

Deneyisel aortik iskemi-reperfüzyonda beta-glukanın böbrek hasarı üzerine etkisi

The effect of beta-glucan on kidney injury in experimental aortic ischemia-reperfusion

Şenol Gülmen,¹ Duygu Kumbul Doğuç,² Berit Gökçe Ceylan,³ Nesibe Kahraman Çetin,⁴
İbrahim Meteöğlü,⁴ Hüseyin Okutan,¹ Ahmet Öcalı⁵

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı,

²Biyokimya Anabilim Dalı, ³Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Isparta;

⁴Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Aydın;

⁵Özel Konak Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Bölümü, Kocaeli

Amaç: Bu deneysel çalışmada, sıçan infrarenal abdominal aortunda (İAA) oklüzyon-reperfüzyon sonrası böbreklerde oluşan iskemi reperfüzyon (İR) hasarı üzerine β-glukanın etkisi araştırıldı.

Çalışma planı: Otuz iki adet Wistar Albino cinsi sıçan rastgele ve eşit sayıda dört gruba (n=8) ayrıldı: Kontrol (sham laparotomi), kontrol + β-glukan, aortik İR ve aortik İR + β-glukan. Aortik İR uygulanan iki grupta, İAA'ya mikrovasküler klemp konularak 120 dakika iskemi ve sonrasında klemp kaldırılarak 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Çalışma öncesinde, β-glukan 50 mg/kg/gün dozunda 10 gün süre ile günde iki kez oral intragastrik gavaj yoluyla uygulandı. Derin anestezi altında sıçanların yaşamı sonlandırıldı ve böbrek dokuları çıkarıldı. Doku malondialdehid (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri ölçüldü ve böbrek doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Biyokimyasal analiz; β-glukan ile böbrek doku MDA, SOD, katalaz ve MPO seviyelerinde anlamlı azalma sağlanırken (aortik İR ile karşılaştırıldığında p<0.05), aortik İR ile anlamlı yükselme olduğunu gösterdi (kontrolle karşılaştırıldığında p<0.05). Histopatolojik olarak aortik İR grubunda; fokal glomerüler nekroz, Bowman kapsülü dilatasyonu, tübüler epitelyal dejenerasyon, tübüler epitelyal nekroz, tübüler dilatasyon, interstiyel inflamatuvar infiltrasyon ve konjesyon kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (kontrolle karşılaştırıldığında p<0.05). Bununla birlikte, aortik İR + β-glukan grubunda bu parametrelerin hepsinde aortik İR grubuna göre anlamlı düşüklük saptandı (aortik İR ile karşılaştırıldığında p<0.05).

Sonuç: Bu deneysel çalışmanın sonuçları β-glukanın sıçanlarda infrarenal aortik İR'nin indüklediği böbrek hasarını azalttığını göstermektedir. Beta-glukanın oksidatif stresi, lipid peroksidasyonu ve lökosit infiltrasyonunu azaltabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: Abdominal aorta; beta-glukan; iskemi-reperfüzyon; böbrek hasarı.

Background: In this experimental study, we investigated the effect of β-glucan on ischemia-reperfusion injury (IR) in kidneys occurring after occlusion-reperfusion of rat infrarenal abdominal aorta (IAA).

Methods: Thirty-two Wistar-albino rats were randomized into four groups with equal number of rats (n=8) as follows: The control group (sham laparotomy), control + β-glucan, aortic IR, aortic IR + β-glucan. In the two groups in which aortic IR was used, 120 minutes of ischemia by clamping of the IAA followed by 120 minutes of reperfusion after removal of the clamp were performed. β-glucan was orally administered at a dose of 50 mg/kg by intragastric gavage twice a day for 10 days. The rats are sacrificed under deep anesthesia and the kidney tissues were removed. The tissue levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase and myeloperoxidase (MPO) were measured and kidney tissue specimens were examined histopathologically.

Results: Biochemical analysis showed that aortic IR significantly increased (p<0.05 vs control) while β-glucan significantly decreased (p<0.05 vs aortic IR) the kidney tissue levels of MDA, SOD, catalase and MPO. Histologically, in the aortic IR group, focal glomerular necrosis, dilatation of Bowman's capsule, tubular epithelial degeneration, tubular epithelial necrosis, tubular dilatation, interstitial inflammatory infiltration and congestion were significantly increased when compared to the control group (p<0.05 vs control). However, in aortic IR + β-glucan group, all of these parameters were significantly decreased when compared to the aortic IR group (p<0.05 vs aortic IR).

Conclusion: The results of this experimental study shows that β-glucan attenuates the kidney injury induced by infrarenal abdominal IR in rats. We think that β-glucan may decrease oxidative stress, lipid peroxidation, and leucocyte infiltration.

Key words: Abdominal aorta, beta-glucan; ischemia-reperfusion; kidney injury.

