SERULEİNLE OLUŞTURULMUŞ SIÇAN AKUT PANKREATİT MODELINDE BETA GLUKAN VE FUKOKSANTİNİN ETKİSİ

The Effect of Beta Glucan and Fucoxanthine in a Serulein-Induced Acute Pancreatitis in Rats

Dilek ÖZBEYLİ[1](0000-0002-4141-6913), Özlem Tuğçe ÇİLİNGİR KAYA[2](0000-0002-2591-9174), Aslı AYKAÇ[3](0000-0002-4885-5070), Sezgin AYDEMİR[1](0000-0002-6116-7854), Esra Bihter GÜRLER[4](0000-0001-8259-521X), Meral YÜKSEL[5](0000-0002-4760-3306)

[1]Marmara Üniversitesi, Patoloji Laboratuvar Teknikleri Programı, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İstanbul, Türkiye

[2]Marmara Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

[3]Yakındoğu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı ve DESAM Enstitüsü, Biyoenformatik ve Hesapsal Biyoloji, Lefkoşa, KKTC

[4] İstanbul Atlas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

[5]Marmara Üniversitesi, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İstanbul, Türkiye

Dilek ÖZBEYLİ, Dr. Öğr. Üyesi
Özlem Tuğçe ÇİLİNGİR KAYA, Dr. Öğr. Üyesi
Aslı AYKAÇ, Dr. Öğr. Üyesi
Sezgin AYDEMİR, Dr. Öğr. Üyesi
Esra Bihter GÜRLER, Dr. Öğr. Üyesi
Meral YÜKSEL, Doç. Dr.

İletişim:
Dr. Öğr. Üyesi Dilek ÖZBEYLİ
Marmara Üniversitesi, Patoloji Laboratuvar Teknikleri, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İstanbul, Türkiye
Tel: +905326619524
e-mail:
dilekozbeyli@yahoo.com

Geliş tarihi/Received:29.03.2020
Kabul tarihi/Accepted: 11.05.2020
DOI: 10.16919/bozoktip.710744

Bozok Tıp Derg 2020;10(2):189-97
Bozok Med J 2020;10(2):189-97

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Beta Glukan, fukoksantin ve kombinasyonlarının serulein kaynaklı akut pankreatit (AP) sıçan modelindeki etkileri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Sıçanlar kontrol ve AP gruplarına ayrıldı. AP bir saat arayla dört kez serulein (20 ug/kg/ip) enjeksiyonuyla oluşturuldu. Serulein enjeksiyonundan 3 gün önce AP gruplarına günde 1 kez taşıyıcı, Beta Glukan (BG;40 mg/kg/po), fukoksantin (Fuko;40 mg/kg/po) veya Beta Glukan (BG;40 mg/kg/po) +fukoksantin (Fuko;40 mg/kg/po) uygulandı. Son enjeksiyondan sonraki 8. saatte ötenazi gerçekleştirildi. Serumda amilaz ve lipaz, pankreas dokusunda interlökin-1β (IL-1β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), lucigenin kemilüminesans (CL), malondialdehit (MDA), miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktivitesi ve Hematoksilen&Eosin (H&E), Siklooksijenaz-2 (COX-2), nükleer faktör kappa B (NF-κB) histopatolojik incelemeleri yapıldı. İstatistiksel analizler için tek yönlü ANOVA ve Bonferroni post-hoc testi uygulandı.

Bulgular: Taşıyıcı grubunda; amilaz, lipaz, lusigenin, IL-1β ve IL-6 düzeyleri kontrole göre (p <0,01-0,0001) yükselirken, GSH ve IL-10 düzeyleri azaldı (p<0,0001). Lipaz ve amilaz düzeyleri; BG, Fuko ve BG+Fuko tedavileri ile taşıyıcıya göre azaldı (p<0,05-0,001). IL-6 düzeyleri, Fuko ve BG+Fuko grubunda taşıyıcıya göre azaldı (p <0,01). IL-1β düzeyleri; BG, Fuko ve BG+Fuko gruplarında taşıyıcı grubuna göre azaldı (p<0,001-0.0001). IL-10 düzeyi yalnızca BG grubunda taşıyıcı grubuna göre arttı (p<0,01). H&E, COX-2 skorları taşıyıcı grubunda kontrole göre artarken (p<0,0001); BG, Fuko ve BG+Fuko tedavileri ile azalma gözlendi (p<0,05-0,001). Taşıyıcı grubunda artan NF-κB skorları (p<0,0001), BG tedavisi ile azaldı (p<0,01). Taşıyıcı grubundaki artan lusigenin kemiluminesans, MPO ve MDA düzeyleri (p <0,01-0,0001) tüm tedavilerle azaldı (p <0,01-0,0001).

Sonuç: Beta Glukan ve fukoksantin tedavisi pro-inflamatuvar sitokinleri, COX-2 düzeyini ve oksidatif belirteçleri azaltarak anti-inflamatuvar sitokin düzeyini arttırarak AP gelişimini hafifletmiştir.

Anahtar sözcükler: *Beta glukan; fukoksantin; COX-2; oksidatif stres*

ABSTRACT

Aim: This study aims to investigate the effects of Beta Glucan, fucoxanthin and their combinations in acute pancreatitis (AP) rat model.

Material and Methods: Rats were divided into control and AP groups. The AP was induced by injection of cerulein (20 µg/kg/ip) four times with an hour interval. Vehicle, Beta Glucan (BG;40 mg/kg/po), fucoxanthin (Fuco;40 mg/kg/po) or Beta Glucan (BG;40 mg/kg/+ fucoxanthin (Fuco;40 mg/kg/po) were administered 3 days before cerulein injection. Euthanasia was performed at the 8th hour after the last injection. Serum and pancreatic tissue collected for biochemical and histopathological examinations. One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test was used for statistical analysis.

Results: Amylase, lipase, lucigenin, interleukin-1β, and interleukin-6 levels are significantly elevated in the vehicle-treated AP groups (p<0.01-0.0001) while IL-10 was decreased (p<0.0001). Lipase and amylase levels decreased in the BG, Fuco and BG+Fuco groups compared to vehicle group (p<0.05-0.001). IL-6 levels, decreased in the fuco and BG+Fuco group (p <0.01). IL-1β levels decreased in BG, Fuco and BG+Fuco groups compared to vehicle group (p<0,001-0.0001). IL-10 levels increased in BG group compared to the vehicle group (p<0.01). H&E and COX-2 scores increased in the vehicle groups, compared to the control group (p<0.0001). All treatments decreased that scores (p<0.05-0.001). Increased NF-κB scores with vehicle (p<0.0001), decreased with BG treatment (p<0.01). Increased lucigenin, MPO and MDA levels (p<0.01-0.0001), decreased with BG, Fuco and BG+Fuco treatments (p<0.01-0.0001).

