



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BİR SIÇAN AKUT RESPIRATUAR DİSTRES MODELİNDE
SİLİMARİN'İN ANTIİNFLAMATUAR VE ANTİOKSİDAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Şenay CANIKLI ADIGÜZEL

Ankara, 2007



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BİR SIÇAN AKUT RESPIRATUAR DİSTRES MODELİNDE
SİLİMARİN'İN ANTİİNFLAMATUAR VE ANTİOKSİDAN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Şenay CANIKLI ADIGÜZEL

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Arash PİRAT

Ankara, 2007

ÖZET

Silimarin özellikle son yıllarda üzerinde pek çok çalışma yapılan “*Silybum marinum*” dan elde edilen antifibrotik, antioksidan, antiinflamatuvar, nöroprotektif bir maddedir. Safra kesesi rahatsızlıkları, hepatitler, kolestaz, kimyasal toksinler ve mantar zehirlenmeleri tedavisinde, radyoprotektif olarak, cilt ve prostat kanserlerinde adjuvan tedavi amacıyla, kardiyopulmoner rahatsızlıklarda ve nefropatiyi önlemek amacıyla kullanımı bildirilmiş olan bitkisel bir ilaçtır. Lipopolisakkaritle indüklenen sepsis modelinde antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Antiinflamatuvar etki mekanizması henüz net olarak açıklanamamıştır.

Çalışmamızda çekal ligasyon-perforasyon yöntemi kullanılarak akut akciğer hasarı gelişimini sağladığımız sıçanlarda silimarin’in antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerini değerlendirmeyi amaçladık.

Toplam 46 sıçanın kullanıldığı çalışmamızda sham (n=14), kontrol (n=16) ve silimarin (n=16) grupları ve her bir grubun erken ve geç alt grupları vardı. Silimarin grubundaki sıçanlara cerrahi işlem öncesi 3 gün ve sonrasında 2 gün olarak toplam 5 gün 50 mg/kg/gün dozunda silimarin, kontrol ve sham grubuna ise eşit volümde salin verildi. Kontrol ve silimarin grubundaki sıçanlarda çekal ligasyon-perforasyon yöntemi ile sepsise bağlı akciğer hasarı gelişimi sağlandı. Erken gruptaki sıçanlar 12. saatte sonlandırılırken geç gruptakiler takibe alındı ve mortalite süreleri kaydedilerek sağkalım analizi yapıldı. Sıçanların serum ve bronkoalveolar sıvı (BAL) tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) seviyeleri ölçüldü. Akciğer dokusunda malondialdehit ve glutatyon-sülfidril seviyeleri, akciğer dokusunun histopatolojik incelemesi ve yaş/kuru ağırlık oranına bakıldı.

Çalışmanın sonucunda 72. saatte silimarin grubunda sağkalım oranı %62.5, kontrol grubunda %12.5 bulundu (p=0.0506). Silimarin grubunda kontrol grubuna göre yaş/kuru ağırlık oranı daha düşüktü (p=0.019). Serum ve BAL TNF- α , IL-1, IL-6 seviyeleri silimarin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük (her biri için p<0.05), histopatolojik skorlama daha düşük bulundu (p=0.001). Doku malondialdehit seviyesinin kontrol grubundan daha düşük (p=0.011) ve glutatyon-sülfidril seviyesinin daha yüksek (p=0.001) olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; silimarin sepsise bağlı akut akciğer hasarı gelişimini önlemede yararlı olmuştur. Bu etkinin antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri sayesinde olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Silimarin, akut akciğer hasarı, antioksidan, antiinflamatuvar.



ABSTRACT

Silymarin recently has been investigated for use as a cytoprotectant, an anticarcinogen, and a supportive treatment for liver damage from *Amanita phalloides* poisoning. Silymarin, a polyphenolic flavonoid antioxidant, is known to have anti-inflammatory, hepatoprotective, and anticarcinogenic effects.

Hypothesis: Silymarin decreases sepsis induced acute lung injury (ALI) in a cecal ligation and puncture (CLP) rat model through its antiinflammatory and antioxidant effects.

Methods: Forty-eight rats were randomized to sham (n=16), control (n=16), silymarin (n=14) groups. ALI was induced with CLP in control and silymarin groups. Animals in silymarin group received silymarin 50 mg/kg/day for 3 days before the experiment and 2 days afterward. Serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) tumor necrosis factor (TNF)-alpha, interleukin (IL)-1beta, and IL-6; lung tissue malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels; lung histopathologic examination; and lung wet-to-dry (w/d) weight ratio measurements were used to compare and evaluate the severity of lung injury between the groups. Survival analyses were also done.

Results: Mortality rates for silymarin and control groups were 37.5% and 87.5%, respectively (log-rank $P=0.0506$). Compared with the silymarin group, the control group exhibited significantly more severe lung injury, as indicated by higher mean values for serum and BALF TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 ($P<0.05$ for all measurements); neutrophil infiltration of the lungs ($P=0.003$); pulmonary edema ($P=.001$); total lung histopathologic injury score ($P=0.001$); w/d ($P=0.019$); and lung-tissue MDA ($P=0.011$) levels. Lung tissue GSH levels were significantly higher in silymarin group than control group ($P=0.001$).

Conclusions : Silymarin reduces the severity of sepsis induced-ALI and may also improve survival in a CLP rat model. These beneficial effects of this agent are probably due to its inhibitory effects on inflammatory process and oxidative injury.

Key words: Silymarin, acute lung injury, antioxidant, antiinflammatory.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ÖZET	iii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLO DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akut Respiratuar Distres Sendromu	3
2.1.1. Patofizyolojik Yolaklar	4
İnflamatuvar yanıt	4
Nötrofiller	6
Diğer inflamatuvar hücreler	6
Proinflamatuvar mediyatörler	7
Antiinflamatuvar mediyatörler	7
2.1.2. Ards Patofizyolojisi	7
Oksidatif hasar	10
2. 2. ARDS' de Deneysel Tedavi Yaklaşımları	11
2. 3. Silimarin	14
3.GEREÇ VE YÖNTEM	16
Gruplar	16
Çekal ligasyon ve perforasyon işlemi	16
Erken ve geç alt gruplar	17
Sağkalımın değerlendirilmesi	17
Yaş-kuru ağırlık	18
Kan ve bronkoalveoler lavaj (BAL) sitokin incelenmesi	18
Oksidan hasar ve doku malondialdehit değerlendirilmesi	18
Histomorfolojik ve histokimyasal değerlendirme	19
İstatistiksel değerlendirme	20

4.BULGULAR	21
5.TARTIŞMA	32
6.SONUÇ	38
7.KAYNAKLAR	39



KISALTMALAR

ALI	Akut akciğer hasarı
ARDS	Akut respiratuar distres sendromu
BAL	Bronko alveoler lavaj
CAT	Katalaz
CD-14	<i>Clusters of differentiation-14</i>
CO ₂	Karbondioksit
COX2	Siklooksijenaz-2
Cu	Bakır
ELISA	<i>Enzyme linked immune sorband assay</i>
F _i O ₂	İnspirasyon havasındaki oksijen basıncı
G	Gauge
GMCSF	Granülosit monosit koloni stimulan faktör
g	Gram
GSH	Glutaton sülfhidril
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IL	İnterlökin
İNOS	<i>Inducible</i> nitrik oksit sentetaz
K ₃ EDTA	Etilendiaminoatetraasetikası
KCL	Potasyumklorür
Kg	Kilogram
LPB	Lipopolisakkarit bağlayıcı protein
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mmHG	milimetre civa
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
Nm	Nanometre
Nmol	Nanomol
NO	Nitrik oksit

PAI-1	Plazmnojen aktivatör inhibitörü-1
PAO2	Parsiyel alveoler oksijen basıncı
PaO2	Parsiyel arteriyel oksijen basıncı
PAOP	Pulmoner arter oklüzyon basıncı
PCO2	Parsiyel karbondioksit basıncı
pg	Pikogram
SOD	Süperoksid dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TNF- α	Tümör nekrotizan faktör- α
TxA2	Tromboxane A2
V/Q	Ventilasyon/perfüzyon
VKI	Vena kava inferior

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. Kuzey Amerikan-Avrupa Uzlaşı Konferansı ARDS tanı kriterleri	3
Tablo 2.2. Direkt ve direkt olmayan akciğer hasarının nedenlerinden bazıları	4
Tablo 2.3. Akut respiratuar distres sendromunda potansiyel mediyatörler	5
Tablo 4.1. Grupların ağırlıklarının dağılımı (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)	21
Tablo 4.2. Grupların yaş/kuru ağırlık oranı (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)	22
Tablo 4.3. Grupların serum tümör nekroz faktör- α , interlökin-6 ve interlökin-1 β 'nin 0. ve 12. saat ölçümleri (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)	23
Tablo 4.4. Bronko alveoler lavajda (BAL) 12. saat TNF- α , IL-6, IL-1 β ölçümleri (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)	26
Tablo 4.5. Grupların histopatolojik bulguları (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)	28
Tablo 4.6. Oksidan hasar (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)	30

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Silimarin (meryemana dikenli, silybum marianum)	14
Şekil 3.1. Çekum bağlandıktan sonra 18G iğne ile delik açılarak barsak içeriğinin çıkışı gözleniyor	17
Şekil 4.1. Gruplar için Kaplan Meier sağkalım eğrileri	21
Şekil 4.2. Yaş/Kuru Ağırlık	22
Şekil 4.3. Serum TNF alfa 0. ve 12. saat değerleri	24
Şekil 4.4. Serum IL-6 0. ve 12. saat değerleri	24
Şekil 4.5. Serum IL-1 β 0. ve 12. saat değerleri	25
Şekil 4.6. Bronko alveoler lavajda TNF- α değerleri	26
Şekil 4.7. Bronko alveoler lavajda IL-6 değerleri	27
Şekil 4.8. Bronko alveoler lavajda IL-1 β değerleri	27
Şekil 4.9. Hafif hasarlı akciğer dokusu	29
Şekil 4.10. Orta derecede hasarlı akciğer dokusu	29
Şekil 4.11. Şiddetli hasarlı akciğer dokusu	29
Şekil 4.12. Gruplar arası glutatyonsülhidril ölçümleri	30
Şekil 4.13. Gruplar arası malondialdehit ölçümleri	31

1. GİRİŞ

Akut akciğer hasarı (ALI)/akut respiratuar distres sendromu (ARDS); akciğer üzerinde direkt ve indirekt hasar oluşturan çok farklı nedenler tarafından tetiklenen, akut olarak başlayan, akciğerlerde inflamasyon, proliferasyon, ve fibrozisin de dahil olduğu ciddi yapısal değişiklikler içeren bir sendromdur. Bu sendromda alveolokapiller permeabilite artışına sekonder nonkardiyak pulmoner ödem, oksijene dirençli hipoksemi ve kompliyans ile fonksiyonel rezidüel kapasitede azalma görülür (1).

ALI/ARDS'de inflamatuvar yanıtı oluşturan nötrofiller ve çok sayıdaki mediyatör endotelial ve epitelial hasardan sorumludur (2). İnflamasyonun başlamasıyla birlikte nötrofil yapımı artar ve akciğerde birikim başlar. Adezyon molekülleri ve kompleman sistemi de nötrofil aktivasyonu ve birikimini uyarır (2). Hayvan modellerinde akciğere nötrofil akımının önlenmesi her zaman olmasa da akciğer hasarının azalmasını sağlayabilmektedir (2). Hasarı başlatan mekanizma ne olursa olsun sonuçta artmış nötrofil aktivitesi, akciğerde infiltrasyon, ve nötrofillerde degranülasyona sebep olmaktadır. Degranülasyon sonrası artmış serbest oksijen radikalleri ve proteazlar endotel hasarına ve kapiller geçirgenliğin artmasına sebep olmaktadır (3). ALI/ARDS'nin patofizyolojisinde çok yol katedilmiş olmasına rağmen farmakoterapi konusunda halen çok başarılı sonuçlar elde edilememiştir. İyi deneysel modellerin oluşturulamaması nedeniyle klinik etki ve yan etkilerinin iyi değerlendirilemiyor olması, ALI/ARDS ve sepsisdeki inflamatuvar kaskada tek bir ajanın etkili olmaması, hastaların çoğunluğunun çoklu organ yetmezliği sebebiyle kaybedilmesi bu başarısızlığının nedenleridir. Günümüzde ALI/ARDS'nin patofizyolojisi ve genel karakterleri iyi bir şekilde anlaşılmış olmasına rağmen radikal bir tedavisinin olmaması bu konuda tartışmalar ve araştırmalar yapılmasına neden olmaktadır (4). Bu araştırmaların büyük bir kısmında özellikle ALI/ARDS patofizyolojisinde önemli rol oynayan inflamatuvar süreç hedef alınmıştır. Sürfaktan, inhale nitrik oksit, oleik asit, glutamin, beta-glukan ve kortikosteroidler bu amaçla tedavide denenmiş ajanlardan bazılarıdır.

Silybum marianum (*milk thistle*, *silymarin*) klasik Yunan tedavisinde safra kesesi rahatsızlıklarında ve karaciğeri toksik ajanlardan korumak için kullanılmış bitkisel bir üründür (5). Aslında 4. yüzyıldan itibaren kullanımı bilinmektedir. Silimarin preparatlarının tipik kullanımı eskiden beri karaciğer rahatsızlıkları ve diğer

gastrointestinal rahatsızlıklar için olmuştur (6). Pankreas problemlerinde, glisemik dengenin sağlanmasında, akciğer problemlerinin tedavisinde, böbrek rahatsızlıklarında, prostatın adenokarsinomasını da içeren çeşitli rahatsızlıklarında ve dermatolojik problemlerde kullanılmaktadır (6). Silimarinin antiinflamatuvar etkinliği muhtemelen bu ajanın olumlu etkilerinin önemli mekanizmalarından birini oluşturmaktadır. Pek çok çalışma silimarinin antiinflamatuvar etkinliğini ortaya koymuştur. Silimarin interferon-gamma, interlökin (IL)-4 ve IL-10'u doza bağımlı olarak inhibe eder (5). Bir sıçan sepsis modelinde silimarinin nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) bağlayan taşıyıcı gen transkripsiyonunu baskıladığı gösterilmiştir (7). Silimarinin lipopolisakkaritle (LPS) uyarılmış makrofajlarda prostaglandin-E₂ ve siklooksijenaz-2'yi de inhibe ederek antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği yine aynı çalışmada gösterilmiştir (7). NF- κ B'nin aktivasyonu ve oksidan hasar ALI/ARDS'nin patofizyolojisinde anahtar görev üstlenmektedir. ALI/ARDS'de önemli rol oynayan tümör nekrotizan faktör- α (TNF- α) ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentez ve saliverilmesi NF- κ B tarafından düzenlendiği gibi bu sitokinler NF- κ B'nin ekspresyonunu artırarak inflamatuvar sürecin artarak devam etmesini sağlarlar (8,9). TNF- α ve IL-1 gibi NF- κ B, IL-6, lenfotoksin, gronülosit monosit koloni stimulan faktör (GM-CSF) ve interferon üretimine de katkıda bulunur (10). Silimarin NF- κ B bağlayan taşıyıcı gen transkripsiyonunu baskılayarak inflamatuvar mediyatör saliverilmesini inhibe eder (10). Silimarinin inflamatuvar süreç ve antioksidan hasar üzerindeki bu olumlu etkilerinin ALI/ARDS tablosunu nasıl etkilediği bilinmemektedir.