Geliş tarihi: 12 Nisan 2010 Kabul tarihi: 30 Nisan 2010

Yazışma adresi: Dr. Şenol Gülmen, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 32260 Isparta.
Tel: 0246 - 232 95 05 e-posta: S.gulmen@myynet.com

İnfrarenal abdominal aort cerrahisi sırasında cerrahi teknik olarak uygulanan kros klemp ve sonrasında kros klempin kaldırılmasının aortik iskemi-reperfüzyon (İR) hasarının gelişimi ile sonuçlandığı bilinmektedir.^[1] Aortik İR hasarı sonucu ortaya çıkan; serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin oluşumu, sistemik vazokonstriktif mediyatörler, nötrofil aktivasyonu, lipid peroksidasyonu ve sistemik enflamatuvar yanıt uzak organ hasarına neden olmaktadır.^[1,2] Bu nedenle aortik İR'nin indüklediği böbrek hasarı; aort cerrahisi sonrası yüksek mortalite ile seyreden akut renal yetmezlik gelişiminde önemli bir komplikasyon olarak kabul edilmektedir.^[3]

Beta (β)-glukanlar; ekmeğe maya hücre (*Saccharomyces cerevisiae*) duvarından elde edilen çok dallı glukoz polimerleridir ve temel besin maddesi olan tahılların ana yapısını oluşturur.^[4] Günümüzde sıkça karşılaşmaya başladığımız ve bir ucu maya hücrelerine uzanan probiyotik tanımı temelinde β -glukanlar üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Beta-glukan immün sistem üzerine etkileri bilinen, toksik ve yan etkisi olmayan güçlü immünoestimülatör olarak tanımlanmaktadır.^[5] Bunun dışında; tümör gelişiminin inhibisyonu,^[6] antibakteriyel, antiviral, antifungal ve anti parazitik etki,^[7,8] sitokin üretiminin tetiklenmesi, makrofaj aktivasyonu,^[9] lipid düşürücü özellik,^[10] radyasyona karşı koruyucu etki, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve hematopoetik etkileri yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.^[11,12]

Ayrıca β -glukanın majör abdominal cerrahide ameliyat sonrası enfeksiyon ve mortalite oranlarını anlamlı şekilde azalttığı bildirilmiştir.^[13] Bu yararlı etkilerinden dolayı son zamanlarda β -glukan molekülü üzerine odaklanılmış ve genellikle deneysel sepsis modellerinde uzak organ hasarına etkileri araştırılmıştır. Bu yararlı etkilerinin altında yatan temel mekanizmanın ise antioksidan etki olduğu ileri sürülmektedir.

Ancak β -glukanın infrarenal abdominal aort (İAA) cerrahisinde aortik İR'ye bağlı uzak organ hasarı üzerine etkileri yeterince açık değildir. Bu deneysel çalışmada, β -glukanın aortik İR sonrası oluşan böbrek hasarına etkisi araştırıldı. Bu amaçla sıçan böbrek doku örneklerinde malondialdehid (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri ölçüldü ve histopatolojik inceleme yapıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvan Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilen, her iki cinsiyetten ve ortalama ağırlıkları 200-250 gr olan 32 adet Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele ve eşit sayıda (n=8) üç gruba ayrıldı. Sıçanlar deney öncesi 10 gün süre ile tel kafeslerde, 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritimde, ortam sıcaklığı 24-26 °C ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu.

Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Sıçanların yemleri, çalışmadan 12 saat öncesinde kesildi ancak bu dönemde su içmelerine izin verildi. Tüm sıçanların bakımları; Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım no. 85-23, 1985 revize edildi) 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz'a uygun olarak yapıldı. Çalışma protokolü ve deneysel yöntem Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (17.02.2009 tarih ve 01/08 sayılı Etik Kurul kararı).

Deneysel model

Sıçanlar, eşit sayıda (n=8) ve rastgele olarak dört gruba ayrıldı. Kontrol grubunda laparotomi ve İAA diseksiyonu yapıldı ancak İAA'ya oklüzyon uygulanmadı. Aortik İR grubunda, İAA atravmatik mikrovasküler klemp ile klemlenerek 120 dakika iskemi, sonrasında klemp kaldırılarak 120 dakika reperfüzyon uygulandı. AİR + β -glukan ve ilaç + β -glukan grubundaki sıçanlara deney öncesi 10 gün boyunca, 50 mg/kg/gün β -glukan (Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. Türkiye) 2 cc serum fizyolojik solüsyonda çözündürülerek iki eşit dozda oragastrik gavaj ile uygulandı.

Aortik iskemi-reperfüzyon

Deneysel başlangıcında; intramusküler enjeksiyon ile 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (Ketalar® flakon, Parke-Davis, USA) verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, sıçanlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan sıçanlara orta hat laparotomi yapıldı. Bağırsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılmasının ardından İAA dikkatli bir şekilde explore edildi. İnfrarenal abdominal aorta, atravmatik mikrovasküler klemp (vascu-statts II®, midi straight 1001-532; Scanlan Int., St. Paul, MN, USA) konuldu. Yüz yirmi dakika sonra İAA'daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik iskemi klemlenme işlemi sırasında distal aortta pulsasyonun kaybolmasıyla, aortik reperfüzyon ise klempin kaldırılması sonrası distal aortta pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı. Böylece "no-reflow" fenomeni ekarte edildi. Kontrol grubuna laparotomi ve İAA diseksiyonu eşit sürede (240 dakika) uygulandı ancak İR oluşturulmadı. İskemi-reperfüzyon dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; İAA'ya klemp konulduktan ve kaldırıldıktan sonraki dönemlerde, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulandı ve batın insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Reperfüzyon süresi sonunda tüm

şıçanlar sakrifiye edildi ve böbrek doku örnekleri alındı. Böbrek doku örneklerinin bir kısmı biyokimyasal inceleme yapıncaya kadar -800 °C'de saklandı. Histopatolojik doku örnekleri ise değerlendirme yapıncaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı.

