

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**SIÇANLARDA, METFORMİN İLE ÖN KOŞULLAMANIN, HEPATİK
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI MODELİNDE
MİTOKONDRIYAL KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

GAMZE BİLGİLİ

DOKTORA TEZİ

ANKARA – 2025

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**SIÇANLARDA, METFORMİN İLE ÖN KOŞULLAMANIN, HEPATİK
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI MODELİNDE
MİTOKONDRIYAL KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

**HAZIRLAYAN
GAMZE BİLGİLİ**

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FATMA BELGİN ATAÇ**

ANKARA – 2025

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde Gamze Bilgili tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/06/2025

Tez Adı: Sıçanlarda, metformin ile ön koşullamanın, hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde mitokondriyal katlanmamış protein cevabı mekanizmalarının araştırılması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Belgili Gamze Bilgili
Başkent Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji
Başkent Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

ONAY

Enstitü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: ... / ... /

Öğrencinin Adı, Soyadı: Gamze Bilgili

Öğrencinin Numarası:

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Programı: Tıbbi Biyoloji Doktora Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. Fatma Belgin Ataç

Tez Başlığı: Sıçanlarda, metformin ile ön koşullamanın, hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde mitokondriyal katlanmamış protein cevabı mekanizmalarının araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam sayfalık kısmına ilişkin, ... / ... / tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %'dır. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

ONAY

Tarih: ... / ... /

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

.....

TEŞEKKÜR

Başkent Üniversitesi ‘ne girdiğim andan, tezimin basım aşamasına geldiği bugüne kadar; zamanını, desteğini ve emeğini hiç düşünmeden ortaya koyan ve gerekli bilgi birikimlerini bana aktararak, hayatıma unutulmaz katkılar sağlayan

Hayat serüvenim süresince beni her zaman destekleyen, hep en iyisi için teşvik eden
canım aileme,

Sonsuz teşekkür ve minnettarlığımı sunarım.

ÖZET

BİLGİLİ G. SIÇANLARDA, METFORMİN İLE ÖN KOŞULLAMANIN, HEPATİK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI MODELİNDE MİTOKONDRIYAL KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI. BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA TEZİ, 2025.

Hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı (H-IRH), karaciğer transplantasyonu sonrası alıcıda karaciğere kan akışının durması ve sonrasında yoğun bir şekilde tekrar sağlanabilmesi ile gerçekleşen anomalileri tanımlar. H-IRH, hücresel düzeyde mitokondrinin olumsuz etkilenmesine neden olur. Bu nedenle, IRH'nin modellenmesi ile mitokondriyal süreçlerin nasıl etkilendiğinin belirlenmesi, doku reddinin mekanizmalarının anlaşılması ve olası terapi yöntemlerinin açığa çıkartılması açısından oldukça önemlidir.

Mitokondri, stres koşullarına bağlı olarak hücre ölümü başta olmak üzere enerji metabolizmasının ve hücre ölümünün regülasyonu gibi hücresel cevaplar yaratır. Ancak, hücre sağkalımı için tetikleyebileceği sinyal yolları, stres koşuluna adaptasyonu sağlayabilir. Mitokondriyal stres adaptasyon yollarından bir tanesi de katlanmamış protein cevabıdır (KPC). Mitokondride gerçekleşen KPC (KPCmt), stres koşuluna bağlı olarak mitokondriyal protein üretiminin durdurulmasını ve hatalı katlanmış proteinlerin eliminasyonunu kapsamaktadır. Fakat, H-IRH'de KPCmt'nin nasıl düzenlendiğine dair bilgiler sınırlıdır.

Sunulan çalışma, sıçanda H-IRH'nin modellenmesi ile KPCmt yolağının nasıl etkilendiğinin ve IRH öncesi metformin ön koşullamasının bu süreci değiştirip değiştirmediğinin moleküler düzeyde açığa çıkartılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, Wistar albino cinsi 30 sıçan optimal IRH modelleme ve metformin ön koşullama işlemleri için 10'ar denekten oluşacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. Grubumuzun önceki çalışmalarında elde ettiği bilgiler doğrultusunda, modelleme süreleri 45 dk iskemi, 6 saat reperfüzyon ve 7 gün metformin ön koşullama olarak belirlenmiştir. Modellemeler sonrası hipoksik ve inflamatuvar süreçler biyokimyasal ve morfolojik metotlarla takip edilmiştir. Süreçler sonunda, belirlenen sürelerde AST ($p<0,0001$), ALT ($p<0,0001$), TNF α ($p=0,02$), ROS ($p<0,0001$), TOS ($p=0,004$) ve MPO ($p=0,016$) seviyeleri, IRH modellemesi ile artış göstermiştir. GSH

($p=0,0009$) ve ATP ($p<0,0001$) seviyeleri modelleme ile azalış göstermiştir. Metformin ön koşullaması ile IRH modelleme sonucu artan AST ($p<0,0001$), ALT ($p<0,0001$), ROS ($p=0,0045$) ve TOS ($p=0,019$) seviyeleri anlamlı bir şekilde azalmıştır. Western blot ile protein analizlerinde, IRH modellemesinin hipoksi belirtici olan HIF1A seviyelerini anlamlı bir şekilde ($p=0,016$) arttırarak bu sonuca neden olabileceği gösterilmiştir. Fakat, metformin ön koşullamanın IRH modelleme ile artan HIF1A seviyelerini anlamlı olarak ($p=0,042$) azaltarak, modellemenin etkisini azalttığı görülmüştür. Ayrıca, modelleme ile KPCmt belirteçleri olan ATF5 ($p=0,015$) ve CHOP ($p=0,0008$) seviyeleri artış göstermiştir. ATF5 ve CHOP seviyelerindeki artış CLPP ($p=0,0009$), HSP10 ($p=0,016$), HSP60 ($p=0,001$) ve HSP70 ($p=0,005$) proteaz ve şaperonların ekspresyon seviyelerini de arttırarak KPCmt'yi başlatmıştır. Metformin ön koşullaması ise IRH modelleme ile ekspresyon düzeyleri artan ATF5'e etki etmezken CHOP ($p=0,0005$), CLPP ($p=0,006$), HSP10 ($p=0,029$), HSP60 ($p=0,005$) ve HSP70 ($p=0,043$) seviyelerini anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Bu durum, metforminin IRH ile indüklenen KPCmt'yi inhibe ettiğini göstermektedir. Bu nedenlerle, karaciğer transplantasyonu öncesi alıcıda metformin uygulamasının doku reddini önleyebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer transplantasyonu, Mitokondriyal katlanmamış protein cevabı, Metformin ön koşullama

ABSTRACT

BİLGİLİ G. INVESTIGATION OF METFORMIN PRECONDITIONING ON MITOCHONDRIAL UNFOLDED PROTEIN RESPONSE IN HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN RATS. BAŞKENT UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES PHD THESIS, 2025.

Hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI) is defined as the anomalies in which blood flow is blocked at first and then harshly restart in the liver after transplantation. Hepatic IRI, widely affect mitochondria at the cellular level. Hence, evaluation of the mitochondrial process in the IRI models is critical in terms of identification of tissue rejection and development of putative therapy strategies.

Mitochondria induces diverse cellular responses including regulation of cell death and energy mechanisms depending on the stress conditions. Nonetheless, mitochondria also trigger cell survival signals to adapt the stress conditions. Unfolded protein response (UPR) is one of the major stress adaptation pathways. Mitochondrial UPR (UPR_{mt}) involves the prevention of mitochondrial protein synthesis and elimination of unfolded proteins during stress conditions. Nevertheless, the role of UPR_{mt} in hepatic IRI has been limitedly reported.

The present study aims to identify molecular mechanisms of UPR_{mt} in rat hepatic IRI models and questions the role of metformin pre-conditioning in those mechanisms. For this aim, 30 Wistar albino rats were divided into 3 groups for optimal IRI modelling and metformin pre-conditioning. Regarding the results of the previous studies of our research group, optimal modelling durations were clarified as 45 min for ischemia, 6 h for reperfusion and 7 days for metformin pre-conditioning. After modellings, hypoxic and inflammatory processes were followed by biochemical and morphological methods. Accordingly, AST ($p<0.0001$), ALT ($p<0.0001$), TNF α ($p=0.02$), ROS ($p<0.0001$), TOS ($p=0.004$) and MPO ($p=0.016$) levels significantly increased in IRI models compared to control group. Nonetheless, GSH ($p=0.0009$) and ATP ($p<0.0001$) levels significantly decreased in IRI group. Moreover, metformin pre-conditioning significantly decreased the levels of AST ($p<0.0001$), ALT ($p<0.0001$), ROS ($p=0.0045$) and TOS ($p=0.019$) compared to IRI alone group. Protein analyses by Western blotting showed that IRI modelling increased the levels

of hypoxia marker, HIF1A ($p=0.016$), speculating that the effects of IRI modelling could be a result of increase in the expression of HIF1A. However, metformin pre-conditioning reversed the effects of IRI modelling putatively by downregulating HIF1A levels ($p=0.042$). Furthermore, IRI modelling increased the levels of UPRmt markers, ATF5 ($p=0.015$) and CHOP ($p=0.0008$). Upregulation of those markers further elevated the levels of proteases and chaperons, CLPP ($p=0.0009$), HSP10 ($p=0.016$), HSP60 ($p=0.001$) and HSP70 ($p=0.005$), demonstrating the initiation of UPRmt. Metformin pre-conditioning, however, reduced the expression of these proteins, CHOP ($p=0.0005$), CLPP ($p=0.006$), HSP10 ($p=0.029$), HSP60 ($p=0.005$) and HSP70 ($p=0.043$) without altering that of ATF5. Hence, the results underlined that metformin pre-conditioning blocked UPRmt activated by IRI. Therefore, metformin pre-treatment in the recipients before transplantation may prevent tissue rejection.

