

KLİNİK ÇALIŞMA / ORIGINAL RESEARCH

SIÇANLARDA KARVAKROL'UN OLEİK ASİTLE OLUŞTURULAN AKUT AKCİĞER HASARINA ETKİSİ

THE EFFECT OF CARVACROL IN OLEIC ACID INDUCED ACUTE LUNG INJURY IN RATS

İ. Özkan ÖNAL¹, İ. Aydın ERDEN¹, Seda Banu AKINCI¹, Gönül ERDEN²
İsmail KARABULUT³, N. Dilara ZEYBEK⁴, Ersin FADILLIOĞLU³, Sevda MÜFTÜOĞLU⁴
Fatma SARICAOĞLU¹, Z. Dicle BALKANCI³, K. Hüsnü Can BAŞER⁵, Ülkü AYPAR¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, Ankara

²Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya AD, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Ankara

⁴Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji AD, Ankara

⁵Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakognozi AD, Eskişehir

¹Hacettepe University Medical Faculty, Department of Anesthesiology and Reanimation, Ankara, Turkey

²Numune Training and Research Hospital, Department of Biochemistry, Ankara, Turkey

³Hacettepe University Medical Faculty, Department of Physiology, Ankara, Turkey

⁴Hacettepe University Medical Faculty, Department of Histology, Ankara, Turkey

⁵Osmangazi University Medical Faculty, Department of Pharmacognosy, Eskişehir, Turkey

ÖZET

Amaç: Bu çalışma deneysel olarak oleik asitle oluşturulan akciğer hasarında oksidan, anti-oksidan sistemlerindeki değişiklikler ile antioksidan özelliği bilinen ve daha önce akciğer, meme, karaciğer, testis tümörlerinde iyileştirici etkisi gösterilmiş olan karvakrolun (kekik suyu) olası iyileştirici ve koruyucu etkisinin araştırılması amacı ile yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 28 adet Wistar cinsi erkek rat (250-350 gr) alındı. Ratlar 4 gruba ayrıldı. Grup I: Oleik asit grubu (n:7, 50 µl oleik asit kuyruk veni kullanılarak intravenöz (iv), 30 dakika sonra 73 mg kg⁻¹ karvakrol dozuna eşdeğer hacimde SF intraperitoneal (ip) uygulandı). Grup II: Oleik asit+Karvakrol grubu (n:7, 50 µl oleik asit iv ve 30 dakika sonra 73 mg kg⁻¹ karvakrol ip uygulandı). Grup III: Kontrol grubu (n: 7, 50 µl SF iv, 30 dakika sonra 73 mg kg⁻¹ karvakrol dozuna eşdeğer hacimde SF ip uygulandı). Grup IV: Karvakrol grubu (50 µl SF iv, 30 dakika sonra 73 mg kg⁻¹ dozunda karvakrol ip uygulandı). Tüm ratlar enjeksiyonlardan sonra 4 saat oksijen odasında tutuldu ve sakrifiye edildi. İncelediği sıçanların hangi gruba ait olduğunu bilmeyen iki histolog tarafından diseke edilen akciğerler akut akciğer hasarı açısından değerlendirildi. Işık mikroskopisinde interstisyel ödem, alveolar hemoraji, total akciğer hasarı, intraalveolar nötrofiller, makrofajlar, pnömositler; elektron mikroskopisinde kan-gaz bariyerinin bütünlüğü, Tip 1 ve 2 pnömositlerin morfolojisi değerlendirildi. Ayrıca akciğer dokusunda oksidan, anti-oksidan parametreler olarak kabul edilen protein karbonil, malondialdehid doku (MDA doku), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) bakıldı. Serumda pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerden interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL10), tümör nekroz naktör alfa (TNF-alfa), granülösit kolonize stimüle edici faktör (G-CSF) düzeylerine bakıldı.

Bulgular: Oleik asit, kontrol ve karvakrol grupları ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde akut akciğer hasarı oluşturdu, proteinkarbonil ve MDA doku düzeyleri daha yüksekti. Oleik asit ve Oleik asit+karvakrol grupları arasında total akciğer hasarı, protein karbonil, CAT, GSH-Px, SOD düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı. Oleik asit+ karvakrol, karvakrol ve kontrol grubu doku MDA düzeyi yalnız oleik asit verilen gruba göre anlamlı olarak daha düşüktü. Pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerden IL-6, IL-10, TNF-α, G-CSF düzeyleri açısından ise gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç: Akut akciğer hasarında karvakrolun oksidan, anti-oksidan sistemlerindeki dengeli anti-oksidanlar lehine artırması nedeniyle karvakrol alımının artırılması akciğer hasarını önlemede ve oluşmuş akciğer hasarını iyileştirmede faydalı olabilir.

ANAHTAR KELİMELELER: Akut Akciğer Hasarı; Oleik Asit; Karvakrol; Antioksidanlar

SUMMARY

Objective: This study was conducted to compare the effects of oleic acid on the antioxidant systems of lung muscle tissue and carvacrol which has been proven to have healing effects on tumors of the lung, liver, breast, and testis and is known to have antioxidant effects, with respect to their healing and protective properties.

Methods: 28 male rats of the Wistar type (250-350 grams) were included in the study. They were divided to four groups. Group I: Group Oleic acid (n: 7, 50 µl of oleic acid were administered intravenously (iv) and 30 minutes later 73 mg kg⁻¹ of saline solution was given intraperitoneally (ip) as the same volume as carvacrol). Group II: Group Oleic acid+Carvacrol (n: 7, 50 µl of oleic acid was administered iv and 30 minutes later 73 mg kg⁻¹ of carvacrol was administered ip). Group III: Group Control (n: 7, 50 µl of saline solution (the same dose as the oleic acid group) was administered and 30 minutes later 73 mg kg⁻¹ of saline solution was administered ip). Group IV: Group Carvacrol: (n: 7, 50 µl of iv saline solution was administered and 30 minutes later 73 mg kg⁻¹ carvacrol was administered ip). After being held in the oxygen room for 4 hours, blood and tissue samples were collected from the rats. Two histologists who were unaware of the group assignments assessed the acute lung injury via light microscopy; interstitial oedema, alveolar haemorrhage, intraalveolar neutrophils, intraalveolar macrophages and intraalveolar pneumocytes and electron microscopy; the integrity of the blood-gas barrier, the morphology of the type 1 and type 2 pneumocytes, and the presence of intraalveolar macrophages and granular material. The lung tissue was examined histopathologically and levels of protein carbonyl, malondialdehyd tissue, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) which are known as oxidant, anti-oxidant parameters were measured. Levels of antiinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6, IL-10, Tumor necrosis factor (TNF)-α and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) were measured in the blood samples.