Hipotez; sıçanlarda sepsise bağlı oluşturulan bir ALI/ARDS modelinde silimarin antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri nedeniyle oluşan akciğer hasarını azaltır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut respiratuar distres sendromu

ARDS ilk kez 1967 yılında tanımlanmıştır, fakat bu tanımlama spesifik kriterler içermediğinden 1988 yılında Murray ve arkadaşları tarafından yeni bir tanımlama önerilmiştir (1). 1994 yılında yayınlanan Kuzey Amerikan-Avrupa Uzlaşma Konferansı (*North American European Consensus Conference [NAECC]*) raporu ile ARDS'nin akut akciğer hasarının şiddetli formu olduğu kabul edilmiştir (Tablo 2.1) (11). ARDS'nin gerçek insidansı bilinmemekle beraber son çalışmalarda dünya çapında 3-8/100,000 olarak bildirilmiştir (4).

Tablo 2. 1. Kuzey Amerikan-Avrupa Uzlaşma Konferansı ARDS tanı kriterleri (12) (4).

Başlangıç şekli	Akut başlangıçlı ve inatçı seyirli
Oksijenasyon	ALI'de $P_aO_2/F_iO_2 \leq 300$ ARDS'de $P_aO_2/F_iO_2 \leq 200$
Dışlama kriterleri	PAOP ≥ 18 mmHg Sol atriyal hipertansiyon klinik bulguları
Radyolojik bulgular	Pulmoner ödemle uyumlu bilateral opasiteler

ALI; Akut akciğer hasarı. ARDS; Akut respiratuar distres sendromu. P_aO_2 ; Parsiyel alveoler oksijen basıncı. F_iO_2 ; İnspirasyon havasındaki oksijen basıncı. PAOP; Pulmoner arter oklüzyon basıncı.

ARDS'ye ait ilk klinik rapor, oksijen desteğine dirençli hipoksemi ve göğüs filminde diffüz infiltratları olan 12 hastadan oluşmaktadır (13,14). Bu hastaların otopsilerinde akciğerde proteinden zengin materyal ile lökosit içeren yoğun infiltrasyonlar saptanmıştır (13).

ARDS'nin akciğerlerde oluşan abartılı inflamatuvar yanıt olduğu düşünülebilir. ARDS pnömoni, aspirasyon, inhalasyon, emboli, sepsis ve yaygın damar içi pıhtılaşma gibi etkenlerin akciğerde inflamatuvar yanıtı başlatması ile oluşmaktadır (12). ARDS gelişimi ile ilgili bu klinik durumlarda (Tablo 2.2.) akciğerlere nötrofillerin artmış göçü ve inflamatuvar mediyatörlerin aktivasyonu oluşur (1,12).

Tablo 2.2. Direkt ve direkt olmayan akciğer hasarının nedenlerinden bazıları (12,15).

Direkt akciğer hasarı
Aspirasyon (gastrik içerik)
Pulmoner enfeksiyon
Ciddi göğüs travması
Boğulma
Toksik inhalasyon
Embolik durumlar
Direkt olmayan akciğer hasarı
Şok
Sepsis
Çok sayıda kan transfüzyonu
Ciddi nontorasik travma (yanık, çoklu kırıklar, nörolojik hasar)
İlaç aşırı dozu
Reperfüzyon hasarı
Akut pankreatit
Yaygın damar içi pıhtılaşma

2.1.1. Patofizyolojik yollar

İnflamatuvar yanıt:

ARDS'de inflamatuvar yanıtı oluşturan nötrofiller ve çok sayıdaki mediyatör kaskadı endotelial ve epitelial hasardan sorumludur (2). ARDS'de proinflamatuvar nitelikteki mediyatörlerin yapımı ve etkilerini kompanse etmek amacıyla bir taraftan da antiinflamatuvar sitokinler yapılır (Tablo 2.3.), (1).

ALI/ARDS gelişmesi ve ciddiyetini belirleyen temel faktör proinflamatuvar ve antiinflamatuvar yanıtlar arasındaki dengedir. Bu yanıtlar arasında denge olduğu takdirde hasar daha büyük hale gelmeden düzelir, aksi takdirde kontrolsüz sistemik inflamatuvar yanıtın baskın olduğu hastalarda organ hasarı gelişir (16).

Tablo 2.3. Akut respiratuar distres sendromunda potansiyel mediyatörler (1,12).

<p>Proinflatuar moleküller ve hücreler</p> <p>Lökositler</p> <p>Doku makrofajları ve monositler</p> <p>Trombositler</p> <p>Araşidonik asit metabolitleri</p> <p>Prostaglandinler, prostasiklin, tromboksan A2 (TxA2), lökotrienler</p> <p>Sitokinler (Tümör nekrozitan faktör-alfa, interlökin-1, interlökin-2, interlökin- 6, interlökin-8, granülosit koloni stimükan faktör)</p> <p>Soluble adezyon molekülleri</p> <p>Trombosit aktive edici faktör (PAF)</p> <p>Kompleman ve kompleman kaskadı aktivasyonu</p> <p>Kininler</p> <p>Endorfinler</p> <p>Histamin ve serotonin</p> <p>Proteolitik enzimler (elastaz ve lizozomal enzimler)</p> <p>Toksik oksijen molekülleri (süperoksit, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit, peroksinitrit vb.)</p> <p>Endotoksin ve diğer bakteriyel veya mikrobiyal toksinler</p> <p>Koagülasyon kaskadı aktivasyonu</p> <p>Plazminojen aktivatör inhibitörü-1</p> <p><i>Clusters of differentiation-14 (CD-14)</i></p> <p>Vazoaktif peptitler</p> <p>Monosit kemoatraktan protein 1 ve 2</p>
<p>Antiinflatuar moleküller ve hücreler</p> <p>Soluble TNF-α reseptörler</p> <p>interlökin-1 reseptör antagonisti</p> <p>interlökin-6 reseptörü</p> <p>interlökin-4</p> <p>interlökin-10</p> <p>interlökin-13</p> <p><i>Transforming growth</i> faktör-β</p> <p>Epinefrin</p> <p>Glukokortikoidler</p> <p>Lökotrien B4 reseptör antagonisti</p> <p><i>Soluble Clusters of differentiation-14 (CD-14)</i></p> <p>Lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LPB)</p>

Nötrofiller;

İnflamasyonun başlamasıyla birlikte nötrofil yapımı artarak, inflamasyon bölgelerinde ve akciğerlerde birikimi başlar. Primer ALI' de oluşan hasarın aktive ettiği alveoler ve intertisyel makrofajlardan salıverilen TNF- α , IL-1, IL-8 ile özellikle β -integrinler olmak üzere adezyon molekülleri nötrofillerin kemotaksisini ve aktivasyonunu uyarırlar. Diğer taraftan primer hasardan sonra aktive olan kompleman sistemi de nötrofil aktivasyonunu ve akciğerlerde toplanmasını tetikleyen faktörlerden biridir (1,17). Sekonder ALI/ARDS'de nötrofil aktivasyonu açısından en önemli faktörlerden biri endotoksindir (Lipopolisakkarit (LPS)). Plazmadaki LPS bağlayan protein (LBP) LPS' i bağlayarak aktivitesinin artmasına neden olur (1). LPS+LBP kompleksi CD₁₈ (cluster differentiation faktör), CD₁₄, kompleman sistemi ve nötrofil aktivasyonuna yol açar. Diğer taraftan nötrofillerin akciğerde birikimine ve sitokin salıverilmesinin tetiklenmesine neden olur. Aktive olan nötrofillerin oluşturduğu serbest radikaller, inflamatuvar medyatörler ve proteazlar (lizozim, elastaz, kollajenaz) endotelial ve epitelial hücre hasarı oluşumuna yol açarlar. Aktive olan nötrofillerde oluşan şekil değişikliklerinin pulmoner kapillerlerden geçiş süresini uzatması ve adezyon molekülleri vasıtası ile nötrofillerin pulmoner endotelle temas süresinin uzaması hasarın artmasına sebep olur (1,2). ARDS'li hastalarda erken dönemde bronkoalveoler lavaj sıvılarında nötrofiller ve nötrofil ürünlerinin belirgin birikimi tespit edilir (1,14). Hayvan modellerinde akciğere nötrofil akımının önlenmesi her zaman olmasa da akciğer hasarının azalmasını sağlayabilmektedir (1,2,14).

Diğer inflamatuvar hücreler;

ARDS'nin patofizyolojisinde makrofajlar, monositler, trombositler ve sonradan lenfositler de aktive olarak bu süreçte yer alır. Trombositler oluşturdukları agregatlarla pulmoner perfüzyonun bozulmasına neden olurken saldıkları mediyatörler vasıtasıyla da endotelial hasarı arttıırırlar (1,11).

Vasküler endotelial hücreler ve alveoler epitel hücreleri de inflamatuvar yanıtın artması ve koagülasyon kaskadının aktivasyonunda önemlidirler.

Sistemik inflamatuvar yanıt oluştuğunda endotel hücreleri, doku faktörü ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) yapımını arttırırken trombomodülin yapımını azaltırlar. Dolayısıyla ekstrensek koagülasyon sisteminin aktivasyonu ve antifibrinolitik etki ortaya çıkar (1,18).

Proinflamatuvar mediyatörler;

İnflamatuvar ve immun süreçleri kontrol eden sitokinler akciğer epitel hücrelerinden salıverilirler. Sitokinler nötrofillerin kemotaksisi ve endotele adezyonunu arttırmının ötesinde diğer proinflamatuvar yanıtları tetikler ve mikrovasküler permeabilitenin artmasına da yol açar. Bu sitokinlerden en erken sentezlenerek salıverilenleri TNF- α ve IL-1'dir. TNF- α , monosit makrofaj (karaciğer kuppfer hücreleri) ve lenfositler tarafından yapılır. Hedef hücreleri endotel hücreleri, monositler, makrofajlar, nötrofiller ve fibroblastlar olup bu hücrelerde IL-1, IL-6, IL-8, trombosit aktive edici faktör (PAF), lökotrienler, prostoglandinler, tromboksan A₂ (TxA₂) ve TNF- α yapım ve salıverilmesini uyarır. Nötrofillerden proteazların ve oksijen radikallerinin salıverilmesini arttırmaları (1,19). TNF- α kemik iliğinde de nötrofil yapımını uyarır ve onların fagositik aktivitesini artırır. Kompleman ve koagülasyon sistemlerini aktive eder, kapiller endotel hücreleri üzerindeki direkt etkisi ile permeabiliteyi artırır, hipotalamik etkisi ile vücut ısısını artırır (1,18). IL-1 monosit, makrofaj, endotel ve epitel hücrelerinde yapılır. Proinflamatuvar yanıtı tetikler, kompleman ve koagülasyon sistemlerini aktive eder, nötrofil aktivasyonunu ve endotelle ilişkisini artırır. Endotel de adezyon moleküllerinin belirginleşmesi ve aktivasyonunu artırır (17,18). Diğer proinflamatuvar sitokinler, IL-2, IL-6, IL-8, IL-18 ve GMCSF' dür. Proinflamatuvar süreçte doku hasarının oluşumunda serbest radikaller de önemli rol oynarlar, DNA, protein ve lipit oksidasyonuna yol açarlar. ARDS'li hastalarda plazma antioksidan düzeyleri azalmıştır (9,20,21).

Antiinflamatuvar mediyatörler:

Bu inhibitörler soluble TNF- α reseptörleri, soluble IL-1 reseptörleri, IL-1 reseptör antagonistleri ve soluble IL-6 reseptörleridir (1,22). Bu doğal inhibitörlerin yanında antiinflamatuvar etkiye sahip olan ve proinflamatuvar etkiyi dengelemeye çalışan IL-1, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler de mevcuttur (8,9).

2.1.2. ARDS Patofizyolojisi

Alveoler epitel iki tip hücreden oluşur. Tip1 pnömositler epitelial yüzeyin %90'ını kaplayan, metabolik olarak daha az aktif olan ve hasarlanmaya çok hassas hücrelerdir. Tip2 pnömositler ise daha az yüzey alanını kaplamakla birlikte (%10) sürfaktan yapımı ve iyon pompalanması gibi önemli metabolik görevler üstlenirler. Tip2 pnömositlerin diğer bir özelliği de hasara dayanıklı olmaları ve hasar sonrasında bölünüp farklılaşma

göstererek Tip1 pnömositleri oluşturmalarıdır. Normalde alveoler epitelin permeabilitesi vasküler endotelden daha azdır (1).

Öncelikli olarak epitel hasarı oluşan primer ARDS'de akut dönemde proteinden zengin alveoler ödem oluşum hızı ve ödem miktarı sekonder ARDS'ye kıyasla daha fazladır. Tip2 pnömositlerin de hasar görmesi ödem sıvısının alveollerden atılımının yanında sürfaktan yapımının ve dönüşümünün bozulmasına da yol açar (1,18,23,24). Aynı zamanda proteinden zengin alveoler ödem sıvısı ve inflamasyon mevcut sürfaktanın fonksiyonunun bozulmasına yol açar (1,18,24,25). Epitel bütünlüğünün kaybı bakteriyel pnömoni hastalarda bakteriyemi ve septik şok oluşumuna neden olabileceği gibi epitelde oluşan belirgin hasar fibrozisin de şiddetli olması ile sonuçlanır (1). Direkt akciğer kaynaklı ARDS direkt olmayanlardan daha sıktır (15). ARDS'deki yaygın patognomonik hasar alveolokapiller ünitededir. Bu patolojik değişiklikler interstisyel ve alveolar proteinöz ödem, kapiller konjesyon, intraalveoler hemoraji, Tip1 alveoler hücre nekrozu, hiyalin membran oluşumu ve sonuçta onarım şeklinde özetlenebilir (15). Nötrofillerin bu hastalığın patogenezindeki rolü çok önemli gibi görünmektedirler. Genetik faktörler de ALI/ARDS'de rol oynar. Toll like reseptör polimorfizmi önemli olabilir (15,26). Hasarın ilk 1-3 günü eksudatif fazdır. Bunu proliferatif faz ve 7-10. günlerde fibrotik faz takip eder. Fibrotik faz 3. haftadan sonra belirginleşir (15).