Keywords: Liver transplantation, Mitochondrial unfolded protein response, Metformin pre-conditioning

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kapsam	2
1.2. Amaç	2
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Mitokondriyal Katlanmamış Protein Cevabı.....	4
2.1.1. Mitokondrinin yapısı, fonksiyonu ve KPCmt.....	4
2.1.2. Farklı hücrel stres koşullarında KPCmt'nin regülasyonu.....	9
2.2. H-IRH	11
2.2.1. H-IRH'nin patofizyolojisi ve mekanizmaları	11
2.2.2. H-IRH'de mitokondrinin rolü.....	13
2.3. Metformin Ön Koşullama	15
2.3.1. Metformin ve etki mekanizmaları	15
2.3.2. Metforminin mitokondriyal fonksiyona etkileri.....	15
2.3.3. Farklı patogenezlere metformin ön koşullama	16
2.4. H-IRH'de Sıçan Modelleri	18
2.4.1. H-IRH'de sıçan modellerinin oluşturulması.....	19
2.4.2. Sıçan modellerinin klinik geçerliliği	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Etik Onay.....	21
3.2. Deney Dizaynı.....	21
3.3. Hayvan Bakımı, Gözetim ve Operasyon Protokolleri	22
3.4. Veri Eldesi ve Analizi	23
3.4.1. Histopatolojik analizler.....	23
3.4.2. Biyokimyasal analizler	24

3.4.2.1. Örneklerin hazırlanması	24
3.4.2.2. TNF α seviyelerinin belirlenmesi.....	25
3.4.2.3. ATP seviyelerinin belirlenmesi	27
3.4.2.4. ROS seviyelerinin belirlenmesi.....	28
3.4.2.5. TOS seviyelerinin belirlenmesi	29
3.4.2.6. MPO seviyelerinin belirlenmesi.....	29
3.4.2.7. GSH seviyelerinin belirlenmesi.....	30
3.4.2.8. MDA seviyelerinin belirlenmesi	31
3.4.2.9. ALT ve AST seviyelerinin belirlenmesi	32
3.4.3. Protein analizleri	33
3.4.3.1. Protein örneklerinin denatüre edilmesi	33
3.4.3.2. Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS-PAGE	33
3.4.3.3. Blotlama.....	34
3.4.3.4. Bloklama	34
3.4.3.5. Primer antikor uygulaması	35
3.4.3.6. Yıkama	36
3.4.3.7. Sekonder antikor uygulaması ve yıkama.....	36
3.4.3.8. Görüntüleme.....	36
3.5. İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Sıçan Modelleri ve Örnek Hazırlanması	38
4.2. IRH ve Metformin Ön Koşullama Sonrası IRH Modellemelerinin Histolojik ve Biyokimyasal Etkileri	40
4.3. IRH ve Metformin Ön Koşullama Sonrası IRH Modellemelerinin Hipoksik ve KPCmt Yolaklarına Etkisi.....	49
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	68
EKLER	
EK 1: Etik Onay	
EK 2: Protein Konsantrasyon Hesaplaması	
EK 3: Suzuki kriterlendirmesi sonrası konjesyon tespiti için gruplar arasında gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu	

- EK 4: Suzuki kriterlendirmesi sonrası vakuolizasyon tespiti için gruplar arasında gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 5: Suzuki kriterlendirmesi sonrası vakuolizasyon tespiti için gruplar arasında gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 6: Suzuki kriterlendirmesi sonrası inflamasyon tespiti için gruplar arasında gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 7: TNF α seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 8: ATP seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 9: ROS seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 10: TOS seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 11: MPO seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 12: GSH seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 13: MDA seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 14: AST seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 15: ALT seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi**
- EK 16: HIF-1'in rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 17: ATF4'ün rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 18: ATF5'ün rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 19: CHOP'un rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 20: CLPP'nin rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 21: HSP10'un rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 22: HSP60'ın rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 23: HSP70'in rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**
- EK 24: LONP1'in rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu**

- EK 25: Beta-aktin proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 26: ATF4 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 27: ATF5 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 28: CHOP proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 29: CLPP proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 30: HIF1A proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 31: HSP10 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 32: HSP60 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 33: HSP70 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**
- EK 34: LONP1 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen ham membran görüntüsü**

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları.	35
Tablo 4.1. Karaciğer örneklerinden izole edilen protein konsantrasyonları.....	39
Tablo 4.2. Çalışma sonucunda elde edilen ve modellemelerin kümülatif etkisini gösteren sonuçların özeti.....	49
Tablo 4.3. Modellemelerle KPCmt yolağının etkilenmesi amacıyla belirteç proteinlerin seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analiz özeti.	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Mitokondrinin, mitokondriyal genomun ve oksidatif fosforilasyon mekanizmasının genel yapısı.....	4
Şekil 2.2. Mitokondriyal şaperonların fonksiyonu ve lokalizasyonu (21).	6
Şekil 2.3. KPCmt'nin 4 farklı yolağı	7
Şekil 2.4. IRH ile ROS seviyelerindeki artış ve artan ROS'a bağlı moleküler değişimler .	14
Şekil 2.5. Metforminin mitokondri üzerindeki etkileri	16
Şekil 3.1. Çalışma boyunca izlenen metodoloji.	22
Şekil 3.2. Örneklerin protein konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorban değerlerini göstermektedir.	25
Şekil 3.3. Örneklerin TNF α konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorban değerlerini göstermektedir.	26
Şekil 3.4. Örneklerin ATP konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorban değerlerini göstermektedir.	27
Şekil 3.5. Örneklerin ROS konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorban değerlerini göstermektedir.	28
Şekil 3.6. Örneklerin TOS konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorban değerlerini göstermektedir.	29

Şekil 3.7. Örneklerin MPO konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbands değerlerini göstermektedir.	30
Şekil 3.8. Örneklerin GSH konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbands değerlerini göstermektedir.	31
Şekil 3.9. Örneklerin MDA konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbands değerlerini göstermektedir.	32
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait H& E boyama görüntüsü. Hafif venüler ve sinüzoidal konjesyon dışında normal görünen karaciğer dokusu. 40X orijinal büyütme.	40
Şekil 4.2. IRH modelinde geniş nekroz alanlarını gösteren H& E boyama sonucu. 40X orijinal büyütme. Oklar nekrotik alanları göstermektedir.	41
Şekil 4.3. Sinüzoidler içinde yaygın nötrofil varlığı. 200X orijinal büyütme. Ok konjesyonu ve daire vakuolizasyonu göstermektedir.	42
Şekil 4.4. Histopatolojik değerlendirmeler ile elde edilen Suzuki kriterlendirmesi. A. Konjesyon, B. Vakuolizasyon, C. Nekroz ve D. Nötrofil infiltrasyonu.	43
Şekil 4.5. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, TNF α seviyelerindeki değişim.	44
Şekil 4.6. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, ATP seviyelerindeki değişim.	44
Şekil 4.7. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, ROS seviyelerindeki değişim.	45
Şekil 4.8. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, TOS seviyelerindeki değişim.	45
Şekil 4.9. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, MPO seviyelerindeki değişim.	46
Şekil 4.10. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, GSH seviyelerindeki değişim.	46
Şekil 4.11. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, MDA seviyelerindeki değişim.	47
Şekil 4.12. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, AST seviyelerindeki değişim.	48

Şekil 4.13. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, ALT seviyelerindeki değişim.	48
Şekil 4.14. Western Blot görüntüleri. 1-3: sham, 4-6: IRH ve 7-9: Met-IRH. IB: İmmünoblat.....	50
Şekil 4.15. Western Blot ile elde edilen bant kalınlıklarının rölatif kantifikasyonu.	51



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	Adenosine diphosphate; Adenozin difosfat
ALT	Alanin aminotransferaz
AMPK	5'-adenosine monophosphate kinase
AST	Aspartat aminotransferaz
ATF4	Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATF5	Aktive edici transkripsiyon faktörü 5
ATP	Adenosine triphosphate; adenozin trifosfat
CHOP	C/EBP homolog proteini
CLPP	Caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit; Kazeinolitik mitokondriyal matriks peptidaz preolitik alt birim
DAMP	Damage-associated molecular pattern molecule
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRP1	Dynamin-related protein 1; dinamin ile ilişkili protein 1
ECM	Extracellular matrix; Ekstrasellüler matriks
eIF2 α	Eukaryotic initiation factor 2 alpha
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay; Enzime bağlı immünosorbent testi
ER	Endoplazmik retikulum
ER- α	Estrogen receptor alpha; Östrojen reseptörü alfa
ET-1	Endotelin 1
FADH2	Flavin adenin dinükleotid
FOXO3A	Forkhead box O3
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLUT4	Glukoz transporter tip 4
GPD2	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S transferaz
H-IRH	Hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı
HbO ₂	Hiperbarik oksijen
HIF	Hypoxia-inducible factor; Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HO-1	Heme oksijenaz 1
HRP	Horseradish peroksidaz
HSF	Heat shock transcription factor; Isı şoku transkripsiyon faktörü
HSP	Heat shock protein; Isı şok proteini
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1; İntrasellüler adezyon molekülü 1
IL	İnterlökin
IRH	İskemi-reperfüzyon hasarı
ISR	Integrated stress response; Entegre stres cevabı
KC	Kupffer cell; Kupffer hücreleri
KPC	Katlanmamış protein cevabı
KPCmt	Mitokondriyal katlanmamış protein cevabı
LDH	Laktik asit dehidrogenaz
LKB1	Liver kinase B1; Karaciğer kinaz B1
LONP1	Lon peptidaz 1
LOOH	Lipit hidroperoksit
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cell; Karaciğer sinüzoidal endotelial hücre
MDA	Malondialdehit

MMP	Matriksmetaloproteinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MTFP1	Mitokondriyal fizyon protein 1
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
MTS	Mitokondriyal sinyal
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NAYKH	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NFkB	Nükleer faktör-kappa B
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
NOS	Nitrik oksit sentaz
NRF1	Nükleer respiratuar faktör 1
OCT	Organic cation transporter; Organik katyon taşıyıcıları
OXPHOS	Oxidative phosphorylation; Oksidatif fosforilasyon
PBS	Phosphate buffered saline; Fosfat tamponlu salin
PERK	PRK benzeri endoplazmik retikulum kinazı
PINK1	PTEN ile indüklenen kinaz 1
PKC	Protein kinaz C
PMAT	Plazma membran monoamin taşıyıcısı
PON1	Paraoksonaz 1
PPAR- α	Peroxisome proliferator activated receptor- α
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reactive oxygen species; Reaktif oksijen türleri
rRNA	Ribozomal RNA
RSH	Okside tiyol
SATB1	Special AT-rich sequence binding protein 1
SATB2	Special AT-rich sequence binding protein 2
SETDB1	SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1
SIRT3	Sirtuin 3
SOD	Süperoksit dismutaz
TIM	Translocase of the inner membrane; İç membran translokazı
TLR	Toll-like receptor; Toll-benzeri reseptör
TNF α	Tümör nekroz faktörü-alfa
TOM	Translocase of the outer membrane; Dış membran translokazı
TOS	Total oksidan statüsü

1. GİRİŞ

Karaciğer detoksifikasyon, metabolizma ve sindirim olaylarında rol alan bir organdır. Kanın pıhtılaşması, besin maddelerinin depolanması ve sentezlenmesi, bağışıklık fonksiyonlarının yerine getirilmesi ve safra üretimi başta olmak üzere kritik metabolik süreçlerin kontrolünde görev alır (1). Özellikle toksinlere maruziyet karaciğerin sürekli olarak risk altında olmasına neden olmaktadır (2). Zaman içerisinde artan maruziyet karaciğer fizyolojisinin olumsuz etkilenmesine neden olur. Bu durum, geri dönüşü olmayan organ hasarı ile sonuçlanır. Geri dönüşümsüz organ kaybında en önemli tedavi yaklaşımlarından biri karaciğer transplantasyonudur (3,4).

Geri dönüşümsüz fonksiyon kaybında, karaciğer transplantasyonu tek çözüm olarak görülmektedir. Yakın zamanda yayınlanan raporlara göre transplantasyon sonrası 10 yıllık sağkalım oranının %70 civarındadır. Sağkalım ihtimalini olumsuz etkileyen en önemli faktörlerden biri transplantasyon sonrası gelişebilecek iskemi-reperfüzyon hasarıdır (5).

Hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı (H- IRH), organlara giden kan akışının kesilmesi ve sonra geriye dönmesidir (6). Moleküler düzeyde iskemi, hücrenin enerji gereksinimi için ihtiyaç duyduğu oksijenin azalmasına ve reperfüzyon azalan oksijen seviyelerinin ani artışına neden olur. Bu nedenlerle iskemi ve reperfüzyon, hücre metabolizmasını negatif etkiler ve reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species; ROS) üretimine neden olur. Bu moleküler değişimlerle IRH, karaciğer fonksiyonun bozulmasına ve sistemik hasara neden olabilir (8,9). Bu nedenlerden ötürü, transplantasyon sonrası gelişebilecek moleküler süreçlerin detaylı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Farklı çalışmalar, hiperglisemi tedavisi için geliştirilen metforminin transplantasyon sonrası gelişebilecek diyabeti engelleyebildiğini göstermiştir (7,8). Aynı zamanda, metforminin transplantasyona bağlı IRH'de oluşabilecek hipoksik koşulun iyileştirilmesinde de rol oynayabileceği gösterilmiştir. Metforminin IRH'deki rolü, inflamasyonun baskılanması ve IRH ile seviyeleri artan ROS'ların azaltılması olarak belirlenmiştir (7,9).

H-IRH'de hücrelerin hipoksik koşullara adaptasyonu, oksijen varlığında gerçekleşen enerji metabolizması ve stresle mücadele mekanizmalarının yeniden düzenlenmesini

gerektirmektedir. Enerji metabolizmasının ve stres koşullarının değişimi, hücrede mitokondriyal fonksiyonu doğrudan etkileyebilmektedir. Normal koşullardan farklı olarak, stres koşulları altındaki mitokondride enerji ve stres adaptasyon mekanizmaları yeniden düzenlenir. Strese bağlı olarak yeniden düzenlenen mekanizmalar arasında katlanmamış protein cevabı (KPC) öne çıkmaktadır (10). Mitokondriyal katlanmamış protein cevabı (KPCmt), stres koşullarındaki değişime bağlı olarak mitokondrinin fonksiyon kaybına uğramasıyla aktive edilen bir yoldur. KPCmt, mitokondriyal hasarı en aza indirir. Bu sayede, organelin hasar görmesini ve hücre ölüm mekanizmalarının tetiklenmesini engeller. KPCmt, mitokondri-nükleus etkileşimi ile gerçekleşen transkripsiyonel bir cevaptır. Mitokondride KP varlığı ve oksidatif fosforilasyon (oxidative phosphorylation; OXPHOS) aktivitesindeki bozulmalar, KPCmt yolağını aktive eder (11). Bu cevap hücrelerin çeşitli çevresel koşullara adaptasyonunda da kullanılmaktadır (12–14). Endoplasmik retikulum (ER)'da gerçekleşen KPC sıkça çalışılmış olsa da farklı çevresel koşullarda KPCmt çalışmaları daha sınırlıdır.

1.1. Kapsam

Sunulan çalışma, yukarıda özetlenen bilgiler çerçevesinde, i) H-IRH'nin *in vivo* modellenmesini, ii) *in vivo* modellerde IRH'nin sistemik etkilerinin açığa çıkartılmasını, iii) H-IRH'nin karaciğer hücrelerinde KPCmt yolağına etkilerini ve iv) metformin ön koşullaması sonrası IRH modellemesi ile metforminin olası pozitif etkilerinin tespit edilmesini kapsamaktadır.

1.2. Amaç

Sunulan çalışma, yukarıda verilen bilgiler eşliğinde,

- i) Sıçan modellerinde en uygun yöntem ve sürelerle H-IRH'yi modellemeyi,
- ii) Model hayvanlarda inflamatuvar seviyelerin ve oksidan seviyelerinin nasıl değiştiğinin tespit edilmesini,
- iii) H-IRH modellemesi sonrası karaciğer hücrelerinde KPCmt yolağının aktive edilip edilmediğini ve

- iv) Metformin ön kořullamasý sonrası H-IRH modeli oluřturarak metforminin IRH kaynaklı deęiřimlere olası etkisini göstermektir.

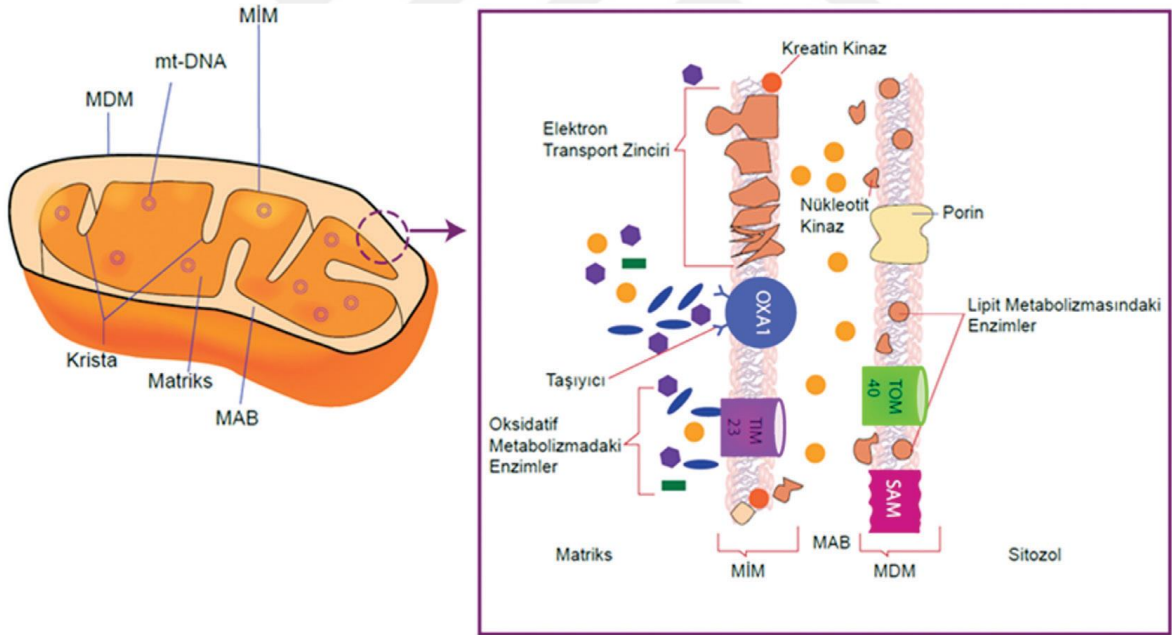


2. GENEL BİLGİ

2.1. Mitokondriyal Katlanmamış Protein Cevabı

2.1.1. Mitokondrinin yapısı, fonksiyonu ve KPCmt

Mitokondri ökaryotik bir hücrenin enerji merkezidir. Mitokondri, 16,5 kilo baz (kb) uzunluğunda ve sirküler DNA'ya sahiptir. Sahip olduğu ribozomlar sayesinde kendi genomundan protein sentezleyebilir. Mitokondriyal genomdan, oksijenin kullanılması ile adenosin trifosfat (adenosine triphosphate; ATP) üretimi için OXPHOS'ta görevli 13 farklı protein üretilir (Şekil 2.1) (15,16). Enerji üretimi, Krebs döngüsü ve elektron transportu ile yağ asitlerinin ve karbonhidratların, karbondioksit ve suya dönüştürülmesi sayesinde gerçekleşir. Mitokondri, ATP üretmesinin yanı sıra metabolizmayı düzenler ve hücre ölümüne dahil olur (17,18).



Şekil 2.1. Mitokondrinin, mitokondriyal genomun ve oksidatif fosforilasyon mekanizmasının genel yapısı (16).

Mitokondri sayısı, enerji gereksinimine bağlı olarak hücre tipleri arasında farklılık gösterebilir. Lipit metabolizmasındaki ve enerji üretimindeki rolleri nedeniyle karaciğer hücrelerinde sayısı oldukça fazladır. Mitokondri, hepatositlerde ER ve lizozom gibi diğer

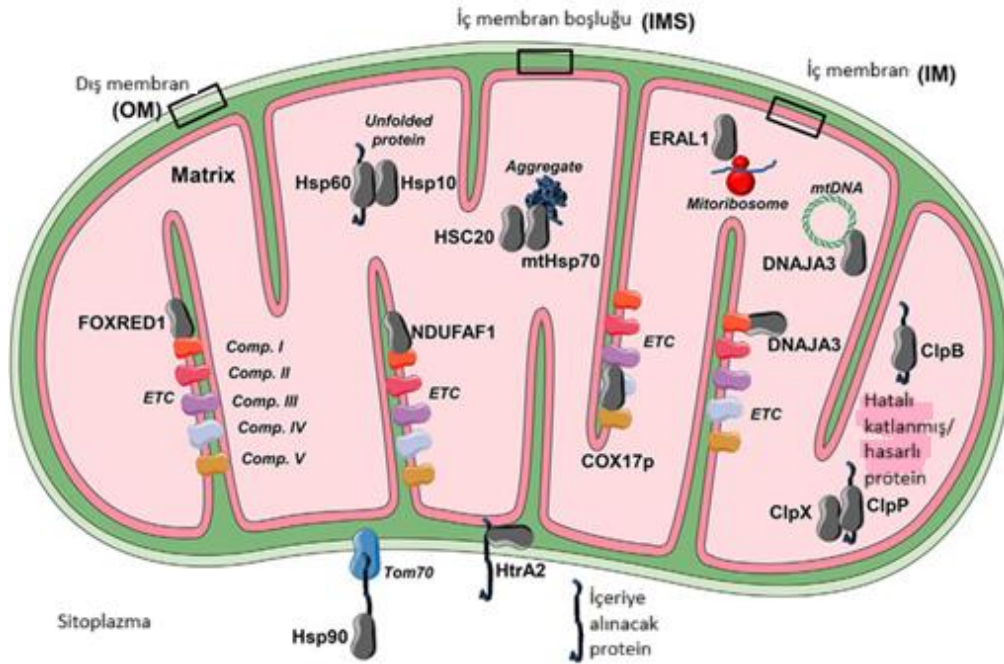
organellerle etkileşerek hücrenin gerek duyduğu enerji, sağkalım ya da ölüm gibi kritik olayları yönetir. Mitokondriyal fonksiyonun bozulması, obezite, tip 2 diyabet ve alkol dışı yağlı karaciğer hastalığı (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) ile ilişkili kronik karaciğer hastalıklarına neden olur. Bu nedenle, hepatik metabolik bozuklukların önlenmesinde mitokondrinin hedeflenmesi etkili bir stratejidir (19,20).

Mitokondriyal proteom, 1500'den fazla proteinden oluşur ve bunların %99'u çekirdek genomu tarafından kodlanır. Mitokondride lokalize olan birçok protein sitozolik ribozomlar tarafından sentezlenir. Sitoplazmik ribozomlarda üretilen öncü proteinler, mitokondriyal hedefleme dizisi tarafından yönlendirilir ve mitokondriyal translokasyon mekanizması (TIM/TOM kompleksi) ile mitokondriye taşınır. Sitoplazmada sentezlenen proteinler, mitokondri içerisine katlanmadan alınır. Proteinler mitokondriyal matriks veya zarlar arası boşluğa taşındıktan sonra, mitokondriye özgü şaperonlar, olgunlaşmamış proteinlerin fonksiyonel konformasyonlara katlanmasına yardımcı olur. Proteinler burada mitokondriyal şaperonlar tarafından doğru katlanmış olmalıdır. Olgun proteinler tek başına hareket edebilir veya ETC kompleksleri ve ATP sentaz gibi büyük protein komplekslerine alt birim olarak dahil olabilirler. Bu proteinler düzgün bir şekilde katlanamazsa, mitokondride birikir ve mitokondri üzerinde lokal baskıya neden olarak mitokondriyal protein stresini açığa çıkarırlar (21–25). Ek olarak, artan ROS seviyeleri de bu süreci aktive edebilir (26).

