

Sıçanlarda Koenzim Q10'un Oleik Asitle Oluşturulan Akut Akciğer Hasarına Etkisi

The Effects of Coenzyme Q10 on Rats in Acute Lung Injury Induced by Oleic Acid

Melike KORKMAZ,^a
İ. Aydın ERDEN,^b
Şennur UZUN,^b
S. Banu AKINCI,^b
Gönül ERDEN,^c
İsmail KARABULUT,^d
N. Dilara ZEYBEK,^e
Ersin FADILLIOĞLU,^d
Sevda MÜFTÜOĞLU,^e
Fatma SARICAOĞLU,^b
Z. Dicle BALKANCI,^d
Ülkü AYPAR^b

^aAnesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği,
Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Elazığ

^bAnesteziyoloji ve Reanimasyon AD,
^cFizyoloji AD,

^dHistoloji ve Embriyoloji AD,
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
^eBiyokimya Kliniği,
Ankara Numune Eğitim ve
Araştırma Hastanesi,
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 26.06.2012
Kabul Tarihi/Accepted: 15.11.2012

Yazışma Adresi/Correspondence:
Melike KORKMAZ
Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği,
Elazığ,
TÜRKİYE/TURKEY
melkorkmaz@gmail.com

ÖZET Amaç: Koenzim Q10 (KoQ10), mitokondride elektron taşıma zincirinde önemli bir rol oynayan antioksidan bir moleküldür. Bu çalışmada amaç, oleik asitle sıçanlarda akut akciğer hasarı oluşturarak, KoQ10'un akciğer hasarına etkisini incelemektir. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya alınan 24 dişi Wistar rat (250-350 g) 4 gruba ayrıldı. Grup I: Oleik asit grubu (n=6), Grup II: Oleik asit ve KoQ10 grubu (n=6), Grup III: Kontrol grubu (n=6), Grup IV: KoQ10 grubu (n=6) olarak belirlendi. Dört saat oksijen odasında tutulan bütün gruplardaki hayvanlardan kan ve doku örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Kan örneklerinde interlökin-6 (IL-6), IL-10, tümör nekrotizan faktör- α (TNF- α), granülosit koloni stimüle edici faktör (GCSF) bakıldı. Akciğer dokusunda ise ışık ve elektron mikroskobu ile histopatolojik inceleme ve proteinkarbonil, malondialdehid doku (MDA doku), katalaz (CAT) enzim aktivitesi, süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri bakıldı. **Bulgular:** Total akciğer hasarı açısından oleik asit grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en yüksek akciğer hasarı oleik asit grubunda saptandı. Protein karbonil düzeyi oleik asit grubunda anlamlı olarak en yüksekti. Doku MDA düzeyi, CAT, SOD, IL-6, IL-10, TNF- α düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmazken, GCSF açısından en yüksek değer oleik asit grubuna ait bulundu ve bu grup ile KoQ10 verilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı. Oleik asit grubu ile oleik asit+KoQ10 uygulanan grup karşılaştırıldığında KoQ10 uygulaması sonrası total akciğer hasarında, intraalveolar nötrofil sayısında ve GCSF düzeyinde azalma anlamlı saptandı. **Sonuç:** KoQ10'un, akut akciğer hasarında oksidan, antioksidan sistemlerindeki dengeyi antioksidanlar lehine artırması nedeniyle yoğun bakımlarda kullanımı, akciğer hasarını önlemede ve oluşmuş akciğer hasarını iyileştirmede destekleyici tedavi olarak yararlı olabilir. Çalışmamız bu hipotezi destekleyecek yeni insan araştırmalarına bir başlangıç adımı atmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akut akciğer hasarları; oleik asit; koenzim Q10; antioksidanlar

ABSTRACT Objective: Coenzyme Q10 is an antioxidant molecule playing an important role in electron transport system of mitochondria. The aim of this study is to investigate the effects of coenzyme Q10 (CoQ10) on acute lung injury in rats whom acute lung injury was developed by oleic acid. **Material and Methods:** 24 female rats of the Wistar type included in the study (250-352 grams) were divided into 4 groups. Group I: Oleic acid group (n=6), Group II: Oleic acid and CoQ10 group (n=6), Group III: Control group (n=6), Group IV: CoQ10 group (n=6) are determined. After being held in the oxygen room for 4 hours, blood and tissue samples were collected from the rats and then they were sacrificed. In blood samples, interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α), granulocyte colony stimulating factor (GCSF) were measured. Lung tissues were examined histopathologically by electron and light microscopy and levels of protein carbonyl, malondialdehid, catalase (CAT), superoxide dismutase were measured. **Results:** For total lung damage when compared to three other groups, oleic acid group had the highest level of damage. Tissue MDA levels, CAT, SOD, IL-6, IL-10, TNF- α had no discrimination between groups. Level of GCSF was topmost in oleic acid group and the difference between oleic acid and CoQ10 group was statistically meaningful in GCSF level. When two groups, the oleic acid group and the oleic acid+ CoQ10 group were compared, the reduction in the total lung damage and the decrease in intraalveolar neutrophil count and GCSF levels was found statistically significant. **Conclusion:** The balance between antioxidants and oxidants in acute lung injury is changed in the favor of antioxidants by using CoQ10. In intensive care units the use of CoQ10 may be helpful in preventing and reversing lung tissue damage. Our study supports that hypothesis as a starting step for new human researches.