Eksudatif fazda epitel bütünlüğü bozulur, alveolokapiller ünitede hiyalin membran oluşumuna kadar giden değişiklikler olur (1,2,15). İmmunoglobulinler, kompleman, fibrinojen gibi plazma proteinleri alveoler debrisler yapar, alveollerde kapiller endotele ve bazal membrana doğru hasar ilerler ve alveoler kollapsa sonuçlanır. İntraalveoler hemoraji ve pulmoner mikrovasküler trombüs görünümü ve genellikle nötrofil infiltrasyonu da vardır (15). Bu sırada araşidonik asit metabolitlerinin salınması de nötrofillerin migrasyonu, adezyonu ve aktivasyonunda etkili olur ve hasarın gelişiminde önemli rol oynar (15). Fibroproliferatif faz vital fonksiyonların temini ve normal akciğer fonksiyonu için ilerleyici bir fazdır. Alveoler epitelde rejenerasyon ve interstisyel ve intraalveoler eksudanın organizasyonu gerçekleşir. ARDS'de Tip2 hücreler Tip1 hücrelere göre rölatif olarak daha fazla hasarlanır. Yaklaşık 1 hafta sonra alveoler ödem çözülür ve hiyalin membran azalır. Pnömoni varlığında nötrofilik infiltrasyon ve interstisyel fibroblast proliferasyonu ve yeni kollajen birikimi daha çok göze çarpar. Fibrozis en erken hasardan 10 gün sonra görülür. Parankimal fibrozis geliştiğinde pulmoner arteriollerde intimal

fibrozis ve medial hipertrofi oluşur (15). Proliferatif faz ağırlıklı olarak 2 ve 3. haftalarda gözlenmektedir. Alveoler hasar daha da ilerler, kapiller ağın doku içindeki dağılımı azalır. İntimal proliferasyon ve makrotrombüsler nedeni ile bu dönemde vasküler tıkanmalar gözlenir ve alveol lümeninde organize fibrozis gelişir. 10. günden başlayıp 3. haftadan sonra belirginleşen fibrotik fazda kollajen fibrozisi iyice belirginleşir, arterlerde kırılmalar, traksiyonel bronşektaziler ve amfizematöz değişiklikler ortaya çıkar. Akciğerin küçük damar ve kapillerlerinde mikrosirkülasyon bozulur, endotelial bariyer hasarına bağlı olarak akciğerin sıvı içeriğinde artış olur (11,26). Alveoler ödem ile birlikte lökositlerin varlığı, hemoraji ve hiyalin membran bazı otopilerde mevcuttur (11). Öncelikle interstisyel alanda alveoler nötrofil infiltrasyonu, Tip1 pnömositler ve endotelde daha belirgin olan nekroz, hiyalin membran oluşumu ve mikrotrombüsler gözlenmektedir (1).

Sekonder ALI/ARDS'de sistemik olarak aktive olan inflamatuvar hücreler, humoral sistem ve mediatörlerin ilk hedefi vasküler endoteldir. Primer ARDS'ye göre intraalveoler alanlar daha az etkilenmektedir, mikrovasküler konjesyon, interstisyel ödem ve bunlara sekonder ortaya çıkan alveoler kollaps akciğer mekaniğinde ve gaz değişiminde bozulmalara yol açmaktadır (1).

Pulmoner patolojinin seyri klinik tablo ve tedavi yaklaşımları açısından hasarın ne taraftan başladığı önemlidir. Ancak daha geç dönemde olayın nereden başladığına bağlı olmaksızın hasarın boyutu artar ve hem epitel hem de endotel tutulmaktadır (1).

ARDS'li hastalarda sıklıkla pulmoner vasküler tonus artışı ve pulmoner hipertansiyon gelişmektedir (1,18). Pulmoner hipertansiyon gelişiminin birçok nedeni vardır. ARDS akciğerinde sıklıkla pulmoner resistansı arttıran mikrotrombüs ve mikroemboliler ortaya çıkar (1,15,18). Vasküler tıkanıklıklar iskemik hasar oluşmasına ve mediyatör salıverilmesinin artmasına neden olur. Trombin aktivasyonu ve fibrin oluşumu endotel hücreleri ile trombositlerden TxA₂ ve serotonin salıverilmesine neden olur. Bu mediatörler güçlü vazkonstrüktör özelliklidir ve pulmoner vasküler rezistansın daha da artmasına yol açar (1,18). Bir taraftan da akciğerlerden vazodilatör etkili mediyatörler de salıverilir. Prostaglandinler, endotoksin etkisi ile pulmoner yatakta etkinliği artan siklooksijenaz-2 (COX₂) ve *inducible* nitrik oksit sentetaz (İNOS) gibi mediyatörler vazodilatör etkilidir (1,2). Bütün bunların sonucunda hipoksik pulmoner vazokonstrüksiyon yanıtı kaybolur ve genellikle pulmoner hipertansiyon oluşur (1). Şant fraksiyonu artar, ventilasyon

(V)/perfüzyon (Q) arasındaki normal dışı sapmalar oksijene yanıtız hipokseminin temel nedenini oluşturur (1,26). Sınırlı alveoler ventilasyon sebebi ile ARDS'de gaz değişimi bozular, alveoler ventilasyon ve kalp debisi arasındaki değişim artar, inflamatuvar medyatörlerin etkileri ve vasküler düz kas tonusları gibi hastalığa bağlı faktörler bu durumu değiştirir. Çünkü karbondioksit (CO₂) değişimi alveoler ventilasyonla düzenlenir. ARDS'de ölü boşluk ventilasyonu artar ve V/Q oranı arteriyel parsiyel karbondioksit basıncı (PCO₂) içeriğini uygun seviyede tutulması için artmış ventilasyon gerektirir. Akciğer kompliyansı düşer, bu da PCO₂ seviyesinin artışına katkıda bulunur (26).

2.1.3 Oksidan hasar

Akciğer hasarı patofizyolojisinde antioksidan savunma sisteminin olmamasının veya aşırı oksidan üretimi sonucu antioksidan savunmanın yetersiz kalmasının rol oynadığı düşünölmektedir (27,28). Akciğerler özellikli yapısı ve fonksiyonu nedeniyle inflamasyon sırasında zarar görebilecek hedef organlardır. Oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türleri hem direkt hem de direkt olmayan etkileri ile oluşan hasara katkıda bulunurlar (28). Pulmoner inflamasyon sırasında iNOS'un uyarılmasıyla NO sentezi artar. NO vasküler kaslarda relaksasyona ve aşırı üretildiğinde süperoksit ile reaksiyona girerek sitotoksik bir oksidan olan peroksinitrit oluşumuna neden olur. Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksidi ortamdan uzaklaştırarak NO ile reaksiyona girmesini engelleyerek peroksinitrit oluşumunu önleyen güçlü bir antioksidandır. Katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalize eder. Tüm bu antioksidanlar serbest toksik radikallerin sitotoksik etkisini sınırlar. ARDS gelişen hastalarda antioksidan savunma sisteminin belirgin olarak baskılandığı bildirilmiştir (29). Antioksidanlar akciğerde nötrofil sekestrasyonunu önler, ALI'li hastalarda radikal temizleyicilerde hasar vardır ve reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri artar (30). Bu oksidatif meknizmalarla savaşan ve organizmayı oksidatif hasara karşı koruyan biyolojik savunma sistemleri vardır (29). SOD, CAT, GSH-Px akciğer koruyucu endojen antioksidanlardır (30).

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun son ürünüdür, bu ürünler direkt doku hasarına sebep olur. Lipit peroksidasyonu hücre membranını bozar ve alveoler kapiller geçirgenliği arttırır (31). Lipit hidroperoksidlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da hücrenin diğer bölümlerine hasar verirler. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin

peroksidasyonunda MDA meydana gelir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Lipid peroksidasyonu, biyolojik zarlarda ciddi hücre hasarına yol açan değişiklikler yaparak hastalık patogenezinde önemli rol oynar. MDA tayini ile lipid peroksidasyonuna bağlı oksidan hasarın derecesi saptanmaktadır (32).

Hasarı başlatan mekanizma ne olursa olsun sonuçta artmış nötrofil aktivitesi ve akciğerde infiltrasyona ve nötrofillerde degranülasyona sebep olmaktadır. Degranülasyon sonrası artmış serbest oksijen radikalleri ve proteazlar endotel hasarına ve kapiller geçirgenliğin artmasına sebep olmaktadır (3) Reaktif oksijen radikalleri akut akciğer hasarında önemli rol oynar. Reaktif oksijen radikalleri antioksidan savunma sistemi ile temizlenir. Bunların başlıcaları; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon, vitamin A, vitamin C, vitamin E' dir (31). Organizmalar oluşan serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı koruyucu antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) eritrositlerde oksijen strese karşı en etkili antioksidandır. Hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin redüksiyonunu katalize eden, tetramerik yapılı, 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aktivitesinde azalma hidrojen peroksit düzeylerinde yükselmeye ve hücre hasarına yol açmaktadır (32).

2.2. ARDS'de deneysel tedavi yaklaşımları

Günümüzde ARDS'de terapötik yaklaşım ağırlıklı olarak mekanik ventilasyon şeklindeki destek tedavisi ve ARDS'ye neden olan olayın ortadan kaldırılmasını içerir. Mekanik ventilasyonda genel ilkeler; hastalarda aspirasyon, barotravma, nozokomiyal enfeksiyon ve oksijen toksisitesinin neden olduğu sekonder akciğer hasarını önlemektir. Bu arada metabolik hızı azaltmak, kardiyovasküler fonksiyonları en iyi duruma getirmek ve dokulara yeterli oksijen sunumunu sağlamak ARDS'de diğer tedavi prensiplerini oluşturur. Bunlarla beraber yeterli nütrisyon dengesi sağlanmalı ve sıvı dengesi ayarlanmalıdır (33).

ARDS patofizyolojisi konusunda çok yol kaydedilmiş olmasına rağmen farmakoterapi ile halen çok başarılı sonuçlar elde edilememiştir. İyi deneysel modellerin oluşturulamaması nedeniyle klinik etki ve yan etkilerin iyi değerlendirilemiyor olması, ARDS ve sepsisdeki inflamatuvar kaskada tek bir ajanın etkili olmaması, hastaların çoğunluğunun çoklu organ yetmezliği sebebiyle kaybedilmeleri tedavi başarısızlığının nedenleridir. Teorik olarak ARDS tedavisinde kullanılacak ideal farmakolojik ajan bir

yandan ARDS patofizyolojisinde önemli rol oynayan inflamatuvar ve oksidan hasar gibi süreçleri değiştirmeli diğer yandan ise ventilasyon perfüzyon uyumsuzluğunu azaltarak oksijenasyonu iyileştirmeli ve sağkalım oranını artırmalıdır (33). Bu amaçla pek çok farmakolojik ajan denenmiştir.

İnhale NO selektif pulmoner vazodilatasyon yaptığı ve ventilasyon/perfüzyon uyumsuzluğunu düzelttiği için umut verici bir tedavi olmuştur. Ancak çalışmalarda pulmoner hemodinamikleri ve oksijenasyonu düzeltmesine rağmen mortalite üzerinde yararlı etkisi gösterilememiştir. İnhale NO'in yeterli oksijenasyonun sağlanamadığı durumlarda kullanılabileceği, ancak akciğer hasarının standart tedavisinde yeri olmadığı belirtilmiştir (34).

ARDS'de inflamatuvar yanıtı baskılamak amacıyla yeni ilaçlar denenmektedir. Sepsis ile beraber görülen akut akciğer hasarında mortalite daha yüksektir. Akciğer hasarı gelişiminden önce ya da hasarın erken evresinde sepsis tedavi edilebilirse mortalite azaltılabilir. Çalışmalarda yüksek doz kortikosteroid, endotoksin monoklonal antibody, anti TNF- α ve anti interlökin gibi ajanlarla tedavide başarılı olunamamıştır (35). Kortikosteroidlerin potent antiinflamatuvar ve antifibrotik etkilerinden dolayı tedavide önemli yer alabileceği düşünülmüş olsa da çalışmalar bu görüşü desteklememiştir. Yüksek doz glukokortikoid sepsis ile beraber görülen akut akciğer hasarında sonucu iyileştirememiş ve erken dönemde yararlı etkisi olmadığı gösterilmiştir (35,36). Kortikosteroidler, akut akciğer hasarının hem inflamatuvar hem de fibrotik döneminde tedavide denenmiş, ancak olumlu etkileri gösterilememiştir (34). Kolesterol düşürücü etkisinin yanında immünomodulatuvar etkisi de olduğu bilinen simvastatinin kullanıldığı deneysel bir akut akciğer hasarı modelinde bu ajanla akut akciğer hasarının azaldığı gösterilmiştir. Bu etki simvastatinin antiinflamatuvar ve nötrofil adezyonunu önleyici etkisi ile oksidan hasar üzerindeki olumlu katkısına bağlanmıştır (37).

Prostaglandin E₁ vazodilatör etkili, trombosit agregasyonu inhibitörü ve nötrofil aktivasyon azaltıcı etkilere sahip bir ajan olarak deneysel çalışmalarda kullanılmış ve mortaliteyi azaltıcı etkisi saptanmamıştır (35).

İbuprofen siklooksijenaz inhibisyonu yapan antiinflamatuvar etkili bir ajandır. Ancak çalışmada mortalite hızı ve ventilatör gün sayısı plasebo ile benzer bulunurken şok süresi veya organ yetmezliksiz gün sayısında anlamlı fark saptanmamıştır (35,38).

Lökotrien ve tromboksan sentez inhibitörü olan ketakonazol'un yüksek riskli cerrahi hastalarda akut akciğer hasarı gelişimini önlediği rapor edilmiş ancak ventilasyon desteğine olan ihtiyacı ve mortaliteyi azaltmadığı gösterilmiştir (35).

Pentoksifilin fosfodiesteraz inhibitörüdür ve nötrofil kemotaksisi ve aktivasyonunu inhibe eder. Sınırlı sayıda insan çalışmasında yararlı etkisi saptanmamış. Lisofilin'in IL-1, IL-6, TNF- α ' yı inhibe ettiği gösterilmiş ancak ARDS Network çalışmasında yararlı etkisi olmadığı gösterilmiştir (35).

Yüksek riskli hastalarda antiinflamatuvar stratejiler akciğer hasarının gelişimi veya önlenmesinde etkili olabilir. Diğer antiinflamatuvar tedavi yaklaşımlarından ekstrasvasküler alana nötrofil migrasyonu ve endotele adezyonunu önleyebileceği düşünülen anti IL-8 tedavisinin yararlı olabileceği düşünülmektedir, bunun en kısa sürede ciddi çalışmalarda gösterilmesi gerekmektedir (35). Diğer potansiyel antiinflamatuvar stratejiler, trombosit aktive edici faktör inhibisyonu, antiproteazlar, antisitokin tedaviler ve koagülasyon kaskadını inhibe eden tedaviler olabilir (35).