Conclusion: Treatment of Beta Glucan and fucoxanthin alleviated AP development by decreasing pro-inflammatory cytokines, COX-2 and oxidative markers and increasing anti-inflammatory cytokine.

Keywords: *Beta glucan; fucoxanthine; COX-2; Oxidative stress*

Bu çalışma 5436 numara ve SAG-K-090518-0213 kodu ile Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

GİRİŞ

Akut pankreatit (AP) kısa süre içinde gelişen, hafif veya şiddetli olabilen bir pankreas iltihabıdır. AP çoğunlukla alkol kullanımı ve safra taşı ile ilişkilidir, ancak bazı vakaların nedeni bilinmemektedir ve tedavisi çoğunlukla semptomatiktir [1].

Oksidatif stres ve inflamasyon AP patogenezinde kritik bir rol oynar ve iltihaplı dokudaki reaktif oksijen türleri (ROS) artışı ile inflamasyonun şiddeti arasında pozitif bir korelasyon vardır [2]. Nükleer faktörü kappa B (NF-κB) AP patofizyolojisinde önemli bir rol oynayan oksidatif stresle aktive olan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür [3-4]. Seruleinle oluşturulan akut pankreatit modelinde, pankreatik NF-κB aktive olarak interlökin 6 (IL-6), interlökin 1β (IL-1β) gibi pro-inflamatuvar aracıların ekspresyonunu arttırır [4]. Yardımcı T-lenfositler tarafından üretilen önemli bir anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 ise IL-6 sentezini inhibe edebilir ve ciddi akut pankreatitin neden olduğu organ hasarına karşı koruma sağlayabilir [5]. Antioksidanların NF-κB aktivasyonunun etkili inhibitörleri olduğu bilinmektedir [3]. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu NF-κB aktivasyonunu azaltır ve serulein kaynaklı pankreatit şiddetini azaltır [6].

Siklooksijenaz enzimi-2 (COX-2), pankreatik inflamasyonda önemli bir rol oynadığı gösterilen indüklenebilir bir enzimdir [7]. Pro-inflamatuvar sitokinler COX-2 ekspresyonunu uyarırken interlökin-10 (IL-10) gibi anti-inflamatuvar sitokinler COX-2' yi baskılar [7]. Serulein ile oluşturulan AP modelinde COX-2'nin farmakolojik olarak inhibisyonunun inflamatuvar mediatörlerde, nötrofil infiltrasyonunda ve pankreatik lezyonların histolojisinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [8].

Fukoksantin, başlıca deniz yosunları ve alglerde bulunan antioksidan aktivitesi α-tocopherolden daha fazla olan, yağda eriyen turuncu renkli bir karetinoididir [9]. Fukoksantinin ROS ve oksidatif hasarlardan koruyucu etkileri çeşitli modellerde gösterilmiştir. Heo ve ark. invitro olarak H_2O_2 ile oluşturulan hücresel hasarda, ROS ve oksidatif hasarlardan koruyucu etkilerini göstermişlerdir [10]. Ayrıca fukoksantinin sepsis modelindeki anti-inflamatuvar [11], alkolik karaciğer hasarındaki antioksidan ve anti-inflamatuvar [12] etkileri rapor edilmiştir. Bununla birlikte, pankreatit modelindeki etkileri henüz bilinmemektedir.

Beta Glukanlar, D-glukoz monomerlerinin farklı biçimlerde bağlanmasıyla oluşan, alg, mantar, bitki, maya ve bazı bakterilerin hücre duvarının bileşeni olan doğal polimerlerdir. Bağışıklık sistemini stimüle edici, antitümoral, antiinflamatuvar hepatoprotektif, antioksidan, etkileri ile bilinirler [13,14]. Literatürde Beta Glukan'ın sepsisle indüklenen akciğer hasarında anti-inflamatuvar etkileri [15], asetik asitle indüklenen sıçan kolit modelinde [16], oksidatif organ hasarlarındaki antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri [17,18] gösterilmiştir. Benzer olarak, fare Tip-II diyabet modelinde Beta Glukanın pankreatik β-hücrelerinde onarıcı ve pankreatik doku bütünlüğünü arttırıcı etkileri bildirilmiştir [19] ancak akut pankreatit modelindeki etkileri tam olarak aydınlatılmamıştır.

Literatür bilgilerinin ışığında çalışmamız; akut pankreatit indüksiyonu öncesinde Beta Glukan veya fukoksantin tedavisinin tek başına veya kombine olarak uygulanmasının potansiyel antioksidan ve anti-inflamatuvar etkilerinin, oksidatif stres ve inflamasyonda rol alan parametreler ve histopatolojik görünüm açısından değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden (DEHAMER) elde edilen 250-300 g ağırlığındaki erkek Wistar sıçanlar (6-8 aylık) aydınlık / karanlık (12 saat/12 saat) siklusunda, kontrollü nem (% 65-70) ve sıcaklık (22 ± 2 °C) koşullarında tutuldu. Sıçanlar, su ve standart sıçan yemi ile *ad libitum* beslendi. Deneylerde hayvanların kullanımıyla ilgili tüm deney protokolleri Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay no: 28. 2018. Mar).

Sıçanlar, akut pankreatit (AP) (n=24) ve kontrol grupları (n=6) olarak rastgele ayrıldı. AP indüksiyonu için Serulein (Alfa Aesar cat no: J64320.M. UK) salin içinde seyreltildi ve bir saatlik aralıklarla dört kez enjekte edildi (20 µg/kg/ip) [20]. Kontrol grubuna aynı hacimde

saline uygulandı. İlk serulein enjeksiyonundan 3 gün önce başlamak üzere AP grubundaki sıçanlara günde 1 kez taşıyıcı (zeytinyağı/po), Beta Glukan (BG; 40 mg/kg/po; (Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye), fukoksantin (Fuco; 40 mg/kg/po; Cayman, cat no: 13068, Michigan, ABD) ve Beta Glukan (BG; 40 mg/kg/po) +fukoksantin (Fuko;40 mg/kg/po) verildi. Çalışmada kuıllanılan dozlar daha önce fukoksantin ve Beta Glukan'ın antioksidan ve antienflamatuar etkilerinin görüldüğü deneysel hayvan çalışmalarına uygun olarak seçilmiştir [12,16].

