

ARAŞTIRMA YAZISI

Sıçanlarda iskemik deri fleplerinde oral β -glukanın etkisi

The effects of oral β -glucan on ischemic skin flap in rats

Abdülhakim İbrahim Ulusoy¹, Erdinç Yenidoğan², Soykan Dinç³, Mehmet Ali Gülçelik³, Gökhan Giray Akgül³, Muhammet Kadri Çolakoglu³, Haluk Alagöl²

Amaç: Sıçanlarda random deri fleplerine β -Glukanın etkisini ve distal nekrozu azaltabilme özelliğini göstermektedir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 14 adet erişkin dişi Wistar sıçan alındı ve her bir grupta 7 denek olacak şekilde randomize 2 grup oluşturuldu. A grubu kontrol grubu, B grubu operasyondan 5 gün önce başlanıp her gün, operasyon günü ve takip eden 2 güne kadar sadece 200 mg/kg β -Glukan peroral verilen grubu oluşturdu. Sıçanların sırtından 2x7 cm boyutunda tam kat deri flebi pedikülü sıçanın kuyruk bölgesinde kalacak şekilde kaldırıldı. Postoperatif 7. gün distal nekroz oranları saptandı. Flep uç kısmından (pediküle doğru) itibaren 2. ve 5. cm'den 1 cm² boyutunda tam kat deri alanı malondialdehit değerlendirmesi ve histopatolojik değerlendirme için alındı.

Bulgular: Kontrol grubunda ortalama nekroz alanı boyutu 3.91 ± 1.38 cm² iken, β -Glukan grubunda ortalama 1.13 ± 0.88 cm² olarak saptandı ($p < 0.001$). Doku örneklerinde malondialdehit değerleri β -Glukan grubunda kontrol grubuna göre daha düşüktü (Kontrol grubunun 2. cm'sinde ortalama 2.5 ± 1.13 , 5. cm'sinde ortalama 2.7 ± 2.19 nmol/g doku iken, β -Glukan grubunun 2. cm'sinde ortalama 0.9 ± 0.56 , 5. cm'sinde ortalama 1.2 ± 1.07 nmol/g doku idi, 2. ve 5. cm, sırasıyla $p < 0.02$, $p = 0.123$). Histopatolojik olarak β -Glukan grubunda makrofaj ve fibroblast aktivitesinde önemli artış saptandı. Histopatolojik değerlendirme β -Glukanın koruyucu etkisini göstermektedir. β -Glukan ile tedavi edilmiş sıçanlarda deri flep nekrozunun tedavi edilmemişlere göre daha az olduğu görülmüştür.

Sonuç: Bu çalışma random deri flep canlılığı için β -Glukanın önemini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: β -Glukan, sıçan, flep nekrozu

¹Görece Devlet Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Giresun, Türkiye
²Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye
³Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Ankara, Türkiye

Dr. Erdinç Yenidoğan
 E-posta: claritromisin@yahoo.com

Makale Geliş Tarihi: 11.04.2012
 Makale Kabul Tarihi: 10.05.2012

Çalışma 18. Ulusal Cerrahi Kongresinde poster olarak yayınlanmak üzere yollanmış ve poster olarak kabul edilmiştir.

GİRİŞ

Flep cerrahisi sonrası dokularda görülen nekroz günümüzde en önemli problemlerden biri olmaya devam etmektedir. Bu problemi çözmeye yönelik birçok medikal ve cerrahi çalışma halen devam etmektedir (1,2). Random iskemik deri fleplerinde nekroza; venöz dönüş eksikliği, iske-mi ve oksijenin neden olduğu bilinmektedir. Bu bilgi çerçevesinde deneysel çalışmalar yapılmış ve sempatotikler, vazodilatörler, antikoagülanlar, prostoglandin inhibitörleri, serbest oksijen radikal tutucuları gibi birçok farmakolojik ajan flebi iskemiyeye karşı korumak için kullanılmıştır (3,4). Deneysel olarak bazı ajanların faydaları saptanmış fakat klinik pratikte bu ajanların kullanımını ile ilgili belirli fikir birliğine varılamamıştır.