Histon proteinlerinin eksikliği ve mtDNA'nın reaktif oksijen türlerinin üretildiği iç mitokondriyal membrana yakınlığı gibi faktörler mtDNA'da daha yüksek mutasyon oranlarına, dolayısıyla mitokondriyal proteotoksisiteye ve mitokondriyal işlevde azalmaya neden olur. Bu durumda, mitokondriyal proteaz ve şaperon sistemi, mitokondri içinde protein homeostazının veya proteostazının korunmasında önemli bir rol oynar. Değişen mitokondriyal proteostaz ve işlev bozukluğu, mitokondriden çekirdeğe geriye dönük bir sinyal yolunun aktivasyonunu tetikler. Bu yol, mitokondriyal şaperonların ve proteazların üretimini ve mitokondriyal işlevin yeniden düzenlenmesini sağlar. Bu yanıt KPC olarak bilinir (27).

Sentezlenen proteinlerin doğru katlanması, mitokondri içerisinde sıkı bir şekilde kontrol edilir. Mitokondrinin iç membranına bağlı olan ribozomlar tarafından sentezlenen proteinler, mitokondriyal şaperonlar tarafından doğru bir şekilde katlanması kontrol edilir (Şekil 2.2) (28). Mitokondriyal şaperonların fonksiyon kaybına bağlı olarak katlanmamış ve

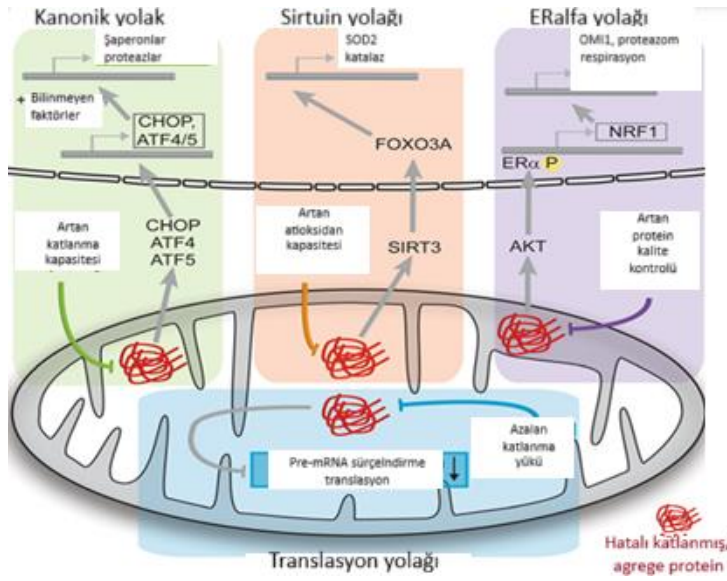
agregre olmuş proteinler, KPC yolağını tetikler. KPC'nin keşfi, doğru katlanmamış bir mitokondriyal protein varlığında, nükleer genomdan şaperonların ve proteazların üretilmesinin gözlemlenmesi ile gerçekleşmiştir. Mitokondride katlanmamış protein varlığı ve OXPHOS aktivitesinde bozulma KPC yolağını aktive eder (11).



Şekil 2.2. Mitokondriyal şaperonların fonksiyonu ve lokalizasyonu (21).

Memelide farklı çalışmalar, mitokondriyal DNA (mtDNA)'ya zarar verilir ve sonrasında hatalı mitokondriyal protein sentezi gerçekleşirse KPC'nin aktif olacağını göstermiştir. KPC, entegre stres cevabının (integrated stress response; ISR) bir sonucudur; hücre içinde gen ekspresyonunun ve/veya kromatinin yeniden düzenlemesi yoluyla sağlanabilir (29). Artan ROS'un, azalan amino asitlerin ya da ER stresin mitokondriyal stresi tetiklemesiyle hücre içi stres sensörleri bir transkripsiyon faktörü olan ökaryotik başlangıç faktörü 2 alfa (eukaryotic initiation factor 2 alpha; eIF2 α)'yı fosforiller. Fosforillenen eIF2 α , genel protein translasyonunu baskılayarak 5' transle olmayan bölgesinde açık okuma çerçeveleri olan mRNA'lardan (C/EBP homolog proteini; CHOP, aktive edici transkripsiyon faktörü 4; ATF4 ve aktive edici transkripsiyon faktörü 5; ATF5 gibi) protein üretir. Bu proteinler mitokondriyal şaperonların ve proteazların üretilmesini sağlayarak mitokondriyal fonksiyonun bozulmasının önüne geçer (11,29,30).

Mitokondriyal proteinlerin hatalı katlanması sonucu oluşan KPCmt, dört yolla gerçekleşebilir: Bu cevaplar; kanonikal, sirtuin eksen, östrojen reseptörü-alfa (estrogen receptor alpha; ER- α)'ya bağlı ve translasyonel cevaptır (Şekil 1.3). Kanonikal yolakta stres koşulu CHOP, ATF4 ve ATF5'i aktive ederek şaperonlarla birlikte proteazların üretilmesini hızlandırır. Memelilerde KPCmt'nin klasik düzenlemesi mitokondriyal matriste gerçekleşir ve ATF4, ATF5 ve CHOP tarafından regüle edilir. Bu faktörler, çekirdekteki şaperon proteinleri ve proteazlar aracılığıyla kanıtlanmamış protein varlığına cevap oluşturur (Şekil 2.3) (31).



Şekil 2.3. KPCmt'nin 4 farklı yolu (32).

Entegre stres yanıtı, hücre içi ve hücre dışı stresle başa çıkmak için evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir ve KPCmt indüksiyonu için ökaryotik başlatma faktörü 2 α (eIF2 α)'nın bir alt birimi olan PERK/ α gereklidir. CHOP, ISR'yi etkiler ve mitokondriyal şaperon proteinlerinin ve proteazların transkripsiyon sürecini etkinleştirir. ATF5 mitokondride bulunur ve KPCmt sırasında çekirdeğe aktarılır; transkripsiyonu mitokondriyal şaperon proteinlerini ve proteazları oluşumunu indükler. KPCmt sırasında memelilerde ISR aktivasyonu, eIF2 α 'nın fosforilasyonuna neden olur ve bu da ATF4, ATF5 ve CHOP transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu artırır (33,34).

ATF4/ATF5-CHOP yolu, mitokondriyal şaperon proteinlerinin ve proteazların ifadesini uyararak ve kontrol ederek mitokondriyal protein stabilitesini sağlar. Şaperon proteinleri protein katlanmasını artırır ve agregat oluşumunu engellerken, proteazlar

birikmiş hasarlı veya yanlış katlanmış proteinleri uzaklaştırır. Şaperon proteini esas olarak Hsp10, Hsp60 ve mitokondriyal ısı şoku proteini 70 (mtHsp70)'den oluşur. Bu proteinler, matriksin çekirdek kodlu proteinlerin katlanmasını ve mitokondriyal genom tarafından kodlanan 13 solunum zinciri proteininin birleşmesini bulmasına yardımcı olur. Hsp60 şaperon proteini, protein katlanmasını ve birleşmesini sağlayarak protein homeostazında kritik bir rol oynar ve Hsp10 ile etkileşime girerek protein katlanmasını destekler. Sitoplazmadaki protein öncüllerinin mitokondriyal matrise transferi için, matriste bulunan mtHsp70 moleküler şaperonunun katılımı gerekir. mtHsp70, proteini mitokondriyal matrise almak ve proteinin sitoplazmaya geri yayılmasını önlemek için iç mitokondriyal membran 23 kompleksinin translokazı ile doğrudan etkileşime girer. Protein alma sürecinde mtHsp70, hem kanalda hem de matriste proteinin doğru şekilde işlenmesine yardımcı olur (35,36).

Sirt3, mitokondriyal katlanmamış protein cevabında önemli bir düzenleyicidir ve antioksidan mekanizmaları, mitofaji ve proteostazı koordine eder. Sirt3, mitokondriyal matriste forkhead box protein O3a (FOXO3a) ve süperoksit dismutaz 2 eksenli aracılığıyla KPCmt sinyallemesini etkinleştirir. Sirt3'ün antioksidan etkisi, FOXO3a aktivitesini ve konumunu düzenlemesiyle sağlanır. Sirt3 seviyeleri arttığında, FOXO3a, nükleer translokasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini desteklemek için Sirt3 deasetilasyonuna dayanır. FOXO3a daha sonra antioksidan etkiler üretmek için SOD2 ve katalazı düzenler. SOD2 aktivitesi asetilasyon tarafından kontrol edilir ve Sirt3 tarafından deasetile edilip etkinleştirilebilir. Sirt3, SOD2 ve katalazın antioksidan aktivitesi proteaz stabilitesi ile doğrudan ilişkilidir. Sirt3, KPCmt aracılığıyla antioksidan kapasiteyi ve mitofajiyi koordine etme konusunda ikili bir role sahiptir ve bu da onu KPCmt ile mitofaji arasında bir köprü haline getirir. Ayrıca merkezi metabolizmayı ve mitokondriyal proteostazı düzenlemede rol oynar. ROS, KPCmt mutasyonlarını ve mitokondriyal proteinlerin oksidasyonunu tetikleyerek mitokondriyal proteostazda bozulmalara neden olur. Lon proteini, oksitlenmiş, hasarlı proteinleri parçalayabilir ve mitokondriyal DNA seviyelerinin korunmasına katılabilir. Sirt3, Lon protein ekspresyonunu ve asetilasyonunu azaltır ve ubiquitinasyon tarafından düzenlenir. Ubikitinasyon, Sirt3 aktivitesini negatif olarak kontrol eder ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu düzenler. Yetersiz Sirt3 ubiquitinasyonu, mitokondrinin enerji kaynağını etkileyebilir. Sirt3 ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında mitokondriyal oksidatif hasarı ve apoptozisi azaltır ve mitokondriyal bölünmeyi bloke ederek iskemi-reperfüzyon hasarını baskılar (37–39).

ER- α yolağında ise hatalı katlanan mitokondriyal protein, AKT kinaz aracılığıyla ER- α 'yı aktive eder. ER- α , nükleer respiratuar faktör 1 (NRF1)'in ekspresyonunu artırır. Böylece nükleer faktör-kappa B1 (NFKB1), HtrA serine peptidaz 2 (HTRA2) ve benzeri proteazların ekspresyonu da artar. Translasyonel yanıtta da hatalı protein katlanması ile bir cevap oluşur ancak bu mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (32,40,41).

KPC ve mitofaji eş zamanlı olarak indüklenebilir. Mitofaji, geri dönüşümsüz bir şekilde hasara uğramış mitokondrinin eliminasyonunu tarif eden bir mekanizmadır. Aynı zamanda, hücredeki mitokondri sayısının dengelenmesinde rol oynar. Mitofaji, PTEN ile indüklenen kinaz 1 (PINK1) proteini aracılığıyla kontrol edilir. Mitokondride geri dönüşümsüz bir hasar varsa PINK1 mitokondri iç zarına giremez. Bu durumda PINK1, parkini fosforiller ve otofagosom oluşturulur. Literatürde, ATF5 ekspresyonunun artışıyla KPC'nin aktivasyonunun mitofajiyi önleyebildiği ve bu sayede hücre enerji metabolizmasını ve sağkalımını desteklediği gösterilmiştir (42,43).