Key Words: Acute lung injury; oleic acid; coenzyme Q10; antioxidants

Akut sıkıntılı solunum sendromu [acute respiratory distress syndrome (ARDS)] 1967 yılında ilk tanımlandığından beri yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde yatan erişkin hastaların mortalite ve morbidite nedenlerinin başında gelir.¹ ARDS, arteriyel hipoksemi, akciğer grafisinde bilateral infiltrasyonlar ve normal bir pulmoner arter oklüzyon basıncı ile karakterizedir. ARDS, akut akciğer hasarı [acute lung injury (ALI)] ismi altında toplanan çok geniş spektrumdaki patolojik olayların en ağır formudur.²

Oleik asit (OA) ile oluşturulan akciğer hasarı modeli, ALI ve ARDS'de yeni tedavi modellerinin araştırılmasında sık kullanılan bir patolojik modeldir.³ Mc Guigan ve ark. tarafından tanımlanan OA ile indüklenen akut akciğer hasarı modeli yaygın olarak laboratuvar çalışmalarında kullanılan bir modeldir. OA ile ortaya çıkan akciğer hasarındaki değişiklikler erişkin solunum yetmezliğinin eksudatif fazına benzerlik gösterir ve interstisiyel ve intraalveolar ödem, hemoraji, lökoaglutinasyonu içerir.⁴ OA infüzyonu hem akciğer endotelini hem de epitelini hasara uğratar, bu da alveoldeki plazma proteinleri ve sıvıda hızlı içeriye akışa neden olur bunun beraberinde gaz değişiminde bozulma meydana gelir.

Proinflamatuvar sitokinlerin [interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF- α)]'nın ARDS'de arttığı bilinmektedir.⁵ Bu artış ARDS'ye özgü olmadığından tanı koydurucu değildir, ancak prognozu belirlemede yardımcı olabilir.

ALI/ARDS ilgili pek çok çalışmada genellikle H₂O₂, oksidize proteinler, peroksidize lipidler, malondialdehit (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.

Günümüzde koenzim Q10 (KoQ10) özellikle kardiyak hastalıklar ve hipertansiyondaki antioksidan, antiinflamatuvar rolüyle popülerite kazanmıştır. Birçok çalışmada konjestif kalp yetmezliği, akut miyokardiyal infarktüs ve hipertansiyon gelişiminde önemli rol oynayan IL-6 ve TNF- α gibi

önemli proinflamatuvar sitokinlerin KoQ10'un oral alımıyla belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir.⁶ Bu olumlu özellikleri ile KoQ10, inflamatuvar süreçlerin baskın olduğu hastalıkların hücresel ve biyokimyasal tedavisinde yeni bir devir başlatmaktadır.

Bu çalışmada amacımız, OA ile sıçanlarda akut akciğer hasarı oluşturarak, KoQ10'un akciğer hasarına etkisini incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınan ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen çalışmamızda 24 tane dişi Wistar sıçan (250-350 g) üzerinde çalışıldı. Hayvanlar Kobay Deney Hayvanları Laboratuvar AŞ'den temin edildi. Hayvanlar deneyler başlayana kadar ortama alıştırmaları açısından Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarında barındırıldı, 22 ± 3°C sıcaklıkta ve %30-70 bağıl nem oranında 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık sikluslar halinde musluk suyu ve standart yem ile bakıldı, deney sabahı hayvanların özel kafeslerle Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarına nakli sağlandı. Yirmi dört hayvan rastgele 4 gruba ayrıldı.

Grup I: Oleik asit grubu (n=6) 50 μ L OA kuyruk veninden intravenöz (iv) verildi, OA enjeksiyonundan 30 dakika sonra 10 mg/kg KoQ10 ile aynı hacimde serum fizyolojik intraperitoneal (ip) verildi. Hayvanlar 4 saat oksijen odasında tutulduktan sonra sakrifiye edildi.

Grup II: Oleik asit ve KoQ10 grubu (n=6) 50 μ L OA kuyruk veninden iv verildi, enjeksiyondan 30 dakika sonra 10 mg/kg ip KoQ10 verildi. Hayvanlar 4 saat oksijen odasında tutulduktan sonra sakrifiye edildi

Grup III: Kontrol grubu (n=6) Kuyruk veni kullanılarak 50 μ L serum fizyolojik iv olarak verildi, enjeksiyondan 30 dakika sonra serum fizyolojik ip olarak KoQ10 ile aynı hacimde verildi. Hayvanlar 4 saat oksijen odasında tutulduktan sonra sakrifiye edildi.

Grup IV: KoQ10 grubu (n=6) 50 μ L serum fizyolojik kuyruk veninden iv verildi, enjeksiyondan 30 dakika sonra 10 mg /kg dozda ip KoQ10 verildi.

Dört saat oksijen odasında tutulan hayvanlar sonrasında sakrifiye edildi.

KoQ10 Sigma-Aldrich Products®'dan sıvı olarak, OA ise Alemdar Kimya'dan sıvı olarak temin edildi. İlaçlar enjeksiyonlar sırasında odada bulunmayan bir anestezi uzmanı tarafından hazırlandı. OA ve serum fizyolojik lateral kuyruk veninden 24 G iv kateter ile verildi. Tüm ilaçlar steril serum fizyolojik içinde çözüldü. Akut akciğer hasarı iv yolla 50 µL OA verilerek oluşturuldu. OA sonrasında hayvanlar 4 saat boyunca oksijen odasında gözlemlendi. İntravenöz enjeksiyonlardan 30 dakika sonra ip enjeksiyonlar yapıldı ve 4 saat sonra 80 mg/kg ketamin anestezisi altında intrakardiyak kan tamamen alınarak hayvanlar sakrifiye edildi.

Kan örnekleri IL-6, IL-10, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) analizi için özel Anka-Lab laboratuvarına gönderildi. Kan örneklerinde manuel olarak ELİSA yöntemiyle IL-6, IL-10, TNF-α, G-CSF miktarları ölçüldü.

Akcığerler çevre dokulardan ayrılarak çıkarıldı ve histopatolojik inceleme için saklandı. Histolojik inceleme Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra akciğerler bütün olarak çıkarıldı. Daha sonra organlar histolog tarafından araştırma için hazırlandı. Dokular %10 formaldehid ile fiske edildi. Parafin bloklardan kesitler hazırlandı ve Hematoksilin 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 arası değişen 4 aşamalı bir skorlama üzerinden değerlendirdi. Akciğer hasarı için 5 parametre (interstisiyel ödem, alveolar hemoraji, intraalveolar nötrofiller, intraalveolar makrofajlar ve intraalveolar pnömositler) 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 5 parametrenin ortalama skorları toplanarak bulundu (maksimum skor 15).