Son enjeksiyondan sonraki 8. saatte sıçanlar, tiyopenthal sodyum (50 mg/kg/ip, İE Ulagay, Türkiye) ile anestezi altında kardiyak ponksiyon ile feda edildi. Serum örnekleri amilaz ve lipaz düzeylerini belirlemek üzere toplandı. Pankreas dokusu çıkarıldı ve pankreas doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik analizler için formaldehit içinde fikse edilirken, geri kalan pankreas dokuları malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) düzeyleri, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, IL-1, IL-6 ve IL-10 ölçümü, luminol ve lucigenin kemilüminesans seviyeleri ölçümü için –80 ° C'de saklandı (Kullanılan tüm kimyasallar Merck KGaA Darmstadt, Germany).
Toplanan pankreaslar kurutma kağıdına alındıktan sonra tartıldı, pankreas ağırlığı vücut ağırlığına oranlandı ve pankreatik ödem indeksi olarak ifade edildi [21].

Toplanan kanlar 3.000 rpm'de 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum amilaz ve lipaz düzeyleri, otomatik cihazlar (Modular Systems, Abbott Diagnostics, CA, US) ve enzim tahlil kitleri (Amilaz, REF: 7D58 ve Lipaz, REF: 7D80, Abbott Diagnostics, CA, US) kullanılarak üretici firma talimatlarına göre ölçüldü.
Pankreatik doku örnekleri homojenize edilerek (Ultra Turrax) ve 6.000 rpm'de 10 dk süre ile 4°C'de santrifüje edildi. IL-1β, IL-6, ve IL-10 düzeyleri üretici firmanın talimatlarına göre ölçüldü (EBIOSCIENCE, Thermo Fisher Scientific, MA, USA, cat no: BMS630; BMS 625; BMS629, sırasıyla).

Lipid peroksidasyonun göstergesi olarak MDA düzeylerine bakıldı. Çözülen doku örnekleri (0,2-0,5 g), soğuk trikloroasetik asit (%10) ile homojenizasyonun (Ultra Turrax) ardından, 4° C'de 15 dk boyunca 3.000 rpm'de santrifüje edildi. Süpernatantlar çıkarıldı ve 5 dk boyunca 4° C'de 10.000 rpm'de yeniden santrifüjlendi. Toplam 0,75 ml süpernatant ve eşit hacimde bir Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi 15 dk kaynatıldı. Absorbans değerleri 532 nm'de okundu. Sonuçlar nmol MDA/g doku olarak belirtildi [17]. Hücresel antioksidan molekül GSH seviyeleri, modifiye Ellman prosedürü kullanılarak ölçüldü. 1 ml 0,3 mol/L Na2HP04.2H20 çözeltisine 0,25 ml süpernatan ilave edildi. 0,2 ml 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) çözeltisi, 0,4 mg/ml %1 sodyum sitrat ilave edilerek 412 nm' de absorbans değeri okundu [17].

İltihaplı dokularda polimorfonükleer lökosit toplanmasının bir işareti olarak MPO enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak test edildi. Yeni çözülmüş −80 ° C pankreatik numuneler (0,2-0,5 g) soğuk bir potasyum fosfat tamponu (PBS, 20 mM K2HP04, pH 7,4) içinde homojenleştirildi ve 12,000 rpm'de 10 dk süreyle 4° C' de santrifüjlendi. Süpernatan atıldıktan sonra elde edilen pelet, hexadecyltrimethylammonium bromide (HETAB) (%0,5 ağırlık/hacim) içeren soğuk bir K2HP04 çözeltisi ile yeniden homojenleştirildi. MPO aktivitesi, o-dianisidin 2HCl'nin H2O2'ye bağlı oksidasyonunun ölçülmesi ile değerlendirildi. 460 nm ve 37° C'de belirlenen enzim aktivitesindeki bir değişiklik, MPO aktivitesi (U/g doku) olarak ifade edildi [17].

ROS'un ışık yayan kimyasal reaksiyonları bir lüminometre (Junior LB 9509, EG&G, Almanya) ile ölçüldü. Ölçümlerden önce pankreas örnekleri yaklaşık 20-25 mg olacak şekilde parçalandı ve PBS (500 mM) + HEPES [20 mM 4- (2-Hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit, N-(2-Hidroksietil) piperazin-Np-(2-etansülfonik asit)] içeren test tüpleri içerisine konuldu. Lusigenin (bis-N-metilakridium nitrat) arttırıcılar, DMSO içinde seyreltildi ve PBS + HEPES ve doku örnekleri içeren test tüplerine nihai konsantrasyonu 0,2 mmol / L (4 ul) olacak şekilde ilave edildi. Okumalar 5 dk boyunca 1 dk'lık periyotlarda yapıldı. Lucigenin CL ölçümlerinden sonra 5 dk'lık bir sayım periyodu için sonuçlar, ıslak ağırlığa kıyasla eğri altındaki alan (AUC) olarak hesaplandı ve göreceli ışık birimi / mg doku (rlu/mg doku) olarak verildi [22].
%10 nötr tamponlu formalin içinde tespit edilen pankreas doku örnekleri, artan alkol serisi (%70, %90, %96, %100) ve ksilen sonrası, parafine gömüldü.

Parafin doku bloklarından, mikrotom (Leica RM2125RT, Wetzlar, Deutschland) ile 5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Azalan alkol serilerinden geçirilerek H&E boyası ile boyandı. Her kesit, Moreno ve ark. 2005 tarafından daha önce tarif edilen kriterlere (0: Yok; 1: Hafif; 2: Orta; 3: Şiddetli) göre uyarlanan teknik ile histopatolojik olarak değerlendirildi [23].

İmmünohistokimyasal incelemeler de alınan kesitler üzerinde yapıldı. NFκ-β p65 tavşan poliklonal antikoru (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD; cat no: PA1-30408) ve COX-2 ticari tavşan poliklonal antikoru (Novus biologicals, LLC, ABD; cat no: NB100-689) üretici talimatına göre uygulandı. İmmünohistokimyasal skorlama, immünopozitif hücrelerin sinyal yoğunluğuna (0: negatif, 1: zayıf, 2: orta, 3: güçlü) ve immünopozitif hücre sayısına (0: %5< pozitif hücre, 1: %5-25 pozitif hücre, 2: %26-50 pozitif hücre, 3: %50> pozitif hücre) göre uyarlanan semi-kantitatif skorlama yapılarak değerlendirildi [24]. Boyanmış tüm kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) ile analiz edildi ve bir dijital kamera (Olympus DP72, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı.

