

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON İNJURİSİNE
L-THEANİNE ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi
Dr. Hakan KÜÇÜKASLAN

TRABZON-2022

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON İNJURİSİNE
L-THEANİNE ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi
Dr. Hakan KÜÇÜKASLAN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Üyesi Mehmet Arif USTA

TRABZON-2022

ÖNSÖZ

Genel Cerrahi uzmanlık süresince bilgi ve deneyimleriyle eğitimimde büyük katkı ve emekleri olan, maddi ve manevi her konuda yardımlarını gördüğüm başta tez hocam Prof. Dr. Etem Alhan ve Doç. Dr. Mehmet Arif Usta'ya, kıymetli hocalarım Prof. Dr. Adnan Çalık, Prof. Dr. Akif Cinel, Prof. Dr. Serdar Türkyılmaz, Prof. Dr. Serdar Topaloğlu, Prof. Dr. Ali Güner, Doktor Öğretim Üyesi Arif Burak Çekiç ve Doktor Öğretim Üyesi Mehmet Uluşahin'e teşekkür ederim.

Asistanlık sürecinde her daim yanımda olan çok değerli eşim Gülden Küçükaslan'a teşekkür ediyorum

Ayrıca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, ameliyathane, servis, poliklinik, hemşire ve hastane personeline ihtisas eğitimim süresince göstermiş oldukları anlayıştan dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Hakan KÜÇÜKASLAN

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda L-Theanine (LTA) karaciğer iskemi reperfüzyon (IR) modelinde mikrosirkülasyon, histopatoloji, apoptozis, antioksidan ve hepatoprotektif ve bazı enzim sistemleri üzerine etkisini araştırmak ve aynı zamanda karaciğer majör rezeksiyonlarında ve karaciğer transplantasyonlarında karaciğerin korunmasına yönelik yeni yöntemleri bulmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde Sıçanlarda karaciğerde %70 bir saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon uygulayarak LTA'nın karaciğer IRI'ne etkisini inceledik. Çalışma dört grup üzerinde yapılmıştır. Gruplar Sham+Salin, Sham+LTA, IR+Salin, IR+LTA'dır. Sham gruplarında IR olmadan salin ve LTA verilirken IR gruplarına IR sonrası salin ve LTA verilmiştir. LTA deney öncesi 3 gün ve deney günü iskemi öncesi ve reperfüzyondan önce 150mg/kg LTA verilmiştir.

Bulgular: İskemi reperfüzyon injurisi LTA kullanımı serum alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α)'nın serum aktivitesini azaltır. Doku indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), doku miyeloperoksidaz (MPO) ve doku malondialdehit (MDA) seviyelerini iskemi sonrası normal seviyelere yaklaştırır. Ayrıca oksite glutatyon (GSSG), hipoksi ile indüklenabilir faktör 1- α (HIF-1 α) için H skorunun doku aktivitesinde önemli bir artışa neden oldu. Karaciğerde indirgenmiş glutatyonun (GSH) doku aktivitesinde artış sağlar ve iskemi sonrası artan Perfüze Vessel Density (PVD) değerlerinde önemli bir azalma sağlayarak hem doku kanlanmasını artırmış hem de antioksidan mekanizmalar üzerine olumlu etkiler göstermiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, LTA uygulaması hepatik IRI'ni önlemektedir. Bu etkilerini lipid peroksidasyonunun, doku iNOS seviyesinin ve TNF konsantrasyonunun azaltılması ayrıca doku kanlanmasını arttırarak HIF 1- α boyama seviyesinin azaltılması ve hücrel antioksidan seviyesinin eski haline getirilmesiyle gösterilmiştir. LTA antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile bu etkileri göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: L-Theanine, hücrel antioksidan, Karaciğer İskemi Reperfüzyon

SUMMARY

Objective: The effects of the L-Theanine (LTA) on the hepatic microcirculation during hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI) has not been investigated yet. The aim of this study was to investigate the influence of LT on the hepatic IRI in rats.

Materials and methods: We investigated the effect of LTA on liver IRI by applying 70% one hour ischemia and 4 hour reperfusion in the liver in Karadeniz Technical University Medical Faculty Surgical Research Center. The study was carried out on four groups. The groups are Sham+Salin, Sham+LTA, IR+Salin, IR+LTA. The groups are Sham+Salin, Sham+LTA, IR+Salin, IR+LTA. While the sham groups were given saline and LTA without IR, the IR groups were given saline and LTA after IR. LTA was given 3 days before the experiment and 150mg/kg LTA was given on the day of the experiment before ischemia and before reperfusion.

Results: Ischemia-reperfusion injury LTA use decreases the serum activity of serum alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Brings tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS), tissue myeloperoxidase (MPO) and tissue malondialdehyde (MDA) levels to normal levels after ischemia. In addition, oxidized glutathione (GSSG) caused a significant increase in tissue activity of the H score for hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α). It provides an increase in the tissue activity of reduced glutathione (GSH) in the liver, and by providing a significant decrease in the Perfuzed Vessel Density (PVD) values that increase after ischemia, it both increased tissue blood supply and showed positive effects on antioxidant mechanisms.

Conclusion: In this study, LTA administration prevents hepatic IRI. This effect has been demonstrated by reducing lipid peroxidation, tissue iNOS level and TNF concentration, as well as decreasing HIF 1- α staining level by increasing tissue blood circulation and restoring cellular antioxidant level. LTA shows these effects with its antioxidant and anti-inflammatory effects.

Key Words: Cellular Antioxidant, L-Theanine, Hepatic Ischemia-Reperfusion,

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Karaciğer Anatomisi	2
2.2. Karaciğer Mikrosirkülasyon ve İskemik Reperfüzyon Patogenezi	5
3. MATERYAL VE METOD.....	8
3.1. Deney Grupları	8
3.2. Deney Prosedürü	8
3.3. Analiz Yöntemleri	9
3.3.1. Doku MDA Seviyesinin Belirlenmesi	9
3.3.2. Doku İndirgenmiş Glutasyon Seviyesinin Belirlenmesi	10
3.3.3. Doku MPO Aktivitesinin Belirlenmesi.....	11
3.3.4. Doku iNOS Seviyesinin Belirlenmesi	12
3.3.5. Serum TNF-alfa Seviyesinin Belirlenmesi	12
3.3.6. Doku Protein Seviyesinin belirlenmesi.....	12
3.3.7. Serum ALT, LDH ve GGT seviyesinin belirlenmesi	13
3.3.8. Patolojik Analiz.....	13
3.3.9. Sidestream dark field (SDF) görüntüleme yöntemi	14
3.3.10. Automated Vascular Analysis (AVA) Programı.....	15
3.3.11. İstatistiksel Analiz ve Veri Görselleştirme	16
4. BULGULAR	17
5. TARTIŞMA.....	28
6. SONUÇ	32
7. KAYNAKÇA	33

KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	Alanin Aminotransferaz
AVA	Automated Vascular Analysis
CCD	Charged-coupled device
CO	Karbonmonoksit
CXCL-10	C-X-C Motif Chemokine Ligand
DAMP	Damage-associated Molecular Patterns
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GGT	Gama Glutamil Transferaz
GSH	Glutathione
GSSG	Glutasyon Disülfid
HETAB	Hekzadesiltrimetilamonyumbromür
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HMGB	High Mobility Group Box
HO	Hemoksijenaz
IFN	Interferon
IL-1	İnterlökin-1
IR	İskemi Reperfüzyon
IRF3	İnterferon regulatory factor 3
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
İMV	İnferior Mezenterik Ven
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthases
İVK	İnferior Vena Kava
JAK2	Janus kinaz 2
JNK	Jun N-terminal kinase
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LTA	L-Theanine
MDA	Malondialdehid
MPO	Miyeloperoksidaz
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88

NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NO	Nitrik Oksit
NO	Nitrik Oksit
OPS	Ortogonal polarizasyon spektral
PAMPS	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Fosfat tamponlu salin
PM	Pringle Manevrası
PVD	Perfuze Vessel Density
RBC	Red Blood Cell
rpm	Dakikada devir sayısı
SDF	Sidestream dark field
SDF-LFCİ	SDF laser speckle kontrast görüntüleme
SEC	Sinusoidal Endothelial Cell
SMV	Superior Mezenterik Ven
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
STAT1	Signal Transducer Activator of Transcription 1
TBA	Tiyobarbütirik asit
TBARS	Tiyobarbütirik asit reaktif bileşenleri
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TVD	Total vessel density

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Serum GSSG mgL, Serum GSH/GSSG ve Serum İNOS ngL'nin Medyan Ortalamaları ve Standart Hata Değerleri	23
Tablo 2. Doku GSH nmolmg, Doku GSSG nmolmg ve Doku GSH/GSSG'nin Medyan Ortalamaları ve Standart Hata Değerleri	27
Tablo 3. Histopatolojik İnceleme Suziki Skolama Sonuçları.....	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Karaciğer Anatomisi ve Couinaid Segmentleri	2
Şekil 2.	Karaciğer Hepatik Arter Anatomisi.....	3
Şekil 3.	Karaciğer Portal Ven Anatomisi.....	4
Şekil 4.	Ratlarda Karaciğer İskemi Yüzdeleri	4
Şekil 5.	Sidestream Dark Field (SDF) Görüntüleme Yöntemi	14
Şekil 6.	Ortogonal Polarizasyon Spektral görüntüleme yöntemi ile karaciğerden alınan anlık mikrosirkülasyon görüntüsü	15
Şekil 7.	ALT değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri.....	17
Şekil 8.	GGT değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri.....	18
Şekil 9.	LDH değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri.....	19
Şekil 10.	PVD değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri.....	20
Şekil 11.	TNF değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri.....	21
Şekil 12.	GSH değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri.....	22
Şekil 13.	Serum iNOS değerlerinin dağılım grafiği	23
Şekil 14.	Doku MDA değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri	24
Şekil 15.	Doku MPO değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri	25
Şekil 16.	Doku iNOS değerlerinin dağılım grafiği.....	26
Şekil 17.	İmmünohistokimyal boyama ile gruplar arası H skoru değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri	28

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karaciğer rezeksiyonu karaciğerin bir kısmının çıkarılmasıdır. Karaciğer diğer intraabdominal organların aksine, rejenerasyon özelliği olması sayesinde rezeksiyon sonrası eski boyutlarına ulaşabilmektedir. Eski Yunanlılar da bu bilgiye sahip olmalı ki; “hepar” kelimesi “onarım” anlamına gelen “hepaomai” kelimesinden türetilmiştir. Karaciğerle ilgili bilgilerin milattan önce 2000’li yıllara dayanmasına rağmen kanamaya bağlı yüksek mortalite nedeniyle karaciğer cerrahisinin gelişmesi zaman almıştır. Daha öncesinde travma nedeniyle karaciğer ameliyatları yapıldığı bilinse de ilk elektif karaciğer rezeksiyonu 1886 yılında Dr. Luis tarafından yapıldı, ancak hasta 6 saat sonra kanama nedeniyle hayatını kaybetti. İlk başarılı elektif karaciğer ameliyatı 1888 yılında Almanya’da Dr. Lagenbuch tarafından yapılmıştır [1]. Dr. Pringle 1908 yılında travma hastalarında porta hepatise basıyla kanama kontrolünü sağladığı, kendi ismiyle tanımlanan manevrayı bulmuştu [2]. Pringle manevrasının (PM) uygulanması kan kaybını azaltmıştır. Karaciğer cerrahisindeki gelişmeler 50 yıllık duraklamanın ardından 1950’lerde Couinaid, Hjortsjo, Healey, Lortat-Jacob ve Starzl’in çalışmalarıyla modern karaciğer cerrahisini günümüze ulaştırmıştır [3]. Gelişen teknoloji ve edinilen bilgilerle karaciğer cerrahisi günümüzde güvenle uygulanmaktadır.

Çalışmamızda LTA’nın karaciğer IRI modelinde mikrosirkülasyon, histopatoloji, apoptozis, antioksidan ve hepatoprotektif ve bazı enzim sistemleri üzerine etkisini araştırmak ve aynı zamanda karaciğer majör rezeksiyonlarında ve karaciğer transplantasyonlarında karaciğerin korunmasında yeni yöntemleri bulmayı amaçladık. Bir glutamat türevi olan LTA (γ -glutamil etilamin), *Camellia sinensis*’in yapraklarında bulunan bir amino asittir [4, 5]. Birçok çalışmada antiinflamatuvar, antitümöral, antioksidan, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkileri gösterilmiştir [4, 6]. Bu etkiler ile vücudun antioksidan kapasitesini artırır [6]. Etkilerini nükleer faktör kappa B yolu ile yapar [7].

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer karnın sağ üst kadranında, diyaframın hemen altında yer almaktadır. Yaklaşık 1200-1600 gram ağırlığındadır. Falsiform ve round ligaman, sağ ve sol triangular ligaman ile buradan anteriora uzanan koroner ligaman ile stabilizeyi sağlar. Karaciğer rezeksiyon öncesinde mobilizasyonu sağlamak için bu ligamanlar kesilir, sonrasında suture edilerek karaciğer tespit edilir. Hepatoduodenal ligaman; koledok, vena porta ve hepatic arter gibi yapıları içermektedir. İnferior Vena Kava (İVK) ile safra kesesi yatağı arasındaki çizgi karaciğeri sağ-sol lob olarak böler. 1957 yılında Couinaud tarafından portal ven dağılımına dayanan 8 segmentli karaciğer anatomisi tanımlanmıştır [8, 9] (Şekil 1).