Elektron mikroskobu için örnekler fosfat ile tamponlanmış glutaraldehit (%2,5) ve osmiyum tetroksit (%1) ile fiske edildi. Örneklerin dehidratasyonu giderek artan konsantrasyonda aseton solüsyonları kullanılarak sağlandı. Dokular araldite CY212 AgaR 1030 (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 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı akciğer Fizyoloji laboratuvarında akciğer dokusunda lipit peroksidasyonunun göstergesi MDA, protein oksidasyon göstergesi protein karbonil (PC) düzeyleri ile antioksidan enzimlerden SOD, katalaz (CAT) enzim aktiviteleri bakıldı. Bu antioksidan parametrelerin ölçümü şu şekilde yapıldı:

Akcığer dokusu tartıldıktan sonra Tris-HCl tamponu (0,2 mM, pH: 7,4) içinde homojenize edildi (Pro200). Homojenattan MDA ve PC ölçümleri yapıldı. Homojenatın bir kısmı 5000 rpm'de 40 dak santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Süpernatanda CAT ölçüldü. Süpernatantın bir kısmına da etil alkol kloroform karışımı eklendi ve karıştırılmasından sonra 5000 rpm'de 40 dak santrifüj edildi ve etanol fraksiyonunda SOD aktivitesi ölçümü yapıldı. Homojenat, süpernatant ve ekstraktlarda Lowry yöntemi ile protein analizi yapıldı.

İstatistiksel analiz için SPSS 14,0 sunumu kullanıldı. Kolmogorov- Smirnov testi verilerin dağılımını test etmek için kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen non-parametrik veriler ortanca (en düşük-en yüksek değer) olarak verildi. Kruskal Wallis testi dört grup arasındaki histopatolojik organ hasar skorlarının karşılaştırılmasında kullanıldı. Mann-Whitney U testi gruplar arasında ikili karşılaştırmalar için kullanıldı. Dört grubun karşılaştırılmasında p<0,05 anlamlı kabul edildi. İkili grup karşılaştırmalarında Bonferroni düzeltmesi yapılarak p<0,008 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Oleik asit grubu ile karşılaştırıldığında OA+KoQ10, kontrol grubu ve sadece KoQ10 verilen grup arasında total akciğer hasarı, interstisyel ödem, intraalveolar nötrofil, intraalveolar makrofaj, intraalveolar pnömosit ve interstisyel nötrofil açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). İntraalveolar makrofaj, intraalveolar pnömosit açısından OA+SF grubu ile OA+ KoQ10 verilen grup, kontrol grubu ve sadece KoQ10 verilen grup arasında ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,008$). OA grubu ile karşılaştırıldığında OA+KoQ10, kontrol grubu ve SF+KoQ10 grubunda total akciğer hasarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,008$) (Tablo 1, 2).

Oksidan proteinlerin karbonil düzeylerinin ölçüldüğü ve bir oksidan parametre olan PC düzeyleri açısından OA grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubu ve sadece KoQ10 verilen grupta izlenen azalma ikili karşılaştırmalarda istatistiksel

olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,008$). Lipid peroksidasyonunun son ürünü ve bir oksidatif hasar göstergesi olan doku MDA düzeyleri açısından gruplar arası anlamlı bir fark bulunamadı. CAT enziminin düzeyi açısından OA+SF grubu ile sadece KoQ10 verilen grup arasında ikili karşılaştırmalarda hedeflenen p düzeyinde anlamlılık saptanmadı ($p>0,008$). SOD enzim düzeyleri açısından OA'yı takiben KoQ10 verilen grup ile kontrol grubu arasında ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,008$) (Tablo 3).

Gruplar arasında IL-6, IL-10 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p<0,05$). TNF- α düzeyi açısından OA grubu ile OA'yı takiben KoQ10 verilen grup arasında ikili karşılaştırmalarda hedeflenen p değerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,008$). GCSF düzeyi açısından OA grubu ile karşılaştırıldığında OA'yı takiben KoQ10 verilen grup ve kontrol grubundaki azalma ikili karşılaştırmalarda hedeflenen p değerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,008$) (Tablo 4).

TABLO 1: Deney gruplarının total akciğer hasarının histolojik olarak skorlanması ortalama \pm standart sapma değerleri.

Değişkenler	Gruplar				P
	Oleik asit + SF	Oleik asit + KoQ10	SF + SF	SF + KoQ10	
Total Akciğer Hasarı	10,1 \pm 5,7	2,3 \pm 1,2*	2,2 \pm 1,2*	2,5 \pm 1,4*	<0,001

* $p<0,008$ oleik asit grubu ile ikili karşılaştırmalarda.

TABLO 2: Deney gruplarının akut akciğer hasarının histolojik olarak skorlanması, ortanca (en düşük - en yüksek değer) ve gruplar arasındaki istatistiksel farkları.

Değişkenler	Gruplar				P
	Oleik asit+SF	Oleik asit + KoQ10	SF + SF	SF +KoQ10	
İnterstisyel Ödem	2,5 (1-3)	1,5 (1-2)	1 (0-2)	1 (1-2)	0,046
Alveolar Hemoraji	2,5 (0-3)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,051
İntraalveolar Nötrofil	2 (0-3)	0 (0-0) [∞]	0 (0-1) [∞]	0 (0-0) [∞]	0,001
İntraalveolar Makrofaj	2,5 (0-3)	0,5 (0-2)	0,5 (0-1)	1 (0-1)	0,045
İntraalveolar Pnömosit	2,5 (0-3)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0,01
Damarda Konjesyon	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-2)	0,127
İnterstisyel Hemoraji	1 (1-1)	1 (0-2)	1,5 (1-2)	1 (0-2)	0,669
İnterstisyel Nötrofil	0 (0-0)	0 (0-2)	1 (1-2)	1 (0-1)	0,028
İntraalveolar Ödem	0 (0-0)	0 (0-2)	0,5 (0-1)	0 (0-0)	0,177

[∞]oleik asit + SF grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,008$.