Veriler GraphPad yazılım programı (Prism 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanılarak değerlendirildi. Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çoklu karşılaştırmalarında son-test Bonferroni kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık değeri p <0,05 olarak kabul edildi. Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edildi.

BULGULAR

Pankreas ağırlığının sıçan ağırlığına oranı taşıyıcı grubunda kontrol grubuna göre artarken (p<0,0001) BG, Fuko ve BG + Fuko tedavi gruplarında taşıyıcı grubuna göre azalarak kontrol değerlerine döndüğü belirlendi (p<0,0001) (Şekil 1a).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, taşıyıcı grubunda lipaz ve amilaz düzeyleri yükseldi (p<0,0001). BG grubunda lipaz ve amilaz düzeyleri taşıyıcı gruba göre azaldı (p<0,001). Fuko tedavi grubunda da lipaz (p<0,001) ve amilaz (p<0,01) düzeylerinin taşıyıcı grubuna göre azalmış olduğu bulundu. BG + Fuko grubunda da lipaz (p<0,01) ve amilaz düzeylerinde (p<0,05) taşıyıcı grubuna göre azalma bulundu (Şekil 1b, c). Ancak BG, Fuko ve BG+Fuko tedavi gruplarında lipaz (p<0,01; p<0,001; p<0,001) ve amilaz düzeyleri (p<0,05; p<0,01; p<0,001) kontrol grubuna göre hala yüksek olarak saptandı (şekil 1b ve c).

Taşıyıcı grubunda kontrol grubuna göre artan IL-1 β düzeyi (p<0,0001), BG, Fuko ve BG+Fuko gruplarında, taşıyıcı gruba göre belirgin şekilde azaldı (p<0,0001; p<0,001; p<0,0001 sırasıyla) (Şekil 2a). Ancak IL-1β düzeyleri BG, Fuko ve BG+Fuko gruplarında kontrol grubuna göre hala yüksekti (p<0,0001; p<0,0001; p<0,001)

Taşıyıcı grubunda IL-6 düzeyi kontrol grubuna göre artarken (p<0,0001), Fuko ve BG+Fuko gruplarında taşıyıcı gruba göre kontrol değerlerine varan belirgin bir azalma gözlendi (p<0,01). BG grubunda taşıyıcı grubuna göre anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 2b).

IL-10 düzeyleri, taşıyıcı grubunda kontrole göre azalmış bulundu (p<0,0001). Bu azalma BG, Fuko ve BG+Fuko gruplarında devam ederken (p<0,001, p<0,0001; p<0,0001 sırasıyla), yalnızca BG grubunda IL-10 düzeyinin taşıyıcı gruba göre anlamlı şekilde arttığı belirlendi (p<0,01) (Şekil 2c).

Taşıyıcı grubunda lucigenin düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı belirlendi (p<0,01). BG, Fuko ve BG+Fuko tedavileri lusigenin düzeylerinde taşıyıcı gruba göre anlamlı bir azalmaya neden oldu (p<0,0001; p<0,01; p<0,0001 sırasıyla) bu azalma kontrol değerlerine yakın değerlerde gözlendi (Şekil 3a).

Taşıyıcı grubunda MDA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken (p<0,0001), BG, Fuko ve BG+Fuko tedavisi uygulanan gruplarda MDA düzeyinin taşıyıcı grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (p<0,0001; p<0,001; p<0,0001 sırasıyla) (Şekil 3b).

Taşıyıcı grubunda kontrole göre artan MPO aktivitesi (p<0,0001), BG, Fuko ve BG+Fuko tedavi gruplarında taşıyıcı gruba göre belirgin şekilde azaldı (p<0,0001; p<0,01; p<0,001 sırasıyla) (Şekil 3c).

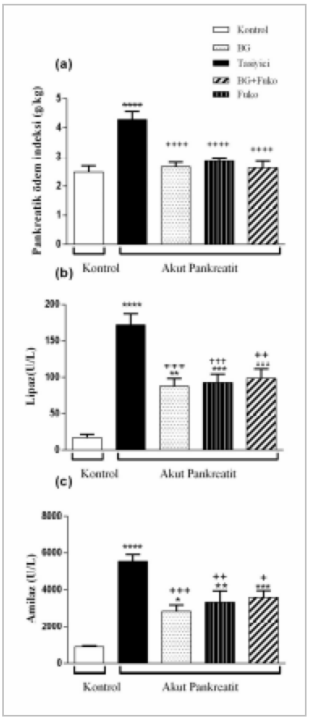
GSH düzeyi taşıyıcı grubunda kontrol grubuna göre belirgin şekilde azalmış bulundu (p<0,0001). Tüm tedavilerin GSH düzeylerini arttırdığı belirlendi. Yalnızca BG tedavi grubunda taşıyıcı gruba göre GSH

düzeyindeki artışın neredeyse kontrol değerlerine ulaştığı belirlenirken (p<0,0001), Fuko ve BG+Fuko tedavi gruplarındaki GSH düzeyleri de taşıyıcı gruba göre belirgin bir şekilde arttı (p<0,001; p<0,01 sırasıyla) (Şekil 3d).

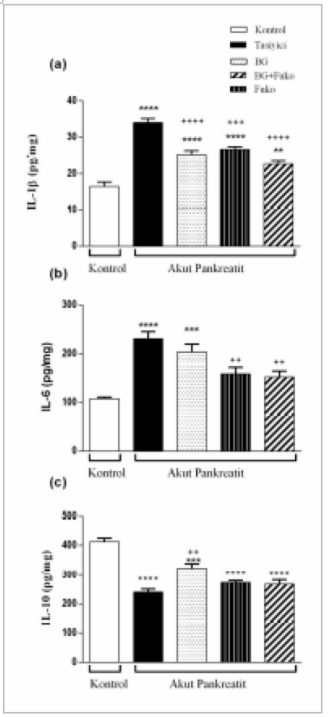
Pankreatik doku hasar skorlaması taşıyıcı grubunda kontrole göre belirgin şekilde arttı (p<0,0001). BG, Fuko ve BG+Fuko gruplarında hasar skoru taşıyıcı gruba göre azalırken (p<0,001; p<0,05; p<0,001 sırasıyla) kontrol grubuna göre yüksekti (p<0,05; p<0,0001; p<0,01 sırasıyla) (Şekil 4A). Kontrol grubunun H&E boyama histopatolojik incelemesinde pankreas parankiminde düzenli morfolojiye sahip iyi organize edilmiş asiner yapılar (Şekil 4B.a) ve taşıyıcı grubunda, sitoplazmik dejenerasyon ve vakuolizasyon, vasküler konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptanırken (Şekil 4B.b), BG, Fuko ve BG+Fuko gruplarında bu hasar görünümünde belirgin bir azalma gözlendi (Şekil 4B.c, d, e).