Reaktif oksijen radikallerinin endotoksin, bakteriyel sepsis veya hiperoksik akciğer yaralanması sonucu oluşan akciğer hasarında rolünün ispatlanmasıyla antioksidan terapi denenmeye başlanmıştır. N-asetil sistein, prosistein, serbest oksijen radikal temizleyicileri ve glutatyon prekürsörlerinin bazı çalışmalarda efektif olduğu gösterilmiş (35).

2.3. Silimarin



Sekil 2.1. Silimarin (meryemana dikenini, silybum marianum)

IV. yüzyıldan beri ilaç olarak kullanımı bilinen *Silybum marianum* (*milk thistle*, *meryemana dikenini*,) 2000' li yıllarda karaciğer ve safra kesesi rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (10). Polimerik ve okside polifenolik içeriklidir. Silimarin' nin aktif komponenti standardize ekstrakt silybum marianum yaklaşık %70-80 ve %20-30' u kimyasal tanımlanmamış formdur (10). 30-100 cm yükseklikte, gövdesi köşeli, seyrek tüylü, 1-2 yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları soluk yeşil renkli, beyaz damarlı, kenarları derin dişli ve dikenlidir. Çiçekleri baş şeklinde bir arada, mor (nadiren beyaz) renkli, meyveleri 7 mm kadar uzunlukta, esmer renkli, uç kısımlarında 15 mm kadar uzunlukta, düşücü ve beyaz renkli bir tüy demeti bulunur. Özellikle Almanya'da Meryemana'yı çağrıştıran bir dinsel sembol olarak resmedildiği için bu isim verilmiştir. Eskiden beri; yaprak, sap ve çiçekleri tedavi amaçlı kullanılmaktaysa da, modern kullanımı tohumları ile sınırlıdır. Tohumları; sabit yağ (%25-30), nişasta, tanen ve *flavono-lignan* türevi bileşikler, silimarin'ler (silibin, silidianin, silikristin) içermektedir. Çok eski çağlardan beri özellikle karaciğer koruyucu olarak kullanılan bu bitki ile ilgili araştırmalar yaklaşık 50 yıl önce (1958) başlamıştır. 10 yıl sonra ise Münih üniversitesi'nden H.Wagner başkanlığındaki bir araştırma grubu, silimarin olarak bilinen bir bileşiği (içeriğindeki faydalı etken madde) tohumlarından ayırmayı başarmıştır. Meryemana dikenini tohumları, %4-6 oranında bu bileşikten içerir. Günümüzde Amerika'da üretilen konsantre Meryemana dikenini ekstreleri %70-80 oranında silimarin içermektedirler. Silimarin' in antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkisinin moleküler temeli henüz tam anlaşılammıştır (10,39). IL-1,

IL-6, TNF- α , lenfotoksin, GMCSF ve interferon üretimine NF- κ B katkıda bulunur (10). Silimarin inflamatuvar mediyatör salıverilmesini inhibe eder. Silimarin NF- κ B bağlayan taşıyıcı gen transkripsiyonunu baskılar. Silimarin forbol ester, LPS ve okadoik asit, c-seramid ile olan NF- κ B aktivasyonunu inhibe eder. Buna karşın H₂O₂'nin indüklediği NF- κ B aktivasyonunu anlamlı olarak etkilemez (10). Silimarin TNF- α 'nın indüklediği *mitogen-activated* proteinkinaz ve c-Jun N terminal kinazı aktive ve TNF- α 'nın indüklediği sitotoksisiteyi ve çapraz reaksiyonu inhibe eder (10). NF- κ B ve kinazların inhibisyonu silimarin'in antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkisinin bir parçasıdır. Bu etkiler kaspazların sitoproteksiyondaki etkisini açıklayabilir (10,40).

Silimarin'in pekçok biyolojik etkisi vardır. Antikarsinojenik etkisi, antihepatotoksik etki, plazma membran stabilizasyonu ve lipit peroksidasyonu inhibisyonu ile lipoksijenaz inhibisyonu etkisi ile; antiülser etkisi ve antioksidatif etki reaktif oksijen radikallerinin toplanması ile sağlanır. Antiinflamatuvar ve antiartritik etkinin lipoksijenaz yolu inhibisyonu ile olabileceği rapor edilmiştir (40). NO kısa ömürlü serbest radikallerdendir ve intrasellüler çeşitli biyolojik fonksiyonlara aracılık eder. Vasküler homeostaz, nörotransmisyon, antimikrobiyal savunma, antitümör aktivite gibi fonksiyonlara aracılık eder. NO, nitrik oksit sentataz (NOS) ile L-arginin'den sentezlenir. NOS'ın 3 izoformundan biri olan İNOS makrofajlardan LPS tarafından yüksek seviyede salıverilir ve bu sebeple şokun patogenezinde katkısı büyüktür. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda organ harabiyetinde önemlidir (40). İNOS geninin ana düzenleyici merkezi makrofajlardır ve NF- κ B/Rel ailesi bu genin düzenlenmesinde anahtar rolü üstlenir ve birçok immün ve inflamatuvar yanıtta görevlidir. Silimarin NF- κ B/Rel bağlayıcı aktiviteyi inhibe edici etki göstererek etki eder (10,40). NF- κ B ve kinazların inhibisyonu silimarin'in antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkisinin bir parçasıdır. Silimarin salisilata göre 100 kat daha düşük konsantrasyonda etkilidir. Silimarin gibi diğer antiinflamatuvar ilaçların da NF- κ B aktivasyonunu bloke ettiği biliniyor. Silimarin endotelial hücrelerde apoptozi indükler ve anjiogenezisi inhibe eder (10).

Silimarin genel olarak iyi tolere edilebilen bir ilaçtır. İlaç etkileşimi bildirilmemiştir (39). Yan etki olarak en sık görülen bulgular gastrointestinal rahatsızlıklardır. Fakat bu rahatsızlıkların görülme oranı plasebo ile aynıdır. Nadiren kaşıntı, egzema, kızarıklık gibi yan etkiler saptanmıştır. Yalnızca bir adet nonfatal anafilaksi vakası bildirilmiştir (39).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma Başkent Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Deneyleti Etik Kurulları'nın DA 06/36 numaralı ve 06.10.2006 tarihli onayı alındıktan sonra ve "Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu Yönergesi" kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi. Deneylede kullanılan sıçanlar Başkent Üniversitesi Deneyle Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, Üretim Ünitesi'nden temin edildi.

Araştırmamızda silimarin'in akciğer hasarına etkisine bakmak için "Wistar albino" cinsi ağırlıkları 200-400 gr arasında erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Başkent Üniversitesi Hayvan Araştırma Merkezinde 7 günlük standart beslenme ve bakımın ardından deney için 6 saat aç bırakıldı. Cerrahi işlem öncesi anestezi için 50 mg/kg ketamin hidroklorit ve 6 mg/kg ksilazin intraperitoneal yolla verildi. Bu aşamada hayvanlar *sham* (n=14), kontrol (n=16) ve silimarin (n=16) olmak üzere 3 gruba rastgele ayrıldı. Daha sonra her grup kendi içinde erken ve geç olmak üzere iki eşit alt gruba ayrıldı.

Gruplar

Silimarin grubu: Erken alt grupta cerrahi öncesi 3 gün, geç alt grupta ise cerrahiden önce 3 gün ve cerrahiden sonra 2 gün olmak üzere toplam 5 gün süreyle günde bir defa sıçanlara orogastrik tüp takılarak silimarin 50 mg/kg 2 ml serum fizyolojik içinde verildi. Son silimarin dozu cerrahiden 2 saat önce verildi. **Kontrol grubu:** Erken alt grupta cerrahi öncesi 3 gün, geç alt grupta ise cerrahiden önce 3 gün ve cerrahiden sonra 2 gün olmak üzere toplam 5 gün süreyle günde bir defa sıçanlara orogastrik tüp takılarak 2 ml serum fizyolojik verildi. **Sham grubu:** Batın açıldı ve serum fizyolojik verildikten sonra kapatıldı.

Çekal ligasyon ve perforasyon işlemi

Uygun tıraş ve saha temizliğinden sonra ksifoidin altından orta hatta 2-3 cm uzunluğunda bir vertikal insizyonla karın boşluğuna girildi. *Sham* grubunda bu aşamada karın geri kapatıldı. Silimarin ve kontrol gruplarında ise çekum bulunduktan sonra ileoçekal valfin altından 2/0 ipekle çekum bağlandı. Çekal perforasyon için çekumun antimezenterik yüzüne 18 gauge (G) iğne ile 2 adet delik açıldı ve barsak içeriğinin bu deliklerden karın boşluğuna akışı gözlendi (Şekil 3.1) (41,42). Daha sonra karın içine 10 ml/kg serum fizyolojik verildikten sonra karın kapatıldı.



Şekil 3.1. Çekum bağlandıktan sonra 18G iğne ile delik açılarak barsak içeriğinin çıkışı gözleniyor.

Erken ve geç alt gruplar

Erken alt gruplar: Cerrahi işlem tamamlandıktan sonra sıçanlar oda havasında spontan solumaya bırakıldı. On iki saat sonra yukarıda anlatılan şekilde anestezi verildikten sonra hayvanların karınları geri açılarak inferior vena kavadan ikinci kan örnekleri alındı ve yüksek doz sodyum tiyopental (200 mg/kg) ile sakrifiye edildiler. **Geç alt gruplar:** Cerrahi işlem tamamlandıktan sonra sıçanlar oda havasında spontan solumaya bırakıldı ve standart bakım ve beslenmelerine devam edildi. 3 günlük takip sonunda sıçanlar yüksek doz sodyum tiyopental (200 mg/kg) ile sakrifiye edildi.

Sağkalımın değerlendirilmesi

Geç gruplardaki sıçanlar cerrahi prosedür sonrası takip edildi ve mortalite saatleri kaydedildi. 3 günlük izlem süresince ölmeyen hayvanlar sağ kalan hayvanlar olarak değerlendirildi.

Yaş-kuru ağırlık

Yaş-kuru ağırlık oranı akciğer dokusundaki ödemin ve dolayısıyla inflamasyonun bir göstergesi olarak kabul edildi. Hassas tartıda sağ üst lobun yaş ve etüvde 80°C' de 8 saat bekletildikten sonra kuru ağırlığı tartıldı (37). Analizlerde yaş ağırlığının kuru ağırlığa oranı kullanıldı.

Kan ve bronkoalveoler lavaj (BAL) sitokin incelenmesi

Kan ve BAL sitokin incelemeleri erken alt gruplarda yapıldı. İnflamatuvar yanıtın değerlendirilmesi için kan ve BAL IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri ölçüldü. Kan örnekleri kuyruk veninden hemen anestezi sonrası (başlangıç değerler) ve 12. saatin sonunda anestezi altında laparotomi yapılarak vena kava inferiordan (VKİ) alındı. Örnekler 3000 devir/sn'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Sakrifikasyondan sonra akciğer doku örnekleri alındı. Sol akciğerin tamamı bronkoalveolar lavaj sıvısı elde etmek için kullanıldı. Sol ana bronşa 16 G' luk kanül ile girilip 2/0 ipekle bağlanarak tespit edildi. 4 cc serum fizyolojik verilip aspire edilerek lavaj örneği alındı (37). Örnekler K₃EDTA (etilendiaminoatetraasetikasit) ile antikoagüle edildikten sonra *Abbot Cell-Dyn[®] 3700 System (Abbot Diagnostics, Santa Clara, CA, USA)* kullanılarak ölçüm yapıldı. Sıçan serumlarında IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyeleri ELISA kitler (*Bio Source International, Nivelles, Belgium*) kullanılarak değerlendirildi. IL-1 β için < 3 pg/ml, TNF- α için < 4 pg/ml, IL-6 için < 8 pg/ml değerler normal sınırlar olarak kabul edildi.

Oksidan hasar değerlendirilmesi ve malondialdehit

Sağ akciğerin alt lobu doku malondialdehit (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) ölçümü için diseke edildikten sonra serum fizyolojik ile iyice yıkanıp kurulandı. Uygun büyüklükteki parçalara ayrılarak epandorf tüplerine alındı. Örnekler -86°C dondurucuda saklanarak muhafaza edildi. Tüm biyokimyasal analizler çift çalışma şeklinde gerçekleştirildi. MDA ve GSH analizleri, doku örneklerinin soğukta 0,15 molar potasyumklorür (KCL) içinde (%10 w/v) cam homojenizatör kullanılarak elde edilen doku hemojenatlarında gerçekleştirildi.

Lipid peroksidasyon belirteci olarak doku MDA derişimi Beuge ve Aust tarafından (43) tanımlanan yöntemle göre saptandı. Yöntem MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile yaptığı

kompleksin kolorimetri ile ölçümü esasına dayanmaktadır. Analizde bir hacim doku hemojenat örneğine iki hacim ayıraç çözeltisi (0,25 normal hidroklorür içinde %14 trikloroasetikasit ve % 0,375 TBA) ilave edilerek kaynar su banyosunda 15 dakika inkübe edildi. Soğutma işlemi sonrasında 1000 g'de 10 dakika satrifüj edilerek elde edilen süpernatanın absorbansı 535 nanometrede (nm) örnek köre karşı ölçüldü (Shimadzu uv-1600). MDA derişimleri molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve nanomol/gram (nmol/g) doku olarak ifade edildi.

Doku hemojenatlarında GSH düzeyleri Ellman tarafından tanımlanan yöntemle göre gerçekleştirildi (44). Hemojenat örnekleri metafosforik asit ile deproteinize edildikten sonra elde edilen süpernatanın Ellman ayırıcı ile oluşturduğu renkli kompleksin absorbansları örnek köre karşı 412 nm' de saptandı. GSH derişimleri GSH kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol GSH/mg olarak ifade edildi.

Doku hemojenatlarında protein analizi Lowry ve arkadaşlarının (45) yöntemine göre gerçekleştirildi. Bu yöntem proteinlerdeki peptit bağlarının alkali ortamda bakır (Cu^{++}) oluşturmak üzere Cu^{++} ile tepkimeye girmesi esasına dayanır. Oluşan kupröz iyonlar folin ayırıcı ile tepkimeye girerek fosfomolibdotungstatı bakır katalizli aromatik amino asit oksidasyonu yolu ile heteromolibden mavisine indirgenmektedir. Tepkime sonrası oluşan renkli kompleksin absorbansı 550 nm'de örnek köre karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Protein derişimleri standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg/ml olarak ifade edildi.