TABLO 3: Deney gruplarının akut akciğer hasarının oksidan, anti-oksidan parametrelerinin ortanca (en düşük- en yüksek değer) ve gruplar arasındaki istatistiksel farkları.

	Gruplar				P
	Oleik asit + SF	Oleik asit + KoQ10	SF + SF	SF + KoQ10	
Protein karbonil (nmol/mg prot)	5,6 (4,1-6,4)	3,6 (2,7-4,7)	3,2 (3-3,8)*	3,2 (2,7-4,1)*	0,001
MDA (µmol/g yaş doku)	0,32 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	0,1 (0,1-0,8)	0,1 (0,1-0,2)	0,418
CAT (k/g prot)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,4)	0,3 (0,1-0,3)	0,3 (0,2-0,4)	0,027
SOD (U/g prot)	0,2 (0,1-0,4)	0,2 (0,2-0,3)	0,3 (0,3-0,5)	0,3 (0,2-0,4)	0,017

*p<0,008 oleik asit + SF grubu ile ikili karşılaştırmalarda.

MDA: Malondialdehid doku, CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit dismutaz.

TABLO 4: Deney gruplarının IL-6, IL-10, TNF-α, GCSF düzeylerinin ortanca (en düşük - en yüksek değer) ve gruplar arasındaki istatistiksel farkları.

Değişkenler (pg/mL)	Gruplar				P
	Grup I Oleik asit + SF	Grup II Oleik asit + KoQ10	Grup III SF + SF	Grup IV SF+ KoQ10	
IL-6	28 (27,6-30,7)	27,6 (27,3-29,7)	29,4 (27,7-46,1)	28 (27-29,1)	0,172
IL-10	11 (9,3-22)	14,5 (9-58,1)	9 (8,1-10,8)	13,2 (11,1-15,1)	0,088
TNF-α	47,3 (45,2-50,2)	45,5 (45,4-46,3)	45,6 (44,6-50,4)	45,4 (44,1-47,1)	0,018
GCSF	36 (29,5-38,1)	31,2 (30,8-32) ^µ	34,8 (29,9-38,4)	31,4 (28,5-32,8) ^µ	0,004

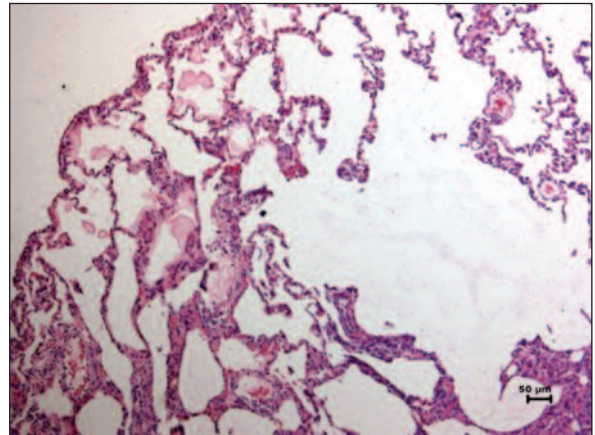
^µp<0,008 oleik asit+SF grubu ile ikili karşılaştırmada.

IL: İnterlökin, TNF-α: Tümör nekrotizan faktör-alfa, GCSF: Granülosit koloni stimüle edici faktör.

Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu bulguları da laboratuvar bulgularını desteklemekteydi. OA verilen grubun akciğer örneklerinin ışık mikroskobunda subplevral alanda ve periferik akciğer bölgelerinde intraalveolar ve interalveolar alanlarda yaygın ödem ve alveolar boşluklarda amorf madde birikimi nedeniyle havalanma alanlarında azalma izlendi. İnterstisyel alanda infiltratif hücreler, ödem, artmış kollajen fibriller nedeniyle oluşan genişlemeler sonucu intraalveolar alanların daraldığı görüldü. Bunların yanı sıra bazı alveolar boşluklarda yaygın makrofaj hücreleri saptandı. Kan hava bariyerinin kalınlaştığı gözlemlendi (Resim 1).

Oleik asit sonrasında Q10 verilen grupta bronşiyol epitelleri ve subepitelyal bağ dokusu oldukça normal yapı ve hücre diziliminde görüldü. Tip 1 pnömosit ve endotel hücre sitoplazmaları ve bazal membranlarından oluşan kan hava bariyeri kolayca ayırt ediliyordu (Resim 2).

Kontrol grubundan akciğere ait örneklerde epitel, epitel altı bağ dokusu ve hemen altında kas hücrelerinden oluşan terminal bronşiyoller ve respiratuvar bronşiyoller izlendi. Akcigerin perife-

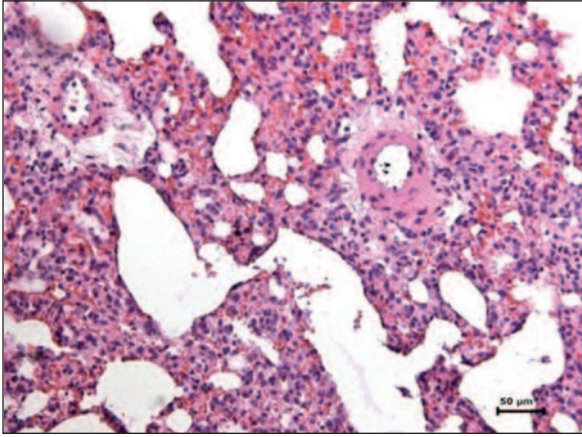


RESİM 1: Oleik asit grubuna ait akciğerde özellikle periferik birçok alveolün dolu olduğu izlenmektedir. Bazı alanlarda interalveolar septaların silindiği, alveolar boşlukların birleşmesi nedeniyle düzensiz genişlemeler gözlenmektedir. (Hematoksilen-eozin X100).