Taşıyıcı grubunda kontrole göre artan NF-κβ immunohistokimyasal skorunda (p<0,0001) yalnızca BG grubunda taşıyıcı gruba göre kontrol düzeylerine varan belirgin bir azalma gözlendi (p<0,01) (Şekil 5a). Fuko ve BG+Fuko gruplarında ise kontrol grubuna göre yüksek skor değerleri azalma eğilimine rağmen devam etti (p<0,01; p<0,05) (Şekil 5A, 5B).

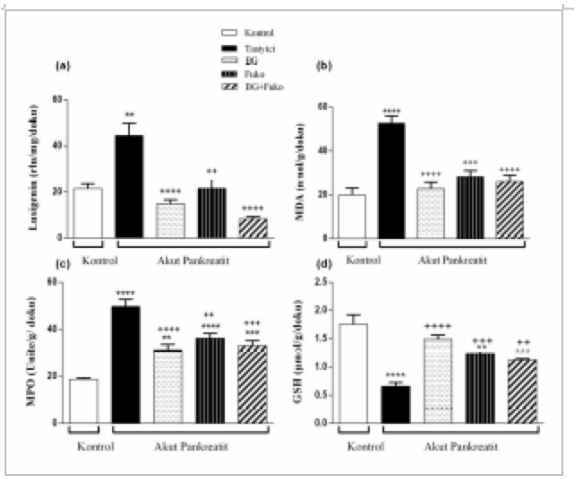
COX- 2 skoru taşıyıcı grubunda kontrole göre artmış bulundu (p<0,0001). BG, Fuko ve BG+Fuko gruplarında taşıyıcı gruba göre belirgin şekilde azalan skorların (p<0,0001) kontrole göre hala yüksek olduğu belirlendi (p<0,01; p<0,01; p<0,001 sırasıyla) (Şekil 6A, Şekil 6B).



Şekil 1. Pankreatik doku ödem indeksi (a), serum lipaz (b) ve amilaz (c) düzeyleri. Kontrol, Taşıyıcı, BG, Fuko ve BG+Fuko tedavi grupları (n=6). Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edilmiştir; **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 kontrol grubuna göre; +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001, ++++p<0,0001 taşıyıcı gruba göre.

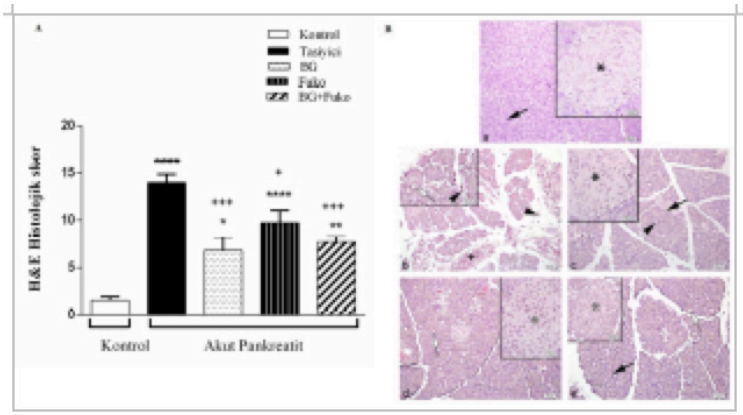


Şekil 2. Pankreas dokusu IL-1β (a), IL-6 (b), IL-10 (c) düzeyleri. Kontrol, Taşıyıcı, Fuko, BG ve BG+Fuko tedavi grupları (n=6). Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edilmiştir; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 kontrol grubuna göre; ++p<0,01, +++p<0,001, ++++p<0,0001 taşıyıcı gruba göre.

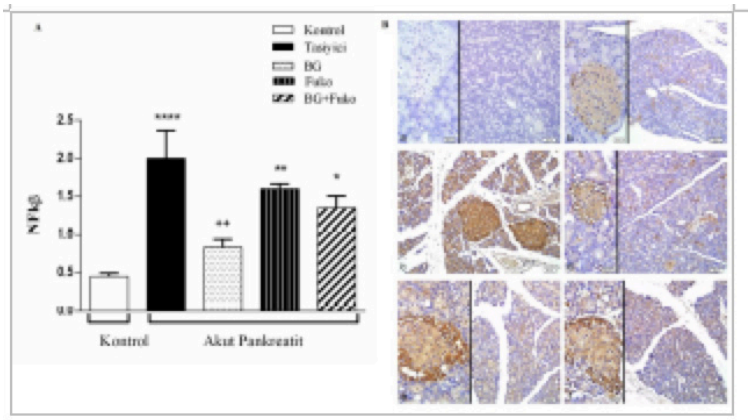


Şekil 3. Pankreas dokusu lusigenin kemiluminesans (a), MDA (b), MPO (c), GSH (d) düzeyleri Kontrol, Taşıyıcı, Fuko, BG ve BG+Fuko tedavi grupları (n=6). Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edilmiştir. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 kontrol grubuna göre; ++p<0,01, +++p<0,001, ++++p<0,0001 taşıyıcı gruba göre.

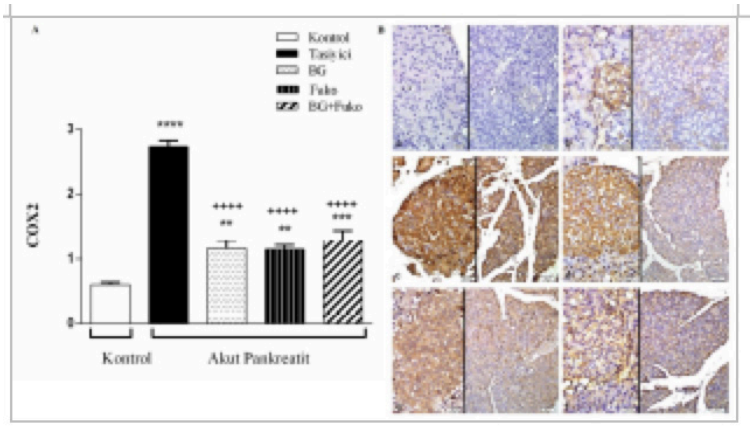
Bozok Tıp Derg 2020;10(2):189-97
Bozok Med J 2020;10(2):189-97



Şekil 4. Pankreas dokusu histolojik skorlaması (4A) Kontrol, Taşıyıcı, Fuko, BG ve BG+Fuko tedavi grupları (n=6). Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 kontrol grubuna göre; +p<0,05, +++p<0,001, taşıyıcı gruba göre.
H&E Boyama temsili histolojik fotomikrograflar (4B). Ok: Düzenli glandüler yapılara sahip parankim. Yıldız işareti (*): Düzenli morfolojisi olan Langerhans'ın adacık. Beyaz ok: Ekzokrin bezinde vakuolizasyon. Okbaşı: Nötrofil infiltrasyonu. Artı (+): Kan damarlarında konjesyon. H&E Boyama. Kontrol (a), Taşıyıcı (b), BG (c), Fuko (d). BG+Fuko (e) grupları (n=6).