Histomorfolojik ve histokimyasal değerlendirme

Sağ akciğerin orta lobu diseke edildikten sonra formole alınarak 24 saat içinde laboratuvara ulaştırıldı. 0,5 µm kalınlığında parafine gömülü paraçalar deparafinize edildi. Ödem, hemoraji, bronş epitelyum hasarı, hiyalen membran oluşumu ve nötrofil infiltrasyonu Hematoksilen-Eozin ile boyanmış örneklerde, semikantitatif olarak değerlendirildi ve derecelendirildi:

- 0 Yok veya ihmal edilebilir
- 1 Seyrek veya fokal
- 2 Orta şiddette
- 3 Yaygın ve belirgin
- 4 Yaygın ve şiddetli

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analizler Windows için yazılmış SPSS 15.0 programıyla yapıldı. Grupların mortalite hızları Kaplan-Meier sağkalım eğrileri ve log-rank testi ile değerlendirildi. Gruplar arasında ortalamaların karşılaştırılmasında dağılımı homojen olan veriler için tek yönlü varyans analizi (tek yönlü ANNOVA) ve dağılımı homojen olmayan veriler için ise Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. Tek yönlü varyans analizi ile anlamlı fark saptanan parametreler için 2 grubun karşılaştırılmasında Bonferroni düzeltmesi ile t-test uygulanırken Kruskal-Wallis testi ile anlamlı fark saptanan parametrelerde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gruplar arasında oranların karşılaştırması için Ki-kare testi kullanıldı. Farkın anlamlılık seviyesi için $p < 0.05$ kabul edildi.



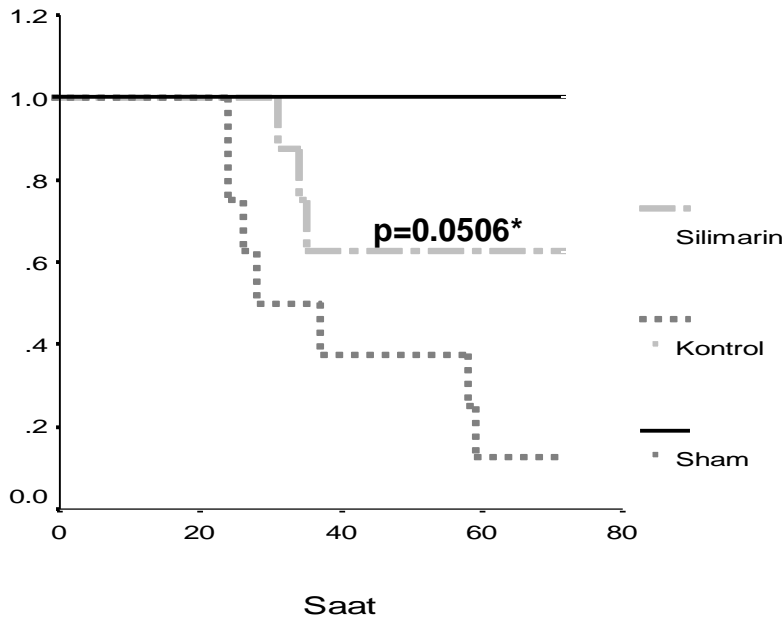
4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan sıçanların ağırlıklarının dağılımında istatistiksel olarak farklılık tespit edilmedi ($p=0.639$) (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Grupların ağırlıklarının dağılımı (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)

	Sham (n=14)	Kontrol (n=16)	Silimarin (n=16)
Ağırlık (g)	342.60 ±27.80 (300-386)	352.00±29.00 (310-400)	350.40±29.10 (302-403)

Yaptığımız çalışmada 72. saatte sağkalım oranları; sham grubunda %100, silimarin grubunda %62.50, kontrol grubunda %12.50'dir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Gruplar için Kaplan Meier sağkalım eğrileri

*Silimarin ile Kontrol grupları için log-rank ile

Akciğer doku örneklerinin yaş ağırlık ortalamaları sham, kontrol ve silimarin gruplarında sırasıyla 0.324 ± 0.124 , 0.517 ± 0.197 , 0.395 ± 0.239 gr; kuru ağırlık ortalamaları sırasıyla 0.069 ± 0.028 , 0.103 ± 0.033 , 0.083 ± 0.045 gr olarak tespit edildi ($p > 0.05$).

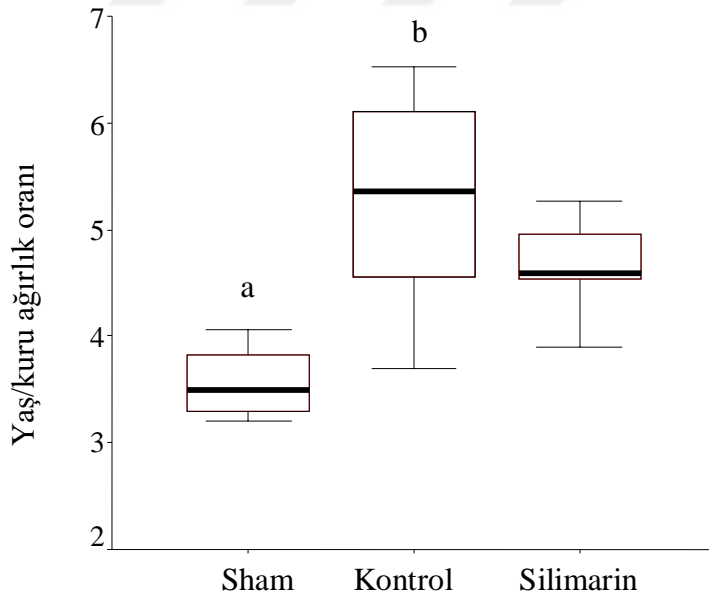
Sham grubunun yaş/kuru ağırlık oranı kontrol ve silimarin gruplarına göre anlamlı olarak düşüktü. Silimarin grubunun yaş/kuru ağırlık oranı da kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (Tablo 4.2, Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Grupların yaş/kuru ağırlık oranı (Ortalama \pm Standart sapma, Minimum-Maksimum)

	Sham (n=14)	Kontrol (n=16)	Silimarin (n=16)
Yaş/kuru ağırlık	3.6 ± 0.3^a (3.2-4.1)	5.3 ± 0.9^b (3.7-6.5)	4.6 ± 0.4 (3.9-5.3)

^a $p < 0.001$ Silimarin ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

^b $p = 0.019$ Silimarin ile karşılaştırıldığında



Şekil 4.2. Grupların yaş/kuru ağırlık oranları

^a $p < 0.001$ silimarin ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında

^b $p = 0.019$ silimarin ile karşılaştırıldığında

Grupların serum sitokin ölçümlerine bakıldığında tüm gruplarda başlangıç (0. saat) serum TNF- α , IL-6 ve IL-1 β değerleri benzer idi ($p>0.05$). 12. saatte ise kontrol ve silimarin gruplarında serum TNF- α , IL-6 ve IL-1 β değerlerinde sham grubuna göre anlamlı yükselme saptandı (tüm karşılaştırmalar için $p<0.001$). Bu yükselme silimarin grubuna göre kontrol grubunda anlamlı olarak daha belirgindi, serum sitokin seviyeleri silimarin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (tüm karşılaştırmalar için $p<0.05$) (Tablo 4.3, Şekil 4.3-5).

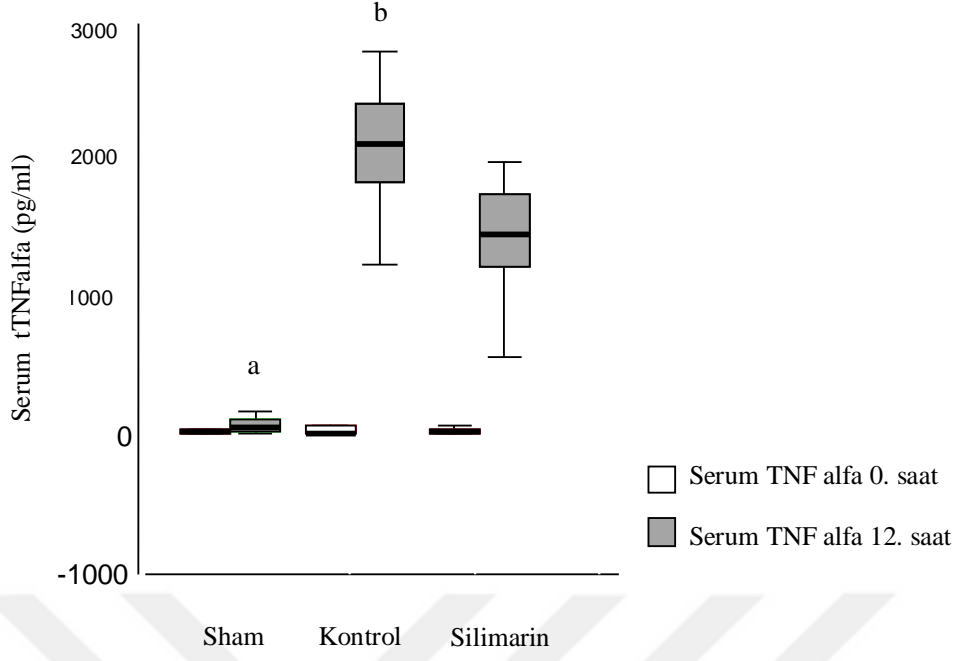
Tablo 4.3. Grupların serum tümör nekroz faktör- α , interlökin-6 ve interlökin-1 β 'nin 0. ve 12. saat ölçümleri (Ortalama \pm Standart sapma, Minimum-Maksimum)

	Sham (n=6)	Kontrol (n=8)	Silimarin (n=8)
Tümör nekroz faktör alfa (pg/ml)			
0.saat	40.07 \pm 23.08 (20.00-82.40)	43.69 \pm 30.15 (18.00-80.80)	38.35 \pm 20.64 (20.00-76.00)
12.saat	71.43 \pm 59.99 ^a (16.00-180.00)	2291.00 \pm 732.30 ^b (1241.00-3654.00)	1439.50 \pm 440.59 (576.00-2000.00)
İnterlökin-6 (pg/ml)			
0.saat	68.05 \pm 53.28 (4.80-131.00)	48.03 \pm 31.35 (1.00-86.40)	51.56 \pm 35.13 (1.50-131.00)
12.saat	79.96 \pm 69.10 ^a (1.00-205.00)	1386.00 \pm 649.03 ^b (440.00-205.00)	601.50 \pm 69.10 (295.00-982.00)
İnterlökin-1 beta (pg/ml)			
0.saat	42.32 \pm 15.52 (23.90-65.50)	37.26 \pm 16.49 (23.90-65.50)	35.00 \pm 13.22 (18.00-55.60)
12.saat	53.04 \pm 26.00 ^a (29.00-89.00)	445.50 \pm 111.58 ^c (353.00-680.00)	297.00 \pm 68.74 (170.00-380.00)

^a $p<0.001$ kontrol ve silimarin ile karşılaştırıldığında

^b $p=0.010$ silimarin ile karşılaştırıldığında

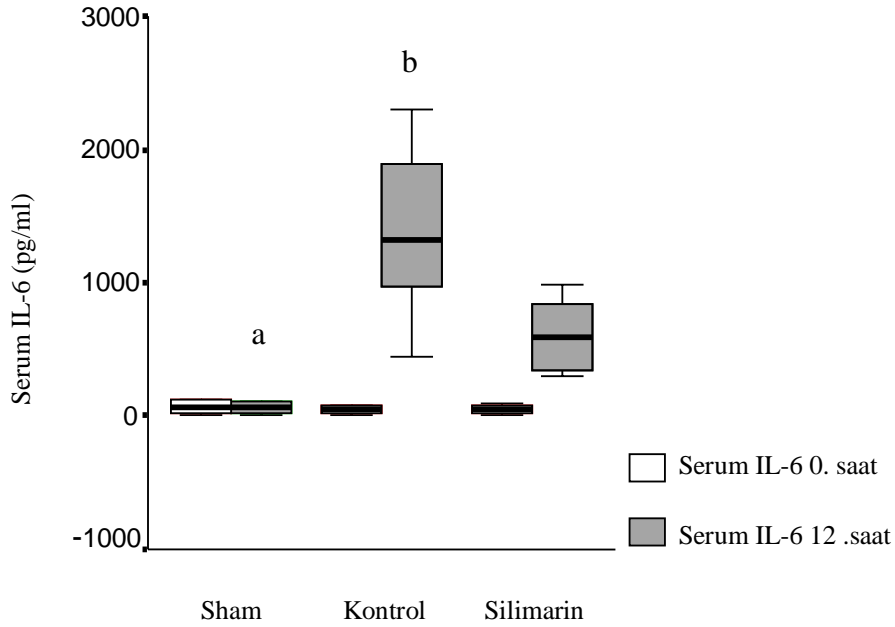
^c $p=0.002$ silimarin ile karşılaştırıldığında



Şekil 4.3. Grupların 0. ve 12. Saat serum tümör nekroz faktör alfa değerleri

^ap<0.001 kontrol ve silimarin ile karşılaştırıldığında

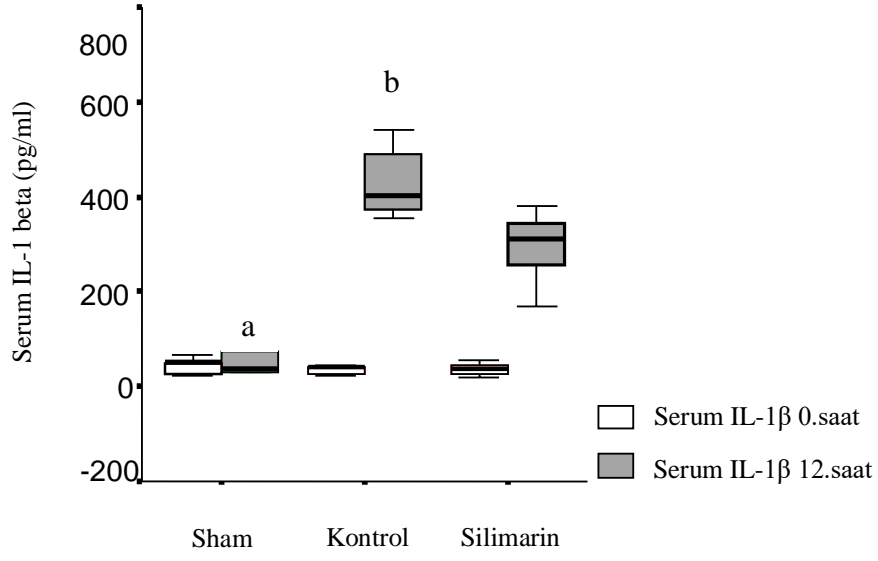
^bp=0.010 saat silimarin ile karşılaştırıldığında



Şekil 4.4. Grupların 0. ve 12. saat serum interlökin-6 değerleri

^ap<0.001 silimarin ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında

^bp=0.010 kontrol ve silimarin grupları ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.5. Grupların 0. ve 12. saat serum interlökin-1 β değerleri
^ap<0.001 saat silmarin ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında
^bp=0.02 saat silimarin ile karşılaştırıldığında

Çalışmamızda bronkoalveoler lavaj başlangıç değerleri (0.saat) arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$), sonuçlar benzerdi. 12. saat TNF- α , IL-6, IL-1 β ölçümleri silimarin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (bütün değerler için $p<0.05$) (Tablo 4.4, Şekil 4.6, 4.7, 4.8.).