(Renkli hali için Bkz. <http://anestezi.turkiyeklinikleri.com/>)

rinde alveoller Tip 1 ve Tip 2 pnömositler ile döşeli, interalveolar septalar normal kalınlıkta saptandı. (Resim 3).

Q10 verilen gruptan alınan akciğer örneklerinde alveolar boşlukların genel olarak açık ve havalanmış bölgeler oldukları gözlemlendi. Bronşiyol



RESİM 2: Oleik asit sonrası koenzim Q10 verilen grubun santral bölgelerine ait akciğer örneklerinin ışık mikroskopunda interstisyel hücrelerin yoğunluğu ve arterlerin çevresinde perivasküler ödem. (Hematoksilen-eozin X200). (Renkli hali için Bkz. <http://anestezi.turkiyeklinikleri.com/>)

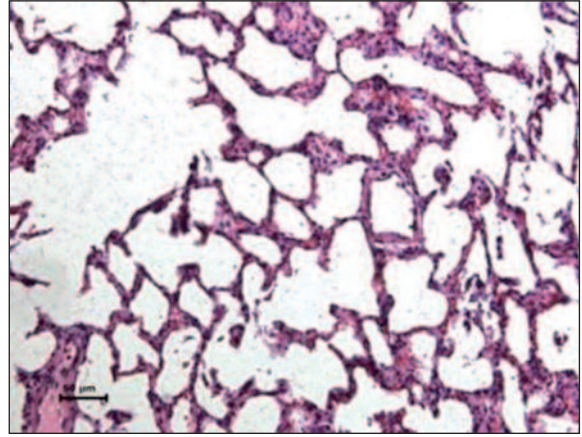
epitelleri ve hemen altındaki bağ dokusunu saran ince düz kas hücreleri sağlam olarak izlendi. İnterstisyel alanların hücreden zengin oldukları bu nedenle de kontrol grubuna kıyasla daha kalınlaşmış oldukları saptandı (Resim 4).

TARTIŞMA

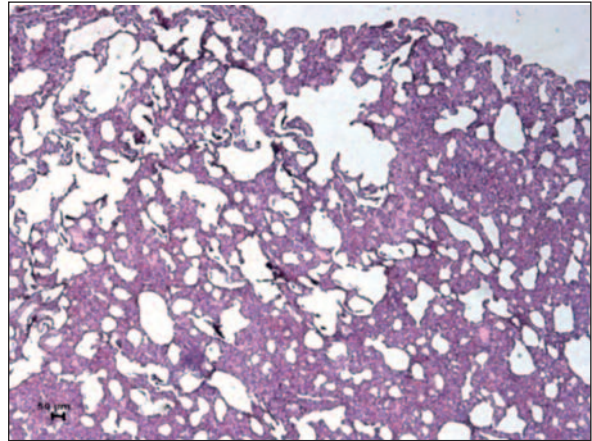
Oleik asit modeli ile akut akciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlarda KoQ10'un akut akciğer hasarına etkisini incelediğimiz çalışmamızda; akciğer hasarı sonucu serum ve akciğer dokusundaki MDA düzeyleri, CAT, SOD enzim aktivitelerindeki değişiklikler ve PC düzeyleri, ARDS fizyopatolojisinde rol oynayan IL-10, TNF- α , GCSF, IL-6 gibi antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlerin rolleri ve iyi bilinen bir antioksidan olan KoQ10'un akciğer hasarındaki olası iyileştirici etkisi ve bu parametreler üzerindeki etkisini araştırdık.

Oleik asit grubu ile OA+KoQ10 uygulanan grubu karşılaştırdığımızda KoQ10 uygulaması sonrası total akciğer hasarında, intraalveolar nötrofil sayısında ve GCSF düzeyindeki azalmayı istatistiksel olarak anlamlı saptadık.

Oleik asit modeli ile akut akciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlarda KoQ10'un akut akciğer hasarına etkisini incelediğimiz çalışmamızda; OA indüksiyonlu akut akciğer hasarı modelinin ARDS'nin klinik, patofizyolojik ve patolojik özelliklerini gösteren iyi bir model olduğu sonucuna varıldı.



RESİM 3: Kontrol grubuna ait ışık mikroskopu. (Hematoksilen-eozin X200). (Renkli hali için Bkz. <http://anestezi.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 4: Q10 verilen gruba ait akciğerin mikroskopu. (Hematoksilen-eozin X50). (Renkli hali için Bkz. <http://anestezi.turkiyeklinikleri.com/>)

Çalışmamızda total akciğer hasarı skorunun parametrelerinden intraalveolar nötrofil açısından OA+SF grubu ile diğer üç grup açısından ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. OA grubu ile OA+KoQ10 uygulanan grup karşılaştırıldığında KoQ10 uygulaması sonrası intraalveolar nötrofil sayısında azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ARDS patogenezi sürecinde başlıca suçlanan hücre nötrofildir.⁷ Üstelik, bronkoalveolar lavaj (BAL) nötrofil sayısı ile ARDS'nin prognozu arasında bir korelasyon da bulunmaktadır, yüksek alveolar nötrofil düzeyleri kötü prognozu göstermektedir.⁸ Dolayısıyla oleik asitle ARDS oluşturulan hayvanlarda intraalveolar nötrofil sayılarının artması literatürdeki bu bilgilerle beklenen bir sonuçtur. Ayrıca KoQ10 uygu-

lamasını takiben anlamlı bir şekilde intraalveolar nötrofil sayısının azalması KoQ10'un tedavi edici özelliğinin bir kanıtı olarak kabul edilebilir.