2.1.2. Farklı hücresel stres koşullarında KPCmt'nin regülasyonu

Memelilerde KPCmt sinyali, hücrede stres koşulları yaratılarak çalışılmıştır. Örneğin, Martinus ve arkadaşları fare hepatoma hücrelerine etidyum bromür uygulamıştır ve mtDNA'yı ortadan kaldırmışlardır. Araştırmacılar bu uygulama sonrası, mtDNA barındırmayan hücre gruplarında, transkripsiyonel aktivasyonlarla mitokondriye spesifik şaperonların ifadesinin arttığını göstermişlerdir. Şaperonların ifadesindeki artışın, hücrelerin ısı stresine sokulması ile de sağlanabildiği görülmüştür. Bu iki stres koşulu memelilerde KPCmt mekanizmasının anlaşılması açısından öncü olmuştur (44).

Literatürde KPCmt, farklı fizyolojik koşullar altında gerçekleşebilecek değişikliklerin takibinde araştırılmıştır. Bir çalışmada, fare modellerinde, genel anestezi sırasında gerçekleşen komplikasyonlarla KPCmt ilişkisi çalışılmıştır. Çalışmada sevofluran aracılı genel anestezinin mitokondrinin aşırı aktivasyonuna neden olduğu, bu nedenle sinaptik değişikliklere yol açtığı raporlanmıştır. Postnatal farenin gelişmekte olan beyinde, genel anestezinin KPCmt'yi aktive ettiği belirtilmiş; bunun yanı sıra bu durum sinaptik deformasyonlarla ilişkilendirilmiştir (45).

KPCmt'nin dış stres koşullarındaki rolü farklı organizma ve hücre modellerinde gösterilmiştir. Soo ve arkadaşları bir çalışmada, *C. elegans*'ı model olarak kullanarak farklı çevresel koşulların ATFS-1 aracılı KPCmt'yi nasıl etkilediğini araştırmıştır. Çalışmada model organizmalar oksidatif strese, bakteriyel patojen stresine, ısı stresine, ozmotik strese, anoksiyaya ve tunicamisin aracılı ER stresine maruz bırakılmıştır. Sayılan bütün bu stres koşullarında ATFS-1 seviyelerinde artış raporlanmıştır. ATFS-1 artışının hücre içinde ve ER'de KPC'yi aktive ettiği bildirilmiştir. KPC'nin, hipoksi indükleyen faktör-1 (HIF-1) aracılı hipoksik cevabı, antioksidan cevabını ve immün cevabı başlatmak için yeterli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca akut fazda KPCmt'nin stres koşullarına direnci sağladığı, ancak kronik maruziyet ile KPCmt aktivasyonunun organizmanın sağkalımı üzerinde negatif etkiler yarattığı belirlenmiştir (46).

Farklı organizmalarla gerçekleştirilen çalışmalar, KPCmt aktivasyonunun gelişim evresinde yaşam süresinin uzamasında rol oynadığını, ancak yetişkinlikte tam tersi bir etki yaptığını göstermiştir (47). KPCmt aynı zamanda mitokondriyal miyopati, parkinson, Alzheimer, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve kardiyomiyopati gibi patofizyolojilerde çalışılmıştır (48–59).

KPCmt'nin en kapsamlı şekilde çalışıldığı fizyolojik stres koşullarından biri hipoksidir. Transplantasyon, sepsis veya organ hasarı gibi durumlar IRH'ye neden olarak kısa veya uzun süreli hipoksiye yol açar (60). Hipoksi ile oksijen yetersizliği, merkezi sinir sistemindeki nöronlar ve kardiyak miyositler gibi oksijene duyarlı hücrelerin sağkalımını negatif etkiler. Bu nedenle, oksijen azlığı sonrası normoksiye dönüş mekanizmaları sıkça çalışılmıştır (61).

Hipoksi-KPCmt ilişkisi *C. elegans*'ta yoğun olarak çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, hipoksinin mitokondriyal protein dengesinde bozukluğa neden olduğu, KPCmt'nin ise bu sorunu ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Özellikle erken hipoksik evrede, KPCmt'nin hipoksi aracılı hücre ölümünü engelleyebildiği belirtilmiştir (62–65). *C. elegans* üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar, mitofaji ile KPCmt etkileşimini de açığa çıkartmıştır. Buna göre, erken hipoksik evrede mitofajinin engellendiği, uzun süreli durumlarda KPCmt'nin devreye girerek mitokondriyal tolerans sağladığı gösterilmiştir (66–68).

Öte yandan, hipoksi belirteci olan HIF-1 ile KPCmt arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Sadece tek bir çalışmada, KPCmt belirteci olan ATF5 ile HIF-1 sinyal yolağındaki proteinlerin ekspresyon seviyelerinin korele olduğu belirlenmiştir. Özofagus kanserine odaklanılan bu çalışmada, ATF5 ekspresyonunun hastalarda dramatik bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Yüksek ATF5 seviyelerinin, özofagus kanseri hücre hattında proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu arttırdığı kanıtlanmıştır. Ek olarak, bu çalışmada ilk defa, ATF5'in HIF-1 α 'ya bağlandığı ve HIF-1 transkripsiyon kompleksini aktive ettiği raporlanmıştır (69).

2.2. H-IRH

Karaciğer metabolik denge, detoksifikasyon, immünite gibi kritik fonksiyonları üstlenir. Bu nedenle, hücre ölümü ve fonksiyon kaybına sıkça maruz kalabilen bir organdır (70). Karaciğer hastalıkları, tüm dünyada ölüm sebepleri arasında giderek üst sıralara yükselmektedir (71). Karaciğerde fonksiyon kaybının önlenmesi için gerçekleştirilen intrahepatik operasyonlar ya da transplantasyonda periyodik iskemi ve Pringle manevrası (kontrollü akış) veya total vasküler dışlanım gereklidir (72). Kan akışı tekrar sağlandığında önceden iskemik olan karaciğerde hasar oluşur ve bu durum IRH olarak isimlendirilir (73). H-IRH, soğuk ve sıcak iskemi olmak üzere ikiye ayrılabilir. Soğuk iskemi, transplantasyon öncesi organın korunması ve saklanması sırasında görülürken; sıcak iskemi, şokla, travmayla ve operasyon sırasında kan tedarikinde gerçekleşebilecek geçici aksamalarla gerçekleşir (74–77).

2.2.1. H-IRH'nin patofizyolojisi ve mekanizmaları

Transplantasyonda H-IRH'de rol oynayan mekanizmalar klinik ve hücresel düzeyde değerlendirilebilir. Klinik bağlamda, alıcıya ve donöre bağlı faktörler IRH'yi tetikleyebilir (6). Transplantasyona ihtiyaç duyan alıcı, kronik karaciğer hasarına maruz kalmaktadır. Alıcının protrombik profili normalden farklılık gösterir (78). Alıcıda yüksek tromboz riski nedeniyle transplantasyon öncesi gerçekleşebilecek IRH, transplantasyon sonrası daha ciddi bir IRH'yi tetikleyebilir (79).

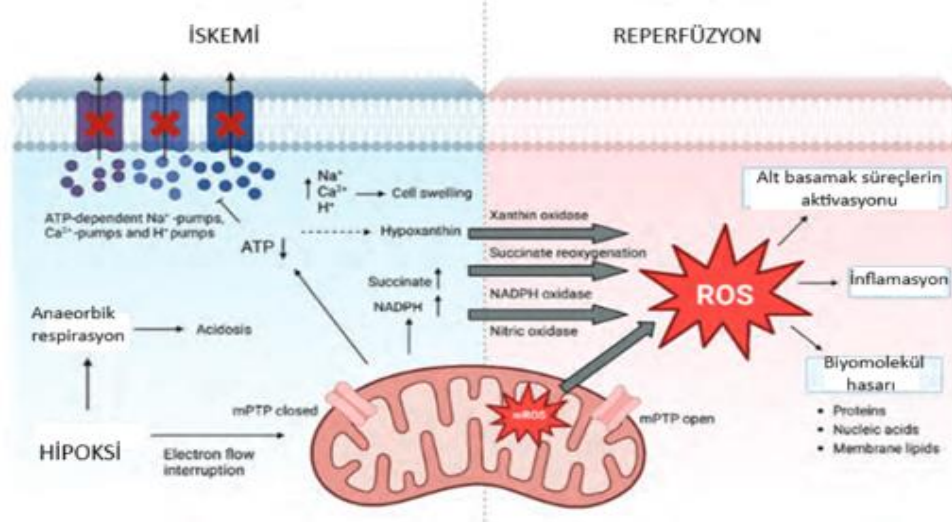
Hücresel düzeyde, birçok farklı hücre tipi H-IRH'nin gelişiminde rol oynayabilir. Bu hücre grupları içerisinde en kritik olanı, karaciğer sinüzoidal endotelial hücrelerdir (liver sinusoidal endothelial cell; LSEC). LSEC, vasküler tonu kontrol ederek hepatositlere oksijen ve besin taşınmasından sorumludur (80). LSEC, karaciğerin transplantasyon öncesi soğukta saklanması önemli ölçüde etkilenir. Soğukta saklama ile açığa çıkan IRH ile LSEC ölümüne neden olacak moleküler yollar indüklenir (81–85). IRH'de rol oynayabilecek bir diğer önemli hücre grubu yerleşik karaciğer makrofajları olan Kupffer hücreleridir (Kupffer cells; KC). KC normal koşullarda tolerojenik bir fonksiyon üstlenir. Karaciğerin maruz kaldığı aşırı antijen yüküne cevap olarak tolerojenik T hücrelerini aktive eder ve interleukin -10 (IL-10) gibi immün baskılayıcı sitokinlerin salgılanmasını sağlar (86). Bununla birlikte, karaciğer hasarı durumunda KC'ler tolerojenik fonksiyonu kaybedip aksine immün aktivatör rolü üstlenerek hasarı artırır (87). Transplantasyon sonrası IRH'de LSEC'lerden ve hepatositlerden salınan hasar ilişkili patern molekülleri (damage-associated molecular pattern molecule; DAMP), KC'deki Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptor; TLR) ile tanınır. TLR ailesinden TLR4 inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine neden olur (88,89). KC'lerle benzer işlevi görerek H-IRH'de rol oynayabilen bir diğer hücre türü hepatik stellat hücreleridir (hepatic stellate cell; HSC). HSC'ler, perisinüzoidal boşlukta lokalize olan hepatik fibrozun merkezi regülatörleridirler. Normal koşullar altında, HSC'ler hepatik hasara karşı reaktif T hücre seviyelerini azaltıp antioksidan salgılayarak aşırı inflamatuvar cevabı baskırlar (90). H-IRH sırasında ise KC'ler tarafından salgılanan TNF α , nitrik oksit ve IL-6 gibi immün aktivatörler HSC'leri aktive ederek miyofibroblast fenotipine dönüştürürler. Bu aktivasyon, nötrofil infiltrasyonu ve vazokonstriksiyonla sonuçlanır (91,92). H-IRH'den direkt olarak etkilenen hücre grubu hepatositlerdir. Oksijen taşınımının yanı sıra ATP üretimindeki hasarlar ana hepatik hücreler olan hepatositlerin enerji ihtiyacını, hipoksik koşulda glikoliziz gibi farklı yollarla, karşılamalarına olanak sağlar. Bu durum, laktat ve benzeri toksinlerin hücre içinde birikmesine yol açar; bu birikim ise hücre hasarına neden olur. Reperfüzyon, iskemi sırasında hasar görmüş mitokondrinin aşırı ROS üretmesine neden olur. Bu durum hepatosit hasarını daha da artırır. Ayrıca, hasar gören hepatositlerden üretilen DAMP'ler, LSEC ve KC aktivasyonunu tetikler (93,94).