Tablo 4.4. Bronko alveoler lavajda 12. saat tümör nekrozis faktör alfa, interlökin-6, interlökin-1beta ölçümleri. (Ortalama \pm Standart sapma, Minimum-Maksimum)

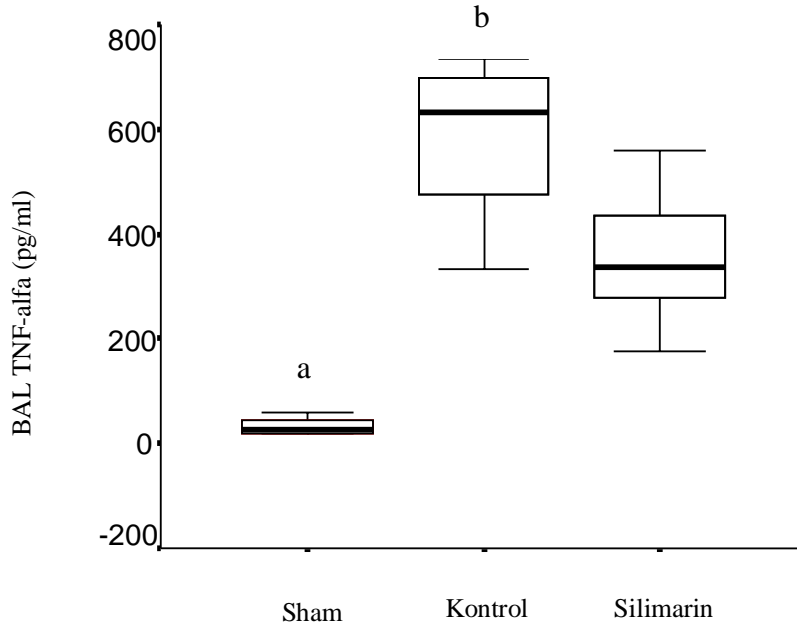
	Sham (n=7)	Kontrol (n=8)	Silimarin (n=8)
Bronkoalveolar lavaj Tümör nekroz faktör alfa (pg/ml)	33.00 \pm 15.76 ^a (18.00-58.00)	584.15 \pm 144.11 ^b (332.20-734.00)	354.62 \pm 126.45 (332.20-734.00)
Bronkoalveolarlavaj İnterlökin-6 (pg/ml)	14.64 \pm 1.23 ^a (13.00-16.30)	129.60 \pm 1.23 ^c (80.00-16.30)	76.10 \pm 34.47 (18.00-101.00)
Bronkoalveolarlavaj İnterlökin-1 beta (pg/ml)	13.74 \pm 1.62 ^a (13.00-15.90)	224.63 \pm 92.91 ^d (80.00-357.60)	122.64 \pm 83.89 (13.00-293.30)

^a $p<0.001$ kontrol ve silimarin gruplarıyla karşılaştırıldığında

^b $p=0.010$ kontrol ve silimarin karşılaştırıldığında

^c $p=0.005$ kontrol ve silimarin karşılaştırıldığında

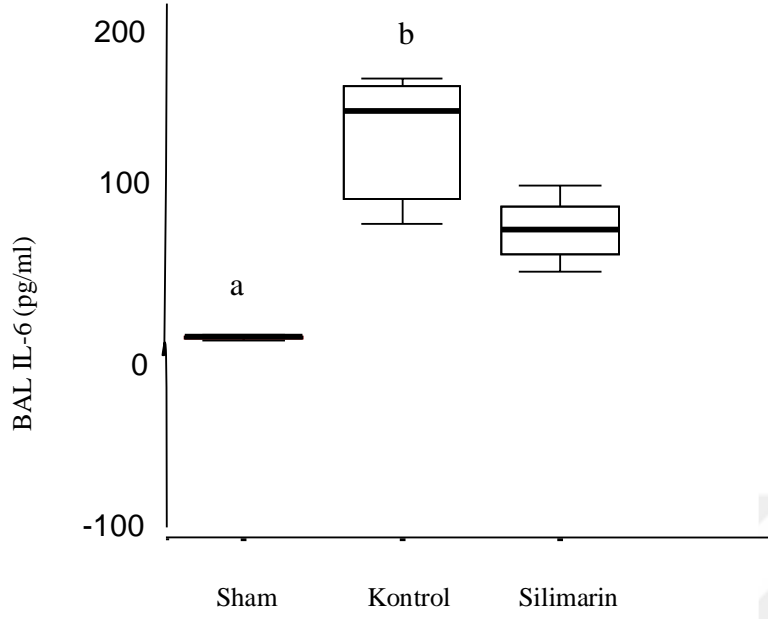
^d $p=0.028$ kontrol ve silimarin karşılaştırıldığında



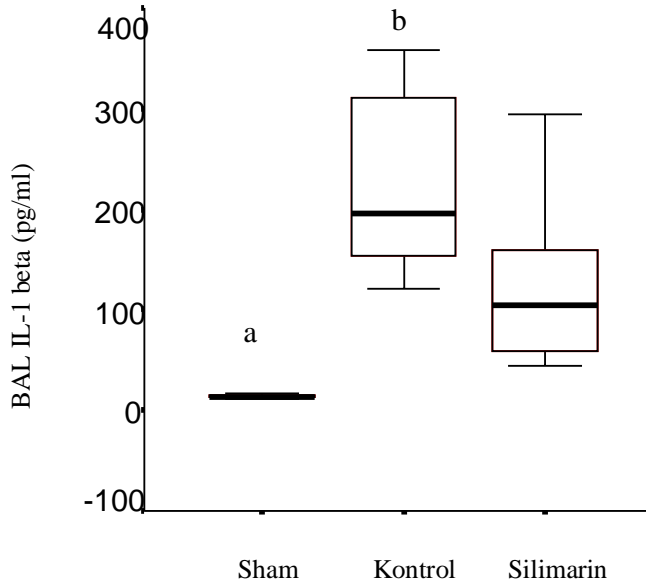
Şekil 4.6. Bronko alveoler lavajda tümör nekrotizan faktör- α değerleri

^a $p<0.001$ silimarin ve kontrol grupları ile karşılaştırma yapıldığında

^b $p=0.010$ kontrol ve silimarin grupları arasında karşılaştırma yapıldığında



Şekil 4.7. Bronko alveoler lavajda interlökin-6 değerleri
^ap<0.001 sham ve kontrol grupları ile karşılaştırma yapıldığında
^bp=0.005 kontrol ve silimarin grupları arasında karşılaştırma yapıldığında



Şekil 4.8. Bronko alveoler lavajda interlökin-1 beta değerleri
^ap<0.001 sham ve kontrol grupları ile karşılaştırma yapıldığında
^bp=0.028 kontrol ve silimarin grupları arasında karşılaştırma yapıldığında

Gruplar histopatolojik olarak değerlendirildiğinde sham grubunda önemli bir akciğer hasarı saptanmadı. Diğer iki grupta ise sham grubuna göre ödem, hemoraji, bronş epitel hasarı, nötrofil infiltrasyonu ve toplam patoloji skoru ile değerlendirilen histopatolojik hasar anlamlı olarak belirgindi (tüm karşılaştırmalar için $p<0.001$). Sadece hiyalen membran oluşumu her üç grupta da ihmal edilebilir düzeyde idi. Ödem, nötrofil infiltrasyonu ve patoloji skoru açısından kontrol grubunda silimarin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo 4.5.).

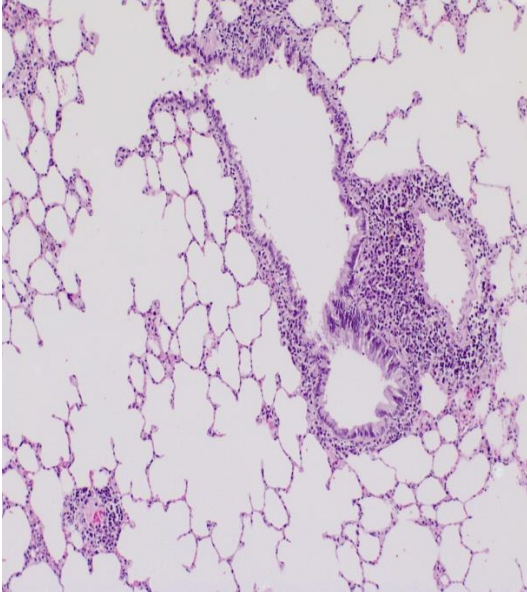
Tablo 4.5. Grupların histopatolojik bulguları (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)

	Sham (n=14)	Kontrol (n=16)	Silimarin (n=16)
Ödem	0.21±0.42 ^a (0-1)	2.93±0.85 ^a (2-4)	1.81±0.66 (1-3)
Hemoraji	0.21±0.42 ^a (0-1)	2.81±0.91 (2-4)	2.31±0.70 (1-4)
Bronş Epitel Hasarı	0.64±0.50 ^a (0-1)	2.68±1.01 (1-4)	2.18±0.66 (1-4)
Hiyalen Membran Hasarı	-	0.06±0.25 (0-1)	-
Nötrofil İnfiltrasyonu	0.71±0.47 ^a (0-1)	2.75±0.77 ^b (2-4)	1.87±0.50 (1-3)
Patoloji Skoru	1.78±0.97 ^a (0-3)	11.25±2.70 ^a (8-16)	8.18±0.91 (7-10)

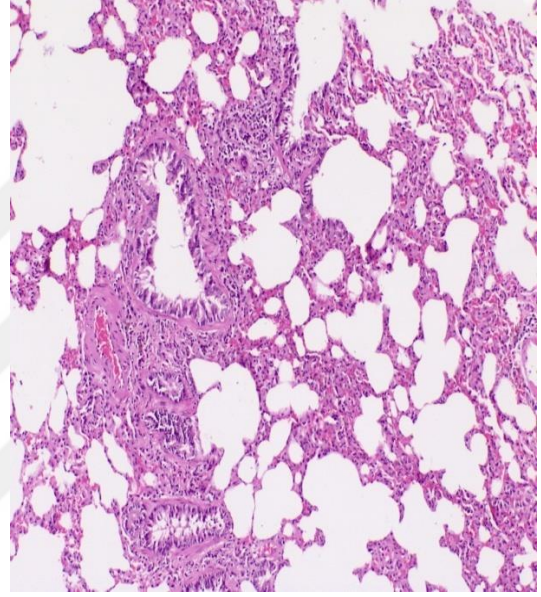
^a $p<0.001$ silimarin ile karşılaştırıldığında

^b $p=0.003$ silimarin ile karşılaştırıldığında

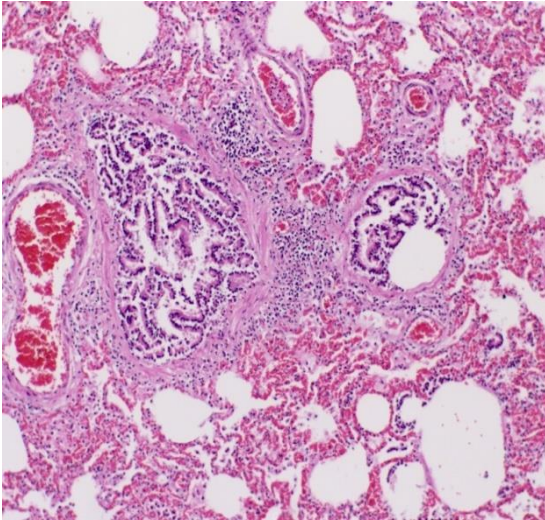
Sham grubu akciğer dokusunda; hafif şiddette bronşiyol epitel hasarı, interstisyel ödem ve hemoraji (H&E, x200 büyük büyütme) (Şekil 4.9), silimarin grubu akciğer dokusunda; orta şiddette bronşiyol epitel hasarı, interstisyel ödem ve hemoraji (H&E, x200 büyük büyütme) görülmekte (Şekil 4.10). Kontrol grubu akciğer dokusunda ise; şiddetli bronşiyol epitel hasarı, interstisyel ödem ve hemoraji (H&E, x200 büyük büyütme) görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.9. Hafif hasarlı akciğer dokusu



Şekil 4.10. Orta derecede hasarlı akciğer dokusu



Şekil 4.11. Şiddetli hasarlı akciğer dokusu

Akciğer dokusu GSH değerleri kontrol ve silimarin gruplarına göre sham grubunda daha yüksek idi (her iki karşılaştırma için $p \leq 0.001$). Kontrol grubuna göre silimarin grubunun ortalama akciğer dokusu GSH değeri kontrol grubuna göre daha yüksek ölçüldü ($p=0.021$). Akciğer dokusu MDA ölçümlerinde sham grubu ile karşılaştırıldığında diğer iki grupta daha yüksek ortalama değerler bulundu (her iki karşılaştırma için $p \leq 0.011$). Silimarin ve kontrol grupları karşılaştırıldığında ise akciğer dokusu ortalama MDA değeri silimarin grubunda daha düşüktü ($p=0.014$). (Tablo 4.6, Şekil 4.9, Şekil 4.10.).