Biyokimyasal işlemler

Eksi 800 °C'de saklanmış olan sıçan doku örnekleri oda sıcaklığına getirilerek serum fizyolojik ile yıkandı. Daha sonra %10'luk homojenat elde etmek için, %0.05 sodyum azid içeren 100 mmol/L soğuk fosfat tampo- nu (PH=7.4) içinde homojenize edildi (Ultra-Turrax T25, Janke and Kungel GmbH & Co., KG Staufen, Almanya). Bu homojenatlara 30 dakika süre ile ultra- son dalgası uygulandı (Sonoplus UW 2070, Bandelin Electronic, Berlin Almanya) ve ardından süpernatant elde etmek için santrifüj edildi (5000 g'de 10 dakika). Süpernatantlar biyokimyasal incelemeler için kullanılıncaya kadar -800 °C'de saklandı. Süpernatantın protein içeriği Lowry yöntemi ile saptandı.^[14]

Malondialdehid ölçümü

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyleri, Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi ile belirlendi.^[15] Bu yöntemde, MDA ile thiobarbitürik asit reaksiyonunun meydana getirdiği renk oluşumu spektrofotometrik ölçümle değerlendirilir. Bu amaçla, 100 gr/l'lik trikloroasetik asit solüsyonundan 2.5 ml, her santrifüj tüpünde 0.5 ml seruma (süpernatant) eklenerek 15 dakika süreyle kaynayan su banyosuna tabi tutuldu. Musluk suyu altında soğutulan tüpler 1000 g hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen materyalin 2 ml'si, 6.7 g/l'lik thiobarbitürik solüsyonunun 1 ml'sine eklenerek 15 dakika kaynayan su banyosunda tutuldu. Bu solüsyon musluk suyunda soğutulduktan sonra absorbansı 532 nm'lik spektrofotometre ile (Shimadzu UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçüldü. Malondialdehid düzeyi, MDA-thiobarbitürik asit kompleksinin emilim katsayısı (emilim katsayısı ϵ : $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) ile hesaplandı ve sonuç proteinin miligramındaki nanomol olarak ifade edildi.

Süperoksit dismutaz ölçümü

Süperoksit dismutaz aktivitesi, Spitz ve Oberley^[16] ve Woolliams ve ark.na^[17] ait yöntemler kullanılarak ölçüldü. Süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini, 2-(4-iodofenol)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazoliumklorid ile reaksiyona girerek kırmızı bir formazan boya oluşturan süperoksit radikallerini üreten ksantin oksidaz reaksiyonu temel alınarak yapıldı. Süperoksit dismutaz aktivitesi bu reaksiyonunun inhibisyon derecesi olarak belirlendi. Sonuçlar ünite/miligram (U/mgr) protein olarak ifade edildi.

Katalaz aktivite ölçümü

Katalaz aktivitesi Aebi^[18] yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntem, hidrojen peroksitin (H_2O_2) parçalanma hızının hız sabitinin (s^{-1} , k) belirlenmesi esasına dayanır. Hız sabiti, $k = (2.3/\Delta t)(a/b) \log (A1/A2)$ formülü kullanılarak hesaplandı. Formülde A1 0. saniye, A2 15. saniye absorbans değerlerini; a dilüsyon faktörünü, b süpernatant protein içeriğini göstermektedir. Sonuçlar k/mg protein olarak ifade edildi.

Miyeloproteksidaz aktivite ölçümü

Dokuda polimorfonükleer lökosit (PMNL) birikiminin hassas bir göstergesi olan MPO aktivitesi, MPO'nun katalize ettiği H_2O_2 bağımlı tetrametylbenzidine oksidasyonu kullanılarak saptandı.^[19] Böbrek örnekleri 1 gr olarak tartıldı ve %0.5 hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, ABD) ile 9 ml 50 mM potasyum fosfat tampo- nu (pH=6) içine konuldu. Örnekler buz banyosu içerisinde 20 saniye süre ile homojenize edildi (Ultra-Turrax T25, Janke and Kungel GmbH & Co., KG Staufen, Almanya). Bu homojenatlara 30 saniye süre ile ultra- son dalgası uygulandı (Sonoplus UW 2070, Bandelin Electronic, Berlin Almanya) ve ardından 40 °C'de, 1200 g hızla, 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Miyeloproteksidaz aktivitesi 460 nm'de absorbansda oluşan değişiklik ölçülerek saptandı. Kullanılan tampon içeriğinde, 50 mM potasyum fosfat, pH 6.0 (50 ml), 0.38 ml H_2O_2 (%0.3 solüsyon; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, ABD) ve 8.34 mg 0-dianisidine hydrochloride (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, ABD) vardı. Süpernatant 1:80 (süpernatant: tampon) oranında karşılaştırıldı. Miyeloproteksidaz birimi $\Delta A/\text{min/g}$ doku olarak ifade edildi.