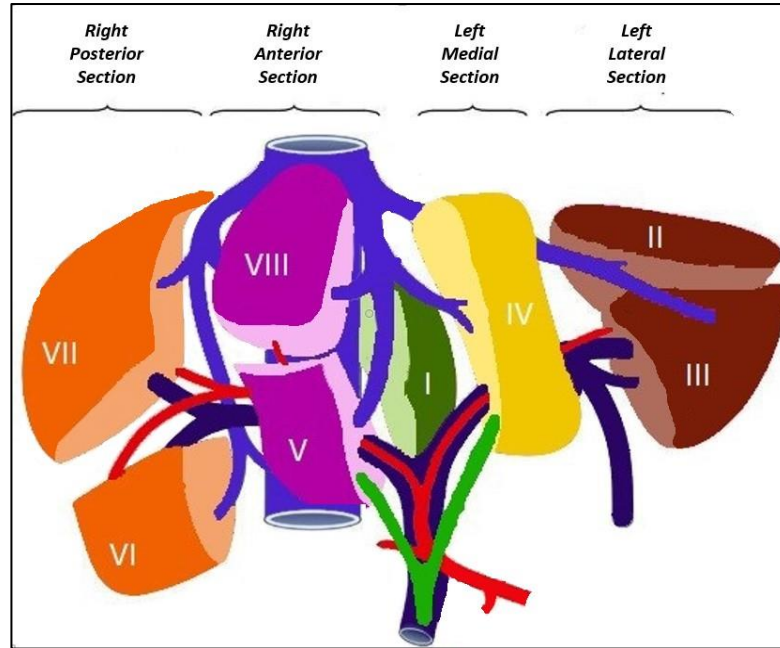
Hepatik ven dağılımına dayanan 4 sektör şu şekilde ayrılmıştır;

Sağ posterior: segment 6-7

Sağ anterior: segment 5-8

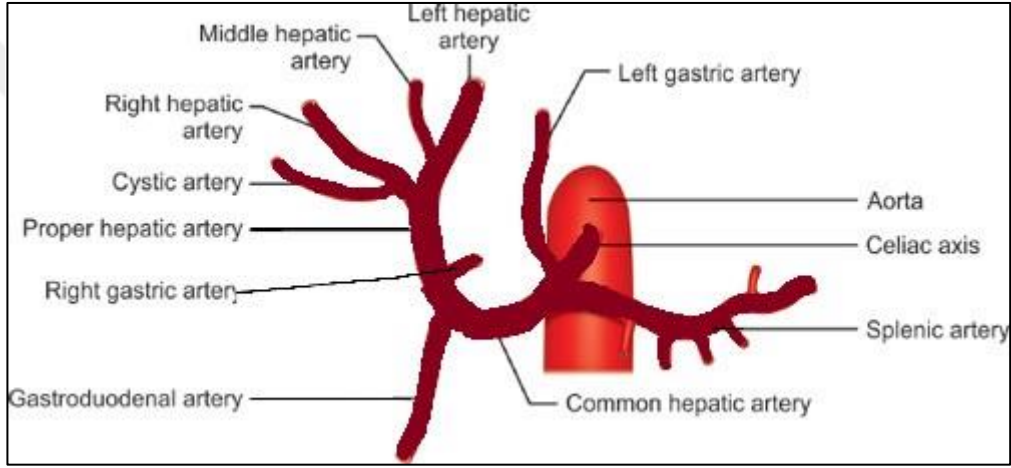
Sol medial: segment 4

Sol lateral: segment 2-3



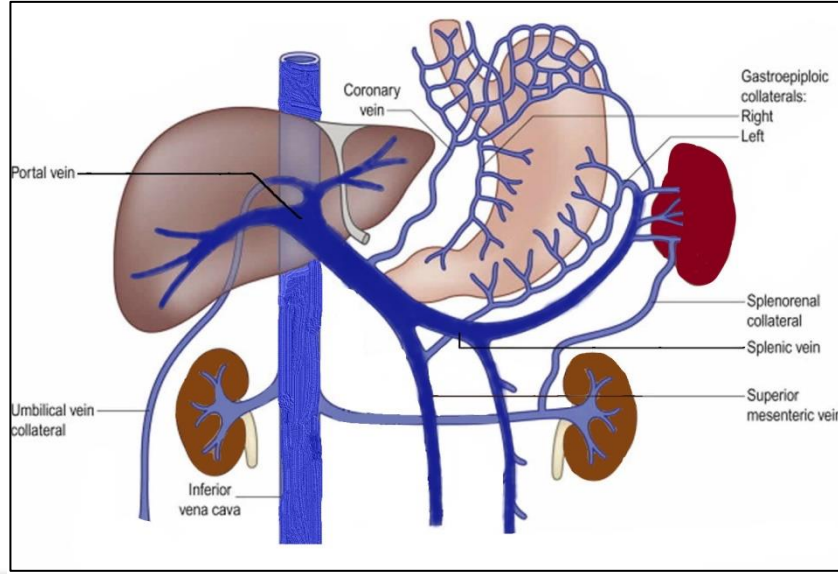
Şekil 1. Karaciğer Anatomisi ve Couinaid Segmentleri

İnsan karaciğer vasküler ve safra yolları anatomisi varyasyonlar açısından zengindir. Kan akımının %25 hepatik arter, %75 portal venden olmak üzere iki damardan sağlanır. Çölyak trunkus aorttan ayrıldıktan sonra gastroduodenal ve common hepatik olarak iki dala ayrılır. Common hepatik arter hepatica propria ve sağ gastrik arter olarak iki dala ayrılır. Hepatika propia oksijen oranı yüksek kanı karaciğere taşır. Sağ gastrik arter çoğunlukla arteria hepatica propriadan ayrılır. Hepatica propia sonrasında sağ ve sol hepatik arterelere ayrılır. Sağ hepatik arter %88 oranında koledok altından geçerek karaciğere girer ve %12 oranında koledok önünden çaprazlar (Şekil 2).



Şekil 2. Karaciğer Hepatik Arter Anatomisi

İnferior mezenterik ven (İMV) ve sol gastrik ven genelde splenik vene dökülür. Splenik ven de superior mezenterik ven (SMV) ile birleşerek portal vene dökülür. İnferior, superior, anterior ve posterior pankreatoduodenal venler de SMV yoluyla ya da doğrudan portal vene dökülür. Böylece sindirim sisteminin venöz drenajının büyük bölümü sistemik dolaşıma geçmeden karaciğere yönelir. Portal ven kapaksızdır. Normalde portal vende 3-5 milimetre cıva (mmHg) olan basıncın portal hipertansiyonda 20-30 mmHg'ya ulaşması halinde portokaval kollaterallerin oluşturduğu klinik sonuçlar görülür. Portal ven, porta hepatisi geçmesinin ardından sağ ve sol dallarına ayrılır. Sol portal ven karaciğere girmeden 90 derece dönüş yaparak yatay olarak ayrılır. Segment 2-3-4 ile birlikte kaudat lobun da ana kan akımını sağlar. Ana portal ven genelde sağda karaciğere girmeden kaudat loba posterior dal verir (Şekil 3).



Şekil 3. Karaciğer Portal Ven Anatomisi

Ratlarda karaciğerin lobar anatomisi insanlardan farklıdır. Sıçan karaciğerinin kütlesi toplam vücut ağırlığının yaklaşık %6'sını oluşturur. Ratlarda karaciğerin yüzde 70'lik kısmı sol lateral ve sol medial segment olarak isimlendirilen loblardan oluşmaktadır. Sıçan karaciğerinin diyafragmatik ve viseral olmak üzere iki peritoneal yüzeyi vardır. Sıçan karaciğeri sol medial, sol lateral, sağ medial, sağ lateral, kaudat ve kuadrat lob olmak üzere 6 lobdan oluşur. Kaudrat lob, kaudal vena cava ile portal venin sol dalı arasında yerleşmiştir. Hepatik damar sistemi hepatic arter ve portal ven olmak üzere ikili sisteme sahiptir. Hepatik arteriyel kan akışı, karaciğere iyi oksijenlenmiş kanı taşır. Portal damarlar kısmen oksijensizdir, ancak besin açısından zengindir [10, 11] (Şekil 4).

<i>İskemi Yüzdesi</i>	10	20	30	40	70	100
<i>İskemik Karaciğer</i>						
<i>Karaciğer Lob</i>	caudate	right	median	left lateral	left lateral and median	all

Şekil 4. Ratlarda Karaciğer İskemi yüzdeleri

Laboratuvar faresi, karaciğerin deneysel cerrahisi için en popüler deneysel modellerden biridir. Biz çalışmamızı sıçanlarda portal vene bulldog klemp koyarak karaciğerde %70 bir saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon uygulayarak gerçekleştirdik.

2.2. Karaciğer Mikrosirkülasyon ve İskemik Reperfüzyon Patogenezi

Karaciğerin majör travmalarında ve büyük karaciğer tümörlerinde cerrahi esnasında iskemi oluşturmak gerekebilir [12, 13]. Kan akımı tekrar sağlandığında bu karaciğerdeki injuriyi artırır. Bu IR injurisi olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca karaciğer transplantasyonları esnasında zorunlu olarak IR injurisi doğal olarak oluşmaktadır [13]. Karaciğere reperfüzyon başladıktan sonra birçok kompleks mekanizmalar rol oynamaya başlar. Reperfüzyon erken evresinde endotel hücrelerinde şişme, vazokonstriksiyon, lökosit birikmesi, sinüzoidlerde trombosit agregasyonu oluşur [14, 15].

Tüm bu olaylar karaciğer mikrosirkülasyonunun bozulmasına neden olur. İskemiye bağlı oluşan mitokondriyal sistemin bozulması sonucunda enerji yetersizliği hücre membranlarında geçirgenliği artırır; bu da endotel ve kupffer hücrelerinde şişmeye neden olur [16].

Vazokonstriksiyon sinüzoid lümeninin daralmasına, lökosit hızının azalmasına lökosit endotel temasının artmasına sebep olur. Endoteldeki bozulmayı takiben sinüzoid içinde lökosittoza neden olur. Lökositoz sinüzoid lümenindeki mikrosirkülasyonu azaltır ve reperfüzyondan sonra bile karaciğerin kanlanması azalmasına neden olur [17]. Bu olayı serbest oksijen radikallerini (SOR) ve inflamatuvar sitokinleri üreten endotel ve kupffer hücre aktivasyonu devam eder [18, 19].

İskemi sonrası mitokondriyal enerji sistemin bozulur. Bunun sonucunda endotel ve kupffer hücrelerinde azalmış ATP sentezi oksidan enzim aktivasyonuna bu da SOR sentezine yol açar. Bunun yanında hepatik IR'in yol açtığı vasküler stres, remodeling, proinflamatuvar ve pro-apoptotik genlerin yol açtığı endotel disfonksiyonu önemli patolojik değişikliklerden birisidir. Araştırmalar endotel disfonksiyonunun nitrik oksit (NO) ve endotelin-1'e bağlı olduğunu göstermiştir [19, 20]. Risbano ve arkadaşları disregülasyonun NO yolağı ile ilgili olduğunu

göstermişlerdir [21]. Karaciğer IR patogenezi NO seviyesi ile ilişkilidir. Endotelden salınan endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) az miktarda salınır ve karaciğerin korunması için önemlidir [22, 23]. Endotel, kupffer hücreleri, stellate ve hepatositlerden salınan indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aşırı salınır ve iNOS karaciğer için proinflamatuvar ve toksiktir [24].

Karaciğerin IR injurisinde mitokondriler önemli rol oynar. Mitokondriler sitoplazmada SOR'nin üretildiği primer kaynaktır. Artmış SOR mitokondri membranlarını etkiler, proteinleri bozar, lipid peroksidasyonunu artırır. Bu mitokondri membranının bütünlüğünün bozulmasına ve cytotokrom c'nin mitokondri dışına çıkmasına yol açar. Mitokondri dışına çıkan cytotokrom c kaspazları aktive ederek apoptozis mekanizmalarının aktive olmasına neden olur [25, 26]. SOR kupffer hücrelerini, endotel hücrelerini, nötrofilleri, monositleri aktive ederek TNF, interlökin 1 (IL1) gibi sitokinleri, NO, lökotrien ve adezyon moleküllerinin salınmasına yol açar. TNF- α hepatositler ve mitokondriler için toksik etkiye bulunur [27].