Bir oksidan parametre olan PC düzeyleri açısından OA grubu ile kontrol grubu ve sadece KoQ10 verilen grup arasında ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Bu üç grup arasında en yüksek PC düzeyi OA verilen grupta tespit edildi. PC düzeylerinin OA ile OA sonrası KoQ10 verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemesi ise KoQ10 dozunun yeterli olmadığı ya da iyileştirici etki için geçmesi gereken sürenin yetersiz olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Sitokin bulgularına bakıldığında GCSF düzeyi açısından ise OA grubu ile OA'yı takiben KoQ10 verilen grup ve kontrol grubundaki azalma ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Çalışmamızda OA verilen grubun akciğer örneklerinin ışık mikroskopunda subplevral alanda ve periferik akciğer bölgelerinde intraalveolar ve interalveolar alanlarda yaygın ödem ve alveolar boşluklarda amorf madde birikimi nedeniyle havalanma alanlarında azalma izlendi. İnterstisyel alanda infiltratif hücreler ödem, artmış kollajen fibriller nedeniyle oluşan genişlemeler sonucu intraalveolar alanların daraldığı görüldü. Aynı grubun elektron mikrograftlarında çok sayıda makrofaj ve alveol duvarından dökülmüş pnömositlerin bulunduğu, kapalı alveolar boşluklar görüldü.

Zhu ve ark.nın yaptığı OA ile oluşturulan akciğer hasarına, sürfaktan verilmesinin etkisinin araştırıldığı çalışmada, sürfaktanın ödem, hemoraji, nötrofil infiltrasyonunu azaltıcı etkisine benzer bulguların KoQ10 ile de görülmesi KoQ10'un sürfaktan gibi akciğer hasarını iyileştirici etkisi olduğu fikrini desteklemektedir.⁹ Literatürdeki OA çalışmaları total akciğer hasarının artışı açısından bizim çalışma bulgularımızı desteklemektedir.⁹⁻¹¹

Oleik asit ile oluşturulan akciğer hasarında görülen amorf maddenin KoQ10 ile çoğu örnekte görülmemesi KoQ10'un muhtemel iyileştirici etkisi olduğu görüşünü desteklemektedir. Ayrıca total akciğer hasarına bakıldığında OA'yı takiben KoQ10

verilen grupta sadece OA verilen gruba göre total akciğer hasarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalması yine KoQ10'un muhtemel iyileştirici etkisi savını desteklemektedir.

Kennedy ve ark.nın yaptığı ve hipertonic salin (HTS) verilmesinin OA ile oluşturulan akut akciğer hasarını azaltıcı etkisini gösterdikleri çalışmada, HTS verilmesi tıpkı KoQ10'daki gibi ALI/ARDS patogenezinde merkezi rol oynayan endotel hücrelerinin nötrofiller tarafından hasarlanmasını nötrofil fonksiyonlarını ve miktarını düşürerek akciğer hasarını azaltmıştır.¹¹

Özdülger ve ark., sepsis oluşturdukları ratların akciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde interstisyel ödem, yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve pulmoner yapıda belirgin bozulma tespit etmişler ve NAC ile ödem, infiltrasyon ve pulmoner yapıdaki bozulmanın azaldığını bildirmişlerdir.¹²

Moriuchi ve ark., OA ile akciğer hasarı oluşturdukları akciğer dokusunun histopatolojisinde yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemişlerdir.¹³ OA'yı takiben NAC kullandıklarında akciğer hasarının azaldığını tespit etmişlerdir.

Q10 verilen gruptan alınan akciğer örneklerinde bronşiyol epitelleri ve hemen altındaki bağ dokusunu saran ince düz kas hücreleri sağlam olarak izlendi. Bu bulgu KoQ10'un akciğere hasar vermediğini düşündürdü. Kan hava bariyerinin devamlılığı ve Tip 1 ve Tip 2 pnömositlerin sağlıklı oluşu KoQ10'un iyileştirici etkisi yanında akciğer koruyucu etkisi olduğunu da düşündürmektedir.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan ve bir oksidatif hasar göstergesi olan doku MDA düzeyleri açısından gruplar arası anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak MDA düzeyinin KoQ10 grubunda, kontrol grubundan bile daha düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa dahi antioksidan özelliği iyi bilinen KoQ10'un hiperoksiden muhtemel koruyucu etkisini bize göstermektedir.

Köksal ve ark. çalışmalarında, hidroklorik asitle akut akciğer hasarı oluşturdukları tavşanlarda erken dönemde tedavide kullanılan intratrakeal

PGE1'in lipid peroksidasyonu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır.¹⁴ On altı adet Yeni Zelanda tavşanına sedasyon altında trakeostomi açıldıktan sonra, MDA düzey tespiti için ilk kan ve BAL sıvısı örnekleri alınmış, hidroklorik asit 2 mL kg⁻¹ intratrakeal olarak verilmiş, ilk gruba tedavi uygulanmamış, ikinci gruba ise hidroklorik asitten 5 dk sonra intratrakeal instillasyon ile PGE1 (5 µg kg⁻¹) uygulanmıştır. Çalışmanın erken dönem tedavi sonrası olan 60. dk'sında ve bitimi olan 180.dk'da kan ve BAL sıvı örneklemeleri tekrarlanmıştır. Grupların plazma ve BAL MDA düzeyleri incelendiğinde; her iki grupta da artış gözlenmiştir. Birinci grubun plazma 180. dk MDA düzeyi ile 60 ve 180. dk'da BAL MDA düzeylerinin II. gruba göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da, 1. grupta MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yükselmesi akciğer hasarının oluştuğunu gösterirken, sadece KoQ10 verilen 4. gruptaki doku MDA düzeylerinin kontrol grubundan ve OA sonrası KoQ10 verilen gruptan daha düşük olması Köksal ve ark.nın çalışmasını desteklemekte PGE1 gibi KoQ10'un da lipid peroksidasyonunu engellediğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Gruplar arasında en düşük CAT enzim aktivitesine sahip olan OA grubuydu. Metnitz ve ark.nın ARDS'li sekiz yoğun bakım hastası üzerinde yaptıkları çalışmada ARDS'li hastalarda CAT enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiştir.¹⁵ Bizim çalışmamızda da sadece OA verilen grupta CAT enzim aktivitesinin en düşük saptanması OA'nın akciğer hasarı oluşturmada iyi bir model olduğunu OA sonrası KoQ10 verilen grupta CAT enzim aktivitesinin yükselmesi KoQ10'un oluşmuş akciğer hasarını iyileştirici etkisini ortaya koymaktadır. Ancak gruplar arası ikili karşılaştırmalarda hedeflenen p düzeyine ulaşamamasının muhtemel sebebi çalışmaya dâhil edilen hayvan sayısının azlığıdır.