Results: Oleic acid caused significant total lung injury compared to the control group and to the vehicle group and levels of protein carbonyl and malondialdehyd were higher than the other groups. Total lung tissue damage score, protein carbonyl, CAT, GSH-Px, SOD, levels were found to be similar in oleic acid and oleic acid+carvacrol groups. Levels of MDA tissue were lower in carvacrol and oleic acid+carvacrol groups than oleic acid group. Levels of proinflammatory and inflammatory cytokines IL-6, IL-10, TNF-α and G-CSF were found to be similar in both groups.

Conclusion: As a result, it has been shown that because of the antioxidant effects of carvacrol in lung tissue, the increased use of carvacrol may be helpful in preventing and reversing lung tissue damage.

KEY WORDS: SAcute Lung Injury; Oleic Acid; Carvacrol; Antioxidants

GİRİŞ

Akut respiratuar distres sendromu (ARDS) pulmoner veya ekstrapulmoner nedenlerle gelişen, lokal veya sistemik inflamatuvar yanıtla bağlı olarak akciğerlerde ciddi fonksiyon kaybıyla seyreden, yüksek mortaliteye sahip bir durumdur (1-2). Henüz ARDS tedavisinde faydalı olduğu gösterilmiş hastalığa özgül bir ilaç tedavisi yoktur (3-4).

Yapılan çalışmalarda karvakrolün (kekik suyu) akciğer, karaciğer, testis, meme kanserinde iyileştirici etkisi olduğu ve anti-oksidan özelliklerinin olduğu gösterilmiştir.

İntravenöz oleik asit (OA) uygulaması ARDS modeli oluşturmada sıklıkla tercih edilen bir yoldur. 25 µm konsantrasyonunda OA'nın tavşanların akciğerinde endotel hücre geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir (5). İntravenöz yolla verilen OA'nın akciğerlerde oluşturduğu patolojik değişiklikler ALI ve ARDS de gözlenen değişikliklere benzerdir (6-7). Oleik asit hasarındaki değişiklikler ARDS ile oldukça benzerdir ve patolojisi interstisyel, intraalveolar ödem, intraalveolar hemoraji, vasküler konjesyon ve intravasküler koagülasyondan ibarettir (8-9). Oleik asitin akciğer ödemi ve hasar oluşturma mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte OA'nın doygun hale getirilememesi ve çok düşük dozlarda bile biyolojik membranlara doğrudan bağlanabilmesinin olası mekanizmalardan olabileceği öne sürülmektedir (8).

OA uygulanmasından sonra oluşan akut akciğer hasarında serum total antioksidan kapasitesinde azalma saptanmıştır (9). ALI/ARDS ile ilgili bazı çalışmalarda ROS'lar araştırılmış; ancak bu maddelerin kısa ömürlü ve oldukça reaktif olmaları nedeniyle, ayrıntılı ve yeterli sonuç elde edilemediğinden, genellikle H₂O₂, oksidize proteinler, peroksidize lipidler, malondialdehyd (MDA) gibi sekonder veya son ürünlerin ölçümü veya süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidanlardaki değişiklikler ile ALI/ARDS'deki oksidan antioksidan denge çözümlenmeye çalışılmıştır (10-11).

Oleik asit kaynaklı akciğer hasarında sitokinlerin rolü tartışmalıdır. Sıçan, fare, tavşan ve köpeklerde yapılan pek çok çalışmada (12-13) OA'nın akciğer dokusunda ve serumda TNF-α ve IL-8 düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. Yine çeşitli ajanlarla TNF-α ve IL-8 baskılandığında OA'ya bağlı akciğer hasarında iyileşme tespit etmişlerdir (12,14).

Bu çalışmada ratlarda oleik asitle oluşturulan akut akciğer hasarında karvakrolün etkilerini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Etik Komitesinden onay alınan ve Hacettepe Üniversitesi tarafından desteklenen çalışmamızda 28 tane erkek Wistar sıçan (250-350 gr) üzerinde çalışıldı. Hayvanlar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi ve deneyler başlayana kadar ortama alıştırmaları açısından burada $22 \pm 3^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve %30-70 bağıl nem oranında 12 saat karanlık 12 saat aydınlık sikluslar halinde musluk suyu ve standart yem ile bakıldı.

Yirmi sekiz hayvan rastgele olarak 4 gruba ayrıldı. Grup I: Oleik asit grubu (n=7) 50 µl oleik asit kuyruk veninden iv verildi, oleik asit enjeksiyonundan 30 dakika sonra 73 mg kg⁻¹ karvakrol dozuyla aynı hacimde serum fizyolojik intraperitoneal verildi. Grup II: Oleik asit ve karvakrol grubu (n=7) 50 µl oleik asit kuyruk veninden iv verildi, enjeksiyondan 30 dakika sonra 73 mg kg⁻¹ karvakrol intraperitoneal verildi. Grup III: Kontrol grubu (n=7) kuyruk veni kullanılarak 50 µl serum fizyolojik intravenöz (iv) olarak verildi ve enjeksiyondan 30 dakika sonra 73 mg kg⁻¹ karvakrol dozuyla aynı hacimde serum fizyolojik intraperitoneal verildi. Grup IV: Karvakrol grubu (n=7) 50 µl serum fizyolojik kuyruk veninden iv verildi, enjeksiyondan 30 dakika sonra 73 mg kg⁻¹ dozda karvakrol intraperitoneal verildi.

Karvakrol Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Farmakognozi A.D.'dan Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER'den ml'de 1 mg olacak şekilde sıvı olarak, Oleik Asit ise Alemdar Kimya'dan sıvı olarak temin edildi. İlaçlar enjeksiyonlar sırasında odada bulunmayan bir anestezi tarafından hazırlandı. Oleik asit ve serum fizyolojik lateral kuyruk veninden 24 G iv kateter ile verildi. Tüm ilaçlar steril serum fizyolojik içinde çözüldü (%0,9 NaCl apirojen steril suda çözünen miktar).

Akut akciğer hasarı intravenöz yolla 50 µl oleik asit verilerek oluşturuldu. Oleik asit sonrasında hayvanlar 4 saat boyunca oksijen odasında gözlemlendi. İntravenöz enjeksiyonlardan 30 dakika sonra intraperitoneal enjeksiyonlar yapıldı ve 4 saat sonra 80 mg kg⁻¹ ketamin anestezi altında intrakardiyak kan tamamen alınarak sakrifiye edildi. Kan örnekleri IL-6, IL-10, TNF-α, G-CSF analizi için laboratuara gönderildi.