Karaciğerde IR, Hem-oksijenaz 1 (HO-1), TLR (Toll Like Receptor) ve JNK (Jun N-terminal kinase) gibi birçok uyarı yollarını aktive eder. Hem oksijenaz hem yıkımında sınırlı etkileri olan bir enzimdir ve hemoglobini CO (Karbonmonoksit), biliverdin ve demire parçalar [28]. Hem oksijenaz IR esnasında indüklenir ve dokuyu inflamatuvar olaylara ve oksidan streslere karşı koruyan anahtar enzimdir [29, 30]. HO-1 ve TLR4 sistemleri arasında karşılıklı ilişkiler mevcuttur [31]. HO-1 direkt ya da TLR4 üzerinden IR esnasında karaciğeri Janus kinase 2 (JAK2) aktivasyonunu signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) ve İnterferon beta I (IFN- β) üzerinden azaltarak korumaktadır. HO-1 IFN- β üzerinden STAT1 fosforilasyonu ile TLR4 reseptörü üzerinden etki ederek CXCL-10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand) oluşumunu azaltarak karaciğer koruyucu etkiye bulunmaktadır [32].

Bir diğer önemli yolak High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) yolağıdır. HMGB1 sepsiste tanımlanmış iskemik dokulardan salınan nükleer bir faktördür. HMGB1 salınımında temel olay hepatositlerin hipoksiye maruz kalmasıdır. Etkilerini Toll benzeri reseptörlerine (TLR) bağlanarak mitojenle aktive olan kinaz (MAPK) 1

aktive ederek inflamasyon ve doku hasarının oluşmasında önemli rol oynar. HMGB1 inhibisyonu IRI sonrası karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir [33].

HMGB1 TLR ile etkileşime girerek hücrel aktivasyona neden olur. Bu aktivasyon “myeloid differentiation primary response gene” (MyD88) ve MyD88 adapter-like (Mal) moleküllerini içeren ortak bir yolak ile ortaya çıkar ün MyD88 ‘e bağlı aktivasyonu direkt nuclear factor κ B (NF- κ B) aktive ederek proinflamatuvar sitokinleri indükler. Proinflamatuvar sitokinler artışı IR hasarının artışına neden olur. MyD88 bağlı olmayan aktivasyonu İnterferon regulatory factor 3 (IRF3) üzerinden olur ve IFN (IFN- α/β) ve IFN-inducible genes (CXCL-10 gibi) sentezini artırır [34].

Tüm bu moleküler yollar, enzimatik reaksiyonlar sonucunda karaciğer endotel hasarı oluşur. Proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı ve endotel hasarı mikrosirkülasyon bozulmasına neden olur. Takip eden süreçte apoptotik yolların aktive edilmesiyle otofajik mekanizmalar aktive olur ve sonucunda hepatosit hasarı meydana gelir.

3. MATERYAL ve METOD

Çalışma, hasta hakları yönetmeliğine ve etik kurallara uygun olarak planlandı. Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nce desteklenen TTU-2018-7704 kod numaralı çalışma öncesinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Etik Kurulunca 2018/19 numaralı 15.05.2018 tarihli onayı alındı.

3.1. Deney Grupları

Bu çalışma KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezinde 32 adet Sprague Dawley ırkı sıçanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıçanlarda karaciğerde %70 bir saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon uygulanarak LTA'nın karaciğer IR etkisini inceledik. Çalışma dört grup üzerinde yapılmıştır. Gruplar Sham+Salin, Sham+LTA, IR+Salin, IR+LTA'dır. Sham gruplarında IR olmadan salin ve LTA verilirken, IR gruplarına IR sonrası salin ve LTA verilmiştir. LTA deney öncesi 3 gün ve deney günü iskemi öncesi 150mg/kg ve iskemi sonlandırıldıktan sonra 150mg/kg LTA verilmiştir.

3.2. Deney Prosedürü

1. Deneyden 15 dakika önce salin ya da LTA intraperitoneal verilmiştir.
2. Ketamine 50mg/kg anestezisi altında laparotomi yapılarak ve karaciğer vasküler yapısının %70'inin bir saat süre ile klempe edilerek iskemi yapılmıştır.
3. İskeminin sona erdirilerek salin veya LTA verildikten sonra laparotominin kapatılarak 4 saat süre ile beklenmiştir.
4. Ardından ketamin 50mg/kg anestezisi altında laparotomi yapılarak karaciğerden Ortogonal Polarizasyon Spektral görüntüleme (OPS) ile video kaydı alınmıştır.
5. Bir miktar karaciğer doku İNOS, doku MDA, doku MPO, doku okside-redükte glutatyon çalışılması için alınmıştır.

6. Bir miktar karaciğer dokusu patolojik inceleme için alınarak %10 luk formaldehit ile saklanmıştır.
7. Aorta abdominalisten kan alınarak Serum TNF- α , serum GSH $\mu\text{mol/L}$, serum GSSG mg/L , serum İNOS ng/L , ALT, LDH, gama glutamil transferaz (GGT) çalışılmıştır.

3.3. Analiz Yöntemleri

Alınan kan örneğinden Serum TNF- α , Serum GSH, Serum GSSG, Serum İNOS ALT, GGT, LDH çalışılmıştır. OPG cihazı ile her bir rat karaciğerinden 6 adet mikrosirkülasyon kaydı alınıp AVA programı kullanılarak herbir kayıttan 3 adet PVD değerlerinin ölçülmüş ve her rat için 18 adet adet PVD değerinin belirlenmiştir. Patolojik inceleme için alınan karaciğerden doku MDA, doku MPO, doku okside redükte glutatyon, doku İNOS değerleri ölçülmüştür.

Yine bir miktar karaciğer dokusunda histolojik çalışma amaçlı olarak alınmış ve hematoxilen-eosin ile boyanarak ve HIF1- α ile inceleme yapılmıştır. Adlardan alınan doku örnekleri %10 luk formole koyularak patolojide hemotosilen-eosin ile boyandıktan sonra karaciğerdeki inflamasyon ve nekroz değerlendirilmiştir.

3.3.1. Doku MDA Seviyesinin Belirlenmesi

3.3.1.1. Doku Homojenatı Hazırlama

Doku MDA tayini için öncelikle dokular homojenize edildi. Yaklaşık 100 mg doku 2 mL'lik homojenizasyon tamponuna (0.05 Triton X-100 içeren %1.15'lik KCl çözeltisi) aktarıldı. Ardından 30 sn süreyle, buz küvetinde 5000 dakikada devir sayısında (rpm) homojenizatör (Homojenizatör: IKA-ultra turrax T18) kullanılarak homojenize edildi. Homojenat 4000 rpm'de, 10 dakika boyunca santrifüj edilerek temiz süpernatant alınarak MDA tayininde kullanıldı.

3.3.1.2. MDA Seviyesi Tayini

Karaciğer dokusunda MDA düzeyi, doku homojenatlarında tiyobarbütirik asit reaktif bileşenleri (TBARS) yöntemine göre belirlendi. Bu yöntem, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbütirik asit (TBA) ile pembe renkli bir şelat oluşturması ve oluşan şelatın 532 nm'deki absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. 500 µL numune üzerine 3000 µL fosforik asit (%1'lik H₃PO₄) ve 1000 µL %0,67'lik TBA çözeltisi eklendi. Vortekslenerek 100°C' de 50 dakika inkübasyona bırakıldı. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek elde edilen supernatanttan 250 µL alınarak mikrolakalara yüklendi ve 532 nm'de mikrolaka okuyucusu ile absorbans değerleri ölçüldü. Standart olarak 1.1.3.3-tetrametoksipropan kullanıldı. Standart grafik kullanılarak doku MDA konsantrasyonu hesaplandı. Doku protein değerlerine bölünerek karaciğer dokusu MDA seviyeleri nmol/mg protein birimi ile verildi [35].

3.3.2. Doku GSH/GSSG Seviyesinin Belirlenmesi

3.3.2.1. Doku Homojenatı Hazırlama

pH:7,4 10 mM fosfat tamponlu salin (PBS) ile dokular (100 mg doku 1ml PBS'de) homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Kit prosedürüne göre deney yapıldı.

3.3.2.2. MPO Aktivitesinin Tayini

İndirgenmiş glutatyon (GSH) kolorimetrik assay kiti (Cat No: E-BC-K030, Lot: MNFVKV4XP1, Elabscience, Wuhan, China) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) seviyesi ise sandviç ELISA kiti (Cat No: E1264, Shanghai, China) ile belirlendi. Elde edilen sonuçları standardize etmek için değerler protein değerlerine bölündü. Doku GSSG ve GSH için sonuçlar nmol/mg protein birimi ile verildi.

3.3.3. Doku MPO Aktivitesinin Belirlenmesi

3.3.3.1. Doku Homojenatı Hazırlama

100 mg karaciğer dokusu 1 mL'lik homojenizasyon tamponunda (50 mM Potasyum Fosfat tampon, pH=7.4) 40 s süreyle, buz küveti üzerinde 9500 rpm'de homojenize (Homojenizatör: IKA-ultra turrax T18) edildi. Homojenat 20000xg'de, 20 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısım atıldı ve pelletle MPO tayinine devam edildi. Pellete 750 µL % 0.5 Hekzadesiltrimetilamonyumbromür (HETAB) ve (10 mM) Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren 50 mM potasyum fosfat taponunda (pH=6) ilave edilerek vortekslendi. 25 dakika –80°C'de dondur çöz yapıldı. Çözöldükten sonra 20000xg 'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant MPO ölçümü için kullanıldı.

3.3.3.2. MPO Aktivitesinin Tayini

Karaciğer dokularında MPO aktivitesi Hillegas ve ark. tarafından önerilen metotla belirlendi. İnflamasyon göstergesi olan MPO aktivitesi tayini MPO tarafından oksitlenen H₂O₂'nin indirgemesi ve bu indirgenmiş ürünün 460 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi esasına dayanır. 30 µL süpernatant üzerine 230 µL o-Dianisidin Hidroklorür (0.246 mg/mL)-H₂O₂ (20 mM) içeren fosfat tampon (50 mM, pH=6) ilave edildi. 37 °C'de 460 nm'de 5 dakika boyunca absorbans ölçüldü. Kinetik ölçüm sonunda elde edilen absorbans değişimi göz önüne alınarak ve aşağıdaki formül kullanılarak doku MPO aktiviteleri hesaplandı.

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{\Delta A}{dk} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times l \times Vs}$$

Doku protein değerlerine bölünerek karaciğer dokusu MPO aktiviteleri U/mg protein olarak verildi [36].

3.3.4. Doku iNOS Seviyesinin Belirlenmesi

3.3.4.1. Doku Homojenatı Hazırlama

100 mg karaciğer dokusu 1 mL pH'sı 7,4 olan 10 mM PBS tampon ile homojenize edildi. 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantlar numune olarak kullanıldı.

3.3.4.2. iNOS Seviyesi Tayini

iNOS sandviç ELISA kiti (Cat No: E0008Ge, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China) kullanılarak kit procedürüne göre iNOS seviyesi belirlendi. Doku protein tayini sonuçları gözönüne alınarak iNOS seviyeleri ng/mg protein birimi ile verildi.

3.3.5. Serum TNF-alfa Seviyesinin Belirlenmesi

Serum TNF- α seviyesi sandviç ELISA kit (Cat No: E0764Ra, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit kullanılmadan önce reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi ve numuneler santrifüj 3000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Serum TNF- α sonuçları ng/L birimi ile verildi.

3.3.6. Doku Protein Seviyesinin Belirlenmesi

Dokuda incelenen her bir parametre için hazırlanan doku homojenatı süpernatantında protein seviyesi Bradford metoduna göre belirlendi. Bu metodun prensibi, organik bir boya olan Coomassie Brilliant Blue G250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 595 nm'de maksimum seviyede absorbands göstermesi esasına dayanmaktadır. 10 μ L numune mikropialalara yüklendikten sonra 100 μ L Bradford reaktifi eklendi ve 10 dakika karanlıkta düşük hızda sallanarak bekletildi. Ardından 595 nm'de mikropiala

okuyucuda (VERSA max tunable microplate reader, Molecular Devices, CA, USA) absorbanslar okundu. Bovine serum albumin (BSA) standartı kullanılarak protein konsantrasyonları mg/mL olarak hesaplandı [37]. Serum GSH ve GSSG seviyesi birimleri eşitlendi ve oranlanarak GSH/GSSG hesaplandı.

3.3.7. Serum ALT, LDH ve GGT Seviyesinin Belirlenmesi

Serum ALT, LDH ve GGT seviyesinin belirlenmesi Beckman Coulter analiz cihazlarında Uluslararası Klinik Kimya Federasyonunun tavsiyelerine dayanarak yapılmaktadır. Uygulanan prosedürler Szasz prosedürünün bir modifikasyonudur [38].

3.3.8. Patolojik Analiz

Sinüzoidal konjesyon, hepatosit iskemi ve vakuolizasyon, Suzuki tarafından daha önce tarif edildiği gibi 0'dan (patolojik değişiklik yok) 5'e (şiddetli konjesyon/balonlaşma dejenerasyonu ve % 60'dan fazla lobüler nekroz) kadar puanlama sistemi kullanılarak değerlendirildi [39]. HIF 1- α , immün histokimyasal boyamayla tespit edildi (Anti-HIF-1 alfa antikor kod numarası: ab114977, abcam Türkiye). Histolojik slaytlar, Nikon Eclipse Ni-U ve Nikon'un NIS-Elements D Mikroskop Görüntüleme Yazılımı Sürüm 4.0 (Tokyo, Japonya) kullanılarak 100x büyütme altında immünohistokimyasal puanlama için dijital olarak görüntülendi. Dijital görüntüler, küçük değişikliklerle H-skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi [40, 41]. Bu yöntemle, her boyama yoğunluğu seviyesindeki hücrelerin yüzdesi hesaplanır ve son olarak, aşağıdaki formül kullanılarak bir H-skoru atanır.