Şekil 5. NF-κB immunohistokimya skorlaması (5A). Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edilmiştir. Kontrol, Taşıyıcı, Fuko, BG ve BG+Fuko tedavili gruplar (n=6). Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrol grubuna göre; ++p<0,01 taşıyıcı gruba göre.
NF-κB temsili immunohistokimyasal fotomikrografı (5B). Kahverengi boyalı bölgeler, NF-κB immünoreaktivitesini gösterir. Taşıyıcı grupta güçlü NF-κB eksprese eden asiner hücreler. Fuko, BG ve BG+Fuko tedavi gruplarında hafifleyen NF-κB ekpresyonu gösteren asiner hücreler. Negatif kontrol (a), Kontrol (b), Taşıyıcı (c), BG (d), Fuko (e) ve BG+Fuko (f) grupları (n=6).



Şekil 6. COX-2 İmmunohistokimya skorlaması (6A). Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edilmiştir. Kontrol, Taşıyıcı, Fuko, BG ve BG+Fuko tedavi grupları (n=6). Değerler ortalama ± S.E.M olarak ifade edilmiştir. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 kontrol grubuna göre; ++++p<0,0001 taşıyıcı gruba göre.
COX-2 temsili immunohistokimyasal fotomikrografı (6B). Kahverengi boyalı bölgeler, COX-2 immünoreaktivitesini gösterir. Taşıyıcı grupta güçlü COX-2 eksprese eden asiner hücreler. Fuko, BG ve BG+Fuko tedavi gruplarında hafifleyen COX-2 ekpresyonu gösteren asiner hücreler. Negatif kontrol (a), Kontrol (b), Taşıyıcı (c), BG (d), Fuko (e) ve BG+Fuko (f) grupları (n=6).

TARTIŞMA

AP patogenezinde zimojen granüllerin erken intrapankreatik aktivasyonu, amilaz ve lipaz gibi enzimlerde, ROS ve COX-2 gibi inflamatuvar medyatörlerde artışa ve pankreatik hasara neden olur [25,26]. Bir kolesistokinin analoğu olan serulein ROS oluşumuna neden olarak NF-κB ve sitokin ekspresyonunu indükler [27,28] ve NF-κB'nin aktivasyonu ve sitokin salınımının AP'nin erken döneminde gerçekleştiği gösterilmiştir [29,30]. Mevcut çalışmada literatüre benzer şekilde serulein uygulaması ile pankreatik amilaz ve lipaz düzeyleri, NF-κB, COX-2 immunoreaktivitesi ve IL-1β ve IL-6 düzeyi artmıştır. Serulein akut ödematöz pankreatit gelişimine yol açar ve insandaki klinikte sık görülen hafif ödemli AP'ye

karşılık gelir [26]. Histopatolojik olarak çalışmamızda gözlenen dejenerasyon ve vakuolizasyon, vasküler konjesyon, doku ağırlığındaki artış ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu ödematöz pankreatitise işaret etmektedir.

Antioksidanların ve anti-inflamatuvar ilaçların pankreatit modellerinde yararlı etkilere sahip olduğu öne sürülmüştür [20,31]. Bu nedenle, mevcut çalışmada antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri olan Beta Glukan ve fukoksantin kullanılmıştır.

Serulein uygulaması ile oksidatif stres göstergesi olan MDA, CL düzeyleri artarken antioksidan molekül GSH düzeyleri azalır [17,20]. Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde AP uygulaması MDA ve CL düzeyini arttırırken GSH düzeyini azaltmıştır. Beta Glukan'ın deneysel oksidatif organ hasarı modellerinde karaciğer, böbrek, akciğer dokularında MDA ve CL düzeyini azalttığı ve GSH düzeyini arttırdığı gösterilmiştir [17,32]. Çalışmamızda önceki çalışmalara benzer şekilde Beta Glukan tedavisi ile MDA düzeyleri azalmış ve GSH düzeyleri artmıştır. Diğer yandan, mevcut çalışmada GSH düzeyinin fukoksantin tedavisi ile arttığı gösterildi. Önceki çalışmalarda fukoksantinin farklı dokularda ROS oluşumunu, MDA düzeyini azalttığı [33], GSH düzeyini arttırdığı [34], ve PI3K / Akt sinyali yoluyla GSH sentezinde yer alan enzimlerin Nrf-2 aracılı ekspresyonunu indükleyerek hücresel antioksidan savunmayı arttırdığı gösterilmiştir [12]. Çalışmamız fukoksantinin GSH düzeyini arttırdığını ve oksidatif belirteçleri azalttığını gösteren önceki çalışmalarla uyumludur. Kombine tedavinin oksidatif stres üzerine tek başına uygulanan tedavilerden daha etkili olduğunu gözlenmemiştir.

Deneysel çalışmalar, NF-κB'nın inhibisyonunun AP şiddetini azalttığını göstermiştir [6,35,36]. Chen ve ark. serulein ile indüklenen AP modelinde NF-κB'nin aktivitesinin azaltılması ile TNF-α, IL-1β, ve IL-6'da inhibisyon olduğunu bildirmişlerdir [28]. Bizim çalışmamızda Beta Glukan ile, NF-κB immunohistokimyasal skorunda kontrol düzeylerine varan bir azalma gözlenmiştir. Li ve ark. Beta Glukan ile ön tedavinin, miyokardiyal NF-κB aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla bölgesel oksidatif hasara karşı koruma sağladığı göstermişlerdir [37]. Çalışmamız Beta Glukanın NF-κB sinyalini azalttığını gösteren bu çalışma ile uyumludur. Diğer yandan, Zheng ve ark. fukoksantinin alkolle oluşturulan karaciğer hasarında NF-κB sinyal yolağında azalışa neden olduğunu rapor etmişlerdir [12]. Mevcut çalışmada fukoksantin ve kombine tedavi ile NF-κB skorunda azalma eğilimi gözlenmiştir ancak bu azalma istatistik olararak anlamlı bir düzeye ulaşmamıştır