Akciğerler çevre dokulardan ayrılarak çıkarıldı ve histopatolojik inceleme için saklandı. Histolojik inceleme H.Ü.T.F. Histoloji A.D Laboratuvarında yapıldı. Hayvanlar öldürüldükten sonra akciğerler bütün olarak çıkarıldı. Daha sonra organlar histolog tarafından araştırma için hazırlandı. Dokular %10 formaldehit ile fiske edildi. Parafin bloklardan kesitler hazırlandı ve hemotoksilen eozin ile boyandı. Preparatlar konvansiyonel ışık mikroskobu (Leica TP 1020) ile incelendi. Hayvanların

hangi gruba ait olduğuna dair bilgisi olmayan iki histolog doku hasarlarını 0-3 arasında değişen 4 aşamalı bir skorlama üzerinden değerlendirdi. Akciğer hasarı için 6 parametre (interstisyel ödem, alveoler hemoraji, intraalveoler nötrofiller, intraalveoler makrofajlar, intraalveoler pnömositler ve interstisyel nötrofiller) değerlendirildi. Parametreler; bulgular yok: 0 hafif: 1 orta şiddette: 2, çok şiddetli: 3 olarak skorlandı. Her bir preparat için dört değişik bölge incelenerek, her parametre ayrı ayrı değerlendirildi ve dört bölgenin ortalama skoru kaydedildi. Toplam akut akciğer hasarı skoru bu 6 parametrenin ortalama skorları toplanarak bulundu (maksimum skor 18).

Elektron mikroskobu için örnekler fosfat ile tamponlanmış glutaraldehit (%2,5) ve osmiyum tetroksit (%1) ile fiske edildi. Örneklerin dehidratasyonu gidererek artan konsantrasyonda aseton solüsyonları kullanılarak sağlandı. Dokular araldite CY212 AgaR1030 (epoksi resin) içine konuldu. Daha sonra yarı ince (1 µm) kesitler alındı ve metilen mavisi-azur 2 ile boyandı. Daha sonra 600 angstrom kalınlığında kesitler elde edildi ve kurşun sitrat ve uranil asetat ile boyandı. Örnekler elektron mikroskobu (JEOL 1400) ile incelendi. Kesitler kan gaz bariyeri bütünlüğü, tip 1-2 pnömositlerin morfolojisi ve intraalveolar makrofaj ve granüler materyalin varlığı açısından incelendi.

Ayrıca H.Ü.T.F. Fizyoloji A.D. Laboratuvarında akciğer dokusunda glutatyon peroksidaz, katalaz, malondialdehid, süperoksit dismutaz, protein karbonil miktarlarına bakıldı. Bu oksidan ve antioksidan parametrelerin ölçümü şu şekilde yapıldı; Akciğer dokusu tartıldıktan sonra Tris-HCl tamponu (0,2 mM, pH: 7,4) içinde homojenize edildi (Pro200). Homojenattan malondialdehit (MDA) ve protein karbonil ölçümleri yapıldı. Homejenatın bir kısmı 5000 rpm da 40 dak santrifüj yapıldı ve süpernatant ayrıldı. Süpernatanda katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ölçüldü. Süpernatanın bir kısmına da etil alkol kloroform karışımı eklendi ve karıştırılmasından sonra 5000 rpm de 40 dak santrifüj edildi ve etanol fraksiyonunda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü yapıldı. Homojenat, süpernatant ve ekstraktlarda Lowry yöntemi ile protein analizi yapıldı (15). Pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerden IL-6, IL-10, TNF-α, G-CSF düzeylerine ise ELİSA yöntemiyle bakıldı.

İstatistik analiz için SPSS 12.0 sunumu kullanıldı. Kolmogorov-Smirnov testi verilerin dağılımını test etmek için kullanıldı. Eğer değişken numerik ise ve normal dağılıma sahipse veriler ortalama±standart sapma olarak verildi ve gruplar arasındaki farklılıkları test etmek için tek yönlü ANOVA kullanıldı. İkili karşılaştırmalar için Bonferoni düzeltmesi kullanıldı. Normal da-

gılım göstermeyen non-parametrik veriler median olarak (güvenilirlik aralığı %5-%95 CI) verildi. Kruskal Wallis testi gruplar arasındaki histopatolojik organ hasar skorlarının karşılaştırılmasında kullanıldı. Mann-Whitney U testi gruplar arasında ikili karşılaştırmalar için kullanıldı. $P < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Gruplar arasında interstisyel ödem, alveolar hemoraji ve total akciğer hasarı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P < 0,05$). Grup 1 ve grup 3 arasında interstisyel ödem ve total akciğer hasarı açısından anlamlı fark bulundu. Grup 1 ile grup 4 arasında da total akciğer hasarı açısından anlamlı fark bulundu (Tablo I).

Oksidan olan proteinlerin karbonil düzeylerinin ölçüldüğü ve bir oksidan parametre olan protein karbonil düzeyleri açısından grup I ile grup III ve IV arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan ve bir oksidatif hasar göstergesi olan doku MDA düzeyleri açısından grup I ile grup II, III ve IV arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Bir antioksidan parametre olan GSH-Px düzeyleri açısından grup I ile grup III ve IV arasında ve grup II ile grup III ve IV arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Süperoksit radikal-

lerini etkisizleştiren ve anti-oksidan parametre olan SOD enzimi düzeyleri açısından grup I ile grup IV arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Deney ortamına konulan hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve oksijene parçalanmasını sağlayan CAT enziminin düzeyi gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir ($p > 0,05$) (Tablo II).

Gruplar arasında IL-6, IL-10, TNF- α , G-CSF düzeyleri arasında istatistik açısından anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Tablo III).

Elektron mikroskopik inceleme bulguları ışık mikroskobu bulgularını destekledi. Oleik asit grubunun lobüllerinin iç kısmına ait elektron mikrograftlarında alveoller döşeyen kapiller komşuluğunda surfaktan granülleri içeren Tip 2 pnömosit ve yassı Tip 1 pnömositler izlendi. Lobüllerin periferine ait örneklerde çok sayıda makrofaj ve alveol duvarından dökülmüş pnömositlerin bulunduğu kapalı alveoler boşlukları görüldü. Birçok Tip 1 pnömosit Tip 2 pnömosit ile birlikte apopitotik görünüm kazanmıştı. Sağlam kalan kan hava bariyeri bölgelerinde birleşmiş bazal laminanın 0,1067 μm olduğu ve kalınlaştığı saptandı (Şekil 1).

Oleik asit sonrasında karvakrol verilen grupta, alveol içine sarkan görünümdeki geniş çekirdekli hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda sürfaktan granülleri saptandı.