Glukan *Saccharomyces cerevisiae*'nin duvarından izole edilen doğal polisakkarid yapısında bir maddedir (5). β -1,3 glukan oral yoldan etkili nontoksik güçlü bir immünostimülandır. 1980'li yılların sonlarında bu materyalin makrofajların yüzeyinde var olan spesifik reseptörlere etki ettiği tanımlanmış, makrofajların β glukan reseptörleri olduğu ve bu reseptörlere bağlanmanın makrofaj aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (6-8). Sıçanlarda yürütülen deneysel çalışmalar glukan uygulamasının granülosit ve makrofaj üretimini arttırdığını düşündürmektedir. β -Glukanın antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümöral, antienflamatuar etkileri ve makrofaj aktivasyonuna etkileri bildirilmiştir (9-13). Bu bilgilerin ışığında yapılan korele invivo çalışmalarda glukanın major torasik ve gastrointestinal

cerrahi girişimler sonrası immün sistemi güçlendirdiği, malnütrisyonu önlediği, makrofaj ve lökosit fonksiyonlarını iyileştirerek ciddi yara yeri enfeksiyonlarını ve ölümlü rölatif olarak azalttığını belirtmişlerdir (14-19). Ayrıca glukun etkili bir serbest oksijen radikali temizleyicisi olarak antioksidan özellik de gösterir (20). Sıçanlarda yapılan cilt yara modelleriyle, glukun uygulanmasının artmış yara gerilim direncini yükselttiği ve yara yeri iyileşmesinin daha iyi olduğu gösterilmiştir (21-24). İnsan deri fibroblastlarında ve murine yara modelinde kollajen biyosentezini uyardığı saptanmıştır (25,26).

Bu çalışmanın hipotezi β -Glukanın immünostimulan, antibakteriyal, antifungal, antiviral, antitümöral, antienflamatuar ve makrofaj aktivasyonuna etkileri ile deri flep canlılığı arasında ilişki olabileceği olup, çalışmanın amacı β -Glukanın yara iyileşmesi üzerine olan olumlu etkileri göz önüne alınarak sıçan modelinde glukun uygulamasının, deri fleplerinin sağ kalımına etkisini belirlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Dr. Abdurrahman Yurtarlan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Eğitim Planlama ve Koordinasyon Kurulu'nun onayı alınarak, "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" kriterleri göz önüne alınarak gerçekleştirildi. Çalışmaya ağırlıkları 200-250 gr. arasında olan 14 adet erişkin dişi Wistar sıçan alındı ve her bir grupta 7 denek olacak şekilde randomize 2 grup oluşturuldu. A grubu kontrol grubu, B grubu operasyondan 5 gün önce başlayıp her gün, operasyon günü ve takip eden 2 güne kadar sadece 200 mg/kg Glukan peroral verilen grubu oluşturdu (Glukan grubu). Operasyon öncesi bütün sıçanlara 50 mg/kg ketamin hidroklorür ve 10 mg/kg xylazin anestezik amaçlı uygulandı. Sıçanların sırtları derileri sağlam kalacak şekilde traş edildi. Sıçanların sırtından 2x7 cm boyutunda tam kat deri flebi pedikülü sıçanın kuyruk bölgesinde kalacak şekilde standart Mc-Farlane tipi dorsal fare flep modelinde kaldırıldı (27). Hemostazı takiben deri flebi kaldırıldığı alana cilt cilde 4/0 prolenele suture edildi. Ameliyattan sonra sıçanların yiyeceği ve su içmeleri serbest bırakıldı.

Postoperatif 7. günde sıçanların sırtlarındaki flep alanlarında oluşan nekroz alanları ölçüldü. Flep alanlarının 2. ve 5. cm'lerinden tam kat 1 cm²'lik doku örnekleri alındı. Dokular patolojik değerlendirme ve biyokimyasal analiz için iki eşit parçaya bölündü. Histopatolojik değerlendirme için alınan dokular nekroz alanlarını ve polimorf nüveli lökosit (PMNL) aktivas-

yonunun değerlendirilmesi için %10'luk formaldehide konuldu. Diğer yarısı hidrokspirolin ve malonildialdehit (MDA) değerlendirmesi için alüminyum folyoya sarılarak sıvı azot tankına konuldu. MDA tayini, Mihara ve Uchiyama tarafından geliştirilen metot ile çalışıldı (28). Numunenin 0.5 mL alınarak, 3 mL fosforik asit, 1 mL tiyobarbitürük asit (TBA) solüsyonuna ilave edildi. Kaynar su banyosunda 45 dakika bekletilip soğutulan tüplere 4 mL n-butanol ilave edilip karıştırıldı. 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra tüpün üst kısmındaki n-butanol fazı 535 ve 520 nm'de spektrofotometrede okutuldu. İki absorbans arasındaki fark nmol/g doku TBA düzeyi olarak hesaplandı. Histopatolojik değerlendirmede doku örneklerinde nekroz alanları ve PMNL akümüasyonu değerlendirildi. Nekroz ve PMNL akümüasyonu 1'den 3'e kadar skorlandırılarak sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 1) (29).

Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Nekroz ve PMNL skorları ortanca (minimum-maksimum) şeklinde gösterilirken, MDA düzeyleri ortalama±standart sapma biçiminde gösterildi. Gruplar arasında nekroz ve PMNL skorları yönünden farkın anlamlılığı Mann-Whitney U testi ile incelenirken, MDA yönünden farklılıklar Student's t testi ile değerlendirildi. P<0.05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışma esnasında denekler arasında ölüm olmadı.

Fleplerde oluşan nekroz alan boyutu göz önüne alındığında; kontrol grubunda ortalama nekroz alanı boyutu 3.91±1.38 cm² iken, glukun grubunda ortalama 1.13±0.88 cm² olarak saptandı. Kontrol grubu ile glukun grubu karşılaştırıldığında sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.001).

Flepler histopatolojik olarak değerlendirildiğinde; kontrol grubuna ait flep doku örneği mikroskopisinde; yaygın nekroz alanları, yer yer ödematöz dokular ve PMNL izlendi. Glukan grubuna ait flep doku örneği mikroskopisinde ise yaygın PMNL izlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında glukun grubunda nekroz ve ödematöz alanlar yok denecek kadar azdı.

Nekroz alanları göz önüne alındığında; 2. cm'den alınan doku örneklerinde kontrol grubunda ortanca skor 3 iken (minimum 1, maksimum 3) glukun grubunda ortanca skor 1 idi (minimum 0, maksimum 2). 2. cm'den alınan doku örneklerinde sonuç-

lar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık vardı (p<0.01). 5. cm'den alınan doku örneklerinde kontrol grubunda ortanca skor 0 iken (minimum 0, maksimum 3) glukun grubunda ortanca skor 0 idi (minimum 0, maksimum 1). 5. cm'den alınan doku örneklerinde sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu (p=0.329).

PMNL aktivasyonu göz önüne alındığında; 2. cm den alınan doku örneklerinde kontrol grubunda ortanca skor 1 iken (minimum 1, maksimum 3) glukun grubunda ortanca skor 3'tü (minimum 1, maksimum 3). 2. cm'den alınan doku örneklerinde sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık vardı (p<0.04). 5. cm'den alınan doku örneklerinde kontrol grubunda ortanca skor 2 iken (minimum 0, maksimum 3) glukun grubunda ortanca skor 2'ydü (minimum 0, maksimum 3). 5 cm'den alınan doku örneklerinde sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu (p=0.891).

Fleplerden alınan doku örnekleri iskemi göstergesi olan MDA açısından değerlendirildiğinde; 2. cm'den alınan doku örneklerinde MDA değeri kontrol grubunda ortalama 2.5±1.13 nmol/g doku iken, glukun grubunda ortalama 0.9±0.56 nmol/g doku idi. 2. cm'den alınan doku örneklerinde kontrol grubu ile glukun grubu karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.02). 5. cm'den alınan doku örneklerinde MDA değeri kontrol grubunda ortalama 2.7±2.19 nmol/g doku iken, glukun grubunda ortalama 1.2±1.07 nmol/g doku idi. 5. cm'den alınan doku örneklerinde kontrol grubu ile glukun grubu karşılaştırıldığında sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (p=0.123).

TARTIŞMA

Fleplerde görülen iskemi flep cerrahisinde önemli sorunlardan birisidir. Özellikle distal iskemik nekroz pediküllü deri flep cerrahisinde en sık görülen komplikasyondur. Random iskemik deri flebinde nekroza venöz dönüş eksikliği, iskemi ve oksijen eksikliği neden olmaktadır. Çeşitli çalışmalarla β -Glukanın antibakteriyal, antifungal, antiviral, antitümöral, antienflamatuar etkileri ve makrofaj aktivasyonuna etkileri belirlenmiştir (9-13). Flep sağkalımını arttırmaya yönelik etkili bir farmakolojik tedavi geliştirmek için birçok araştırma ve çalışma yapılmış, günümüzde de bu çalışmalar devam etmekte olmasına rağmen şu an için uygulanan ideal bir farmakolojik tedavi yoktur. β -Glukan belirlenmiş etkileri ile

Tablo 1. Nekroz alanları ve PMNL akümüasyonu değerlendirme skalası (29)

Nekroz	Küçük alanlar	1
	Bir kaç alan	2
	Masif	3
PMNL akümüasyonu	Artmış	1
	Belirgin infiltrasyon	2
	Masif infiltrasyon	3

iskemik pediküllü deri fleplerinde sağ kalımı arttırmaya yönelik araştırmalara yardımcı olabilir.