COX-2, nötrofillerin baskın olduğu inflamasyonun erken evrelerinde ifade edilen bir pro-inflamatuvar enzimdir. Song ve ark. 'ları pankreatik COX-2 düzeyinin serulein uygulamasından sonra arttığını göstermişlerdir [8]. COX-2 epitelyal duktal hücre hasarını arttırmakta ve dokuya inflamatuvar hücreleri çekmektedir [8]. Çalışmamızda AP modeli ile artan nötrofil infiltrasyonun göstergesi olan MPO aktivitesi ve pro-inflamatuvar COX-2 skoru, BG ve fukoksantin tedavileri ile belirgin şekilde azalmıştır ancak bu azalma kontrol düzeylerine varan oranlarda gözlenmemiştir. Bu durum uygulanan tedavilerin süresine ya da dozuna bağlı olabilir. Şener ve ark. Beta Glukan'ın oksidatif organ hasarında MPO düzeyini belirgin şekilde azalttığını göstermişlerdir [17,32]. Doku COX-2 histolojik skorlamasında da hasara göre azalma gözlenmiş ancak bu azalma kontrol seviyelerine ulaşmamıştır. Önceki bir çalışmada, fukoksantinin metaboliti olan fukoksantinol'ün, COX-2 mRNA ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu önlediğini göstermiştir [38]. Çalışmamız fukoksantinin COX-2 enzimini azaltıcı etkisi olduğunu gösteren çalışmalarla uyumludur. İlave olarak, çalışmanın genel histolojik hasar değerlendirilmesinde uygulanan tüm tedaviler hücresel hasarın azaldığını göstermiştir. Bu sonuç Liu ve ark.'larının Beta Glukan'ın pankreatik dokunun hasarını azalttığını gösteren önceki bir çalışmayı desteklemektedir [19].

IL-1β ve IL-6, AP patofizyolojisinde önemli rol oynayan iki önemli pro-inflamatuvar sitokindir [4]. Beta Glukan, sıçanlarda deneysel sepsis modelinde TNF-α, IL-1, IL-6 konsantrasyonunu, akciğer yaralanma skorunu düşürmüş ve akut akciğer hasarını önlemiştir [15]. Çalışmamızda Beta Glukan IL-1β düzeyini düşürmüş ancak IL-6 düzeyi üzerinde bir etki göstermemiştir. Fukoksantin'in lipopolisakkarit ile indüklenen fare

sepsis modelinde IL-6, IL-1β, ve TNF-α, gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin düzeyini azalttığı rapor edilmiştir [11]. Mevcut çalışmada da benzer şekilde fukoksantin IL-6 ve IL-1 β düzeylerini azaltmıştır. İlave olarak, IL-6 düzeylerindeki azalma kontrole yaklaşan bir düzeyde olmuştur. Sitokin düzeyleri açısından kombine tedavinin tek başına tedavilere göre bir üstünlüğü bulunmamıştır. Mevcut çalışmamızda Beta Glukanın anti-inflamatuvar IL-10 düzeyini arttırıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Literatürde Beta Glukan'ın IL-10 düzeyini arttırıcı etkisi Tip-I diyabet modelinde gösterilmiştir [39]. Çalışmamızın sonucu önceki bu çalışma ile uyumludur.

SONUÇ

Çalışmamız Beta Glukan ve fukoksantin'in antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri aracılığı ile akut pankreatit şiddetini azalttığını, histopatolojik ve biyokimyasal olarak ortaya koymaktadır. Öte yandan kombine tedavinin tek başına tedavilere göre bir üstünlüğü gözlenmemiştir. Akut pankreatit riski taşıyan bireylerde olası akut pankreatitin etkilerini azaltmak amacı ile Beta Glukan veya fukoksantin desteği verilebilir. Beta Glukan ve fukoksantin'in akut pankreatitteki terapötik etkisinin ve mekanizmasının farklı AP modellerinde araştırılmasının yeni bir semptomatik tedavi seçeneğini oluşturma ihtimali açısından önemli olduğu düşüncesindeyiz.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 5436 numara ve SAG-K-090518-0213 kodu ile destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Su KH, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. HPB (Oxford). 2006; 8(4):264–286. doi:10.1080/13651820500467358

2. Escobar J, Pereda J, Arduini A, Sandoval J, Sabater L, Aparisi L, et al. Cross-Talk between Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Cytokines in Acute Pancreatitis: A Key Role for Protein Phosphatases. Current Pharmaceutical Design. 2009; 15(26), 3027–3042. doi:10.2174/138161209789058075

3. Lin ZS, Ku CF, Guan YF, Xiao HT, Shi XK, Wang HQ, et al. Dihydro-Resveratrol Ameliorates Lung Injury in Rats with Cerulein-Induced Acute Pancreatitis. Phytother Res. 2016 ;30(4):663-70. doi: 10.1002/ptr.5576.

4. Rakonczay Jr Z, Hegyi P, Taka´cs T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. Gut. 2008; 57:259–267. doi:10.1136/gut.2007.124115

5. Xiong J, Wang K, Yuan C, Xing R, Ni J, Hu G, et al. Luteolin protects mice from severe acute pancreatitis by exerting HO-1-mediated anti-inflammatory and antioxidant effects. Int J Mol Med. 2017; 39(1): 113–125.

6. Altavilla D, Famulari C, Passaniti M, Campo GM, Macrì A, Seminara P, et al. Lipid peroxidation inhibition reduces NF-kappaB activation and attenuates cerulein-induced pancreatitis. Free Radic Res. 2003; 37:425–35.

7. de Almeida JL, Jukemura J, Coelho AM, Patzina RA, Machado MC, da Cunha JE. Inhibition of cyclooxygenase-2 in experimental severe acute pancreatitis. Clinics (Sao Paulo). 2006;61(4):301-6. doi:10.1590/s1807-59322006000400005

8. Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GGD, Steer ML, Saluja AK. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002; 283:1166-74.

9. Raposo MF, de Morais AM, de Morais RM. Carotenoids from Marine Microalgae: A Valuable Natural Source for the Prevention of Chronic Diseases. Mar Drugs. 2015; 13(8):5128–5155.

10. Heo SJ, Ko SC, Kang SM, Kang HS, Kim JP, Kim SH, et al. Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae Sargassum siliquastrum against H2O2-induced cell damage. Eur. Food Res. Technol. 2008; 228:145–151. doi: 10.1007/s00217-008-0918-7.