Tablo I. Deney gruplarının akut akciğer hasarının histolojik olarak skorlanması, ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ve gruplar arasındaki istatistiksel farkları

DEĞİŞKEN	GRUPLAR				p
	Grup I (Oleik asit + SF)	Grup II (Oleik asit + Karvakrol)	Grup III (SF + SF)	Grup IV (Karvakrol + SF)	
İnterstisyel ödem	2,46 $\pm$ 0,87	2 $\pm$ 0,6	1 $\pm$ 0,8*	1,44 $\pm$ 0,5	0,034
Alveolar hemoraji	1,8 $\pm$ 1,6	0,5 $\pm$ 0,8	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,028
İntraalveolar nötrofil	1,6 $\pm$ 1,5	0,5 $\pm$ 1,2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,085
İntraalveolar makrofaj	2,4 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,8	1 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,4	0,055
İntraalveolar pnömosit	1,8 $\pm$ 1,6	0,5 $\pm$ 1,2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,058
İnterstisyel nötrofil	1,6 $\pm$ 1,5	1,6 $\pm$ 1,5	0,5 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,6	0,62
Total akciğer hasarı	11,66 $\pm$ 7,87	6,7 $\pm$ 6,1	2,5 $\pm$ 2,3*	3,04 $\pm$ 1,5*	0,02

* $p < 0,05$ grup 1 ile karşılaştırıldığında

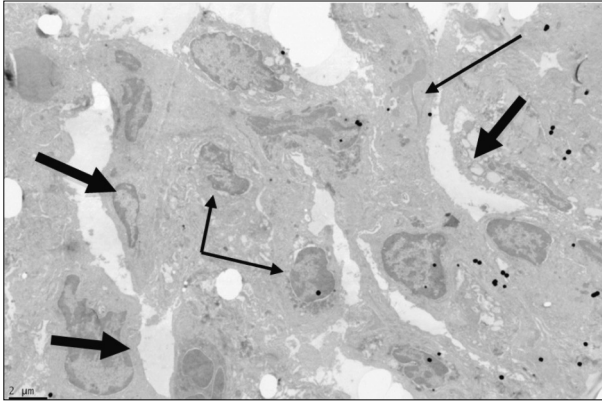
Tablo II. Deney gruplarının akut akciğer hasarının oksidan, anti-oksidan parametrelerinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ve gruplar arasındaki istatistiksel farkları

DEĞİŞKEN	GRUPLAR				p
	Grup I (Oleik asit + SF)	Grup II (Oleik asit + Karvakrol)	Grup III (SF + SF)	Grup IV (Karvakrol + SF)	
Proteinkarbonil (nmol/mg prot)	5,3 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 1,1	3,2 $\pm$ 0,8*	3,06 $\pm$ 1,1*	0,011
MDA doku					
(mmol/g yağ doku)	1,05 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,2*	0,47 $\pm$ 0,09*	0,43 $\pm$ 0,11*	0,003
CAT (k/g prot)	0,18 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,05	0,2 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,04	0,458
GSH-Px (U/g prot)	2,4 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,8*	5,7 $\pm$ 1,4*	6,15 $\pm$ 1,1*	0,00
SOD (U/g prot)	0,32 $\pm$ 0,11	0,47 $\pm$ 0,1	0,49 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,07*	0,043

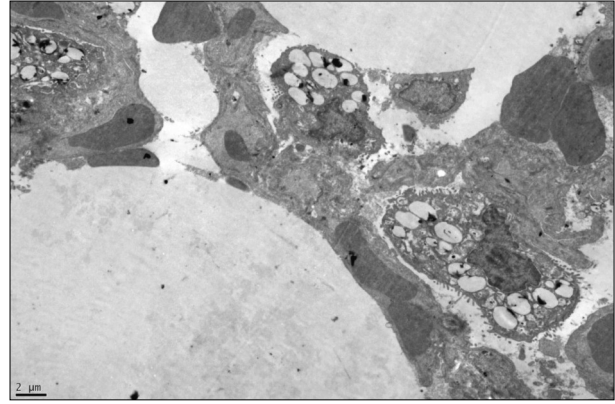
* $p < 0,05$ grup 1 ile karşılaştırıldığında

* $p < 0,05$ grup 3 ile karşılaştırıldığında

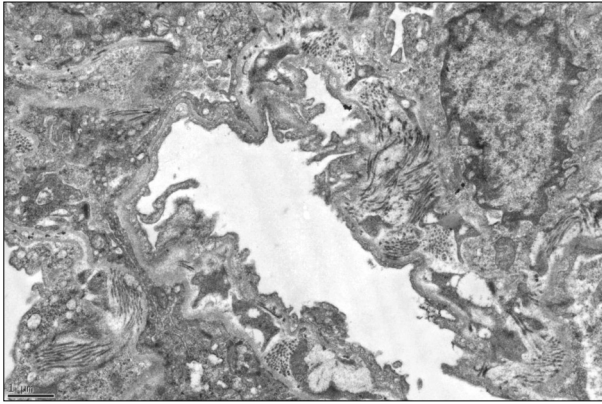
* $p < 0,05$ grup 4 ile karşılaştırıldığında



Şekil 1. Oleik asit grubuna ait akciğer interstisyel alan ve alveol duvarındaki Tip 1 (kalın ok) ve Tip 2 (ince ok) pnömositler izlenmektedir. Pnömositlerin bir kısmında özellikle Tip 2 pnömositlerde perinukleer alanda genişleme dikkati çekmektedir. (Uranilasetat- kurşunsitrat; X 6000)



Şekil 3. Kontrol grubuna ait elektron mikrofrafında alveol boşlukları (yıldız) açık, alveol duvarında sitoplazmasında surfaktan granüllerinden zengin ökromatik çekirdekli çok sayıda Tip 2 pnömosit (ok) gözlenmektedir. (Uranilasetat- kurşunsitrat; X 5000)



Şekil 2. Oleik asit + karvakrol grubunda interstisyel alanda yoğun kollagen fibriller ve yakın komşuluğunda kollagen sentezi yapan fibroblast izlenmektedir. (Uranilasetat- kurşunsitrat; X 15000)



Şekil 4. Karvakrol grubunda surfaktan (ok başı), kan hava bariyeri (yıldız) ve birleşmiş bazal membran (ok) izlenmektedir. (Uranilasetat- kurşunsitrat; X 30000)

Tip 1 pnömosit ve endotel hücre sitoplazmaları ve bazal membranlarından oluşan kan hava bariyeri kolayca ayırt ediliyordu. Birleşik bazal membran 0,3461 µm kalınlıktaydı. İntralalveoler septum içerisinde çok sayıda aktif fibroblast ve hemen komşuluğunda kollagen fibriller görüldü (Şekil 2).