Süperoksit radikallerini etkisizleştiren anti-oksidan bir parametre olan SOD enzimi düzeyleri açısından OA'yı takiben KoQ10 verilen grup ile kontrol grubu arasında anlamlı istatistiksel fark saptandı. En düşük SOD aktivitesine sahip olması beklenen grup OA grubu iken, en düşük aktiviteye sahip grup OA'yı takiben KoQ10 verilen grup idi.

Leff ve ark.nın sepsisli hastada yaptıkları bir çalışmada, ARDS gelişenlerde ARDS gelişmeyenlere göre SOD aktivitesinde yükselme tespit etmiş olmaları SOD enziminin her ARDS'li hastada düşmeyebileceğini göstermiş olması açısından bizim bulgularımızı desteklemektedir.¹⁶

Sitokin bulgularına bakıldığında TNF-α düzeyi açısından OA grubu ile OA'yı takiben KoQ10 verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. TNF-α'nın indüklenmiş şok ve doku hasarındaki mekanizması tam olarak bilinmemese de bu sitokinin akciğer kapiller permeabilitesini artırdığı bilinmektedir. İnflamatuar hücreler için kemotaktik özellikleri bulunmakla birlikte nötrofilleri ve endotelial hücreleri aktive edebilme kapasitesine sahiptir.¹⁷

Meduri ve ark. 27 yoğun bakım hastası üzerinde yaptıkları çalışmada, 14 ARDS hastasında TNF-α düzeyleri uzun süre yüksek kalmıştır.¹⁸ Zhu ve ark.nın OA ile akciğer hasarı oluşturulmuş ratlarda Jinhuang-1'in etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada, Jinhuang-1'in ARDS'deki koruyucu etkinliği TNF-α ekspresyonunu azaltması olarak açıklanmıştır.¹⁹ Bu çalışmalar da bizim çalışmamızdaki sonucu desteklemektedir. Bununla birlikte ikili karşılaştırmalarda TNF-α düzeyi açısından hedeflenen p düzeyine ulaşamamış olmasının çeşitli sebepleri bulunmaktadır. Öncelikle çalışmamız bir hayvan çalışmasıdır ve bu sitokinin insanlarda ALI/ARDS'nin patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. Diğer muhtemel sebep sitokinlerin yükselmesi için gerekli zamanın bizim kanları aldığımız 4 saatten uzun olmasıdır. Bir diğer muhtemel sebep de hayvan sayısının yetersizliğidir.

GCSF düzeyi açısından ise OA grubu ile OA'yı takiben KoQ10 verilen grup ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. GCSF enfeksiyon ve inflamasyona endojen yanıtın santral mediatörüdür.²⁰ Hierholzer ve ark., ratların akciğerlerine direkt GCSF uygulandığında ALI oluştuğunu rapor etmişlerdir.²¹ Wiedermann ve ark. 19 ARDS hastası ve 10 ALI hastası üzerinde yaptıkları çalışmada, 19 ARDS hastasının 18'inde ve 10 ALI hastasının 7'sinde GCSF seviyeleri belirgin ola-

rak yüksek bulunmuştur.²² OA sonrası KoQ10 uygulanan grupta GCSF düzeyinin düşmesi KoQ10'un muhtemel iyileştirici etkisinin bir kanıtı olarak düşünülebilir.

Gruplar arasında IL-6, IL-10 düzeyleri açısından anlamlı istatistiksel fark bulunamadı. Çalışmamızda pro ve anti-inflamatuar sitokinler neden klinik sonuçların zayıf bir belirteci olarak kalmıştır sorusunun cevabı inflammatuar cevabın kompleksitesi altında yatmaktadır. Çünkü ARDS'deki inflammatuar yanıt tek bir faktörün epitelyal ve endotelial bariyerler üzerinde hasar oluşturduğu bir süreç değildir. Hücreler ve sitokinler arası kompleks ilişkiler nedeniyle tekli sitokin ölçümlerinden çok değişkenli analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için de çok sayıda hastanın analiz edildiği çalışmalara gerek vardır.²³

Literatüre bakıldığında KoQ10'un akciğer hasarı üzerinde etkilerinin incelendiği sadece 1 çalışma görülmektedir. Lim ve ark. 2 aşamalı bir laboratuvar çalışmasında, akciğer transplantasyonu yapılan ratlarda iskemi reperfüzyon hasarına KoQ10'un etkisini inceledikleri çalışmalarında, akciğer transplantasyonunda oluşan ciddi iskemi ve reperfüzyon hasarının önlenmesinde oral KoQ10 ile yapılan koruyucu tedavinin yetersiz olduğunu bulmuşlardır.²⁴ Bununla birlikte anestezi altında ya da transplant cerrahisi olmayan akciğer cerrahisi gibi akciğer hasarının daha az olduğu durumlarda KoQ10'un koruyucu olabileceği görüşüne varmışlardır.