11. Su J, Guo K, Huang M, Liu Y, Zhang J, Sun L, et al. Fucoxanthin, a Marine Xanthophyll Isolated From Conticribra weissflogii ND-8: Preventive Anti-Inflammatory Effect in a Mouse Model of Sepsis. Front Pharmacol. 2019; 10:906. doi: 10.3389/fphar.2019.00906. eCollection 2019.

12. Zheng J, Tian X, Zhang W, Zheng P, Huang F, Ding G, et al. Protective Effects of Fucoxanthin against Alcoholic Liver Injury by Activation of Nrf2-Mediated Antioxidant Defense and Inhibition of TLR4-Mediated Inflammation. Mar Drugs. 2019; 17(10): 552.

13. Şöhretoğlu D, Uz AK. Beta Glukanlar ve İmmün Sistem. 2015; 2:103 – 115

14. Jung KH, Kim MJ, Ha E, Kim HK, Kim YO, Kang SA, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 in experimental severe acute pancreatitis. Clinics (Sao Paulo). 2006; 61(4):301-6. doi:10.1590/S1807-59322006000400005

15. 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(4):397-401. doi: 10.1097/01.shk.0000245030.24235.f1

16. Ozsoy Z, Gevrek F, Ozsoy S, Dasıran MF, Akgul GG, Yenidogan E. Effect of β-glucan on acetic acid-induced colitis in rats. Int J Clin Exp Med. 2018;11(8):7775-7787

17. Şener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Çetiner M, Ercan F, Çağlayan-Yeğen B. β-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. Eur J Pharmacol. 2006; 542(1-3):170-8.

18. Çetin E. Pretreatment with β-glucan attenuates isoprenaline-induced myocardial injury in rats. Exp Physiol. 2019; 104(4):505-513.

doi: 10.1113/EP086739.
19. Liu M, Zhang Y, Zhang H, Hu B, Wang L, Qian H, et al. The anti-diabetic activity of oat β-d-glucan in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. Int J Biol Macromol. 2016; 91:1170-6. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.083.
20. Bulut NE, Özkan E, Ekinci O, Dulundu E, Topaloğlu Ü, Şehirli AÖ, et al. Beneficial effects of alpha lipoic acid on cerulein-induced experimental acute pancreatitis in rats. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2011; 17(5):383-9.
21. Carvalho KM, Morais TC, de Melo TS, de Castro Brito GA, de Andrade GM, Rao V S et al. The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 33, 1534–1539. doi:10.1248/bpb.33.1534
22. Haklar G, Sayin-Ozveri E, Yüksel M, Aktan AO, Yalcin AS. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. Cancer Letters. 2001; 165: 219–224. doi:10.1016/s0304-3835(01)00421-9
23. Moreno C, Nicaise C, Gustot T, Quertinmont E, Nagy N, Parmentier M, et al. J. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006; 291: G1089 –G1099, 2006
24. Koc M, Kumral ZNÖ, Özkan N, Memi G, Kacar Ö, Bilsel S, et al. Obestatin improves ischemia/reperfusion-induced renal injury in ratsvia its antioxidant and anti-apoptotic effects: Role of the nitric oxide. Peptides. 2014; 60:23-31. doi:10.1016/j.peptides.2014.07.019.
25. Pérez S, Pereda J, Sabater L, Sastre J. Redox signaling in acute pancreatitis. Redox Biology. 2015; 5:1–14. doi:10.1016/j.redox.2015.01.014
26. Kim H. Cerulein pancreatitis: Oxidative stress, inflammation, and apoptosis. Gut and Liver. 2008; 2(2): 74–80. doi:10.5009/gnl.2008.2.2.74
27. Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. Laboratory Investigation. 2002;82(10), 1359–1368. doi:10.1097/01.lab.00000 32377.09626.c7
28. Chen P, Huang L, Zhang Y, Qiao M, Yao W, Yuan Y. The antagonist of the JAK-1/STAT-1 signaling pathway improves the severity of cerulein-stimulated pancreatic injury via inhibition of NF-κB activity. Int J Mol Med. 2011; 27(5):731-8. doi: 10.3892/ijmm.2011.632.
29. Jakkampudi A, Jangala R, Reddy BR, Mitnala S, Nageshwar Reddy D, Talukdar R. NF-kappaB in acute pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential. Pancreatology. 2016; 16:477-488. doi: 10.1016/j.pan.2016.05.001.
30. Jaworek J, Szklarczyk J, Kot M, Góralska M, Jaworek A, Bonior J, et al. Chemerin alleviates acute pancreatitis in the rat thorough modulation of NF-κB signal. Pancreatology. 2019;19(3):401-408. doi: 10.1016/j.pan.2019.02.005.
31. Ozkan E, Akyüz C, Dulundu E, Topaloğlu U, Sehirli AÖ, Ercan F et al. Protective effects of lycopene on cerulein-induced experimental acute pancreatitis in rats. J Surg Res. 2012; 176(1):232-238. doi: 10.1016/j.jss.2011.09.005.
32. Toklu HZ, Sehirli AO, Velioğlu-Oğünç A, Cetinel S, Sener G. Acetaminophen-induced toxicity is prevented by beta-D-glucan treatment in mice. Eur J Pharmacol. 2006; 14;543(1-3):133-40.
33. Zhang L, Wang H, Fan Y, Gao Y, Li X, Hu Z, et al. Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways. Sci Rep. 2017; 7:46763. doi:10.1038/srep46763
34. Zheng J, Piao MJ, Kim KC, Yao CW, Cha JW, Hyun JW. Fucoxanthin enhances the level of reduced glutathione via the Nrf2-mediated pathway in human keratinocytes. Mar Drugs. 2014; 12(7):4214-30. doi: 10.3390/md12074214
35. Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003; 284:85–95. doi:10.1152/ajpgi.00138.2002
36. Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. Gastroenterology. 2002; 122:448–57. doi:10.1053/gast.2002.31060
37. Li C, Ha T, Kelley J, Gao X, Qiu Y, Kao RL, et al. Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1–>3)- b-D-glucan rapidly induces cardioprotection. Cardiovasc Res. 2004; 61:538.
38. Park HJ, Lee MK, Park YB, Shin YC, Choi MS. Beneficial effects of Undaria pinnatifida ethanol extract on diet-induced-insulin resistance in C57BL/6J mice. Food Chem Toxicol. 2011; 49(4):727-33. doi: 10.1016/j.fct.2010.11.032.
39. Karumuthil-Melethil S, Gudi R, Johnson BM, Perez N, Vasu C. Fungal β-glucan, a Dectin-1 ligand, promotes protection from type 1 diabetes by inducing regulatory innate immune response. J Immunol. 2014;193(7):3308-21. doi: 10.4049/jimmunol.1400186.