Kontrol grubunun elektron mikroskop incelemelerinde alveol boşlukları açık, duvarı döşeyen çok sayıda Tip 1 yassı epitel hücreleri (pnömosit 1) ve sitoplazmasında surfaktan granüllerinden zengin ökromatik çekirdekli Tip2 pnömositler gözlemlendi. Birçoğunun çekirdekçikleri de belirgin izleniyordu. Tip1 pnömosit sitoplazması bazal membranı ve birleşmiş endotel bazal memb-

ranı ile birlikte endotel sitoplazmasından oluşan kan hava bariyeri devamlı ve 0,0397 µm kalınlığında izlendi (Şekil 3).

Karvakrol verilen grubun elektron mikroskop örneklerinde periferik yerleşimli alveol duvarlarının oldukça sağlam oldukları kan hava bariyerlerinin korunmuş oldukları hatta damar lümenlerinin santral bölgelere göre daha az hücre içerdiği görüldü. Tip I pnömosit ve Tip II pnömosit hücrelerinin çekirdek görünümleri ve sitoplazma içerikleri yönünden oldukça sağlıklı oldukları saptandı. Bazı hücrelerde genişlemiş endoplazma retikulumlarının gözlenmesi aktif olarak kollagen sentezi yapmakta oldukları izlenimini verdi (Şekil 4).

Tablo III. IL-6, IL-10, TNF- α , G-CSF düzeylerinin gruplar arasındaki ilişkisinin dağılımı

Değişken (pg/ml)	Oleik asit	Oleik asit + Karvakrol	Kontrol	Karvakrol	p
IL-6	30,8 $\pm$ 2,1	37,9 $\pm$ 11,3	35,3 $\pm$ 7,1	33 $\pm$ 3,1	0,43
IL-10	26 $\pm$ 14,5	89,4 $\pm$ 111,1	13,5 $\pm$ 5,2	76,1 $\pm$ 104,4	0,4
TNF- α	48,7 $\pm$ 1,2	55,1 $\pm$ 10,6	50,8 $\pm$ 0,96	56,4 $\pm$ 6,7	0,28
GCSF	41,9 $\pm$ 7,7	45,9 $\pm$ 20,1	38,2 $\pm$ 3,7	44,4 $\pm$ 7,5	0,8

TARTIŞMA

Araştırmacılar; oleik asit indüksiyonlu akut akciğer hasarı modelinin ARDS'nin klinik, patofizyolojik ve patolojik özelliklerini gösteren iyi bir model olduğu sonucuna varmışlardır. Bu nedenle oleik asit ile oluşturulan akut akciğer hasarı modeli, ALI/ARDS'nin mekanizmalarının anlaşılmasında ve yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (16). Akut akciğer hasarında histopatolojik değişiklikler nötrofillerin artması, aktifleşmesi ve akciğer hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin oluşmasıyla başlar. Karvakrolun serbest oksijen radikallerinin etkilerini önleme yönünden yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu, bu güçlü antioksidan aktivite ile hücre yapısının, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın in vivo olarak oksidasyonuna karşı koruyucu etki ve bazı hastalıkların önlenmesine katkı sağladığı bildirilmektedir (17-19).

Çalışmamızda OA ile oluşturulan akciğer hasarı sonucu serum ve akciğer dokusundaki MDA düzeyleri, SOD, GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerindeki değişiklikler ile protein karbonil düzeyleri, ARDS fizyopatolojisinde rol oynayan IL-10, TNF- α , G-CSF, IL-6 gibi (4, 20-24) antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlerin rolleri ve iyi bilinen bir anti-oksidan olan karvakrolun akciğer hasarındaki olası iyileştirici etkisi ve bu parametreler üzerindeki etkisini araştırdık.

Çalışmamızda OA verilen grupta histopatolojik olarak akut akciğer hasarı tespit ettik. Total akciğer hasarı skoru açısından oleik asit grubu ile kontrol ve karvakrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ve üç grup arasında total akciğer hasarı skoru en yüksek OA verilen grup idi. OA bağlı akut akciğer hasarı interstisyel ödem, intraalveolar ödem, vasküler konjesyon, intraalveolar hemoraji, fibrin mikrotrombusları ve mononükleer hücre infiltrasyonu olarak tanımlanmıştır ve erişkin solunum yetmezliği sendromunun eksudatif fazına benzetilmektedir (25). Bizim bulgularımızda OA'ın ciddi akut akciğer hasarı oluşturduğunu desteklemektedir. Hsing I Chen ve arkadaşları (26), Kennedy ve arkadaşları (27) ve Zhu (28)'nin yaptığı bir çalışma bizim bulgularımızı desteklemektedir. Bu çalışmalarda OA verilen akciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde yaygın ödem, inflamatuvar hücreler ve artmış akciğer hasarı skoru görülmüştür.

OA sonrasında karvakrol verilen grubun bronşiyol epitelleri ve subepitelyal bağ dokusu OA verilen gruba göre oldukça normal yapı ve hücre diziliminde görüldü. Bazı örneklerde daha belirgin olarak periferde intraalveolar ödemin devam ettiği gözlemlendi. Oleik asit+karvakrol grubunda total akciğer hasarı skorları Oleik asit grubuna göre belirgin olarak daha düşük olmasına rağmen istatis-

tiksel fark saptanmamıştır. Bu da karvakrolun OA ile oluşturulan akciğer hasarını muhtemelen iyileştirmeye başladığını ancak karvakrol verildikten sonra geçen sürenin ya da karvakrol dozunun yeterli olmadığını düşündürmektedir. Bir başka olasılık hayvan sayısının azlığı olabilir. Çoğu örnekte subplevral ödeme rastlanılmadı. OA ile oluşturulan akciğer hasarında görülen ödemin karvakrol ile çoğu örnekte görülmemesi karvakrolun muhtemel iyileştirici etkisi olduğu görüşünü desteklemektedir.

Bunların yanı sıra Tip 1 pnömositler yassı çekirdekli ve uzun sitoplazmaları ile alveol duvarında izlendi. Yine OA ile Tip 1, 2 pnömositlerin hasarlanması ve surfaktan molekülünün azalması, OA sonrasında karvakrol verilen grupta ise çok sayıda surfaktan molekülünün tekrar görülmeye başlaması karvakrolun akut akciğer hasarını muhtemel iyileştirici etkisi düşüncesini desteklemektedir.