Tablo 4.6. Grupların malondialdehit ve glutatyon-sülfidril değerleri (Ortalama±Standart sapma, Minimum-Maksimum)

	Sham (n=7)	Kontrol (n=8)	Silimarin (n=8)
Malondialdehit (nmol/g)	13.10±3.59 ^{a, b} (8.90-17.90)	39.54±10.55 ^c (26.50-56.20)	26.35±7.92 (16.60-38.90)
Glutatyon-sülfidril (mg/ml)	2.57±0.52 ^{a, d} (1.90-3.30)	1.12±0.32 ^e (0.80-1.80)	1.98±0.27 (1.70-2.40)

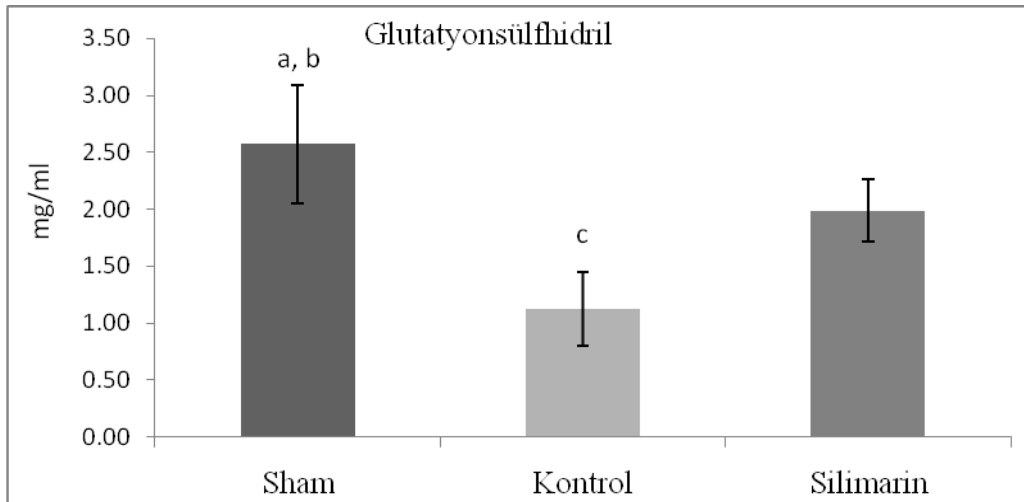
^a $p < 0.001$ kontrol ile karşılaştırıldığında

^b $p = 0.011$ silimarin ile karşılaştırıldığında

^c $p = 0.014$ silimarin ile karşılaştırıldığında

^d $p = 0.001$ silimarin ile karşılaştırıldığında

^e $p = 0.021$ silimarin ile karşılaştırıldığında

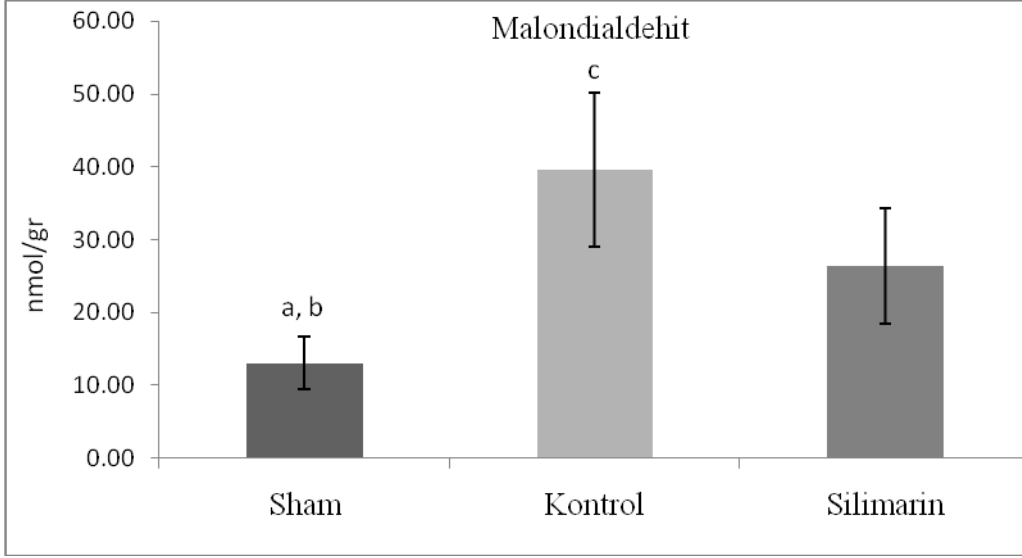


Şekil 4.12. Grupların glutatyon-sülfidril ölçümleri

^a $p < 0.001$ kontrol ile karşılaştırıldığında

^b $p = 0.001$ silimarin ile karşılaştırıldığında

^c $p = 0.021$ silimarin ile karşılaştırıldığında



Şekil 4.13. Grupların malondialdehit ölçümleri

^ap<0.001 kontrol ile karşılaştırıldığında

^bp=0.014 silimarin ile karşılaştırıldığında

^cp=0.011 silimarin ile karşılaştırıldığında

5. TARTIŞMA

Sepsise bağlı ALI/ARDS oluşturulan bu sıçan çekal ligasyon-perforasyon modelinde silimarin'in akut akciğer hasarını azaltabileceği gösterildi. Silimarin ile sepsise bağlı akciğer hasarının azalması ile beraber hayvanların mortalitesinde de azalma saptandı ($p=0.0506$). Silimarin alan hayvanlarda yaş/kuru akciğer ağırlık oranı, serum ve BAL TNF-alfa, IL-1 beta ve IL-6 ile belirlenen sistemik ve akciğerlerdeki inflamatuvar yanıt kontrol grubuna göre daha düşüktü (tüm karşılaştırmalar için ($p<0.05$)). Yine histopatolojik incelemede de silimarin grubunda ödem, hemoraji, bronş epitel hasarı, ve nötrofil infiltrasyonuna anlamlı olarak daha az rastlandı. Silimarin grubunda GSH'nin daha yüksek, MDA'nın ise daha düşük oluşu bu ilacın bu modeldeki olumlu etkilerinin muhtemel mekanizması hakkında fikir vermiştir.

Sağkalım analizi, mortalite hızının yüksek olduğu durumlarda ilaç etkinliğinin araştırılmasında önemli bir belirleyicidir. Bu çalışmada 72 saatlik izlemin sonunda silimarin grubunda sağkalım %62.5, kontrol grubunda ise %12.5 olarak bulundu. Her ne kadar bu oranlar istatistiksel anlamlılık açasından sınırdaki bulunsada ($p=0.0506$) sağkalım analizi yapılan gruplarda sadece 8'er hayvan olması bu verileri dikkat çekici kılmaktadır (Şekil 4.1). Silimarin'in sepsis durumunda mortalite üzerindeki bu olumlu etkisi başka bir çalışmada da gösterilmiştir. Kang ve arkadaşları (7) bir LPS fare sepsis modelinde silimarinin etkinliğini inceledikleri çalışmada, her grupta 15 fare olmak üzere fareler üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna yalnız 15 mg/kg LPS intraperitoneal, diğer gruba intraperitoneal LPS ve 100 mg/kg/gün oral silimarin verilmiş. Silimarin LPS verilmeden 2 saat önce ve LPS ile aynı zamanda verilmiş. Fareler 60 saat takip edilerek yaşam analizi yapılmış. Sadece LPS verilen grupta 48. saatte sağkalım %5 iken silimarin grubunda %33 olarak bulunmuş. Otuzuncu saatte yaşam analizi silimarin ile tedavi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş ($p<0.05$) (7). Mevcut çalışma ile Kang ve arkadaşlarının (7) çalışması sepsis durumunda silimarinin mortalite üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ancak deneysel modellerde elde edilen bu olumlu sonuçların klinik çalışmalar ile doğrulanması gerekmektedir.

Bu çalışmada akciğerde sepsise bağlı oluşan hasar ve inflamasyonun göstergelerinden olan akciğer yaş/kuru ağırlık oranı kullanıldı. Yaş/kuru ağırlık oranları inflamasyon sonucunda akciğerlerde oluşan doku ödeminin gösteren en önemli bulgulardandır. Birçok çalışma bu

parametreyi akciğer inflamasyonunun derecesini belirlemek için kullanmıştır (37,42). Bu çalışmada silimarin grubunda yaş/kuru ağırlık oranının daha düşük bulunması silimarinin sepsise bağlı akciğer hasarı tablosunu hafiflettiğini göstermektedir.

Akut akciğer hasarının oluşmasında proinflamatuvar sitokinler anahtar rol üstlenirler (46). Bu nedenle de birçok deneysel ve klinik farmakolojik girişim bu sitokinlerin baskılanmasına odaklanmıştır. Bu çalışmada silimarin kullanımı ile hem serum TNF-alfa, IL-1 beta ve IL-6 seviyeleri ile değerlendirilen sistemik inflamatuvar yanıt hem de yine aynı sitokinlerin BAL konsantrasyonunun ölçümü ile incelenen akciğer inflamasyonu anlamlı derecede baskılanabildi (bütün değerler için $p < 0.05$) (Şekil 4.3-5. Tablo 4.3). Silimarin bu etkilerini muhtemelen proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesinde önemli rol oynayan NF- κ B'yi baskılayarak göstermektedir. Silimarin'in antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkisinin moleküler temeli henüz tam anlaşılamamıştır (10,39). Silimarin forbol ester, LPS ve okadoik asit, c-seramid ile olan NF- κ B aktivasyonunu inhibe eder. Buna karşın H_2O_2 'nin indüklediği NF- κ B aktivasyonunu anlamlı olarak etkilemez (10). Silimarin TNF- α 'nın indüklediği *mitogen-activated* proteinkinaz ve c-Jun N terminal kinazı aktive ve TNF- α 'nın indüklediği sitotoksisteyi ve çapraz reaksiyonu inhibe eder (10). NF- κ B ve kinazların inhibisyonu silimarin'in antiinflamatuvar etkisinin bir parçasıdır. Lipopolisakkaritle stimüle edilen makrofajlarda silimarin PGE2 üretimini inhibe eder (47). Burada NF- κ B rol oynar. Silimarin'in IL-1 ve PGE2 üretimini inhibe edici etkisi NF- κ B/Rel DNA bağlanmasını inhibe ederek olmaktadır (7). Silimarin'in doza bağımlı olarak lipopolisakkaritle indüklenmiş sepsisi inhibe edici etkisi farelerin peritoneal makrofajlarında IL-1 beta ve PGE2 üretimini inhibe ederek sağladığı gösterilmiştir (40). LPS uygulanmadan 2 saat önce ve hemen önce olmak üzere 50 mg/kg 2 doz silimarin oral verilmiş, 60 saat takip yapılmış. Silimarin' in LPS'le indüklenmiş IL-1 beta ve PGE2 üretimini %84 ve %91 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir (7,40).

NF- κ B LPS tarafından iNOS geni indüklenebilmesini sağlayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (40,48). NF- κ B; IL-1 beta, TNF-alfa, NO ve PGE2 gibi pek çok inflamatuvar mediyatörün üretimini artırmasına aracılık eder (7,40,49). Silimarin NF- κ B'yi inhibe ederek inflamatuvar kaskadı bozmaktadır, bu sayede sepsis ve ALI/ARDS'de aşırı inflamasyon önlenmekte ve hastalığın şiddeti azalmaktadır. Çalışmamızda inflamatuvar etkinin şiddetini belirlemek için inflamatuvar mediyatörlerden serumda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ile BAL'da IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyeleri değerlendirildi. LPS ile indüklenen farelerde serum ve

BAL örneklemelerinde kontrol grubu ve silimarin grubu değerleri karşılaştırıldığında bütün inflamatuvar mediyatörler için silimarin grubunda anlamlı olarak değerler daha düşüktü. İnflamatuvar etki daha az belirgindi ve hastalığın şiddeti silimarin grubunda anlamlı olarak daha azdı.

Halen akut akciğer hasarında inflamatuvar kaskad oldukça karmaşıktır. Bu konu ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. ALI/ARDS'de inflamatuvar mekanizma patofizyolojide büyük rol oynadığı için tedavide inflamatuvar mekanizmayı kırmaya yönelik pek çok antiinflamatuvar madde çalışılmıştır. Pirat ve arkadaşları (37) iskemi ve reperfüzyon yöntemi ile akut akciğer hasarı oluşturdukları sıçanlarda simvastatin ile ön tedavi yaparak akut akciğer hasarını azaltmışlar. Çalışmada sıçanlar 3 gruba ayrılmışlar ve simvastatin grubuna 10 mg/kg dozda 3 gün oral simvastatin verilmiş. Son doz iskemi reperfüzyon prosedürü uygulanmadan 1 saat önce verilmiş. Süperior mezenterik arter 60 dakika klemplendikten sonra 90 dakika reperfüzyon yapılarak akut akciğer hasarı gelişimi sağlanmış. Serum ve BAL sitokin seviyeleri simvastatin grubunda anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (37).

Coimbra ve arkadaşları (50) sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada pentoksifilin'in akciğer hasarı üzerindeki etkisine bakmışlar. Sham grubuna sadece salin, kontrol grubuna sadece 5 mg/kg intravenöz LPS ve pentoksifilin grubuna da LPS ile beraber 25 mg/kg pentoksifilin verilmiş. 4 saat sonra BAL sıvısı ve doku örnekleri alınmış. LPS'le indüklenmiş sepsise bağlı akciğer hasarında fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin kullanarak inflamatuvar madde salınımını azaldığı ve daha sınırlı organ hasarı görüldüğü saptanmıştır.

Ayan ve arkadaşları (51) peroksinitrit vererek akut akciğer hasarı gelişimini sağladıkları sıçanlarda antiinflamatuvar olan lornoksikam kullanmışlar. Sıçanları üç gruba ayırmışlar ve intratrakeal peroksinitrit enjeksiyonu ile akciğer hasarı gelişimi sağlamışlar. Peroksinitrit enjeksiyonunda 24 saat önce lornoksikam grubundaki sıçanlara intraperitoneal lornoksikam verilmiş. Çalışma 48 saatlik takibin ardından sonlandırılmış. Sonuçta serum MDA seviyesi, serum ve BAL sitokin seviyeleri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.

Singleton ve arkadaşlarının (52) çekal ligasyon-perforasyon yöntemini kullanarak sepsis sonrası akciğer hasarı geliştirdikleri sıçanlarda glutamin ve salin'i karşılaştırmışlar. Glutamin grubunda 18, salin grubunda da 17 sıçan çalışmaya alınmış. Çekal-ligasyon

perforasyon yöntemi 20 G iğne ile 2 adet delik açılarak fekal materyalin çıkışı gözlenerek yapılmış. Bütün sıçanlara 20 ml/kg salin verilerek sıvı resüsitasyonu yapılarak karın kapatılmış. Çekal ligasyon-perforasyon işlemi uygulandıktan 1 saat sonra glutamin 0.75 mg/kg dozda verilmiş. Çalışmada glutamin grubunda akciğerde histopatolojik değişiklikler daha az, inflamatuvar sitokin seviyeleri anlamlı olarak daha düşük, NF-κB seviyesi daha düşük ve sağ kalım daha yüksek bulunmuş.

Mediyatör ve sitokinlerin sepsis ve akut akciğer hasarının patofizyolojisindeki öneminin anlaşılmasıyla araştırmalar serbest radikaller ve antioksidanlar üzerine yoğunlaştırılmıştır. Serbest radikaller, sitokinlerin sentezini tetikleyerek akut akciğer hasarında rol oynarlar. Normal şartlarda SOD, CAT ve glutatyon gibi endojen antioksidanlar radikalleri temizler ve akciğerler korunur. Akut akciğer hasarında hem reaktif oksijen ürünlerinde artış, hem de radikal temizleyici sistemde azalma vardır. Oksidan hasar kritik hastalarda sağkalımı azaltan faktörlerdendir (30). Reaktif oksijen radikalleri antioksidan savunma sistemi ile temizlenir, antioksidanlar akciğerde nötrofil sekestrasyonunu önler (30,31).