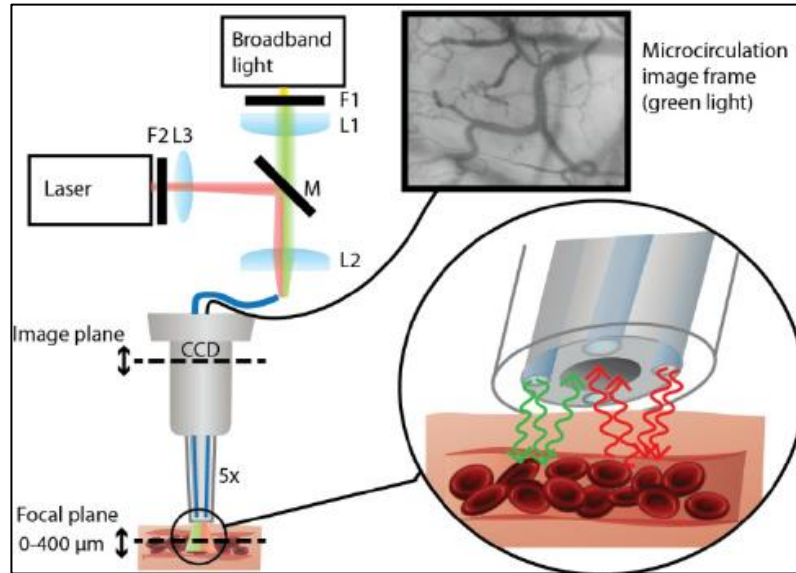
$$(1 \times (\% \text{ hücre } 1+) + 2 \times (\% \text{ hücre } 2+) + 3 \times (\%3+ \text{ hücre}))$$

H-skoru, çeşitli büyütme ölçeklerinde görüntülenen farklı yoğunluklarda boyanan hücrelerin yüzdesine dayalı olarak 0 ila 300 arasında değişen skor hesaplanır.

3.3.9. Sidestream Dark Field (SDF) Görüntüleme Yöntemi

OPS görüntüleme yöntemi organ ve doku mikrosirkülasyonunun gözlem ve araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır. OPS görüntüleme yöntemi ile mikrovasküler dolaşımın olduğu alanları görüntülemek için eritrositlerdeki hemoglobini absorbers olarak kullanır ve eritrositleri görünür hale getirir. Görüntü kalitesinin düzeltilmesi ve aydınlatma için ek bir ışık kaynağı kullanılarak yapılan araştırmalar sonucunda Sidestream dark field (SDF) görüntüleme tekniği bulunmuştur [42].

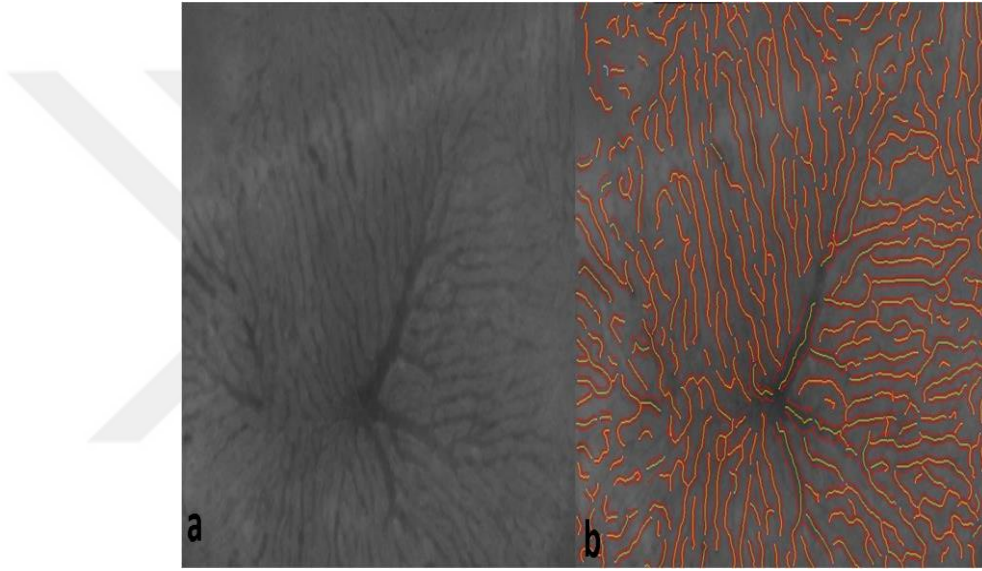
SDF sistemi ikili modda yüzey altı mikrosirkülasyonu göstermek için kullanılan non invaziv bir sistemdir. SDF, dolaşımda ki kırmızı kan hücreleri (RBC) tarafından yüksek oranda emilir ve bu da damarlar ve doku arasında kontrast oluşturur. SDF laser speckle kontrast görüntüleme (SDF-LFCİ) doku ve hareketli RBC'ler tarafından dağıtılır ve bu da damarlar ve çevreleyen doku arasında kontrast renk dinamiklerine neden olur. Lens sistemi 5x büyütme ile yüzey altı mikrosirkülasyon görüntüsünü bir charged-coupled device (CCD) kameraya odaklar [43] (Şekil 5).



Şekil 5. Sidestream Dark Field (SDF) görüntüleme yöntemi

3.3.10. Automated Vascular Analysis (AVA) Programı

Otomatik Vasküler Analiz (AVA Dobbe ve ark. tarafından geliştirilmiştir ve mikrodolaşım video kayıtlarını analiz eden ticari yazılım aracıdır [44]. Hem kalitatif hem de kantitatif mikrovasküler analiz sağlayan bir programdır (Şekil 6). Görüntülerden kısa kesitler alınarak analiz yapılmaktadır. Kan akım tipini, damarların boy-çap oranını, dansitesini, mikrovasküler yataktaki kan akımını ve kanın akım ile çap oranını içeren detaylı bir rapor sunmaktadır [45].



Şekil 6. (a) OPS görüntüleme yöntemi ile karaciğerden alınan anlık mikrosirkülasyon görüntüsü, (b) mikrosirkülasyon görüntüsünün AVA programı ile analiz edilmesi

Raporda; Total vasküler dansite (TVD) (mm/mm^2), hem perfüze olan hem de perfüze olmayan damarların dansitesini verir. PVD (mm/mm^2) ise belli bir bölgedeki perfüze olan damarların dansitesini verir.

Biz çalışmamızda PVD yani perfüze olan damarların dansitesini hesaplayarak karşılaştırma yaptık. Çalışmamızda her bir rattan karaciğer ekspozite edilerek OPS video mikroskopu ile karaciğerden iskemiye bıraktığımız alanlardan 6 adet kayıt alındı. Bu kayıtların her birinden 3'er adet kesitler alınarak AVA programında analiz edildi. Elde edilen her bir rat için 6 adet görüntü kaydı alınarak 18 adet PVD değerlerinin ortalaması alınarak gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırıldı [44, 46].

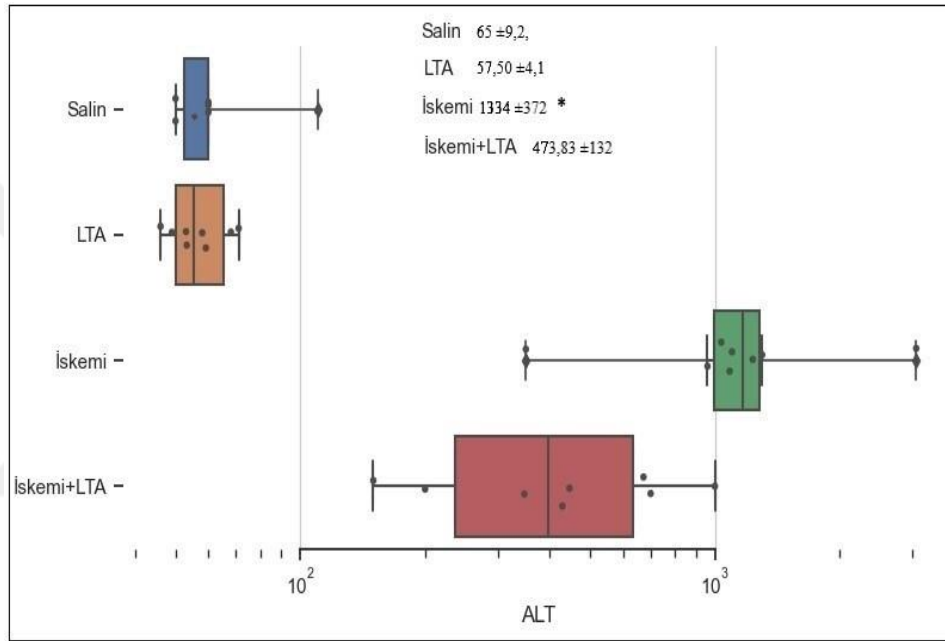
3.3.11. İstatistiksel Analiz ve Veri Görselleştirme

İstatistiksel Analiz için SPSS 22 programı kullanılarak Shapiro testiyle normallik analizi yapıldı. normal dağılıma uyan veriler T testi kullanılarak, normal dağılıma uymayan veriler Mann Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırma yapılmıştır. Anlamlılık oranı olarak p değeri 0.05 altı anlamlı kabul edilmiştir. Veri görselleştirme amacıyla Python 3.9 programlama dili aracılığıyla seaborn ve pandas kütüphaneleri kullanılmıştır.



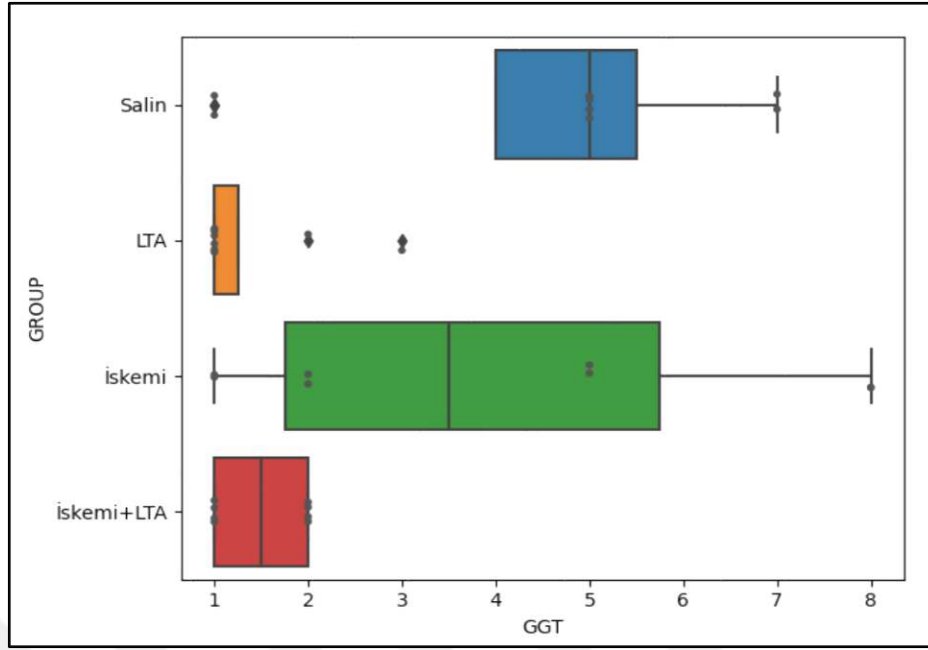
4.BULGULAR

Serum ALT değerleri Salin grubunda 65 ± 9.2 , LTA grubuna 57.50 ± 4.1 , İskemi+Salin grubunda 1334 ± 372 , İskemi+LTA grubunda 473.83 ± 132 olarak bulundu. İskemi sonrası serum ALT değerlerinde belirgin bir artış gözlemlendi. Bu artış İskemi+Salin grubunda en fazla idi (Şekil 7, $p < 0.01$). LTA verilmesi sonrasında serum ALT değerini anlamlı olarak düşürdü (Şekil 7 $p < 0.05$).