Yine intraalveolar septum içerisinde çok sayıda aktif fibroblast ve hemen komşuluğunda kollagen fibrillerin görülmesi, karvakrolun hasarlı akciğeri iyileştirmeye başladığını ancak birleşik bazal membran kalınlığının henüz 0,3461 μ m kalınlıkta olması henüz iyileşme için yeterli sürenin geçmediğini, karvakrolun iyileşme için gerekli ideal dozda verilmediği ya da hayvan sayısının yeterli olmadığı düşüncesini desteklemektedir.

Zhu ve arkadaşlarının (28) yaptığı OA ile oluşturulan akciğer hasarına, surfaktan verilmesinin etkisinin araştırıldığı çalışmada surfaktanın ödem, hemoraji, nötrofil infiltrasyonunu azaltıcı etkisine benzer bulguların karvakrol ile de görülmesi karvakrolun surfaktan gibi akciğer hasarını iyileştirici etkisi olduğu fikrini desteklemektedir. Koparal ve arkadaşlarının akciğer kanserine karvakrolun etkisini araştırdıkları çalışmada bizim çalışmamızın bulgularını desteklemektedir. Koparal ve arkadaşları (29) karvakrolun kanserli akciğer hücrelerini azalttığını göstermişlerdir.

Kennedy ve arkadaşlarının (27) yaptığı ve hipertonic salin (HTS) verilmesinin OA ile oluşturulan akut akciğer hasarını azaltıcı etkisini gösterdikleri çalışmada karvakrolun akut akciğer hasarını iyileştirici etkisini desteklemektedir. Bu çalışmada HTS verilmesi ALI/ARDS patogenezinin merkezinde yer alan endotel hücrelerinin nötrofiller tarafından hasarlanmasını nötrofil fonksiyonlarını ve miktarını azaltarak akciğer hasarını azaltmıştır. Mc Guigan ve arkadaşlarının oleik asit kullanarak yaptıkları akciğer hasarını inceledikleri çalışmada histopatolojik olarak interstisyel ve intraalveolar ödem, alveolar hemoraji tespit etmişlerdir (30). Moriuchi ve arkadaşları oleik asitle yaptıkları bir çalışmada akciğer dokusunun histopatolojisinde yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve pulmoner yapıda belirgin bozulma tespit etmişler ve NAC verilmesi ile akciğer hasarının azaldı-

ğını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da OA'in ardından karvakrol verilen grupta, sadece OA verilen gruptan daha az nötrofil ve interstisyel hücre görülmesi karvakrolun muhtemel iyileştirici etkisi olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Kontrol grubunun akciğerine ait örneklerde alveoller yassı ve kübik epitelyum ile döşeli ve interalveolar septalar normal kalınlıkta izlendi. İnteralveolar boşluklarda yer yer makrofajlar izlendi. Bu bulgular muhtemel bir stres veya hiperoksiyi düşündürdü. Ancak alveol duvarını döşeyen çok sayıda Tip 1 pnömosit ve sürfaktan granüllerinden zengin Tip 2 pnömositin gözlenmesi stres ya da hiperoksinin çok şiddetli olmadığını düşündürdü.

Sadece karvakrol verilen grubun akciğer örneklerinin ışık mikroskobunda alveoler boşlukların oldukça açık olduğu görüldü. İntraalveoler boşluklarda pnömosit izlenmemekle birlikte alveolar makrofajlarda da artış görülmedi. Bu bulgu karvakrolun akciğere hasar vermediğini düşündürdü. Sadece karvakrol alan grubun EM örneklerinde periferik yerleşimli alveol duvarlarının oldukça sağlam oldukları kan hava bariyerlerinin korunmuş oldukları görüldü. Tip1 ve Tip 2 pnömositlerin oldukça sağlıklı oldukları ve Tip 2 pnömositlerin sürfaktan granüllerinden zengin sitoplazmaları ile çok sayıda alveol duvarında izlenmesi karvakrolun muhtemel iyileştirici etkisinin yanında akciğer koruyucu etkisinin de olduğunu düşündürmektedir.

Alveolar septaların içerisinde bağ dokusu, hücrelerden ve kollajen fibrilden zengindi. Bazı hücrelerde genişlemiş endoplazmik retikulumların gözlenmesi aktif olarak kollajen sentezi yapmakta oldukları izlenimini verdi. Bu da oksijen odasındaki muhtemel hiperoksinin ya da stresin oluşturduğu akciğer hasarını karvakrolun onarmaya başladığını düşündürmektedir Başer'in 2005'de karvakrolun anti-inflamatuar ve angiogenik etkilerini belirttiği yayını bu düşüncemizi desteklemektedir (31).

Oksidan proteinlerin karbonil düzeylerinin ölçüldüğü ve oksidan bir parametre olarak kabul edilen protein karbonil düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu. Yine OA verilen grup ile sadece karvakrol verilen grup ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulundu. OA verilen grup ile OA sonrası karvakrol verilen grup arasında ise anlamlı fark bulunamadı. Ancak protein karbonil düzeylerinin karvakrol grubunda, kontrol grubundan bile daha düşük bulunması ve OA grubunda en yüksek bulunması istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile anti-oksidan özelliği bilinen karvakrolun muhtemel akciğer hasarını iyileştirici ve koruyucu etkisi olduğu düşüncesini desteklemektedir. Protein karbonil düzeylerinin OA ile OA sonrası karvakrol verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterme-

mesi ise muhtemelen karvakrol dozunun yeterli olmadığı ya da iyileştirici etki için geçmesi gereken sürenin henüz tamamlanmadığı düşüncesini desteklemektedir.

Protein karbonil gibi oksidan bir parametre kabul edilen ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan doku MDA düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Aynı zamanda Oleik asit grubu ile Oleik asit+karvakrol, kontrol ve karvakrol grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Doku MDA düzeylerinin en yüksek OA verilen grupta, en düşük ise kontrol grubundan bile daha düşük olarak karvakrol grubunda olması karvakrolun muhtemel iyileştirici ve koruyucu etkisi olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Sayman ve arkadaşları'nın çalışması bulgularımızı desteklemektedir. Deneysel olarak hidroklorik asidin intratrakeal uygulanmasıyla akut akciğer hasarı oluşturup, plazma ve BAL MDA düzeyinin anlamlı düzeyde yükseldiğini göstermişlerdir (32). Benzer bir çalışmada Meyancı ve arkadaşları (33), tavşanlara intratrakeal hidroklorik asidin verilmesiyle oluşan akciğer hasarında, plazma ve BAL MDA düzeyinin anlamlı düzeyde yükseldiğini bildirmişlerdir. Yine aynı araştırmacının PGE1'in lipid peroksidasyonu üzerine etkisi ile ilgili bir çalışmada da benzer veriler bildirilmiştir (34).