Histopatolojik inceleme

Şıçan böbrek doku örnekleri ayrı ayrı formalin solüsyonunda tespit edilerek, rutin takip işlemleri sonrası parafine gömülerek bloklandı. Beş mikrometrelilik kesitler yapılarak hematoksilen-eozin boyasıyla boyandı ve ışık mikroskopu ile incelendi. Tüm örnekler deney gruplarından habersiz olan aynı patolojik tarafından değerlendirildi. Böbrek hasarı; kesitlerde saptanan, fokal glomerüler nekroz, Bowman kapsül dilatasyonu, tübüler epitelyal dejenerasyon, tübüler epitelyal nekroz, tübüler dilatasyon, interstisyel inflamatuvar infiltrasyon ve konjesyona göre aşağıdaki skalaya uygun olarak semikantatif olarak skorlandı: (-) değişiklik yok; (+) fokal, hafif değişiklikler, (++) multifokal belirgin değişiklikler ve (+++) yaygın belirgin değişiklikler.

İstatistiksel analiz

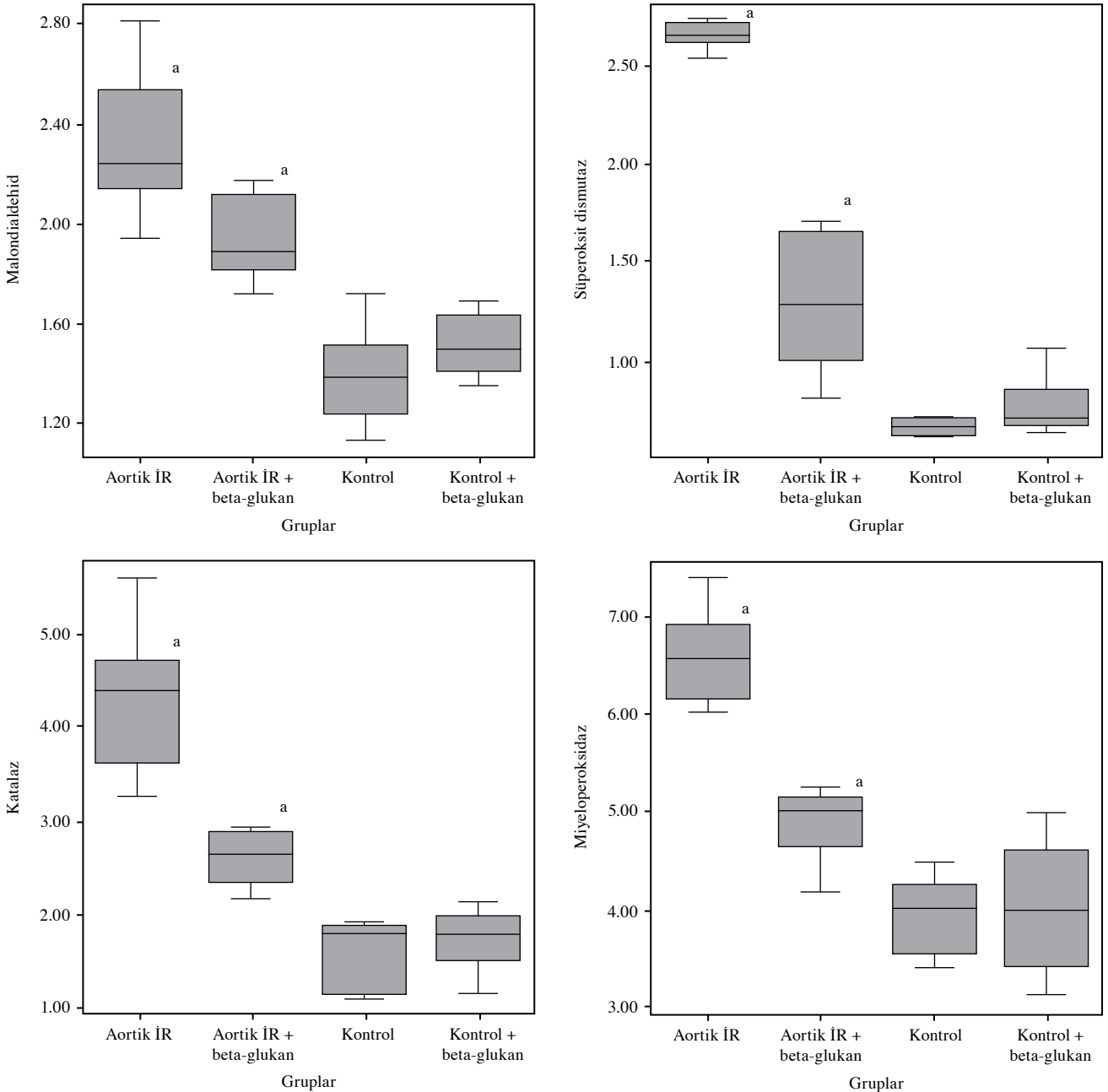
İstatistiksel analizler Windows için SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 13.0 versiyon bilgisayar programı

kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde sunuldu. Biyokimyasal verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında gruplar arası farkların incelenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey honestly significant difference testi kullanıldı. Histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U-testi kullanıldı. *P* değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Biyokimyasal bulgular

Tüm gruplara ait sıçan akciğer örneklerindeki MDA (nmol/mg protein) düzeyleri ve SOD (U/mg protein), katalaz (k/mg protein) ve MPO aktiviteleri ($\Delta A/\text{min/g}$ doku) Şekil 1a-d'de gösterildi. Aortik İR grubunda MDA (2.31 ± 0.29 karşılık 1.38 ± 0.19 , $p=0.001$), SOD (2.65 ± 0.06 karşılık 0.68 ± 0.11 , $p=0.001$), katalaz (4.27 ± 0.76 karşılık 1.55 ± 0.38 , $p=0.001$) ve MPO (6.59 ± 0.47 karşılık 3.94 ± 0.40 , $p=0.001$) değerleri kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı derecede yüksek