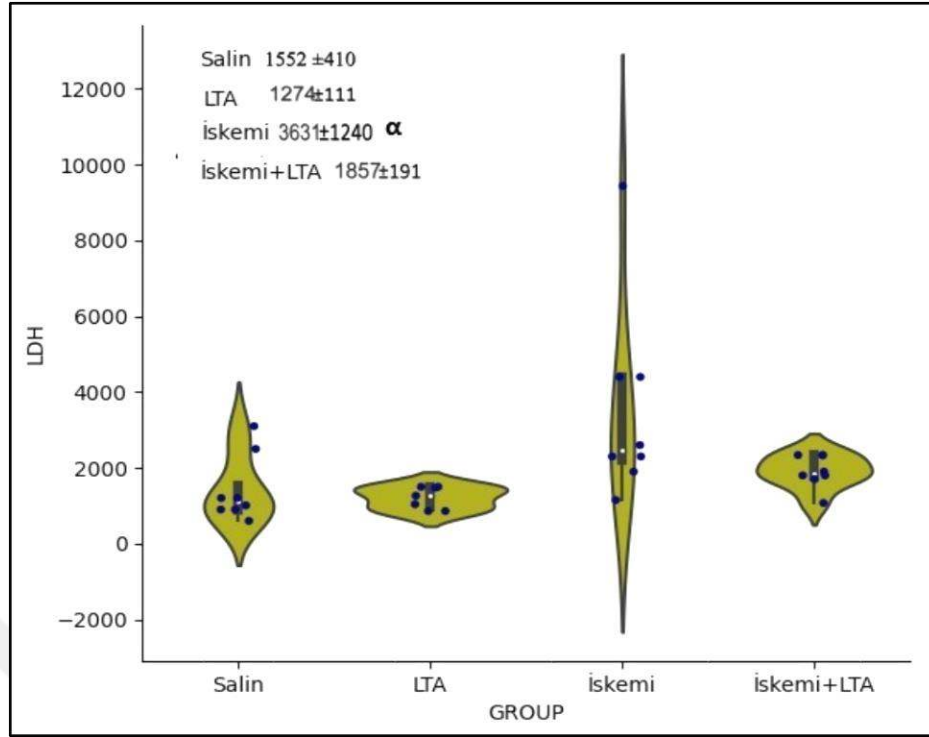
Şekil 7. ALT değerlerinin dağılım grafiği medyan ortalamalarını ve standart hata değerleri,

Serum GGT değerleri Salin grubunda 4 ± 1 , LTA grubuna 1.17 ± 0.16 , İskemi+Salin grubunda 3.83 ± 1.07 , İskemi+LTA grubunda 1.50 ± 0.22 olarak bulundu. İskemi sonrası GGT değerlerinde belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Gruplar arasında istatistiksel olarak da belirgin fark saptanmamıştır (Şekil 8, $p > 0.05$).



Şekil 8. GGT değerlerinin dağılım grafiği medyan ortalamalarını ve standart hata değerleri

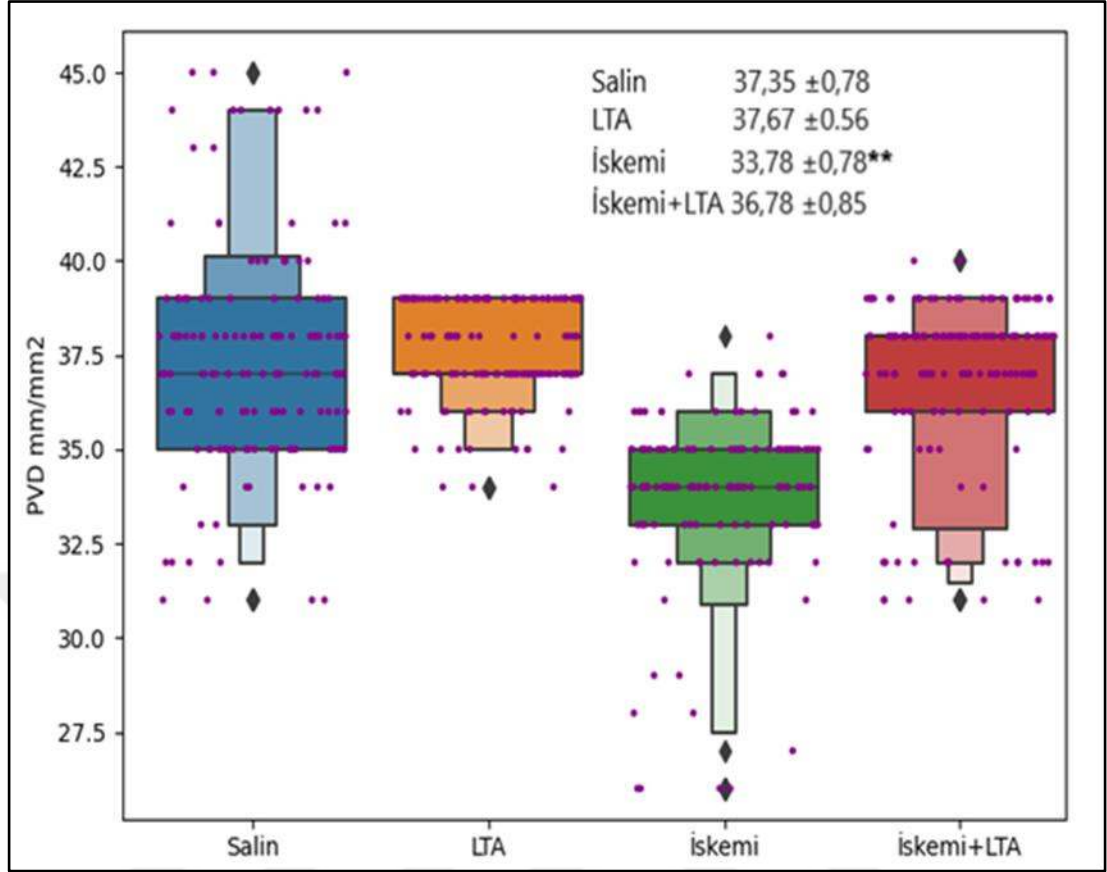
Serum LDH değerleri Salin grubunda 1552 ± 410 , LTA grubuna 1274 ± 111 , İskemi+Salin grubunda 3631 ± 1240 , İskemi+LTA grubunda 1857 ± 191 olarak bulundu. İskemi sonrası serum LDH değerlerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir artış gözlemlendi. Bu artış İskemi+Salin grubunda en fazla idi (Şekil 9, $p < 0.05$). LTA verilmesi sonrasında serum LDH değerlerinde belirgin azalma meydana gelmiştir.



α p<0.05 karşılaştırma diğer gruplar

Şekil 9. LDH değerlerinin dağılım grafiği medyan ortalamalarını ve standart hata, değerleri

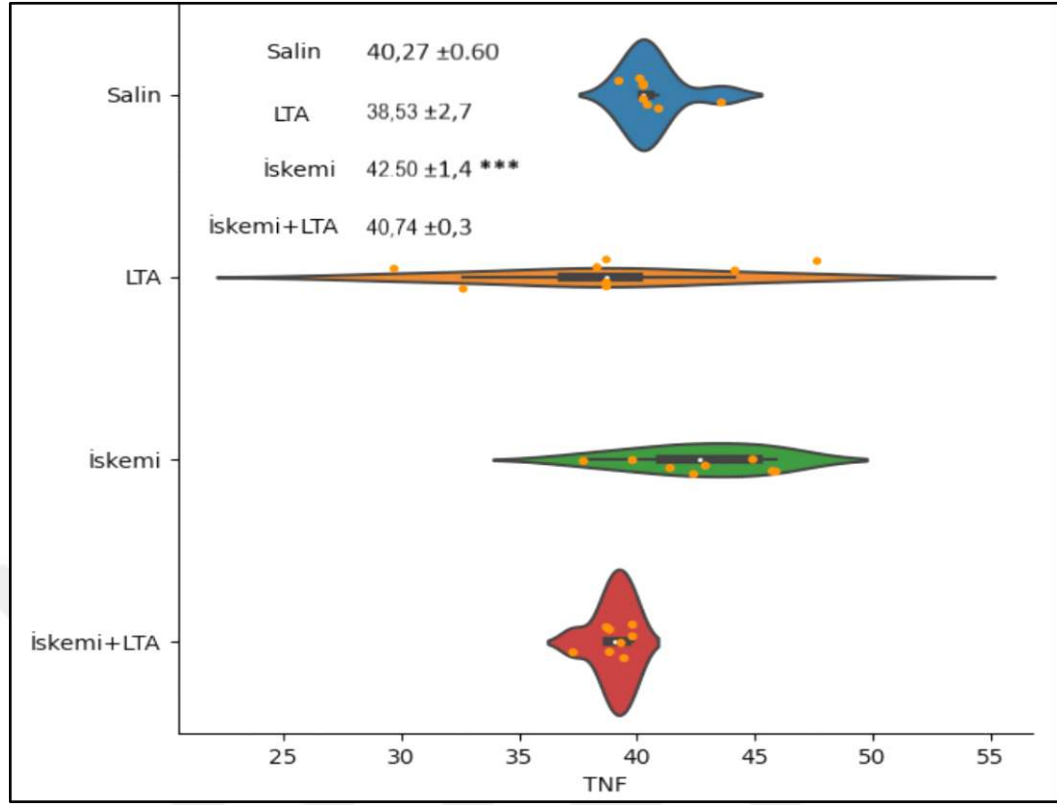
PVD değerleri Salin grubunda 37.35 ± 0.78 mm/mm², LTA grubunda 37.67 ± 0.56 mm/mm², İskemi+Salin grubunda 33.78 ± 0.78 mm/mm², İskemi+LTA grubunda 36.78 ± 0.85 mm/mm² olarak ölçüldü. İskemi sonrası kontrol grubuyla kıyaslandığı perfüze olan damarların yoğunluğunda belirgin azalma meydana gelmiştir (p <0.05). LTA verilmesi sonrasında bu değer normal sınırlara yaklaşmıştır (Şekil 10, p <0.05).



** p < 0.05 karşılaştırma diğer gruplar

Şekil 10. PVD değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri

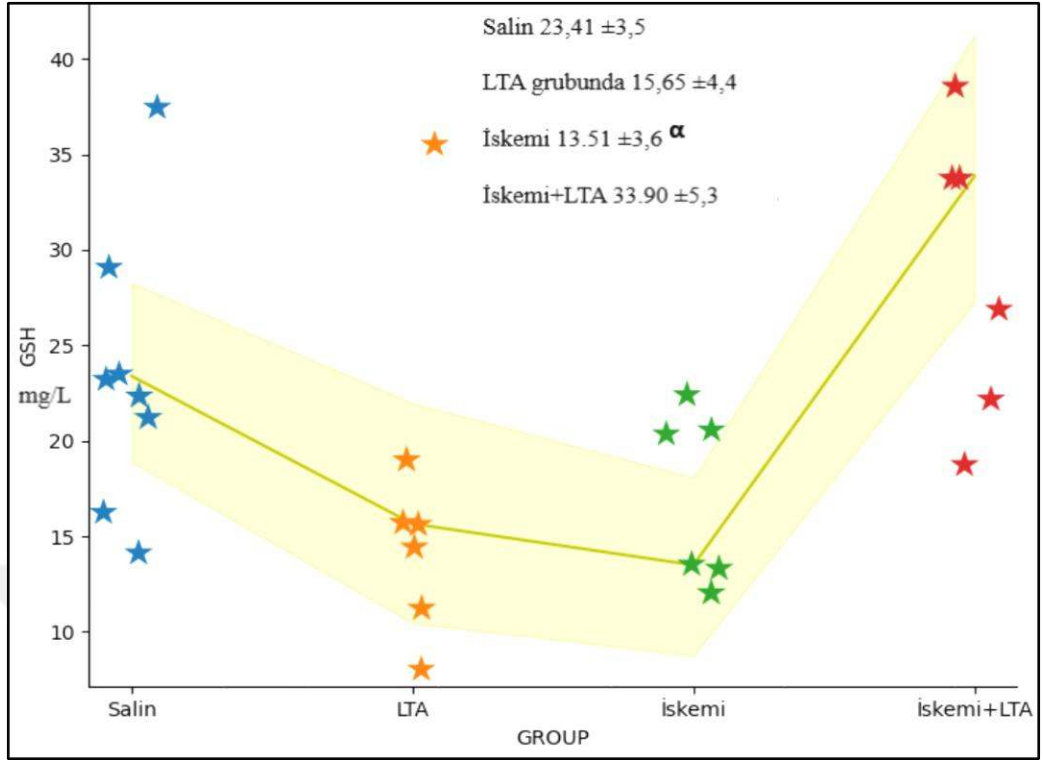
Serum TNF değerleri Salin grubunda 40.27 ± 0.60 ng/L, LTA grubunda 38.53 ± 2.7 ng/l, İskemi+Salin grubunda 42.50 ± 1.4 ng/L, İskemi+LTA grubunda 40.74 ± 0.3 ng/L olarak bulundu. İskemi sonrası serum TNF değerlerinde belirgin olarak artış saptandı (p < 0.05). LTA verilmesi sonrası TNF değerleri normal seviyeye gerilemiş ve iskemi grubuyla kıyaslandığında anlamlı fark saptanmıştır (Şekil 11, p < 0.05).