Bizim çalışmamızda da oleik asit verilen 1. ve 2. gruplarda kontrol grubuna göre doku MDA düzeylerinin yükselmesi akciğer hasarının oluştuğunu gösterirken sadece karvakrol verilen 4. gruptaki doku MDA düzeylerinin kontrol grubundan ve OA sonrası karvakrol verilen grupların altında bulunması ve bunun literatürle uyumlu olması karvakrolun lipid peroksidasyonunu engellediğinin göstergesi olarak değerlendirildi.

Anti-oksidan parametrelerden GSH-Px düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu. GSH-Px düzeyleri açısından grup I ile grup III ve grup IV arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Yine OA sonrası karvakrol verilen grup ile kontrol ve sadece karvakrol verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. GSH-Px düzeylerinin karvakrol verilen grupta, OA sonrası karvakrol verilen gruptan ve kontrol grubundan fazla olması karvakrolun anti-oksidan özelliğini desteklemekte, akut akciğer hasarını muhtemelen iyileştirici olmasının yanı sıra koruyucu da olduğu düşüncemizi desteklemektedir.

Velmurugan ve arkadaşları, sıçanlarda sodyum klorit varlığında N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin'in neden olduğu gastrik karsinogenezinde serumda GSH-Px enzim aktivitesinin düştüğünü, anti-oksidan özelliği bilinen likopen verilmesinden sonra GSH-Px enzim aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir (35-36).

Süperoksit radikallerini etkisizleştiren ve anti-oksidan bir parametre olarak kabul edilen SOD enzimi düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ancak bu istatistiksel farkın sadece OA verilen grup ile sadece karvakrol verilen grup arasında olması diğer gruplar arasında fark olmaması karvakrolun SOD enzimini yükseltmesi ve dolayısı ile oluşmuş akciğer hasarını muhtemel iyileştirici etkisinin ortaya çıkması için gerekli sürenin ve dozun verilmediği düşüncesini desteklemektedir. Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma düşüncemizi desteklemektedir. Buna göre oleik asit ile indüklenen ARDS'de erken dönemde SOD enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiştir (37).

Hidrojen peroksitin (H₂O₂) su ve oksijene parçalanmasını sağlayan ve anti-oksidan bir parametre olarak kabul edilen CAT enzimi düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Daha önce Leff ve arkadaşlarının sepsisli hastalarda yaptığı bir çalışmada ARDS gelişenlerde, gelişmeyenlere göre SOD ve CAT aktivitesinde yükselme, GSH-Px aktivitesinde azalma tespit etmiş olmaları (38) CAT enziminin her ARDS'li hastada düşmeyebileceğini göstermiş ve bizim bulgularımızın CAT enzimi açısından ihtimal dahilinde olduğunu ispatlamıştır.

Yine ARDS ve sepsisli hastalarda yapılan bazı çalışmalarda serumda CAT, SOD artmış, glutatyon ise azalmış olarak bulunmuştur (39-40).

Gruplar arasında IL-6, IL-10, TNF- α , G-CSF düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Daha önce ALI/ARDS, astım gibi akciğer patolojilerinde rol oynadığı gösterilen (41) pro-inflamatuar sitokin TNF- α ve anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 düzeylerinin gruplar arasında anlamlı fark göstermemesinin çeşitli muhtemel sebepleri vardır. Çalışmamız bir hayvan çalışmasıdır ve bu sitokinlerin insanlarda ALI/ARDS'nin fizyopatolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. Diğer muhtemel sebep sitokinlerin yükselmesi için gerekli zamanın bizim kanları aldığımız 4 saatten uzun olmasıdır. Çünkü bu sitokinlerin ARDS'nin 24. saatinde (42) en yüksek düzeye yükseldiği ve 3 hafta kadar yüksek kaldığı belirtilmiştir. Yani ARDS uzun bir süreçtir, bizim bulgularımız ise ARDS'nin erken sonuçlarıdır. Bu düşüncemizi destekleyen yayınlarda bulunmaktadır (43). Bir diğer muhtemel sebep ise sitokinlerin yükselmesi için gerekli OA dozunun verilmemiş olmasıdır. Gerekli olan OA dozu ve geçmesi gereken süre tartışmalıdır. OA dozunun artırılması ve ratların sakrifiye edilmesi için gereken sürenin uzatılması bir alternatif olarak düşünülmüşse de bunun için hayvanların mekanik ventilatörde izlenmesi gerekliliği ve zor olmasından dolayı vazgeçilmiştir. Bir diğer sebep ise OA ile ratlarda

yapılan akciğer hasarı modelinin kolay ve sık yapılabilen bir emboli modeli olmasına rağmen insanlarda ki ALI/ARDS fizyopatolojisini yansıtmadaki belirsizlik olduğu düşünülmüştür (43). Bir diğer muhtemel sebebin ise bu sitokinlerin ELİSA yöntemiyle manüel olarak çalışılması olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızın kısıtlılıkları ise şunlardır; bu bir hayvan deneyidir ve insanlar üzerinde yapılan bir çalışmayla eşit olamaz, zira ratlarda ki ARDS/ALI oluşma zamanı, verilecek OA dozu, verildikten ne kadar süre sonra hasar oluştuğu ve oluşan hasarın klinik ARDS/ALI patofizyolojilerinde hangi safhada eşleştiği bilinmemektedir. Bir diğer eksikliğimiz ise OA ile akciğer hasarı modelinin bir emboli modeli olduğu ve ALI/ARDS fizyopatolojisini yansıtmada ki yetersizliğidir. Bir diğer kısıtlılık ise hayvan sayısının azlığıdır. Karvakrol ile ilgili eksikliklerimiz ise şunlardır; karvakrolun ideal dozunu bilmiyoruz. Yine saflaştırılma yöntemine bağlı sonuçları etkileyebilecek değişiklikler olabilmesi ve karvakrol verildikten sonra geçmesi gereken ideal sürenin bilinmiyor olması bizim çalışmamızın eksiklikleridir.

Çalışmamızda, ratlarda deneysel olarak oluşturulan akciğer hasarında OA verildikten sonra, histopatolojik olarak akut akciğer hasarı oluştuğu, protein karbonil, MDA doku gibi oksidan parametrelerin arttığı görülmüştür. OA ardından karvakrol verilen akut akciğer hasarı oluşturulmuş ratlarda histopatolojik olarak akciğer dokularında düzelme görülmüş, total akciğer hasarı skorunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş, anti-oksidan parametrelerden GSH-Px ve SOD düzeylerinde anlamlı yükselme görülmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızın, daha önce akciğer, meme, karaciğer, testis dahil olmak üzere pek çok kanser türünde iyileştirici etkisi gösterilmiş olan karvakrolun akut akciğer hasarında da muhtemel iyileştirici ve koruyucu etkisini ispatlayacak olan çalışmalara öncü ve yol gösterici olacağına inanıyoruz.