Şekil 1. Gruplara ait biyokimyasal değerlendirme sonuçları.

bulundu ($p<0.05$). Aortik İR + β -glukan grubunda β -glukan ile tedavi; MDA (1.93 ± 0.17 karşılık 2.31 ± 0.29 , $p=0.009$), SOD (1.29 ± 0.35 karşılık 2.65 ± 0.06 , $p=0.001$), katalaz (2.58 ± 0.29 karşılık 4.27 ± 0.76 , $p=0.001$) ve MPO (4.87 ± 0.37 karşılık 6.59 ± 0.47 , $p=0.001$) değerlerinde aortik İR grubundaki değerlere göre anlamlı azalma ile sonuçlandı ($p<0.05$).

Histopatolojik bulgular

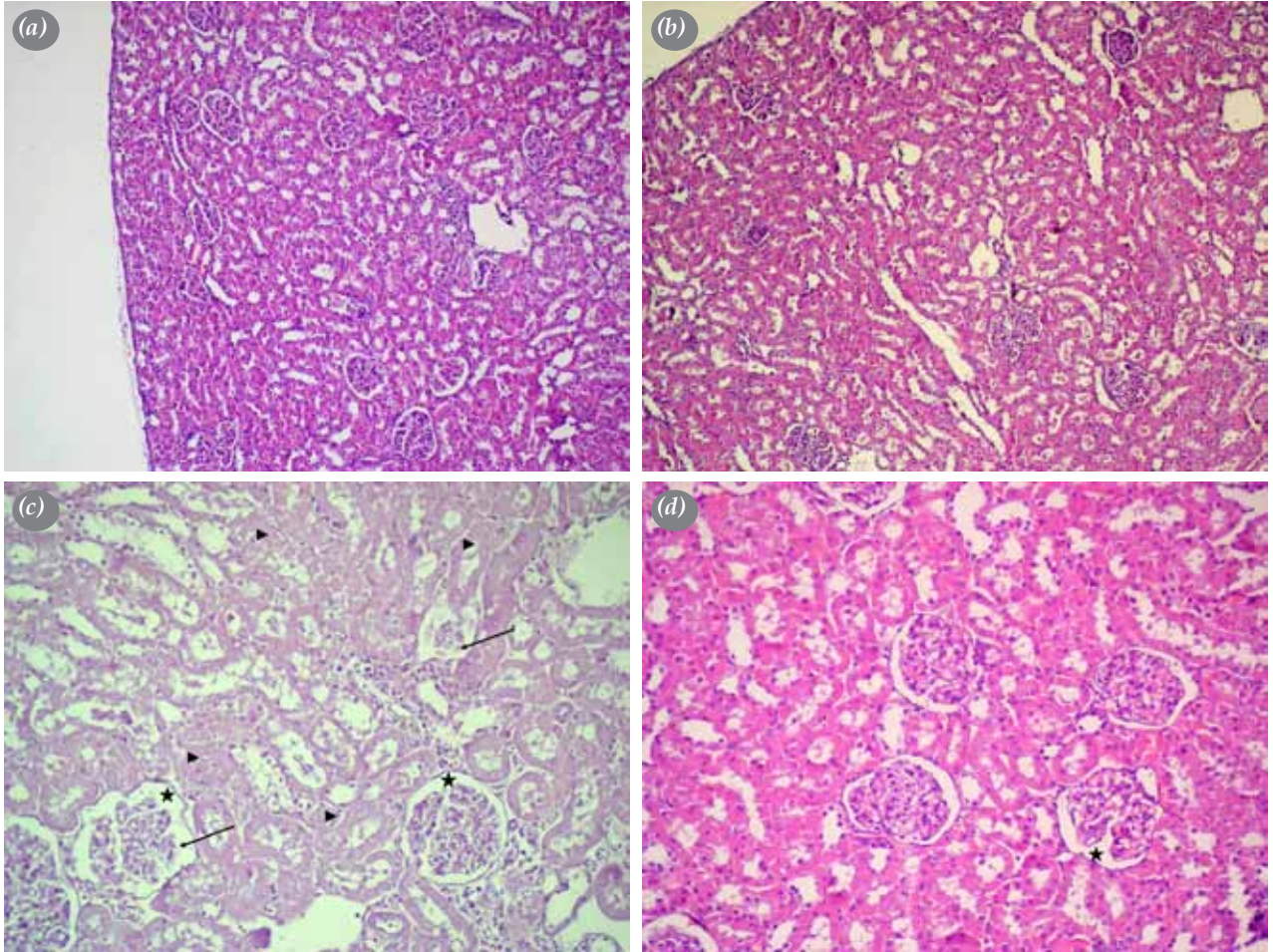
Kontrol ve kontrol + β -glukan gruplarında hafif histopatolojik değişiklikler gözlemlendi (Şekil 2a, b). Aortik İR grubunda, fokal glomerüler nekroz, Bowman kapsül dilatasyonu, tübüler epitelyal dejenerasyon, tübüler epitelyal nekroz, tübüler dilatasyon, intertisyel inflamatuvar infiltrasyon ve konjesyon kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti ($p<0.05$), (Şekil 2c). Aortik İR + β -glukan grubunda ise fokal glomerüler nekroz,

Bowman kapsül dilatasyonu, tübüler epitelyal dejenerasyon, tübüler epitelyal nekroz, tübüler dilatasyon, intertisyel inflamatuvar infiltrasyon ve konjesyonda anlamlı azalma saptandı ($p<0.05$ vs aortik İR; Şekil 2d).

TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları β -glukanın sıçanlarda aortik İR'nin indüklediği böbrek hasarı üzerine koruyucu etkileri olduğunu gösterdi. Bu hipotezi destekleyen iki temel bulgu; (i) β -glukan doku MDA, SOD, katalaz ve MPO değerlerinde anlamlı azalma sağladı, (ii) aortik İR'nin indüklediği böbrek hasarı ile ilişkili histopatolojik değişiklikleri anlamlı şekilde azalttı.

Aortik İR hasarı oluşumunda, SOR'nin oluşumu önemli bir yer tutar.^[20] Doku O_2 düzeyinin reperfüzyon sonucunda tekrar sağlanması ve moleküler O_2 'nin hücre içerisinde oksidatif enzimler tarafından indirgenmesi



Şekil 2. Beta-glukan aortik iskemii reperfüzyonun indüklediği böbrek hasarı ile ilişkili morfolojik değişiklikleri azaltır. Böbrek doku kesitleri Hemotoksilin-Eosin (H-E) ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. (a) Kontrol grubunda minimal konjesyon bulguları (H-E x 100) (b) Kontrol + β -glukan grubunda hafif konjesyon ve hafif tübüler dilatasyon bulguları (H-E x 100) (c) Aortik iskemii reperfüzyon grubunda fokal glomerüler nekroz (oklar), şiddetli tübüler dejenerasyon, dilatasyon ve şiddetli nekroz (okbaşları) ile Bowman kapsül aralığında belirgin genişleme (yıldız) bulguları (H-E x 200) (d) Aortik iskemii reperfüzyon + β -glukan grubunda Bowman kapsül aralığında hafif genişleme (yıldız) ile hafif konjesyon bulguları (H-E x 200).

artmış SOR'nin ortaya çıkması ile sonuçlanır. Bilinen en önemli SOR'ler; süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^-) iyonlarıdır.^[21,22] Süperoksit radikali, normal hücre metabolizmasında membran elektron transportu sırasında oluşan bir ara üründür.^[21] İskemik koşullarda ise, hipoksantin ve ksantin katabolizması sırasında ksantin oksidaz katalizörlüğünde bir reaksiyon ile oluşur. Süperoksit radikalinden SOD katalizörlüğünde H_2O_2 oluşuktan sonra, H_2O_2 katalaz ve glutatyon peroksidaz katalizörlüğünde H_2O ve CO_2 'ye dönüştürülerek inaktive edilir.^[23] Bu basamakta; SOR'ye karşı savunma ve en önemli hücre içi antioksidan enzim sistemleri SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdır.

Kapan ve ark.^[24] yaptıkları deneysel aortik İR modelinde renal doku SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre İR grubunda anlamlı düzeyde yükseldiğini bildirmişlerdir. Mun ve ark.^[25] da deneysel böbrek İR modelinde doku SOD ve katalaz düzeylerinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda aortik İR grubunda böbrek doku SOD ve katalaz düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Bununla birlikte, aortik İR + β -glukan grubunda doku SOD ve katalaz seviyelerinin aortik İR grubuna göre anlamlı azaldığı saptandı. Bayrak ve ark.^[26] sıçanlarda yaptıkları deneysel böbrek İR hasarında β -glukanın SOD düzeylerini anlamlı ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Bu noktada; İR sırasında SOR'nin aşırı üretiminin endojen antioksidan seviyelerine paralel olarak tüketime neden olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca İR hasarı sırasında antioksidan enzim seviyelerinin; İR hasarının yaygınlığı, iskemi ve reperfüzyonun ayrı ayrı sürelerine ve spesifik doku antioksidan kapasitesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bu bulgular β -glukanın antioksidan özelliği ile aortik İR'nin indüklediği oksidatif stresi anlamlı ölçüde azalttığını desteklemektedir.

Serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oluşan İR hasarı lipid peroksidasyonu ile de ilişkilidir.^[27] Serbest oksijen radikalleri sadece DNA ve protein düzeyinde zararlı etki göstermemekte, aynı zamanda fosfolipid ve poliansatüre yağ asitlerini içeren hücre membranında geçirgenliği bozarak, hücre içi kalsiyum birikimi ve hücre ölümüne neden olmaktadır.^[27,28]