2.2.2. H-IRH'de mitokondrinin rolü

H-IRH'nin en önemli sonuçlarından biri apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının devreye girmesidir (95). Programlı ve enerji gereksinimli hücre ölüm mekanizması olarak tanımlanabilecek apoptoz, dışsal/içsel yollarla tetiklenebilir. Mitokondriyal yolak olarak da adlandırılabilen intrinsik yolağın tetiklenmesinde radyasyon, hücre içi organel stresi, oksidatif stres ve büyüme faktörü azlığı gibi nedenler etkilidir (96,97). İntrinsik apoptotik yolakta mitokondriyal elektron transportunda aksama, ROS üretimi, ATP yetersizliği, mitokondriyal membran potansiyelinde düşüş ve mitokondriyal geçirgenlik geçiş poru (mitochondrial permeability transition pore; MPTP) açılması nedenleriyle apoptoz gerçekleşir (98). MPTP'nin açılmasıyla pro-apoptotik faktörler sitoplazmaya geçer. Bu süreç hipoksi, radyasyon ya da sitotoksin gibi dış faktörlerle regüle edilebilir (99–101).

H-IRH'de dinamin ile ilişkili protein 1 (dynamin-related protein 1; DRP1) sitoplazmadan mitokondriye transfer edilerek fizyonu tetikler ve artan fizyon mekanizması apoptoza neden olur (102–104). Bu nedenle, hepatositlerde IRH ile gerçekleşen DRP1 aracılı fizyonun inhibisyonu apoptozu engelleyebilmektedir (105). Öte yandan, H-IRH'de fizyon yerine mitokondriyal füzyonun indüklenmesi, IRH ile hasar görmüş mitokondriden sitokrom C ve ROS salınımını azaltır ve apoptozu önler (106,107).

IRH'de aşırı ROS üretimi, artan kalsiyum yükü ve mitokondri membran potansiyelinin kaybı MPTP'lerin açılarak pro-apoptotik sinyallerin tetiklenmesine sebep olur (99). ROS, mitokondri tarafından üretilen ve aynı zamanda mitokondriye zarar veren bileşenlerdendir (108). Erken IRH'de ROS üretimi sonucunda hepatositlerde hasar ana unsurlardandır (109). H-IRH'de artan ROS DNA'ya, proteinlere, lipitlere ve diğer hücresel kompartmanlara zarar vererek apoptozun tetiklenmesinde kritik bir rol oynar (110). ROS üretimi özellikle hipoksi sonrası reperfüzyonla artan oksijen seviyeleri nedeniyle gerçekleşir (111). Bununla birlikte, iskemi sırasında hipoksik koşullarda karbon monoksit, demir metabolizmasındaki değişiklikler aracılığıyla ROS ve hidroksil radikallerinin üretilmesine yol açarak hücreye zarar verir (112). ROS aynı zamanda çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşerek reaktif lipid peroksitler üretilmesine neden olur ve hücresel hasarı daha da artırır (Şekil 2.4). Hücresel hasar, artan H₂O₂ gibi reaktif türlerin, makromoleküllere zarar vermesi ve inflamasyon tetiklenmesi şeklinde gerçekleşir. Reaktif türler, özellikle DNA zincirlerinde kırılmalara neden olarak genotoksisiteye neden olur ve hücrede geri dönüşümsüz hasar oluşur (99,113).



Şekil 2.4. IRH ile ROS seviyelerindeki artış ve artan ROS'a bağlı moleküler değişimler(110)

Hepatik hasarda rol oynayan ve mitokondri ile ilişkilenebilen bir diğer kriter kalsiyum konsantrasyonudur. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu, membran kanalları ve pompaları ile düzenlenir (114,115). İskemi ve hipoksi, hücre membran geçirgenliğini artırarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının yükselmesine neden olur; bu da mitokondriden kalsiyum salınımına ve intraselüler kalsiyum miktarlarının artışına yol açar (116). Artan intraselüler kalsiyum miktarı, protein kinaz C (PKC) aracılı NFκB aktivasyonuna neden olur. Böylece, ROS seviyeleri artar ve mPTP'ler açılır (117). Reperfüzyon sırasında ise zarar gören karaciğer hücrelerinde mitokondriyal kalsiyum artışıyla birlikte artan lipid peroksidasyonu gerçekleşir. Mitokondride artan kalsiyum miktarı membrana hasar verir ve pro-apoptotik sinyali tetikler (118).

H-IRH ve mitokondri etkileşimi özellikle ATP azlığı nedeniyle gerçekleşmektedir. İskemi sırasında oksijen yetersizliği ATP üretiminin kritik derecede azalmasına neden olur (119). Bu nedenle, hücrede ATPaz enzimlerinin aktivitesi azalır. Bu durum, hücrede sodyum ve kalsiyum iyonları dengesizliğine neden olarak mitokondriyal hasar geliştirir (120).

H-IRH-mitokondri ilişkisinde rol oynayan bir diğer molekül IRH'de çift yönlü rol oynayabilen nitrik oksittir. Nitrik oksit lokal kan akışını düzenleyip platelet oluşumunu engeller. Diğer yandan, mitokondriyal solunumu inhibe ederek peroksitlerle etkileşimi sonrası lipid peroksidasyonuna ve sonrasında doku hasarına yol açar (121). Nitrik oksidin bu farklı fonksiyonları H-IRH'de farklı nitrik oksit sentaz enzimlerinin rolü ile açıklanabilmektedir (122–124).

2.3. Metformin Ön Koşullama

Metformin tip 2 diyabet tedavisinde öncelikli olarak tercih edilen kritik terapötiklerdendir. Bir anti-glisemik ajan olmasına rağmen birden fazla moleküler etkiye sahiptir. Bu nedenle, farklı hastalıkların moleküler mekanizmasının düzenlenmesinde ve/veya araştırılmasında sıkça tercih edilmiştir (125).

2.3.1. Metformin ve etki mekanizmaları

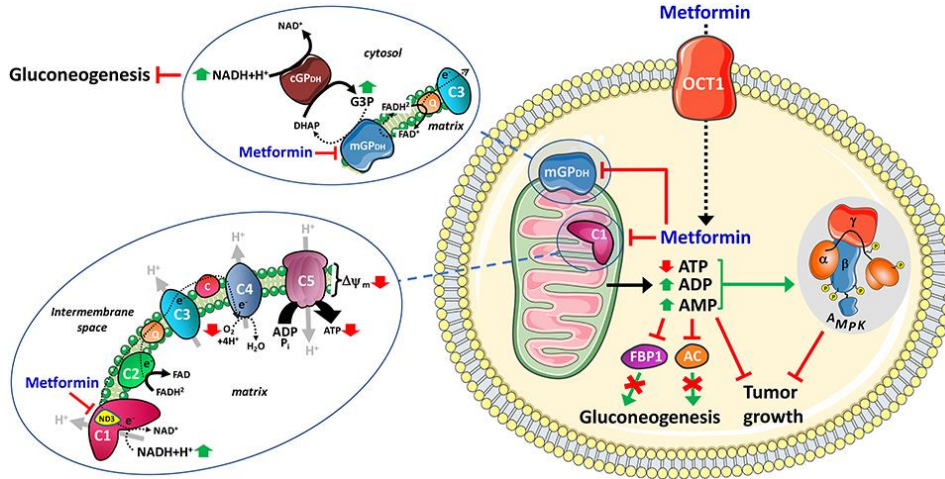
Metformin, 1922 yılında keşfedilen sentetik bir biguaniddir. Polar guanidin yapısı nedeniyle oldukça hidrofiliktir ve fizyolojik pH'de katyonik halde var olup pasif difüzyonla hücre içerisine girebilir. Metformin, hipergliseminin tedavisinde, 1950'li yıllardan itibaren kabul görmüştür (126–128). Diyabet tedavisine ek olarak diyabetin önlenmesinde, polikistik over sendromunda ve metabolik sendromlarda kullanılabilmektedir (129–132).

Metformin insanda fonksiyonunu organik katyon taşıyıcıları (organic cation transporter; OCT) aracılığıyla sergiler. OCT ile etkileşim metforminin absorpsiyonunu, dağılımını ve biyokimyasal etkilerini belirler (132). İnce bağırsakta metformin emiliminde enterositlerde bulunan plazma membran monoamin taşıyıcısı (PMAT) rol oynar (147). PMAT ve OCT3, metforminin enterositlere alımında görev alır; OCT1 ise metforminin enterositlerden kana geçişini sağlar. Kanda metforminin hepatositlere geçişi ve bu sürecin tersi OCT1 ve OCT3 aracılığıyla gerçekleşir. Ayrıca, kandan böbreklere geçiş OCT2 ile olur. Renal tübüler hücrelerden idrara geçişte ise OCT1 ve çoklu ilaç/toksin ekstrüzyon proteinleri görev alır (132).

2.3.2. Metforminin mitokondriyal fonksiyona etkileri

Mitokondri, metforminin birincil moleküler hedeflerindendir (133). Metformin, mitokondri matriksi içerisinde lokalize olur ve burada mitokondriyal elektron transferi zincirinin kompleks I'ini inhibe eder. Bu durum nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) oksidasyonunun yanında ATP sentezini de azaltır (Şekil 2.5) (129,133,134). ATP seviyelerindeki azalış karaciğerde, karaciğer kinaz B1 (liver kinase B1; LKB1) aracılı 5'-

adenozin monofosfat kinazın (5'-adenosine monophosphate kinase; AMPK) indüklenmesini sağlayarak hepatik glukogenezi inhibe edip kaslarda glukoz kullanımını artırır (135,136). Farklı çalışmalar, metforminin glukoz seviyelerinin azalışının LKB1 ve AMPK'den bağımsız olabileceğini de göstermiştir (137).



Şekil 2.5. Metforminin mitokondri üzerindeki etkileri (131).

Birçok farklı kaynak, metforminin antioksidan özelliğe sahip olduğunu raporlamıştır. Bu sayede metformin sadece diyabet tedavisinde ve çalışmalarında değil, aynı zamanda karaciğer hasarı, serebral iskem/reperfüzyon hasarı, Parkinson hastalığı ve organ yetmezliği gibi birçok farklı patogeneizde çalışılmıştır (138–140). Bu çalışmalarda metforminin antioksidan özelliğinin SIRT3, bir antioksidan olan paraoksonaz 1 (PON1) (141) ve AMPK aktivasyonu ile üretilen tiyoredoksin (142) aracılığıyla gerçekleşebileceği bildirilmiştir. Metforminin ROS'u, hidroksil radikallerini direkt olarak bağlayarak da önlediği belirtilmiştir (143). Ancak bu minör etkinin yanında asıl etkinin -hücre içinde- glutatyon redüktaz, katalaz, SOD, NADPH oksidaz ve glutatyon (GSH) seviyelerini etkilenmesi ile gerçekleştiği bildirilmiştir (144).

2.3.3. Farklı patogenezlere metformin ön koşullama

Literatürde metformin, farklı moleküler mekanizmalara odaklanarak hücre hatlarında ve/veya hayvan modellerinde çalışılmıştır. Metformin ön koşullama adı ile gerçekleştirilen bu çalışmalarda metforminin patofizyolojik yönden olumlu yönleri çalışılmıştır ancak sekonder bulguların nasıl etkilendiği halen araştırılmaktadır.