*** p <0.05 karşılaştırma diğer gruplar

Şekil 11. TNF değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri,

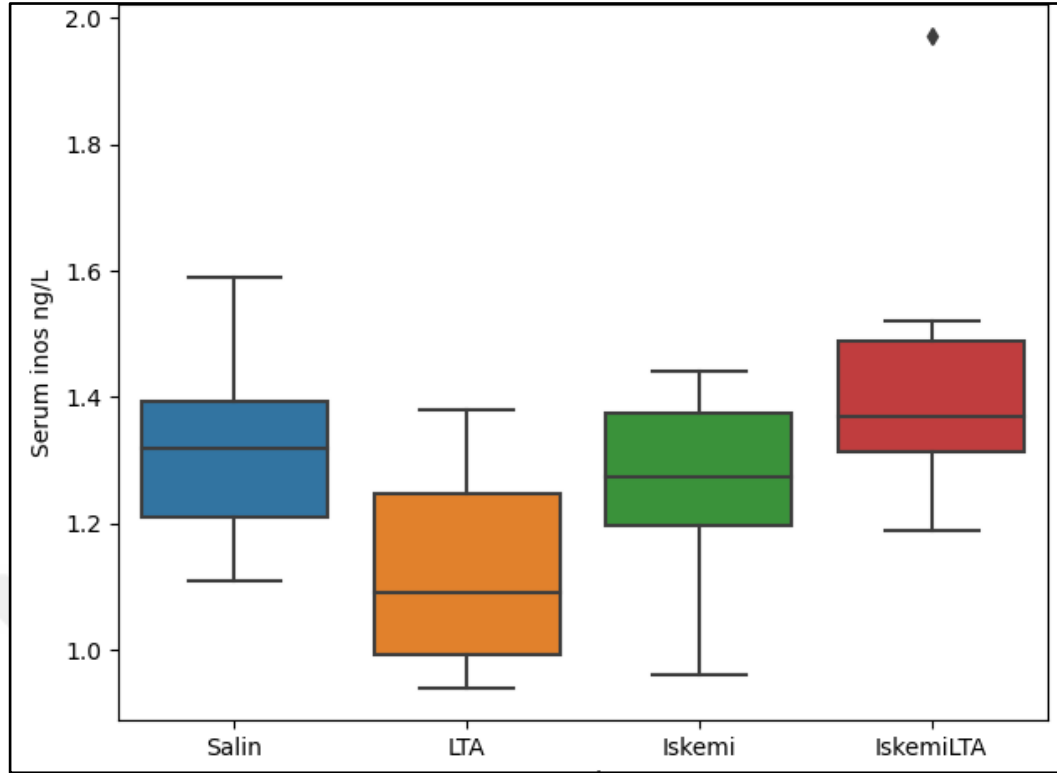
Serum GSH değerleri Salin grubunda 23.41 ± 3.5 mg/L, LTA grubunda 15.65 ± 4.4 mg/L, İskemi+Salin grubunda 13.51 ± 3.6 mg/L, İskemi+LTA grubunda 33.90 ± 5.3 mg/L bulundu. İskemi sonrası GSH değerinde azalma meydana geldi. LTA verilmesi sonrası GSH değerlerini anlamlı olarak artırdı (Şekil 12, p <0.05).



α p < 0.05 karşılaştırma diğer gruplar

Şekil 12. GSH değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri

Serum iNOS değerleri salin grubunda 1.32 ± 0.06 ng/L, LTA grubunda 1.13 ± 0.07 ng/L, İskemi+Salin grubunda 1.25 ± 0.07 ng/L, İskemi+LTA grubunda 1.45 ± 0.1 ng/L olarak bulundu. LTA uygulanması sonrası gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 13, $p > 0.05$).



Şekil 13. Serum iNOS değerlerinin dağılım grafiği

Serum GSSG değerleri salin grubunda 19.23 ± 0.8 mg/L, LTA grubunda 19.94 ± 0.8 mg/L, İskemi+Salin grubunda 22.35 ± 1.6 mg/L, İskemi+LTA grubunda 22.91 ± 3.45 mg/L olarak bulundu. İskemi sonrası GSSG değerlerinde bir miktar artış olmasına rağmen istatistiki olarak gruplar arası anlamlı fark saptanmamıştır

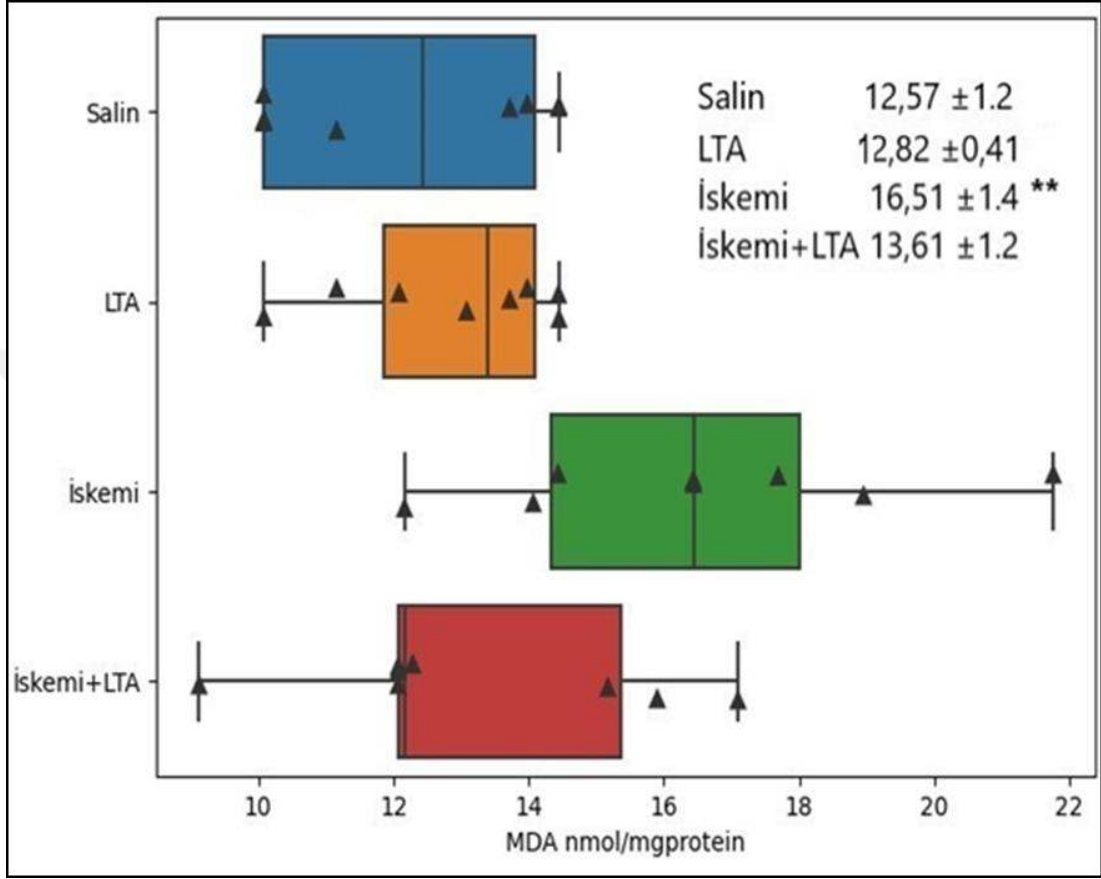
Serum GSH/GSSG oranları ise iskemi sonrası belirgin olarak azalmakla beraber LTA verilmesi sonrası normal seviyelere yükselmiştir (Tablo 1, $p < 0.05$).

Tablo 1. Serum GSSG mg/L ve Serum GSH/GSSG Medyan ortalamaları ve standart hata değerleri $\alpha p < 0.05$ karşılaştırma İskemi+Salin grup

	Salin (n=8)	LTA (n=8)	İskemi+Salin (n=8)	İskemi+LTA (n=8)
Serum GSSG mg/L	$19,23 \pm 0,8$	$19,94 \pm 0,8$	$22,35 \pm 1,6$	$22,91 \pm 3,45$
Serum GSH / GSSG	$1,26 \pm 0,2$	$0,76 \pm 0,17$	$0,64 \pm 0,2$	$1,53 \pm 0,22^a$

Doku MDA değerleri Salin grubunda 12.57 ± 1.2 nmol/mgprotein, LTA grubunda 12.82 ± 0.41 nmol/mgprotein, iskemi grubunda 16.51 ± 1.4 nmol/mgprotein, İskemi+LTA grubunda 13.61 ± 1.2 nmol/mgprotein olarak bulundu. İskemi sonrası

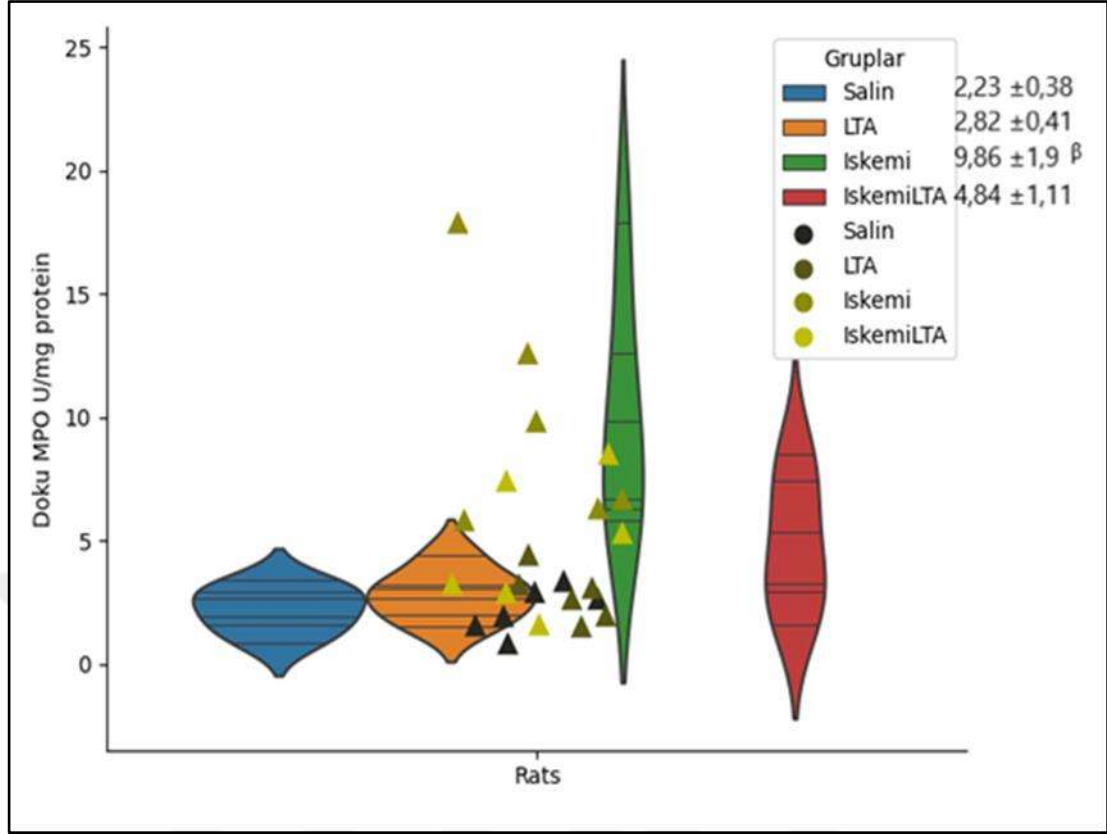
doku MDA değeri kontrol grubuna göre artış saptandı. İskemi yapılan gruba LTA verilmesi sonrası doku MDA değeri normal sınırlara gerildi (Şekil 14, $p<0.05$).



** $p < 0.05$ karşılaştırma diğer gruplar

Şekil 14. Doku MDA değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri

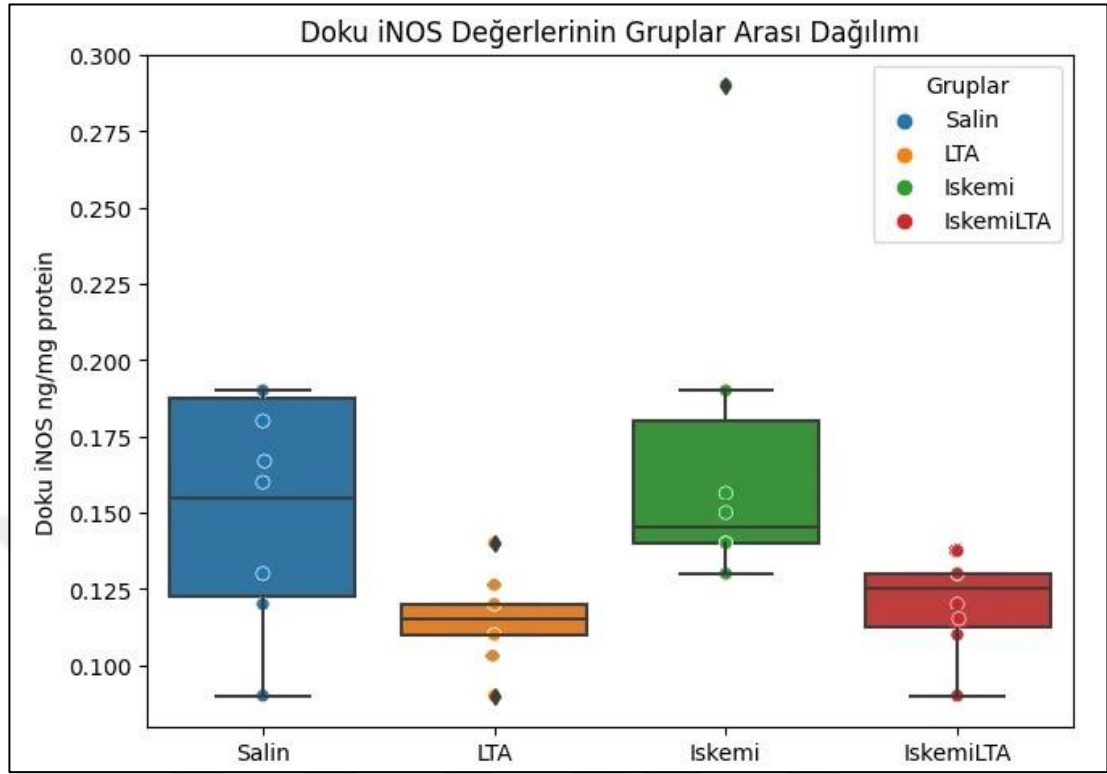
Doku MPO değeri salin grubunda 2.23 ± 0.38 nmol/mgprotein, LTA grubunda 2.82 ± 0.41 nmol/mgprotein, İskemi+Salin grubunda 9.86 ± 1.9 nmol/mgprotein, İskemi+LTA grubunda 4.84 ± 1.11 nmol/mgprotein olarak bulundu. İskemi sonrası doku MPO değeri anlamlı artış saptandı. LTA verilmesi sonrası doku MPO değerleri normal sınırlara gerildi (Şekil 15, $p<0.05$).