Yaptığımız bu çalışmada; doku örneklerini 2. ve 5. cm'lerden aldık. Çalışmamızdan önce yapılan kontrol çalışmalarımızda kontrol grubunun flebinde 2.3 cm ile 5.4 cm'ler arasında nekroz alanları gelişmişti. Biz de glukanın etkisini efektif değerlendirebileceğimiz alan olarak 2. ve 5. cm'leri uygun gördük.

İkinci cm'den alınan doku örneklerinde nekroz alanları açısından farklılık olmasını glukanın yara iyileşmesinde anjiogenezisi (neovaskülarizasyon) artırmasının sonucu olarak değerlendirdik. Bilindiği gibi makrofajlar yara iyileşmesinde anahtar hücrelerdir (30). Ürettiği humoral faktörlerle yaralanma bölgesindeki hücreleri dinamik olarak kontrol ettiği gösterilmiştir. Sonuçta fibroplazi, fibrogenesis ve anjiogenezisde artış olur. Ayrıca makrofajların yaranın metabolik enerji durumunun kontrolünde yeri vardır (31). Glukanın makrofaj uyarıcı olduğu bilinmektedir (32). Topikal ve intravenöz preparatların kutanöz yara iyileşmesinde kullanımı ile yara gerilme-

sinde kayda değer artışlar saptanmış ve bulguları yayınlanmıştır (31).

Histopatolojik açıdan PMNL aktivasyonu iki grup arasında karşılaştırıldığında; 2. cm'den alınan doku örneklerinde PMNL aktivasyonu açısından farklılık olmasını glukanın nötrofil migrasyonu protein sinyal transdüksiyon arayolları aracılığıyla aktive etmesinin sonucu olarak değerlendirdik (33).

Beşinci santimetreden alınan doku örneklerinde nekroz alanları ve PMNL aktivasyonu açısından gruplar arasında (kontrol grubunda maksimum skor 3, glukun grubunda maksimum skor 1 olmasına rağmen) anlamlı farklılık olmasını; flebin vasküler beslenmesinin 5. cm'de normal olmasına bağladık.

Glukanın iskemik deri fleplerindeki olumlu etkisini literatür çalışmalarında açıklanan mekanizmalarla oluşturduğu düşünülmektedir. Makrofajlar üzerinde glukun için var olan reseptörler tanımlanmıştır (34). Glukan bu reseptörlere bağlanarak makrofaj fonksiyonlarını düzenler. Glukanın fibroblastlar üzerinde de reseptörleri olduğu saptanmıştır (26). Glukanın yara iyileşmesinde, fibroblast-

lardan kollajen biyosentezinin oluşmasını sağlayan yara büyüme faktörlerinin makrofajlarca salınmasını modüle ediyor olabilir (26). Yüksek derecede saflaştırılmış glukun, fibroblast, NF-1 (nükleer faktör-1) nükleer bağlanma aktivitesini, prokollajen gen ekspresyonunu ve kollajen biyosentezini uyardığı gösterilmiştir (26). Araştırmalar glukun hem Tip I hem de Tip III kollajenin gen ve protein ekspresyonunu zaman ve doz bağımlı olarak uyardığını göstermektedir (26). Portera ve ark. (21) da tam kat deri yaralarında glukun ile kollajen artışını rapor etmişlerdir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler β -Glukan tedavisinin flep nekrozuna karşı önemli bir koruyucu ajan olabileceğini göstermektedir. Ayrıca β -Glukan'ın flep nekrozunu ve lipid peroksidasyonunu da azalttığı görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen düşük MDA değerleri fleplerde lipid peroksidasyonunun azaldığını göstermektedir. β -Glukan iskemik deri flepleri üzerine açıklanan mekanizmaların bir veya birkaçı ile olumlu etkiye sahiptir.

SONUÇ

Bu çalışmamızın sonucunda; iskemi oluşturulmuş tam kat deri fleplerinde iskeminin β -Glukan ile önlenabilir olabileceğini saptadık. β -Glukan, yan etki spektrumunun düşük olması, peroral uygulanabilmesi avantajı ile iskemik deri fleplerinde kullanılabilirliği yönünden olumlu sinyaller vermekle birlikte, insanlarda riski yüksek fleplerde kullanılabilirliği için oldukça geniş araştırmalara gereksinim vardır.