Metformin ön koşullamasının etkilerinde nörolojik patogeneze yoğunlaşan çalışmalar oldukça fazladır (145). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 200 mg/kg konsantrasyonlu metformin ön koşullamanın inflamasyonun ve otofaji programlarının baskın olduğu spinal kord hasarında mTOR/p70S6K yolağını aktive ederek otofajiyi arttırdığı, NFkB ekspresyonunu manipüle ederek apoptozu ve inflamasyonu azalttığı belirtilmiştir (146). Benzer bir çalışmada, 50 mg/kg/gün dozajında metformin kronik ön koşullama ile sıçanlarda NFkB, TNF α , IL-1 β ve IL-6 aktivasyonunun engellenmesiyle nöronal korunma sağlandığı bildirilmiştir (147). Tek doz metformin uygulaması gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, 10 mg/kg metforminin sıçanlarda AMPK'yle birlikte otofajiyi aktive ederek nöronal koruma sağladığı bulgusuna ulaşılmıştır (148).

Metformin koşullamanın gerçekleştirildiği bir diğer önemli grup ise kardiyak patogenezlere. Bu çalışmada metforminin koruyucu etkileri altı çizilerek raporlanmıştır (149,150). Kardiyak tutulma gerçekleştirilen fare modellerinde 14 gün boyunca içme suyu ile 1 mg/ml konsantrasyonunda verilen metforminin, AMPK aktivasyonu ile otofajiyi tetiklediği ve mitokondriyal fonksiyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Farelerde aynı zamanda kardiyak anomali ile böbreklerde görülebilecek iskemi/reperfüzyon hasarının azaldığı da kaydedilmiştir (151).

Renal anomaliler, metforminin koruyucu etkisinin vurgulandığı bir diğer hastalık grubudur (152). Fare modelinin kullanıldığı bir çalışmada, kronik böbrek hastalığına sahip hayvanlara 5 hafta boyunca 200 mg/kg/gün dozajında metformin uygulamasının AMPK'yi aktive ve NFkB aracılı inflamasyonu inhibe ederek nöronal progresyon sağladığı ve inmeyi engellediği gösterilmiştir (153). Ayrıca, başka bir çalışmada metformin uygulamasının, kronik böbrek hastalığına sahip farelerden elde edilen mezenkimal kök hücrelerde DNA hasarını önlediği ve hücreleri senesensten kurtardığı belirtilmiştir (154).

İskemi/reperfüzyon hasarı, metformin ön koşullama ile sıkça çalışılan konu başlıkları arasındadır (8). Bir çalışmada, miyokardiyal IRH fare modellerine, iskemi öncesi ya da reperfüzyon başlangıcında 125 μ g/kg metformin koşullaması gerçekleştirilmiş ve etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, metformin uygulamasının diyabetik ve diyabetik olmayan farelerde miyokardiyal hasarı önlediği gösterilmiştir. Bu etkinin, AMPK ve endotelial NOS aktivasyonu ile gerçekleştirildiği kanıtlanmıştır (155). Benzer sonuçlar kardiyak transplantasyon gerçekleştirirken görülebilecek IRH'den de elde edilmiştir (156).

Metformin, SOD ekspresyonunu azaltarak ve apoptozu önleyerek kardiyak IRH koruyucu bir rol üstlenmiştir (157). Bir diğer çalışmada, sıçanda yumurtalıktaki IRH'de malondialdehit (MDA), GSH ve TNF α seviyelerinin, Kaspaz-3 aktivasyonun ve NFkB aracılı inflamasyonun arttığı ancak östrojen seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Değişen dozajlarda (250-500 mg/kg) metformin koşullamasının GSH haricinde tüm bu parametreleri tersine çevirerek hasarı önlemede etkili olduğu belirlenmiştir (158). Bu moleküler yollardan farklı olarak, sıçanlarda serebral IRH'de metformin uygulamasının PI3K/Akt yolağı üzerinden nöronal apoptozu engellediği gösterilmiştir (159). Yağlı karaciğerdeki IRH'ye odaklanılan bir çalışmada, sıçanlara 3 gün boyunca intraperitoneal olarak verilen 50 mg/kg/gün konsantrasyonundaki metforminin, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST), IL-6, TNF α , IL-1 β , TLR4 ve NFkB seviyelerini azaltarak inflamasyona ek olarak apoptozu da engellediği belirlenmiştir (160). Metformin koşullama sonrası IRH aynı zamanda ince bağırsak (161), böbrek, testis (162) ve retina (163) gibi farklı organlarda da çalışılmıştır.

2.4. H-IRH'de Sıçan Modelleri

H-IRH'de hayvan modellerinin oluşturulmasında en önemli basamak, en uygun hayvan türünün tercihinin yapılmasıdır. Model hayvan olarak fareden domuza geniş bir tür aralığı kullanılmıştır. Uygulama kolaylığı nedeniyle fare ve sıçan gibi küçük hayvanlar tercih sebebidir. Öte yandan, hayvan küçüldükçe elde edilen bilginin insana uyarlanabilirliği farklı anatomiler nedeniyle zorlaşmaktadır. Büyük hayvanlarda ise uygulama zorlukları ve etik kaygılar devreye girmektedir (164). Seçilen türün cinsiyeti ve yaşı, hepatik mikrosirkülasyon farklılıkları nedeniyle dikkat edilmesi gereken bir diğer etkidir (165). Hayvan yaşının 14-16 hafta (250 g) tutulmasının ideal olabileceği belirtilmiştir (166). Dişi hayvanlardaki östrus döngüsüne bağlı hormonal değişimlerin fazlalığı, erkek hayvanların H-IRH modellemesinde daha etkin kullanılabileceğine işaret etmektedir (167).

2.4.1. H-IRH'de sıçan modellerinin oluşturulması

Sıçanlar farelere göre büyük vücut ebatları sayesinde kolay uygulama ve gözlem avantajı sunar; domuz, köpek ve koyun gibi büyük hayvanlara kıyasla aydınlatılmış genomları ve moleküler mekanizmaları ile de H-IRH modellemede ön plana çıkmaktadırlar (166,168). Sıçanlarda *in vivo* H-IRH modellemenin farklı operasyonel metotları mevcuttur. Bu metotlar karaciğer transplantasyonu ve normotermal iskemi başlıkları altında toplanabilir (166).

Sıçanda karaciğer transplantasyonu, H-IRH'yi modellemede klinik geçerliliği en üst düzeyde olabilecek yöntemdir (169). Karaciğer transplantasyon modeli ile organ saklama koşullarını, toleransı, organ reddini ve immün baskılayıcı terapötikleri aydınlatılabilmek mümkündür (170). Dahası, transplantasyon ile büyüklük ve ön koşullama gibi graft temelli manipülasyonların gerçekleştirilebilmesi farklı mekanizmaların aydınlatılabilmesi için kritiktir (171). Bununla beraber, operasyon zamanı ve teknik gereksinimler H-IRH modellemesinde transplantasyonu sınırlamaktadır (169).

Normotermal iskemi global ve parsiyel olarak gerçekleştirilebilir. Global hepatik iskemi, portokaval dekompresyonla ya da dalak transpozisyonuyla sağlanabilir. Portal dekompresyon, karaciğer transplantasyonu sonrası gelişebilecek sıcak IRH'yi modellemektedir. Bu yaklaşımda amaç portojugular ve splenokaval şantlarla karaciğere kan akışını belirlenen sürelerle engellemektir (172,173). Global hepatik iskemide bir diğer yaklaşım dalak transpozisyonudur. Bu yöntemde dalak, subkutan bir keseye bağlanır ve haftalar sonra iskemi oluşur. Operasyon göreceli olarak kolay olsa da uzun zaman gerektirmesi yöntemin dezavantajıdır (174,175). Parsiyel iskemide, sol ve medyan lobların hepatik arteri, portal damarı ve safra kanalı tıkanır. Diğer loblar üzerinden kan akışı devam edeceğinden bu yöntemde ekstrakorporel şanta ihtiyaç kalmaz. Bu sayede değişen yüzdelerle (%30 ve 70 gibi) iskemi sağlanabilir. Yüzde 70 iskemi, çalışmalarda sıkça tercih edilen bir metodolojidir. Klinikte iskemi-reperfüzyon varlığında parsiyel hepatektomi kan akışının kontrolü için uygulandığından, parsiyel model, kliniğe yakın sonuçlar oluşturabilmesi açısından fazlaca tercih edilmektedir. Yöntem portal triada bir pens yerleştirilmesi ile gerçekleştirildiğinden iskemi ve reperfüzyon sürelerini kontrol etmek mümkündür (176–178). Pens yardımıyla parsiyel IRH modellemede, sıçanda 3 cm'lik orta hat supraumbikal kesik açılır. Daha sonrasında, ya abdominal duvarın iki yanına basınç uygulayarak ya da

retraktör yardımıyla karaciğer görünür hale getirilir. Ligamentöz bağlantılar ayrıştırılarak karaciğer izole edilir. Karaciğer hilusu açığa çıktığında hepatik arter ve portal damar görünür hale gelir. Sonraki adımda, karaciğerin istenilen lobuna kan akışı atravmatik vasküler mikropensler yardımıyla engellenir. İskemi oluşumu ilgili lobun beyazlaşması ile anlaşılır. İşlem sonrası karaciğer abdominal boşluğa yerleştirildikten sonra yara dehidrasyonunu ve hipotermiyi önlemek amacıyla kapatılır. Öngörülen süre sonunda pens çıkartılıp reperfüzyon sağlanır (179).

2.4.2. Sıçan modellerinin klinik geçerliliği

Hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular ve insana yönelik çıkarımlar oldukça anlamlı olmakla birlikte birtakım limitasyonları beraberinde getirmektedir. Organizmalar arası hipotermi ve iskemi toleranslarının, karaciğer anatomileri gibi araştırma esnasında kullanılan ajanların etkilerinin farklılık göstermesi de bu limitasyonlardandır. Bu nedenlerle en uygun hayvan türünün ve deney modelinin seçilmesiyle klinik soruya yönelik protokolün standardize edilmesi gerekir (166). Literatürde, farklı çalışmalarda oluşturulan modellerde, aynı mekanizma için farklı sonuçlar elde edilebileceği bildirilmiştir. Bu durum, yapılan çalışmalardan birinde cerrahi operasyon farklılıkları ile ilişkilendirilmiştir. Cerrahi yaklaşımlarla iskemik koşul yaratılan modellerin, iskemi için seçilen karaciğer lobuna göre araştırılan moleküler mekanizmaları etkileyebildiği belirtilmiştir (176). Bu nedenle, insana dair klinik çıkarımlar yapılacak olan model organizmalarda iskeminin yüzdesi ve süresi önemlidir (166).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