β p < 0.05 Karşılaştırma diğer gruplar

Şekil 15. Doku MPO değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri

Doku iNOS değerleri Salin grubunda 0.12 ± 0.01 , LTA grubunda 0.12 ± 0.007 , İskemi+Salin grubunda 0.17 ± 0.02 ve İskemi+LTA grubunda 0.12 ± 0.006 olarak bulundu. İskemi sonrası doku iNOS değerlerinde istatistiki olarak anlamlı artış saptandı. LTA verilmesi doku iNOS düzeylerini azalttı (Şekil 16 p < 0.05).



Şekil 16. Doku iNOS değerlerinin dağılım grafiği

Doku GSH değerlerinde gruplar arası anlamlı fark saptanmamıştır. Doku GSSG değerleri salin grubunda 2.21 ± 0.27 nmol/mgprotein, LTA grubunda 2.15 ± 0.25 nmol/mgprotein, İskemi+Salin grubunda 3.01 ± 0.24 nmol/mgprotein, İskemi+LTA grubunda 1.95 ± 0.23 nmol/mgprotein olarak bulundu. İskemi sonrası doku GSSG değeri anlamlı artış saptandı. LTA verilmesi sonrası doku GSSG değerleri normal sınırlara gerildi (Tablo 2 $p < 0.05$).

Doku GSH/GSSG değerleri salin grubunda 3.53 ± 0.3 nmol/mgprotein, LTA grubunda 3.19 ± 0.2 nmol/mgprotein, İskemi+Salin grubunda 1.81 ± 0.29 nmol/mgprotein, İskemi+LTA grubunda 4.89 ± 0.3 nmol/mgprotein olarak bulundu. İskemi sonrası doku GSH/GSSG değeri anlamlı düşüş saptandı. LTA verilmesi sonrası doku GSH/GSSG değerleri normal sınırlara yükseldi (Tablo 2, $p < 0.05$).

Tablo 2. Doku GSHnmolmg, doku GSSG nmolmg ve Doku GSH/GSSG ‘nin medyan değerleri ve standart hata değerleri

	Saline (n=8)	Thenine (n=8)	İskemi+Salin (n=8)	İskemi+Thenin (n=8)
Doku GSH nmol/mg	5,31 ±0,8	5,51 ±0,53	4,71 ±0,31	6,31 ±1,23
Doku GSSG nmol/mg	2,21 ±0,27	2,15 ±0,25	3,01 ±0,24	1,95 ±0,23
Doku GSH / GSSG	3,53 ±0,3	3,19 ±0,2	1,81 ±0,29	4,89 ±0,3

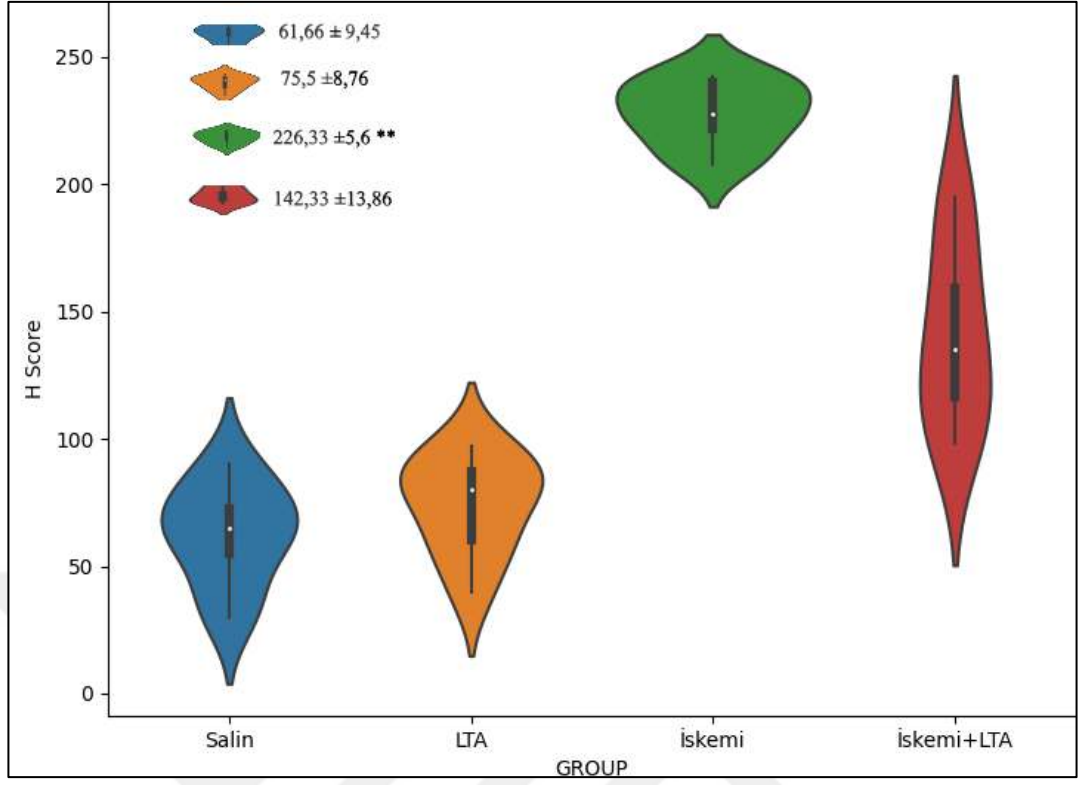
* p <0.05 karşılaştırma diğer gruplar

Histopatolojik incelemede Suzuki skorumla sistemine göre elde edilen veriler çerçevesinde sinüzoid konjesyon, nekroz ve vakuolizasyon açısından gruplar arası karşılaştırma yaptığımızda belirgin bir fark saptanmamıştır (Tablo 3 p> 0.05)

Tablo 3. Histopatolojik inceleme suzuki skorumla sonuçları,

	Salin (n=8)	LTA (n=8)	İskemi+Salin (n=8)	İskemi+ LTA (n=8)
Sinüzoidal Konjesyon	0.9 ± 0,15	0.8 ± 0.15	1.5 ± 0,5	0.83 ± 0,19
Nekroz	0	0	0.8 ± 0,2	0
Vakuolizasyon	0	0	0. 3± 0,2	0

Hif-1α kullanılarak yapılan immunhistokimyasal inceleme neticesinde elde edilen H skoru salin grubunda 61.66±9.45, LTA grubunda 75.5±8.76, İskemi+Salin grubunda 226.33±5.6 ve İskemi+LTA grubunda 142.33±13.86 olarak bulundu. İskemi sonrası H skorunda belirgin olarak artış saptandı (p <0.01). LTA uygulanması sonrasında H Skorunda belirgin azalma meydana gelmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığından gruplar arasında belirgin fark saptanmıştır (Şekil 17, p <0.05).



** p <0.05 Karşılaştırma diğer gruplar

Şekil 17. İmmunhistokimyasal boyama ile gruplar arası H Skoru değerlerinin dağılım grafiği, medyan ortalamaları ve standart hata değerleri,

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda deneysel model olarak karaciğerin % 70'inde 1 saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon seçilmiştir. Bu model en çok kullanılan yöntemlerden biridir ve ratlarda ölüme daha az neden olur [47, 48].

Bir glutamat türevi olan LTA, *Camellia sinensis*'in yapraklarında bulunan benzersiz bir protein olmayan amino asittir. Birçok çalışma antiinflamatuvar, antitümör antioksidan, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkilerini göstermiştir. Bu etkiler vücudun antioksidan kapasitesini artırır [4-6]. Etkilerini nükleer faktör kappa B yolu ile yapar [7]. Glutaminin yerini alabilir ve glutamin etkisini düzenleyebilir [4, 5]. Çalışmamızda bu etkilerinde dolayı LTA seçilmiştir.

Serum ALT değerleri, karaciğer fonksiyonunu ve karaciğer hasarının boyutunu gösterir. Çalışmamızda literatüre benzer şekilde, hepatik IR indüksiyonu histolojik incelemeye göre belirgin ALT artışı, LDH artışı ve nekroza neden olmuştur [27, 47-49]. IR'den sonra hepatosit hücre ölümünün modu hakkında önemli tartışmalar olmuştur [50-55]. Hepatosit hücre ölümünün apoptoz ve nekroz olmak üzere iki formu vardır. Bu iki form mekanizma ve morfoloji açısından büyük farklılıklar gösterir. Hücre küçülmesi, kromatin yoğunluğu artışı, nükleer parçalanma ve apoptotik cisim oluşumu apoptozun ayırt edici özelliklerindendir. Diğer yandan, nekroz ise morfolojik olarak hücre zarı bütünlüğünün bozulması, hücresel vakuolizasyon ile mitokondriyal hasar olarak tanımlanabilir [53]. Apoptoz ve nekroz ana neden olarak mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak birlikte bulunabilir [52-55]. Stimülasyonun şiddeti, olayın apoptoz veya nekroz ile sonuçlanıp sonuçlanmayacağını belirler. Düşük doz SOR veya ATP eksikliği apoptoza neden olabilirken, yüksek doz SOR veya çok az ATP nekroza neden olabilir.

Literatürde hepatik IR ve apoptoz hakkında önemli çalışmalar vardır [50-52]. Bu çalışma apoptoz yollarının hepatik IR tarafından aktive edilebileceğini göstermekle beraber nihai hücre ölümünün nekroz olduğunu göstermiştir. Maalesef çalışmamızda ekonomik nedenlerden dolayı apoptotik yollar incelenememiştir.

SOR üretimine bağlı oksidan stres, hepatik IR'nin önemli patogenetik mekanizmalarından biridir [27, 49, 52, 55]. Oksijen eksikliği olmayan hücrelerde mitokondride sınırlı miktarda SOR üretimi olur ve bu reaktif oksijen ürünleri hücre

içindeki antioksidan sistem tarafından yok edilir. Hepatik iskemiden sonra antioksidan sistemi elimine eden oksidatif strese neden olan, yüksek SOR ürünlerinin üretilmesi reperfüzyon ile beraber oluşur [50, 52-54].

Çalışmamızda hepatik İskemi grubunda artmış doku MDA, MPO, GSSG değerleri ve düşük GSH / GSSG oranı sonuçları bunu desteklemektedir. SOR üretiminin kaynağı belirsizdir. Ana kaynaklar mitokondriyal metabolizma, ksantin oksidaz / redüktaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazdır. ROS, proteinleri, lipidleri, DNA'yı ve endotelyumu yok eder ve ayrıca mikrovasküleriteyi oluşturan endotel hücrelerine zarar verebilir. ROS'un bir diğer etkisi de kupffer hücrelerin aktivasyonudur [27, 49, 50, 52-54]. Çalışmamızda LTA kullanarak iskemide azalan GSH oranı artırarak antioksidan kapasiteyi arttırdık ve bunun olumlu sonuçlarını gözlemledik.

Mikrosirkülasyon bozukluğu, hepatik IR sırasında başka bir önemli patogenetik faktördür [49-54]. Karaciğerin mikrosirkülasyonu, difüz yansıtma spektroskopisi, intravital mikroskopi, çoklu gösterge seyreltme tekniği ve OPS ile ölçülebilir. Bu çalışmada hepatik mikrosirkülasyonu ortogonal polarizasyon görüntüleme ile ölçtük. Çalışmamızda, hepatik IR indüksiyonu PVD'de bir azalmaya neden olmuştur. Birçok yazar intravital mikroskopi, difüz yansıtma spektroskopisi veya OPS kullanarak benzer sonuçlar bildirmiştir [52-54, 56, 57]. Karaciğer IR sırasında mikrodolaşım yetmezliğinin ortaya çıkmasında üç faktör önemli rol oynar. İlk başta, hepatik iskemi döneminde, hücrede ATP tükenmesi azalır, bu da hücre sinosoidal kupffer hücrelerinin ve endotel hücrelerinin şişmesi ve hücre zarı geçirgenliğinde artışa neden olur. Bu şişme sinüzoid çapında daralmaya neden olur. İkincisi, reperfüzyon sırasında aşırı SOR, SEC ve kupffer hücre aktivasyonunda hasara neden olur. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu sitokin, kemokin salınımı, lökosit kemotaksisi ve aktivasyonu, endotelde adezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olur. Bunu SEC'de lökosit yapışması ve trombosit agregasyonu izler. Sonuç olarak, mikrosirkülasyon azalır. Mikrosirkülasyon bozulmasındaki üçüncü mekanizma NO ve endotelin arasındaki dengesizliktir. Denge endotelin lehine bozulur ve vazokonstriksiyon oluşur [27, 47, 50-54].