Çalışmamızın kısıtlılıklarını değerlendirdiğimizde; ratlarda OA kullanarak oluşturulan akut akciğer hasarı modeli öncelikle bir hayvan modelidir, hayvanlarda OA verildikten sonra ALI/ARDS oluşma zamanı, sitokinlerin ortaya çıkma zamanı, hayvanlarda oluşan hasarın herhangi bir yoğun bakım hastasıyla hangi safhada eşleştiğine dair bilgilerimiz yetersizdir. OA modeli mevcut olanlar arasında en iyi model olarak tanımlanmakla birlikte bir emboli modelidir ve ALI/ARDS fizyopatolojisini yansıtmada yetersizdir. Bu nedenle ratlarda yapılmış bu deneydeki sonuçların farklı hayvan türleriyle ve insanlarla birebir benzerlik göstermesi

mümkün değildir. Hayvan sayısının yetersizliği özellikle anlamlı istatistiksel farkların çıktığı oksidan-antioksidan bulgular ve sitokinlerde ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak hedeflenen p düzeyine ulaşamamıza neden olmuştur. KoQ10'un özellikle miyokard üzerindeki etkinliğini araştıran çok sayıda çalışma olmasına rağmen akut akciğer hasarındaki etki mekanizmasını araştıran çalışmalara rastlanmamıştır. Bu da KoQ10'un akut akciğer hasarında etkili olabilecek dozunu ve KoQ10 verildikten sonra muhtemel iyileştirici etkinin ortaya çıkacağı zamanı belirlememiz açısından yetersiz kalmıştır. Verilen OA miktarını artırarak, ratlarda daha yoğun bir akciğer hasarı oluşturup onları mekanik ventilatörde izleyerek, ratların sakrifiye edilme zamanını uzatarak, ARDS'nin günler içindeki gelişimini izlemek, teknik açıdan ve maliyet açısından oldukça zor olduğu için bir günlük sürede beklenen sitokin seviyelerine ulaşamamıştır.

Sonuç olarak, çalışmamız akut akciğer hasarında KoQ10'un oksidan, antioksidan sistemlerindeki dengeyi antioksidanlar lehine artırması nedeniyle yoğun bakımlarda KoQ10 kullanımı akciğer hasarını önlemede ve oluşmuş akciğer hasarını iyileştirmede destekleyici tedavi olarak yararlı olabilir hipotezi doğrultusunda yeni insan araştırmalarına bir başlangıç adımı atmıştır.

Teşekkür

Asistanlık eğitimim süresince sağladığı sonsuz olanaklar ile sınırsız çalışma ve araştırma yapma fırsatı sunan, her türlü zor koşulda yardımlarını esirgemeyen, bizlere sağladığı dayanışma, anlayış, hoşgörü, huzur içinde çalışma şartlarıyla tüm sorunlarımızı çözümlleyen çok değerli hocam Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Ülkü AYPAR'a, asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli Anabilim Dalı hocalarıma, çalışmamın yapım aşamasına maddi ve teknik destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimine, hayatımın her aşamasında sevgisi ve bilgeliğiyle tüm kararlarımı destekleyip bana yol gösteren canım anneme, sabırla ve fedakârlıkla hep yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

KAYNAKLAR

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2(7511):319-23.
2. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *The Consensus Committee. Intensive Care Med* 1994;20(3):225-32.
3. Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(1):245-60.
4. 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):412-7.
5. Maitra A, Kumar V. The lung and the upper respiratory tract. *Robbins Basic Pathology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p.453-508.
6. Kumar A, Kaur H, Devi P, Mohan V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. *Pharmacol Ther* 2009;124(3):259-68.
7. Tate RM, Repine JE. Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983;128(3):552-9.
8. Rucker GM, Wiseman MS, Pearson D, Shale DJ. Diagnostic criteria for adult respiratory distress syndrome: time for reappraisal. *Lancet* 1989;1(8630):120-3.
9. Zhu GF, Sun B, Niu SF, Cai YY, Lin K, Lindwall R, 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;158(2):437-43.
10. 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):1214-21.
11. 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.
12. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L, Avlan D, Unlu A, et al. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock* 2003;19(4):366-72.
13. Moriuchi H, Zaha M, Fukumoto T, Yuizono T. Activation of polymorphonuclear leukocytes in oleic acid-induced lung injury. *Intensive Care Med* 1998;24(7):709-15.
14. Köksal MG, Sayılğan C, Finci A, Uzan S, Öz H. [The effect of PGE1 on lipid peroxidation in the treatment of early period of acute lung injury]. *Journal of Cardio-Vascular-Thoracic Anaesthesia and Intensive Care Society* 2004;10(3):108-10.
15. Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1999;25(2):180-5.
16. Leff JA, Parsons PE, Day CE, Moore EE, Moore FA, Oppegard MA, et al. Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(4):985-9.
17. Balibrea-Cantero JL, Arias-Diaz J, Garcia C, Torres-Melero J, Simon C, Rodriguez JM, et al. Effect of pentoxifylline on the inhibition of surfactant synthesis induced by TNF-alpha in human type II pneumocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(3 Pt 1):699-706.
18. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 1995;107(4):1062-73.
19. Zhu D, Liu HG. [Protective effect of Jinhuang-1 on acute respiratory distress syndrome rats induced by oleic acid]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 200;32(18):1913-6.
20. Louie SG, Jung B. Clinical effects of biologic response modifiers. *Am J Hosp Pharm* 1993;50(7 Suppl 3):S10-8.
21. Hierholzer C, Kelly E, Lyons V, Roedling E, Davies P, Billiar TR, et al. G-CSF instillation into rat lungs mediates neutrophil recruitment, pulmonary edema, and hypoxia. *J Leukoc Biol* 1998;63(2):169-74.
22. Wiedermann FJ, Mayr AJ, Kaneider NC, Fuchs D, Mutz NJ, Schoberberger W. Alveolar granulocyte colony-stimulating factor and alpha-chemokines in relation to serum levels, pulmonary neutrophilia, and severity of lung injury in ARDS. *Chest* 2004;125(1):212-9.
23. Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest* 1999;116(1 Suppl):2S-8S.
24. Lim HK, Jayaweera S, Calderone A, Pepe S, Rosenfeldt FL, Marasco SF. Protective role of coenzyme Q10 in two models of rat lung injury. *ANZ J Surg* 2010;80(4):265-70.