Bundan dolayı, hücre membranının lipid peroksidasyonu İR hasarının önemli bir basamağıdır ve MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü ve hassas bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.^[15,29] Biz çalışmamızda aortik İR grubunda doku MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı yükselme saptadık. Aynı zamanda aortik İR + β -glukan grubunda ise doku MDA düzeylerinde aortik İR grubuna göre anlamlı azalma saptadık. Bu bulgularımızla uyumlu olarak Toklu ve ark.^[30] deneysel olarak sıçanlarda yanık hasarı ile oluşturdukları

sepsis modeli ve oksidatif hasarda β -glukanın böbrek MDA düzeylerinde anlamlı azalma sağladığını bildirmişlerdir. Şener ve ark.^[31] ise nikotin indüklediği oksidatif hasarda β -glukanın böbrek ve mesane doku MDA düzeylerinde anlamlı azalma bildirmişlerdir. Bolcal ve ark.^[32] da deneysel alt ekstremite İR hasarında β -glukanın kas doku MDA düzeylerini anlamlı azalttığını bildirmişlerdir. Kayali ve ark.^[33] ise β -glukan ile yaptıkları deneysel spinal kord hasarında doku MDA düzeylerinde anlamlı değişiklik saptamamışlar ve bunu iskemi süresi ile ilişki olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, β -glukanın böbrek dokusunda hücre bütünlüğünü koruyarak lipid peroksidasyonunu azalttığını desteklemektedir.

Aortik İR hasarında nötrofil infiltrasyonunun önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir.^[34] Lökositlerde lokalize bir enzim olan MPO, deneysel çalışmalarda uzak organ olarak pek çok dokuda olduğu gibi böbrek İR hasarında da nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olarak kullanılmaktadır.^[34,35] Çalışmamızda, MPO böbrek doku düzeylerinin aortik İR sonrası anlamlı yükseldiği saptandı. Bu sonuçla uyumlu olarak İR hasarının indüklediği böbrek ve akciğer doku MPO düzeylerinin artmış seviyeleri bildirilmiştir. Çalışmamızda, β -glukanın MPO seviyelerini de anlamlı oranda azalttığı saptandı. Bedirli ve ark.^[36] ve Babayigit ve ark.^[37] deneysel sepsis modelinde oluşturdukları akut akciğer hasarında β -glukanın akciğer doku MPO düzeylerini anlamlı azalttığını bildirmişlerdir. Bunun dışında Toklu ve ark.^[30] deneysel oksidatif organ hasarında nötrofil infiltrasyonunun inhibisyonu ile böbrek MPO seviyelerinde anlamlı azalma bildirmişlerdir. Bu sonuçlarımız, β -glukanın böbrek dokusunda aktive olmuş lökosit infiltrasyonunun inhibisyonu ile aortik İR'ye karşı böbrek koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, β -glukanın aortik İR'nin indüklediği böbrek hasarı ile ilişkili morfolojik değişiklikleri azalttığı saptandı. Şener ve ark.^[38] histopatolojik olarak β -glukanın böbrek dokusunda interstisyel inflamatuvar infiltrasyonu, tübüler epitelyal dejenerasyonu, Bowman's kapsül dejenerasyonunu ve glomerüler nekrozu anlamlı azalttığını ve normal böbrek dokusunu koruduğunu bildirmişlerdir. Bedirli ve ark.^[36] ise deneysel sepsis modelinde β -glukanın akciğer hasarı üzerine olan etkisini araştırmışlar; pulmoner infiltrasyon, konjesyon ve intraalveoler hemoraji açısından histopatolojik anlamlı iyileşme bildirmişlerdir.

Yukarıdakilerin dışında, Sandvik ve ark.^[39] β -glukanın antioksidan özelliği ile miyokard ve düz kas hücre kontraksiyonu üzerine indirekt etki ile kan basıncını artırdığını bildirmişlerdir. Yine Sandvik ve ark.^[39] β -glukanın organ koruyucu etkisinin altında yatan mekanizmanın artmış organ perfüzyonu olduğunu

ve bu özelliği ile böbrek ve karaciğer hasarının azaltılmasına katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir. Bunların dışında Aarsaether ve ark.^[40] ise koroner bypass cerrahisinde gelişen İR hasarında β-glukanın antioksidan özelliği ile kardiyak koruyucu etki gösterdiğini klinik bir çalışma ile bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, çalışmamızda β-glukanın deneysel infrarenal aortik İR modelinde oluşan böbrek hasarını azalttığı histopatolojik olarak gösterildi. Doku MDA, SOD, katalaz ve MPO düzeylerinde İR grubuna göre β-glukan + İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı. Yine de, β-glukanın bu konudaki etki mekanizmasının ve hemodinamik etkilerinin; β-glukan reseptörleri ve antagonist β-glukanaz ile yapılacak çalışmalarla ayrıntılı olarak tanımlanması için farklı deneysel çalışmalara gereksinim vardır. Bu deneysel çalışmaların sonucunda, β-glukanın İAA cerrahisinde gelişen böbrek hasarına etkisinin klinik olarak da araştırılabileceği düşüncesindedir.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Joyce M, Kelly C, Winter D, Chen G, Leahy A, Bouchier-Hayes D. Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates renal injury in an experimental model of ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2001;101:79-84.
2. Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology* 1995;82:1026-60.
3. Ozcan AV, Sacar M, Aybek H, Bir F, Demir S, Onem G, et al. The effects of iloprost and vitamin C on kidney as a remote organ after ischemia/reperfusion of lower extremities. *J Surg Res* 2007;140:20-6.
4. Jamas S, Chen Y- CJ, von der Osten CH, Sinskey AJ, Rha CK. Spectral analysis of glucan produced by wild-type and mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Polymers* 1990;13:207-19.
5. Bedirli A, Gokahmetoglu S, Sakrak O, Ersoz N, Ayangil D, Esin H. Prevention of intraperitoneal adhesion formation using beta-glucan after ileocolic anastomosis in a rat bacterial peritonitis model. *Am J Surg* 2003;185:339-43.
6. Vetvicka V, Tereyama K, Mandeville R, Brousseau P, Kournikakis B, Ostroff G. Pilot Study: Orally- administered yeast yeast β1,3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. *JANA* 2002;5:1-5.
7. Onderdonk AB, Cisneros RL, Hinkson P, Ostroff G. Anti-infective effect of poly-beta 1-6-glucotriosyl-

beta 1-3-glucopyranose glucan in vivo. *Infect Immun* 1992;60:1642-7.

8. Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis* 2003;187:710-3.
9. Berner VK, Sura ME, Hunter KW Jr. Conjugation of protein antigen to microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;80:1053-61.
10. Bell S, Goldman VM, Bistran BR, Arnold AH, Ostroff G, Forse RA. Effect of beta-glucan from oats and yeast on serum lipids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1999;39:189-202.
11. Gu YH, Takagi Y, Nakamura T, Hasegawa T, Suzuki I, Oshima M, et al. Enhancement of radioprotection and anti-tumor immunity by yeast-derived beta-glucan in mice. *J Med Food* 2005;8:154-8.
12. Wei D, Williams D, Browder W. Activation of AP-1 and SP1 correlates with wound growth factor gene expression in glucan-treated human fibroblasts. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1163-72.
13. Dellinger EP, Babineau TJ, Bleicher P, Kaiser AB, Seibert GB, Postier RG, et al. Effect of PGG-glucan on the rate of serious postoperative infection or death observed after high-risk gastrointestinal operations. *Betafectin Gastrointestinal Study Group. Arch Surg* 1999;134:977-83.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
15. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-31.
16. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989;179:8-18.
17. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34:253-6.
18. Aebi Y. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:12-126.
19. Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 1996;66:143-6.
20. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
21. Kiris I, Kapan S, Kilbas A, Yilmaz N, Altuntaş İ, Karahan N, et al. The protective effect of erythropoietin on renal injury induced by abdominal aortic-ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res* 2008;149:206-13.
22. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
23. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40.
24. Kapan S, Kiris İ, Kılbas A, Altuntas İ, Karahan N, Okutan H. Eritropoietin şıçan aortik iskemi reperfüzyonunda akciğer

- hasarı üzerine etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2009;17:110-6.
25. Mun KC, Lee HG, Lee TH, Kim YH, Kwak CS, Kim SP, et al. Effect of modified polyhemoglobin on the ischemia/reperfusion injury in kidney. *Transplant Proc* 2003;35:99-100.
 26. Bayrak O, Turgut F, Karatas OF, Cimentepe E, Bayrak R, Catal F, et al. Oral beta-glucan protects kidney against ischemia/reperfusion injury in rats. *Am J Nephrol* 2008;28:190-6.
 27. Rodríguez-López JM, Sánchez-Conde P, Lozano FS, Nicolás JL, García-Criado FJ, Cascajo C, et al. Laboratory investigation: effects of propofol on the systemic inflammatory response during aortic surgery. *Can J Anaesth* 2006;53:701-10.
 28. Siems WG, Grune T, Esterbauer H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sci* 1995;57:785-9.
 29. Saçar M, Özcan V, Aybek H, Önem G, Demir S, Gökşin İ ve ark. Vitamin C and iloprost attenuate skeletal muscle injury caused by ischemia-reperfusion of the lower extremities. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;13:374-8.
 30. Toklu HZ, Sener G, Jahovic N, Uslu B, Arbak S, Yeğen BC. Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. *Int Immunopharmacol* 2006;6:156-69.
 31. Sener G, Toklu HZ, Cetinel S. β -glucan protects against chronic nicotine-induced oxidative damage in rat kidney and bladder. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007;23:25-32.
 32. Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, Sargin M, Aydın A, Eken A, et al. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2007;139:274-9.
 33. Kayali H, Ozdag MF, Kahraman S, Aydın A, Gonul E, Sayal A, et al. The antioxidant effect of beta-Glucan on oxidative stress status in experimental spinal cord injury in rats. *Neurosurg Rev* 2005;28:298-302.
 34. Kiris İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibaş N. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinium klorürün etkisi. *Turkish J Vasc Surg* 2005;14:13-8.
 35. Chatterjee PK, Todorovic Z, Sivarajah A, Mota-Filipe H, Brown PA, Stewart KN, et al. Inhibitors of calpain activation (PD150606 and E-64) and renal ischemia-reperfusion injury. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1121-31.
 36. Bedirli A, Kerem M, Pasaoglu H, Akyurek N, Tezcaner T, Elbeg S, et al. Beta-glucan attenuates inflammatory cytokine release and prevents acute lung injury in an experimental model of sepsis. *Shock* 2007;27:397-401.
 37. 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* 2005; 31:865-70.
 38. Sener G, Toklu H, Ercan F, Erkanli G. Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1387-96.
 39. Sandvik A, Wang YY, Morton HC, Aasen AO, Wang JE, Johansen FE. Oral and systemic administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. *Clin Exp Immunol* 2007;148:168-77.
 40. Aarsaether E, Rydningen M, Einar Engstad R, Busund R. Cardioprotective effect of pretreatment with beta-glucan in coronary artery bypass grafting. *Scand Cardiovasc J* 2006; 40:298-304.