Çalışmamızda iskemi yapılan grupta PVD değerlerinde belirgin artış saptandı. İskemi sonrasında LTA verilen grupta kontrol grubuna göre PVD

değerlerinde belirgin azalma meydana geldi. Bu düşüş LTA'nın bir antioksidan olarak SOR'un oksidan etkisini azaltarak PVD'yi düzeltmesine bağlı olabilir.

NO, hepatik IR sırasında önemli bir rol oynar. NO, hepatik yıldız hücreleri aracılığıyla sinüzoidlere vazodilatör görevi görür ve ayrıca proinflamatuvar sitokin salınımını, trombosit agregasyonunu, lökosit adezyonunu ve apoptozu inhibe eder. NO etkileri doza bağlıdır. Düşük dozlarda sinüzoidler üzerinde vazodilatör etkiye sahipken aşırı dozlarda ters etki yapmaktadır [50, 51, 53, 54]. Çalışmamızda iskemi sonrasında iNOS seviyesinin arttığını gözlemledik, ancak LTA uygulaması ile iNOS seviyelerinde düşüş meydana geldi. Bu, çalışmamızdaki mikrosirkülasyondaki iyileşmeyi açıklayabilir.

HIF 1- α , son on yılda tıpta en çok araştırılan maddelerden biridir. HIF 1- α , hücrenin oksijen sensörü olarak işlev görür. Normal oksijen basınçlarında reaksiyon vermezken, düşük oksijen basınçlarında salınımı artar ve çekirdekten koruyucu maddelerin salınmasını sağlar [40]. Çalışmamızda iskemi yapılan grubunda HIF 1- α 'da anlamlı bir artış bulduk. LTA verilmesinin HIF 1- α düzeylerinin belirgin olarak azalttığı görülmüştür. Bu durum hepatik IRI sürecinde hücrenin derin hipoksida kaldığını ve durumun LTA uygulamasıyla HIF 1- α düzeylerinin azalması doku oksijenizasyonunda düzelme meydana geldiğini gösterir [36, 40]. Aynı zamanda HIF1- α immünohistokimyal H skoru hesaplamasının Suzuki skorlamasına göre iskemi derecesini ve IR patolojisine LTA'nın etkisini gözlemlemekte daha etkili olduğu göstermiştir. HIF 1- α pek çok çalışmada farklı zaman dilimlerinde çalışılmıştır [58, 59]. Biz çalışmamızda ratlarda 1 saat iskemi 4 saat reperfüzyon yaparak çalıştık.

TNF- α , hepatik IR sırasında hepatik kupffer hücrelerinden salınan önemli bir sitokindir. TNF- α , lökosit kemotaksisini ve aktivasyonunu sağlar. Endotelyumdan yapışma moleküllerinin ekspresyonunu uyarır.

Ayrıca TNF- α 'nın hepatositler ve SEC hücreleri üzerinde doğrudan toksik etkileri vardır. Çalışmamızda hepatik İskemi grubunda kontrol grubuyla kıyasladığımızda TNF- α konsantrasyonu anlamlı artış saptandı ve LTA uygulanması sonrasında iskemi grubuna kıyasla TNF- α düzeylerini belirgin olarak azalttı. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu SOR aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu LTA'nın TNF- α 'yı azaltma etkisini açıklar. Ayrıca Malkoç ve ark bulguları çalışmamızı desteklemektedir [59].

6. SONUÇ

- Bu çalışmada, LTA uygulaması hepatik IR'i önlemektedir.
- Serum iNOS seviyesinin azaltarak dokuda inflamasyonu azaltmaktadır.
- İskemi sonrası artan TNF- α konsantrasyonunu azaltarak doku hasarını azaltmaktadır.
- İmmünpatolojik HIF 1- α boyamada görüldüğü gibi doku oksijenlenmesinin artırılmasını sağlamaktadır.
- İskemi sonrası azalan perfüze damarların oranı artırılarak doku kanlanmasının artmasını sağlamaktadır.
- IR'de azalan hücresel antioksidan seviyesinin eski haline getirilmesini etkilemektedir.
- Karaciğer fonksiyon değerlerini iskemi sonrası azaltmaktadır.
- LTA'nın hepatik IR üzerindeki önleyici veya azaltıcı etkilerini doğrulamak için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

7.KAYNAKÇA

1. Aragon, R.J. and N.L. Solomon, *Techniques of hepatic resection*. Journal of gastrointestinal oncology, 2012. 3(1): p. 28.
2. Pringle, J.H., V. *Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma*. Annals of surgery, 1908. 48(4): p. 541.
3. Wigmore, S., *Advances in liver surgery*. Journal of British Surgery, 2020. 107(7): p. 788-789.
4. Jiang, W., et al., *Protective effect of L-theanine on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice*. Biochemical and biophysical research communications, 2012. 422(2): p. 344-350.
5. Gong, Z., et al., *l-Theanine prevents ETEC-induced liver damage by reducing intrinsic apoptotic response and inhibiting ERK1/2 and JNK1/2 signaling pathways*. European journal of pharmacology, 2018. 818: p. 184-190.
6. Li, G., et al., *L-Theanine prevents alcoholic liver injury through enhancing the antioxidant capability of hepatocytes*. Food and Chemical Toxicology, 2012. 50(2): p. 363-372.
7. Pérez-Vargas, J., et al., *l-Theanine prevents carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of nuclear factor κ B and down-regulation of transforming growth factor β and connective tissue growth factor*. Human & experimental toxicology, 2016. 35(2): p. 135-146.
8. Delva, E., et al., *Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases*. Annals of surgery, 1989. 209(2): p. 211.
9. Couinaud, C., *The Liver. Anatomical and surgical investigations*. 1957, Paris: Masson.
10. Vdoviaková, K., et al., *Importance rat liver morphology and vasculature in surgical research*. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 2016. 22: p. 4716.
11. Kogure, K., et al., *A comparative study of the anatomy of rat and human livers*. Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery, 1999. 6(2): p. 171-175.
12. Henderson, J., *Liver transplantation and rejection: an overview*. Hepato-gastroenterology, 1999. 46: p. 1482-1484.
13. Vollmar, B., et al., *Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion*. The American journal of pathology, 1994. 145(6): p. 1421.

14. Yadav, S.S., et al., *L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1998. 275(6): p. G1341-G1352.
15. Cywes, R., et al., *Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat*. Hepatology, 1993. 18(3): p. 635-647.
16. Vollmar, B., S. Richter, and M.D. Menger, *Leukocyte stasis in hepatic sinusoids*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1996. 270(5): p. G798-G803.
17. Colletti, L.M., et al., *The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat*. Hepatology, 1996. 23(3): p. 506-514.
18. Shirasugi, N., et al., *Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury*. Transplantation, 1997. 64(10): p. 1398-1403.
19. Li, Y., et al., *A review of melatonin in hepatic ischemia/reperfusion injury and clinical liver disease*. Annals of medicine, 2014. 46(7): p. 503-511.
20. Javeshghani, D., et al., *Reduced macrophage-dependent inflammation improves endothelin-1-induced vascular injury*. Hypertension, 2013. 62(1): p. 112-117.
21. Shah, V. and P.S. Kamath, *Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications*. Liver Transplantation, 2003. 9(1): p. 1-11.
22. Albrecht, E.W., et al., *Protective role of endothelial nitric oxide synthase*. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 2003. 199(1): p. 8-17.
23. Dalkara, T., M. Endres, and M.A. Moskowitz, *Mechanisms of NO neurotoxicity*. Progress in brain research, 1998. 118: p. 231-239.
24. Zamzami, N., et al., *Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 1997. 29(2): p. 185-193.
25. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. Biochemical Journal, 1999. 341(2): p. 233-249.
26. Serracino-Inglott, F., N.A. Habib, and R.T. Mathie, *Hepatic ischemia-reperfusion injury*. The American Journal of Surgery, 2001. 181(2): p. 160-166.
27. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1997. 37(1): p. 517-554.

28. Zhu, X., et al., *Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: a short review*. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2011. 17(38): p. 4283.
29. Shen, X.-D., et al., *Stat4 and Stat6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: HO-1 dependence of Stat4 disruption-mediated cytoprotection*. Hepatology, 2003. 37(2): p. 296-303.
30. Kang, J.W. and S.M. Lee, *Melatonin inhibits type 1 interferon signaling of toll-like receptor 4 via heme oxygenase-1 induction in hepatic ischemia/reperfusion*. Journal of pineal research, 2012. 53(1): p. 67-76.
31. Tsuchihashi, S.-i., et al., *Heme oxygenase-1 mediated cytoprotection against liver ischemia and reperfusion injury: inhibition of type-1 interferon signaling*. Transplantation, 2007. 83(12): p. 1628-1634.
32. O'Neill, L.A., *Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases*. Current opinion in pharmacology, 2003. 3(4): p. 396-403.
33. Hertzog, P.J., L.A. O'Neill, and J.A. Hamilton, *The interferon in TLR signaling: more than just antiviral*. Trends in immunology, 2003. 24(10): p. 534-539.
34. Uchiyama, M. and M. Mihara, *Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test*. Analytical biochemistry, 1978. 86(1): p. 271-278.
35. Hillegass, L., et al., *Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney*. Journal of pharmacological methods, 1990. 24(4): p. 285-295.
36. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
37. Szasz, G., *New substrates for measuring gamma-glutamyl transpeptidase activity*. Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie, 1974. 12(5): p. 228-228.
38. Suzuki, S., et al., *Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine*. Transplantation, 1993. 55(6): p. 1265-1272.
39. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proceedings of the national academy of sciences, 1995. 92(12): p. 5510-5514.
40. Ercin, M.E., et al., *Hypoxic Gene Signature of Primary and Metastatic Melanoma Cell Lines: Focusing on HIF-1 β and NDRG-1*. Balkan medical journal, 2020. 37(1): p. 15.
41. Ishibashi, H., et al., *Sex steroid hormone receptors in human thymoma*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003. 88(5): p. 2309-2317.

42. Nadort, A., et al., *Quantitative laser speckle flowmetry of the in vivo microcirculation using sidestream dark field microscopy*. Biomedical optics express, 2013. 4(11): p. 2347-2361.
43. Dobbe, J.G., et al., *Measurement of functional microcirculatory geometry and velocity distributions using automated image analysis*. Medical & biological engineering & computing, 2008. 46(7): p. 659-670.
44. Demir, S.U., et al., *An automated method for analysis of microcirculation videos for accurate assessment of tissue perfusion*. BMC medical imaging, 2012. 12(1): p. 1-13.
45. Çil, H., *Inhalasyon Anesteziklerinden Sevofluran ve Desfluranın Mikrosirkülasyon Üzerine Karşılaştırmalı Etkileri*. 2014.
46. Karatzas, T., et al., *Rodent models of hepatic ischemia–reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms*. Journal of Surgical Research, 2014. 191(2): p. 399-412.
47. Kim, M.S., et al., *CD44 disruption attenuates murine hepatic ischemia/reperfusion injury*. Journal of Korean medical science, 2011. 26(7): p. 919.
48. Montalvo-Jave, E.E., et al., *Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury*. Journal of Surgical Research, 2008. 147(1): p. 153-159.
49. Datta, G., B.J. Fuller, and B.R. Davidson, *Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models*. World journal of gastroenterology: WJG, 2013. 19(11): p. 1683.
50. Li, J., et al., *The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. 19(11): p. 2036-2047.
51. Guan, L.-Y., et al., *Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide*. World journal of gastrointestinal surgery, 2014. 6(7): p. 122.
52. Konishi, T. and A.B. Lentsch, *Hepatic ischemia/reperfusion: mechanisms of tissue injury, repair, and regeneration*. Gene Expression The Journal of Liver Research, 2017. 17(4): p. 277-287.
53. Rampes, S. and D. Ma, *Hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplant setting: mechanisms and protective strategies*. Journal of biomedical research, 2019. 33(4): p. 221.
54. Dar, W.A., et al., *Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: cellular and molecular mechanisms*. Liver International, 2019. 39(5): p. 788-801.
55. Alhan, E., et al., *Effects of glutamine alone on the acute necrotizing pancreatitis in rats*. journal of surgical research, 2015. 193(1): p. 161-167.

56. Classics Lowry, O., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J biol Chem, 1951. 193: p. 265-75.
57. Howell, N.J. and D.A. Tennant, *The role of HIFs in ischemia-reperfusion injury*. Hypoxia, 2014. 2: p. 107.
58. Ju, C., S.P. Colgan, and H.K. Eltzschig, *Hypoxia-inducible factors as molecular targets for liver diseases*. Journal of molecular medicine, 2016. 94(6): p. 613-627.
59. Malkoç, M., et al., *l-theanine alleviates liver and kidney dysfunction in septic rats induced by cecal ligation and puncture*. Life sciences, 2020. 249: p. 117502.