SUMMARY

The effects of oral β -glucan on ischemic skin flap in rats

Purpose: The purpose of this study was to determine the effects of β -glucan and the ability of β -glucan to reduce distal necrosis in a random skin flap in the rat.

Materials and Methods: The present study utilised 14 adult female Wistar rats distributed at random into two groups of seven animals. Group A was set as the control group, in which the subjects received only water and food. In group B, subjects daily received β -glucan (200 mg/kg/day) per oral, starting 5 days prior to surgery, and continued until the second postoperative day. Random pattern skin flaps were cut and sutured on the back of the animals. On the seventh postoperative day, the percentage of distal necrosis was determined and skin samples 2 and 5 cm from the wound were collected in order to determine malondialdehyde levels and for histopathological examinations.

Results: The mean necrotic areas in the control and β -glucan groups were $3.91 \pm 1.38 \text{ cm}^2$ and $1.13 \pm 0.88 \text{ cm}^2$, respectively ($p < 0.001$). Malondialdehyde levels were lower in skin samples which were collected from the control group as compared to samples obtained from β -glucan rats (2 cm in the control group, 2.5 ± 1.13 ; 5 cm in the control group, 2.7 ± 2.19 ; 2 cm in the β -glucan group 0.9 ± 0.56 ; 5 cm in the β -glucan group, 1.2 ± 1.07 ; 2 and 5 cm, $p < 0.02$ and $p < 0.123$, respectively). Histopathologically, a significant increase in macrophage and fibroblast activity was observed in the β -glucan group. The histopathological evaluation in the β -glucan group revealed the protective effects of this intervention. β -Glucan treated rats showed decreased skin flap necrosis when compared with untreated animals.

Conclusion: This study revealed the importance of β -glucan for random skin flap viability.

Key Words: β -Glucan, rat, flap, necrosis

KATKIDA BULUNANLAR

Çalışmanın düşünülmesi ve planlanması:
Abdülhakim İbrahim Ulusoy, Soykan Dinç

Verilerin elde edilmesi:

Abdülhakim İbrahim Ulusoy, Erdiç Yenidoğan

Verilerin analizi ve yorumlanması:

Abdülhakim İbrahim Ulusoy, Muhammet Kadri Çolakoğlu, Haluk Alagöl

Yazının kaleme alınması:

Erdiç Yenidoğan, Gökhan Giray Akgül

İstatistiksel değerlendirme:

Mehmet Ali Gülçelik

KAYNAKLAR

1. Pang CY, Forrest CR, Morris SF. Pharmacological augmentation of skin flap viability: a hypothesis to mimic the surgical delay phenomenon or a wishful thought. *Ann Plast Surg* 1989; 22: 293-306. doi:10.1097/0000637-198904000-00003
2. Nichter LS, Sobieski MW, Edgerton MT. Augmentation of critical skin flap survival following ibuprofen therapy. *Ann Plast Surg* 1986; 16: 305-312. doi:10.1097/0000637-198604000-00006
3. Israeli D, Senderoff DM, Zhang WX, et al. Enhancement of fluorescein perfusion in experimental skin flaps following postischemic washout with iloprost, urokinase, verapamil, and University of Wisconsin solution. *J Reconstr Microsurg* 1993; 9: 435-439. doi:10.1055/s-2007-1006753
4. Abila LE, Gomes HC, Percario S, et al. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras* 2005; 20: 121-123. doi:10.1590/S0102-86502005000200004
5. Di Luzio NR, Williams DL, McNamee RB, et al. Comparative evaluation of the tumor inhibitory and antibacterial activity of solubilized and particulate glucan. *Recent Results Cancer Res* 1980; 75: 165-172. doi:10.1007/978-3-642-81491-4_26
6. Abel G, Czop JK. Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1 beta. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14: 1363-1373. doi:10.1016/0192-0561(92)90007-8
7. Doita M, Rasmussen LT, Seljelid R, et al. Effect of soluble aminated beta-1,3-D-polyglucose on human monocytes: stimulation of cytokine and prostaglandin E2 production but not antigen-presenting function. *J Leukoc Biol* 1991; 49: 342-351.
8. Rasmussen LT, Seljelid R. Novel immunomodulators with pronounced in vivo effects caused by stimulation of cytokine release. *J Cell Biochem* 1991; 46: 60-68. doi:10.1002/jcb.240460110
9. Di Luzio NR, Williams DL. Protective effect of glucan against systemic *Staphylococcus aureus* septicemia in normal and leukemic mice. *Infect Immun* 1978; 20: 804-810.
10. Williams DL, Cook JA, Hoffmann EO, et al. Protective effect of glucan in experimentally induced candidiasis. *J Reticuloendothel Soc* 1978; 23: 479-490.
11. Williams DL, Di Luzio NR. Glucan-induced modification of murine viral hepatitis. *Science* 1980; 208: 67-69. doi:10.1126/science.7361108
12. Lee SB, Jeon HW, Lee YW, et al. Bioartificial skin composed of gelatin and (1->3), (1->6)-beta-glucan. *Biomaterials* 2003; 24: 2503-2511. doi:10.1016/S0142-9612(03)00003-6
13. Janusz MJ, Austen KF, Czop JK. Isolation of soluble yeast beta-glucans that inhibit human monocyte phagocytosis mediated by beta-glucan receptors. *J Immunol* 1986; 137: 3270-3276.
14. Kernodle DS, Gates H, Kaiser AB. Prophylactic anti-infective activity of poly-[1-6]-beta-D-glucopyranosyl-[1-3]-beta-D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 545-549.
15. Studley HO. Percentage of weight loss: a basic indicator of surgical risk in patients with chronic peptic ulcer. 1936. *Nutr Hosp* 2001; 16: 141-143. doi: 10.1001/jama.1936.02770060032009
16. Mullen JL, Gertner MH, Buzby GP, et al. Implications of malnutrition in the surgical patient. *Arch Surg* 1979; 114: 121-125. doi:10.1001/archsurg.1979.01370260011001
17. Gross RL, Newberne PM. Role of nutrition in immunologic function. *Physiol Rev* 1980; 60: 188-302.
18. Redmond HP, Leon P, Lieberman MD, et al. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch Surg* 1991; 126: 192-196. doi: 10.1001/archsurg.1991.01410260080011
19. Babineau TJ, Marcello P, Swails W, et al. Randomized phase I/II trial of a macrophage-specific immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients. *Ann Surg* 1994; 220: 601-609. doi:10.1097/0000658-199411000-00002
20. Patchen ML, D'Alessandro MM, Brook I, et al. Glucan: mechanisms involved in its "radioprotective" effect. *J Leukoc Biol* 1987; 42: 95-105.
21. Portera CA, Love EJ, Memore L, et al. Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *Am Surg* 1997; 63: 125-31.
22. Wolk M, Danon D. Promotion of wound healing by yeast glucan evaluated on single animals. *Med Biol* 1985; 63: 73-80.
23. Leibovich SJ, Danon D. Promotion of wound repair in mice by application of glucan. *J Reticuloendothel Soc* 1980; 27: 1-11.
24. Delatte SJ, Evans J, Hebra A, et al. Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 113-118. doi:10.1053/jpsu.2001.20024
25. Bhide MV, Dunphy MJ, Mirkopoulos N, et al. Promotion of wound collagen formation in normal and diabetic mice by quadrol. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1988; 10: 513-522. doi:10.3109/08923978809006452
26. Wei D, Zhang L, Williams DL, et al. Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Repair Regen* 2002; 10: 161-168. doi:10.1046/j.1524-475X.2002.10804.x>
27. Hammond DC, Brooksher RD, Mann RJ, et al. The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival. *Plast Reconstr Surg* 1993; 91: 316-321. doi:10.1097/00006534-199302000-00017
28. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86: 271-278. doi:10.1016/0003-2697(78)90342-1
29. Verhofstad MH, Lange WP, van der Laak JA, et al. Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 423-431. doi:10.1007/BF02234744
30. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78: 71-100.
31. Browder W, Williams D, Lucore P, et al. Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery* 1988; 104: 224-230.
32. Williams DL, Sherwood ER, McNamee RB, et al. Chemoimmunotherapy of experimental hepatic metastases. *Hepatology* 1987; 7: 1296-1304. doi:10.1002/hep.1840070620
33. Sato T, Iwabuchi K, Nagaoka I, et al. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 204-211. doi:10.1189/jlb.0106069
34. Battle J, Ha T, Li C, et al. Ligand binding to the (1->3)-beta-D-glucan receptor stimulates NFkappaB activation, but not apoptosis in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 499-504. doi:10.1006/bbrc.1998.9175