Günümüzde sepsis ve buna bağlı akut akciğer hasarında tedavinin temelini antimikrobik ve destekleyici tedavi oluşturmaktadır. Oksidan ajanların rolünün anlaşılmasıyla tedavi antioksidan yöne kaymaktadır. Yapılan çalışmalarda sepsiste ortaya çıkan serbest radikallerin etkilerini nötralize etmek için antioksidan ajanlar kullanılmaktadır. Çalışmamızda ALI/ARDS'de oksidan hasarı akciğer dokusunda MDA ve GSH ölçümleri yaparak değerlendirdik. Silimarin grubunda oksidan hasarın daha az olduğunu gördük. MDA değerleri anlamlı olarak kontrol grubundan daha düşük ($p=0.011$), GSH değerleri ise daha yüksekti ($p=0.001$) (Şekil 4.12, 13. Tablo 4.6). Silimarin serbest radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu önler ve membran stabilizatörüdür; bu sayede antioksidan özelliğidir (53). Sisplatin, amiadaron, dietilnitrosamin gibi oksidan hasara yol açan maddeleri kullanarak hepatotoksisite gelişmiş ratlarda antioksidan özelliği ile koruyuculuğu gösterilmiştir (54-56).

Pradeep ve arkadaşları da (54) sıçanlarda silimarin'in antioksidan özelliğini değerlendirmişler. Çalışmalarında dietilnitrozamin kullanarak sıçanlarda oksidatif hasar gelişimini sağlamışlar. Her grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 grup çalışmaya alınmış. I. Gruba salin ile propilen glikol 30 gün, II. Gruba 200 mg/kg intraperitoneal dietilnitrozamin tek doz, III. Gruba dietilnitrozamin tek doz verildikten sonra 50 mg/kg oral silimarin ile

propilen glikol 30 gün, IV. Gruba ise sadece 50 mg/kg oral silimarin ile propilen glikol 30 gün verilmiş. Sonuçta I. Grupta karaciğer enzimleri 2 kat, II. Grupta 3 kat artarken III. Grupta dinitrozamin'le olan yükselme anlamlı olarak geri çevrilmiş. Lipit peroksidasyonu anlamlı olarak baskılanmış, antioksidan enzim seviyeleri normale yakın seviyeye dönmüş. Bu çalışma dinitrozamin'in karaciğer hasarını silimarin'in antioksidan özelliği sayesinde önlediğini gösteren ilk çalışma olarak literatürde yerini almıştır.

Agoston ve arkadaşları (56) amiodoron'un oksidan hasar yapan etkisini önlemek için vitamin E ve silimarin vermişler. 3 hafta boyunca 150 mg/kg amiodoron verilen sıçanlardan bir gruba 60 mg/kg silimarin, bir gruba 100 mg/kg vitamin E verilirken, bir gruba da başka ilaç verilmemiş. Silimarin ve E vitamini verilen grupta karaciğer amiodoron seviyesi daha düşük bulunmuş, amiodoron'un indüklediği lizozomal fosfolipidozis azalmış. Başka bir çalışmada silimarin kullanımında anlamlı olarak oksidan hasarın daha az olduğu, karaciğer dokusunun daha iyi korunduğu gösterilmiş. Silimarin karaciğerde lipid peroksidasyonunu inhibe ederek, serbest radikalleri temizleyerek antioksidan etki göstermekte ve iNOS aktivitesini de azaltmaktadır (55).

Henüz basılma aşamasında olan Toklu ve arkadaşlarının (53) çalışmasında sepsis kaynaklı akut akciğer ve beyin hasarında silimarin'in antioksidan özelliği değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sepsis modeli olarak çekal ligasyon-perforasyon kullanılmış. Çekal ligasyon-perforasyon uygulanan sıçanlardan bir gruba 150 mg/kg N-asetilsistein intraperitoneal, diğer gruba da 50 mg/kg silimarin oral verilmiş. Tedaviye 10 gün önce başlanmış ve cerrahi işlemden 6 saat sonra da sıçanlardan kan örnekleri alınmış ve 1 haftanın sonunda sakrifiye edilerek doku örnekleri alınmış. Sonuçta serum ve BAL sitokin seviyeleri anlamlı olarak silimarin ve N-asetilsistein grubunda kontrol grubundan düşük bulunmuş. Sağkalım 1 haftanın sonunda silimarin grubunda %62.5, N-asetilsistein grubunda %75 ve sepsis grubunda %25 olarak tespit edilmiş. Doku MDA seviyesi daha düşük ve GSH seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Akciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde silimarin ve N-asetilsistein grubunda anlamlı olarak hasar daha az tespit edilmiş. Sonuçta bu çalışmada silimarin'in sepsis kaynaklı organ hasarının önlenmesinde oksidan-antioksidan dengeyi ayarlayarak etkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Biz de çalışmamızın verilerine dayanarak silimarin'in sepsis kaynaklı organ hasarında antiinflamatuvar, antioksidan özellikleri ile etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Bizim alışmamızda akciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde ödem, hemoraji, histopatolojik skorlama, yař/kuru ağırlık oranı silimarin grubunda anlamlı olarak daha dūřüktü (bütün değerler için $p < 0.05$), (Tablo 4.5). Bu da akciğerde inflamatuvar hasarın daha az olduğunu gösteren önemli bulgulardandır. Silimarin sitokin salınımını bloke eder, nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder, dokularda myeloperoksidaz aktivitesini azaltır. Silimarin'in koruyucu etkisiyle inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve sitokin salınımı inhibe olur. Sepsis sistemik inflamatuvar ve koagülatif yanıtta bozuklukla seyreder. Koagülasyon ve fibrinolizis mekanizmalarındaki bozulma sepsisin majör patogenetik özelliklerindedir. Tromboplastik aktivitede artma, akciğer dokusunda tromboplastin seviyesinde azalma histolojik olarak vasküler konjesyonla sonuçlanır. Silimarin antioksidan etkisiyle lipit peroksidasyonunu önler, membran bütünlüğünü korur ve tromboplastik aktiviteyi normalize eder (53). Bu sayede hasarlı dokuda konjesyonu azaltır, ödem gelişimini yavaşlatır. Bu zellikleri ile silimarin'in akciğer hasarını önlemede etkili olduğunu dūřünmekteyiz.

6. SONUÇ

Çalışmamızda silimarin sepsise bağlı akut akciğer hasarında inflamatuvar mekanizmaları inhibe ederek mortaliteyi azalttığı ve sağkalımı yükselttiği görülmektedir.

Silimarin'in serumda ve BAL'da inflamatuvar mediyatörlerin salınımını inhibe ederek akciğer hasarı gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir.

Silimarin sitotoksisiteyi inhibe eder ve serbest radikalleri temizleyerek antioksidan özelliği ile akciğerde oksidan hasarı önlemektedir.

Antiinflamatuvar özelliğinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamış olsa da bu konu ile ilgili yeni çalışmalar yapılabileceğini düşünmekteyiz. Bizim çalışmamız silimarin'in akut akciğer hasarında antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinin gösterilmeye çalışıldığı ilk çalışmalardandır.

7. KAYNAKLAR

1. Ünal N. Akut akciğer hasarı/akut respiratuar distres sendromunda (ALI/ARDS) patogenez/patofizyoloji ve mekanik ventilasyon ile ilişkili akciğer hasarı (VALI). Yoğun Bakım Der Derg 1: 6-21, 2002.
2. Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. Thorax 57: 540-546, 2002.
3. Raijmakers PG, Rauwerda JA, Teule GJ, Hack CE. Acute lung injury after aortic surgery: the relation between lung and leg microvascular permeability to 111 indium-labelled transferrin and circulating mediators. Thorax 52: 866-871, 1997.
4. Özyurt Y, Recep Demirhan, Zuhul Arıkan. Akut respiratuar distres sendromu. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 10: 126-130, 2002.
5. Rainone F. Milk thistle. American Family Physician 72: 1285-1288, 2005.
6. Morazzoni P, Bombardelli E. Silybum marianum (Carduus marianus). Fitoterapia 64: 3-42, 1995.
7. Kang JS, Park SK, Yang KH, Kim HM. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1 beta and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. Biochem Pharmacol 67: 175-181, 2004.
8. Meduri GU, Muthiah MP, Carratu P, Eltorkey M, Chrousos GP. Nuclear factor-kappaB and glucocorticoid receptor alpha-mediated mechanisms in the regulation of systemic and pulmonary inflammation during sepsis and acute respiratory distress syndrome. Evidence for inflammation-induced target tissue resistance to glucocorticoids. Neuroimmunomod 12: 321-338, 2005.
9. Martin TR. Cytokines and lung injury: searching for useful biomarkers. Crit Care Med 33: 230-232, 2005.
10. Vladimir K, Walterova D. Silybin and silymarin new effect and applications. Biomed Papers 149: 29-41, 2005.
11. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. Am J Respir Cell Mol Biol 33: 319-327, 2005.
12. Aslan TA, Özçelik U. Akut respiratuar distres sendromu. Çocuk Sağlığı ve Hast Derg 47: 209-221, 2004.
13. Marino PL. Intensive care book. 2. baskı, İstanbul , Logos Tıp Yayıncılık, 185-193, 2002.
14. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med 342: 1334-1349, 2000.

15. Irwin RS, Rippe JM. Intensive Care Medicine. Fifty edition, Boston, Lipincott Williams and Wilkins, 481-501, 2003
16. Bone RC GC, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the process. Chest 112: 235-243, 1997.
17. Fulkerson WJ, MacIntyre N, Stamler J, Crapo JD. Pathogenesis and treatment of the adult respiratory distress syndrome. Arch Intern Med 156: 29-38, 1996.
18. Gunther A, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Pathophysiology of acute lung injury. Semin Respir Crit Care Med 22: 247-258, 2001.
19. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. Crit Care Med 31: S195-199, 2003.
20. Zhang H, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. Intensive Care Med 26: 474-476, 2000.
21. Fan J, Shek PN, Suntres ZE, Li YH, Oreopoulos GD, Rotstein OD. Liposomal antioxidants provide prolonged protection against acute respiratory distress syndrome. Surgery 128: 332-338, 2000.
22. Gunther A, Lubke N, Ermert M, Schermuly RT, Weissmann N, Breithacker A, Markart P, Ruppert C, Quanz K, Ermert L, Grimminger F, Seeger W. Prevention of bleomycin-induced lung fibrosis by aerosolization of heparin or urokinase in rabbits. Am J Respir Crit Care Med 168: 1358-1365, 2003.
23. Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG, Courtney Broaddus V, Matthay MA. Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. Am J Respir Crit Care Med 160: 1450-1456, 1999.
24. Matthay MA, Robriquet L, Fang X. Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. Proc Am Thorac Soc 2: 206-213, 2005.
25. Suratt BT, Parsons PE. Mechanisms of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. Clin Chest Med 27: 579-589, 2006.
26. Claude A, Plantadosi M, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. Ann Intern Med. 141: 460-470, 2004.
27. Ware LB. Advances in the pathogenesis and treatment of the acute respiratory distress syndrome. Clinical Pulmonary Med 10: 208-218, 2003.
28. Lang JG, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. Chest 122: 314-320, 2002.
29. Demirbilek S, Karaman A, Karadağ N, Bayraktar N, Türkmen E, Ersoy MÖ. Septik ratlarda metilen mavisinin akciğer hasarı üzerine etkileri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg 11: 207-212, 2004.

30. Kiss J, Savunen T. Antioxidant combined with NO donor enhance systemic inflammation in acute lung injury in rats. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 41: 186-191, 2007.
31. Yang C, Takase J, Ishitsuka Y, Irikura M, Irie T. Oxidative stress in early stage of acute lung injury induced with oleic acid in guinea pigs. *Biol Pharm Bull* 26: 424-428, 2003.
32. Yılmaz S. Karbon tetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve pirovat kinaz aktiviteleri. *Türk J Vet Anim Sci* 24: 25-28, 2000.
33. Luh SP, Chiang CH. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B* 8: 60-69, 2007.
34. Calfee C. Nonventilatory treatment for acute lung injury and ARDS. *Chest* 131: 913-921, 2007.
35. Roy GB, Ware LB, Berthiaume Y, Matthay MA. Treatment of ARDS. *Chest* 120: 1347-1367, 2001.
36. Meduri GU, Leeper KV. Corticosteroid rescue treatment of progressive fibroproliferation in late ARDS: patterns of response and outcome. *Chest* 105: 1516-1527, 1994.
37. Pirat A, Zeyneloglu P, Aldemir D, Yucel M, Ozen O, Candan S, Arslan G. Pretreatment with simvastatin reduces lung injury related to intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Anesth Analg* 102: 225-232, 2006.
38. Matthay MA. Severe sepsis: a new treatment with both antikoagulant and antiinflammatuar properties. *N Engl J Med* 344: 759-762, 2001.
39. Rainone F. Milk Thistle. *American Family Physician* 72: 1285-1288, 2005.
40. Jong S, Kang YJJ, Hwan M. Kim, Seung H. Han and Kyu-Hwan Yang. İnhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacology* 302: 138-144, 2002.
41. Wichterman KA, Chaudry IH. Sepsis and septic shock-A review of laboratory models and proposal. *Journal of surgical research* 29: 189-201, 1980.
42. Babayigit H, Kucuk C, Sozuer E, Yazici C, Kose K, Akgun H. Protective effect of beta-glucan on lung injury after cecal ligation and puncture in rats. *Intensive Care Med* 31: 865-870, 2005.
43. Beauge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310, 1978.
44. Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77, 1959.

45. Lowry OH, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
46. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 602-611, 1996.
47. Santangelo S, Gamelli RL, Shankar R. Prostaglandin E2 receptor antagonist (SC-19220) treatment restores the balance to bone marrow myelopoiesis after burn sepsis. *J Trauma* 48: 826, 2000.
48. Xie QW, Nathan C. Role of transcription factor NF-KB/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 225-228, 1994.
49. Bohrer H NP. Nuclear factor kappaB-a new therapeutic approach? *Intensive Care Med* 24: 1129-1130, 1998.
50. Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, Porcides RD, Wolf P, Tobar M, Hoyt DB. LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappaB, and ICAM-1 expression. *J Trauma* 60: 115-125, 2006.
51. Ayan E, Koksel O, Tamer L, Karabacak T, Ayaz L, Ozdulger A. Efficiency of lornoxicam in lung and trachea injury caused by peroxynitrite. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007.
52. Singleton KD, Beckey VE, Wischmeyer PE. Glutamine prevents activation of NF-kappaB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents Acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. *Shock* 24: 583-589, 2005.
53. Toklu HZ, Akbay TT, Ogunc AV, Ercan F, Gedik N, Uysal KM, Sener G. Silymarin, the antioxidant component of *silybum marianum*, prevents sepsis induced acute lung and brain injury. *J Surg Research* 2007.
54. Pradeep K, Gobianand K, Karthiyekan S. Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylntrosamine induced oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol.* 560: 110-116, 2007.
55. Mansour H, Fhamy NM. Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biocemistry and moleculer biology* 39: 656-661, 2006.
56. Agoston M, Feher H, Hagymasi K, Orosz Z, Blazovics A, Feher J, Vereckei A. Silymarin and vitamin E reduce amiodarone-induced lysosomal phospholipidosis in rats. *Toxicology* 190: 231-241, 2003.