Yazışma Adresi (Correspondence):

Dr. İ. Özkan ÖNAL

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, Sıhhiye, Ankara
e-posta (e-mail): drozkanonal@gmail.com

KAYNAKLAR

1. Repine JE. Scientific perspectives on adult respiratory distress syndrome. Lancet 1992;339(8791):466-469.
2. Artigas A, Bernard GR, Carlet J et al. The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 1998;157(4 Pt 1):1332-1347.

3. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(3 Pt 1):818-824.
4. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2(7511):319-323.
5. Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2001;7(1):1-7.
6. Syrbu S, Thrall RS, Smilowitz HM. Sequential appearance of inflammatory mediators in rat bronchoalveolar lavage fluid after oleic acid-induced lung injury. *Exp Lung Res* 1996;22(1):33-49.
7. Koksel O, Cinel I, Tamer L, et al. N-acetylcysteine inhibits peroxynitrite-mediated damage in oleic acid-induced lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 2004;17(5):263-270.
8. Rylander C, Hogman M, Perchiazzi G, Magnusson A, Hedenstierna G. Oleic acid lung injury: a morphometric analysis using computed tomography. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48(9):1123-1129.
9. Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(1):245-260.
10. Eiermann GJ, Dickey BF, Thrall RS. Polymorphonuclear leukocyte participation in acute oleic acid induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1983;128(5):845-850.
11. Lang JD, Mcardle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest* 2002;122(Suppl 6):314-320.
12. Liu H, Zhang D, Zhao B, Zhao J. Superoxide anion, the main species of ROS in the development of ARDS induced by oleic acid. *Free Radic Res* 2004;38(12):1281-1287.
13. Ito K, Mizutani A, Kira S, Mori M, Iwasaka H, Noguchi T. Effect of Ulinastatin, a human urinary trypsin inhibitor, on the oleic acid-induced acute lung injury in rats via the inhibition of activated leukocytes. *Injury* 2005;36(3):387-394.
14. Xie LX, Liu YN, Zhao XW, et al. Effects of prone position ventilation on inflammatory factors in blood and bronchial alveolar lavage fluid of acute respiratory distress syndrome dogs caused by pulmonary and extrapulmonary insults. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004;84(14):1200-1204.
15. Xu GL, Yao L, Rao SY, Gong ZN, Zhang SQ, Yu SQ. Attenuation of acute lung injury in mice by oxymatrine is associated with inhibition of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase. *J Ethnopharmacol* 2005;98(1-2):177-183.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-275.
17. Azaz D, Demirci F, Satil F, Kırkcıoğlu M, Başer KH. Antimicrobial activity of some Satureja essential oils. *Z Naturforsch C* 2002;57(7-9):817-821.
18. Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanisms of action of thymol and carvacrol in two lipid system. *Food Chem* 1999;64(1):59-66.
19. Arunasree KM. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine* 2010;17(8-9):581-588.
20. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170(6):2081-2095.
21. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147(11):3815-3822.
22. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin-10. *J Exp Med* 1991;174(6):1549-1555.
23. Armstrong L, Millar AB. Relative production of tumor necrosis factor alpha and -interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1997;52(5):442-446.
24. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34(3):497-500.
25. Aebi H. Catalase. Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis* Academic, New York, (1974) pp 673-677.
26. Chen HI, Hsieh NK, Kao SJ, Su CF. Protective effects of propofol on acute lung injury induced by oleic acid in conscious rats. *Crit Care Med* 2008;36(4):1214-1221.
27. Kennedy MT, Higgins BD, Costello JF, Curtin WA, Laffey JG. Hypertonic saline reduces inflammation and enhances the resolution of oleic acid induced acute lung injury. *BMC Pulm Med* 2008;8:9.
28. Zhu GF, Sun B, Niu SF, et al. Combined surfactant therapy and inhaled nitric oxide in rabbits with oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;58(2):437-443.
29. Koparal AT, Zeytinoglu M. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology* 2003;43(1-3):149-154.
30. McGuigan RM, Mullenix P, Norlund LL, Ward D, Walts M, Azarow K. Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat: establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase. *Curr Surg* 2003;60(4):412-417.
31. Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcüoğlu M, Baser HC. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem* 2005;93(3):551-556.
32. Meyancı G, Arıcıoğlu F, Öz H, Aydemir A. Akut akciğer hasarında intratrakeal deksametazonun lipid peroksidasyonuna etkileri. *Cerrahpasa J Med* 2001;32(1):20-24.
33. Meyancı KG, Sayılğan C, Finci A, Uzan S, Öz H. Akut akciğer hasarının tedavisinde erken dönemde intratrakeal PG E1'in lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. *GKD Anestezi Yoğun Bakım Derneği Dergisi* 2004;10(3):108-110.
34. Arunasree KM. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine* 2010;17(8-9):581-588.
35. Velmurugan B, Nagini S. Combination chemoprevention of experimental gastric carcinogenesis by s-allylcysteine and lycopene: modulatory effects on glutathione redox cycle antioxidants. *J Med Food* 2005;8(4):494-501.
36. Velmurugan B, Bhuvaneshwari V, Burra UK, Nagini S. Prevention of N-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine and saturated sodium chloride-induced gastric carcinogenesis in Wistar rats by lycopene. *Eur J Cancer Prev* 2002;11(1):19-26.
37. Liu H, Zhang D, Zhao B, Zhao J. Superoxide anion, the main species of ROS in the development of ARDS induced by oleic acid. *Free Radic Res* 2004;38(12):1281-1287.
38. Leff JA, Parsons PE, Day CE, et al. Serum antioxidants as predictors of adult respiratory distress syndrome in patients with sepsis. *Lancet* 1993;341(8848):777-780.
39. Leff JA, Parsons PE, Day CE, et al. Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(4):985-989.
40. Brigham KL. Role of free radicals in lung injury. *Chest* 1986;89(6):859-863.
41. Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine and Growth Factor Rev* 2003;14(6):523-535.
42. Koksel O, Cinel I, Tamer L, et al. N-acetylcysteine inhibits peroxynitrite-mediated damage in oleic acid-induced lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 2004;17(5):263-270.
43. McGuigan RM, Mullenix P, Norlund LL, Ward D, Walts M, Azarow K. Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat: establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase. *Curr Surg* 2003;60(4):412-417.