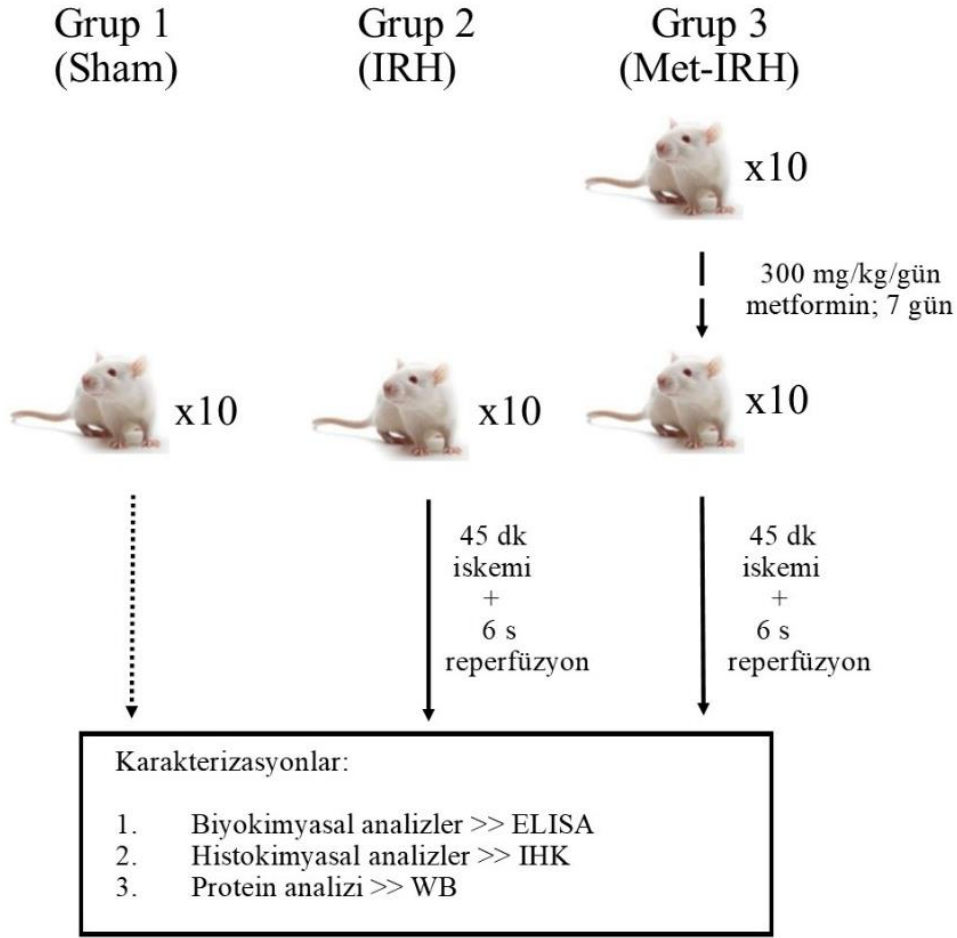
3.1. Etik Onay

Sunulan çalışma, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul tarafından 04.12. 2023 tarih, 23/23 sayı ve DA23/14 proje koduyla onaylanmıştır. Etik onay, EK 1’de sunulmuştur.

3.2. Deney Dizaynı

Sunulan çalışmada H-IRH sıçanlarda modellenmiştir. Çalışmada her grupta 10 hayvan olacak şekilde 30 sıçan (güç analizi 2.5’te verilmiştir) sıçanlar, i) hiçbir uygulama yapılmamış (sham), ii) IRH ve iii) Metformin koşullaması sonrası IRH (Met-IRH) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Şekil 3.1).

Gruplar içerisinde iskemi, reperfüzyon ve metformin uygulama süreleri, optimal I/R sürelerinin çalışıldığı iki ayrı çalışma ile (Proje no:DA23/14; Başlık: Sıçanlarda ideal hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı modeli standardizasyonu ve Proje no: DA23/18; Başlık: Sıçanlarda hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde metformin ile ön koşullama standardizasyonu) kapsamında varyasyonlar halinde denenerek belirlenmiştir. Söz konusu bu çalışmada iskemi süreleri 45 ve 90 dk; reperfüzyon süreleri 6, 12, 24 ve 48 saat; metformin süreleri 1, 3, 7 ve 15 gün olarak belirlenmiştir. Bu sürelerin farklı kombinasyonları ile gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında, model oluşturma açısından en uygun kombinasyonun 45 dk iskemi, 6 saat reperfüzyon ve 7 gün metformin ön koşullama olduğu görülmüştür (kabulu alınmış yayın; Experimental hepatic ischemia-reperfusion injury model in rats). Bu nedenle, çalışma kapsamında belirtilen süre kombinasyonu baz alınmıştır.



Şekil 3.1. Çalışma boyunca izlenen metodoloji.

3.3. Hayvan Bakımı, Gözetim ve Operasyon Protokolleri

Çalışmada kullanılan sıçanlar, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışmada Wistar albino ırkından, tamamı erkek, 6-9 aylık ve 250-300 g ağırlığında sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma süresince sıçanlar, polikarbonat şeffaf kafeslerde ve 12:12 aydınlık/gece döngü, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve %45-50 nem oranı sağlanan odalarda muhafaza edilmiştir.

Metformin önkoşullaması, sıçanlara 7 gün devam edecek şekilde orogastrik gavaj yoluyla 300 mg/kg/gün dozunda metformin verilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

İskemi-reperfüzyon hasarı, IRH modelleme yöntemlerinden parsiyel modelle gerçekleştirilmiştir. Operasyon, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nin operasyon odasında ve steril ortamda gerçekleştirilmiştir. Operasyon öncesi sıçanlarda anestezi, 60 mg/kg ketamin ve 7 mg/kg ksilazin içeriği ile intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Uyum sonrası sıçanlar supin pozisyonunda tutulmuştur ve abdominal deri povidon iyot solüsyonu ile dezenfekte edilmiştir. Daha sonra, sağ subkostal bölgede 4 cm'lik bir insizyonla portal triad izole edilmiştir ve Scanlan Vascu-Stat bulldog pens kullanılarak hepatik hilusta klampe edilmiştir. Ekspoze abdominal bölgeyi nemli tutabilmek adına 3-4 ml sıcak salin solüsyonu uygulanmıştır. İnsizyon, tam kat seyrek dikiş ile kapatılmıştır ve sıçanlar planlanan iskemi süreci boyunca bir radyan ısıtıcı altında tutulmuştur. Planlanan iskemi süresine ulaşıldığında, dikişler sökülmüştür ve reperfüzyon periyodunu başlatmak amacıyla klamp çıkartılmıştır. Abdominal duvar, anatomik olarak devam eden bir şekilde dikilmiştir. Planlanan reperfüzyon süresinin sonunda, sıçanlara tekrar anestezi uygulanmıştır. Kardiyak ponksiyon ile sıçanlardan 2 ml kan alındıktan sonra insizyon tekrar açılmıştır ve total hepatektomi uygulanmıştır. Daha sonra sıçanlar genel anestezi altında servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. Karaciğer dokularının bir kısmı, histolojik analizler için %10'luk formaldehit solüsyonuna alınmıştır. Kalan dokular sıvı nitrojen içerisine alınmıştır ve kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. Veri Eldesi ve Analizi

3.4.1. Histopatolojik analizler

Modellemelerin karaciğer dokusu üzerindeki etkileri öncelikle histopatolojik metotlarla belirlenmiştir. Histopatolojik çalışmalar, Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Histopatolojik çalışmalarda modellemeler sonrası karaciğer dokuları parafin blok içerisine alınmıştır. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alınarak rutin Hematoksilen-Eozin (H& E) boyaması gerçekleştirilmiştir. Boyamalar ışık mikroskobu ile görüntülenerek imajlar elde edilmiştir. Görüntülerde konjesyon, vakuolizasyon, nekroz ve nötrofil infiltrasyonu parametreleri, Suzuki kriterleri ile kantifiye edilmiştir.

3.4.2. Biyokimyasal analizler

Çalışmada model hayvanların oluşturulması sonrasında, hipoksi ve metformin koşturması ile etkilenebilecek TNF α , MDA, GSH, myeloperoksidaz (MPO), ATP, ROS, total oksidan statüsü (TOS), AST ve ALT seviyeleri, enzime bağılı immünosorbent testi (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) ile belirlenmiştir. TNF α , MDA, GSH, MPO, ATP, ROS ve TOS seviyeleri karaciğer dokusundan çalışılmıştır. AST ve ALT seviyeleri ise direkt olarak kandan tespit edilmiştir.

3.4.2.1. Örneklerin hazırlanması

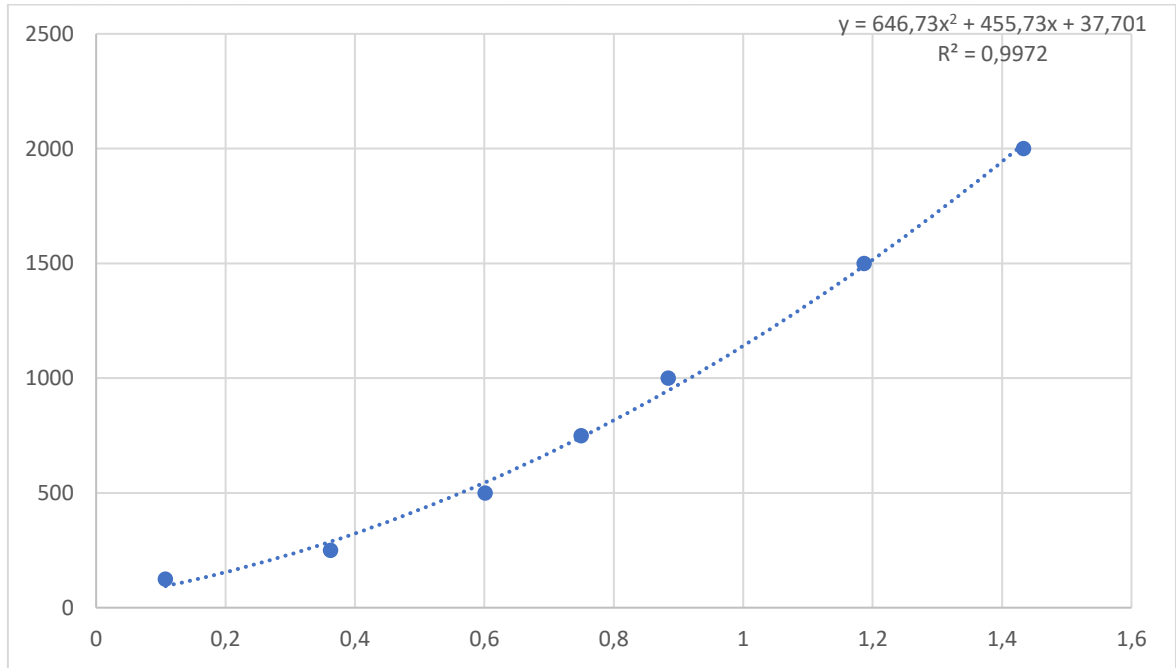
Örneklerin hazırlanmasında izlenen adımlar şu şekildedir:

- Sıvı azot ile dondurulmuş karaciğer dokuları bir bistüri yardımıyla parçalanmıştır.
- Örnekler arası sapmayı engellemek adına her bir örnekten 100 mg ağırlığında doku kullanılmaya çalışılmıştır.
- Dokular bir bistüri yardımıyla daha da parçalanmıştır ve 1.5 ml eppendorf tüp içerisine alınmıştır.
- Doku parçaları üzerine 1 ml soğuk fosfat tamponlu salin (phosphate buffered saline; PBS) ilave edilmiştir.
- Karışım 4°C'de 8000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- İşlem sonunda süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır ve bu solüsyon direkt olarak ELISA için kullanılmıştır.
- AST ve ALT seviyeleri, intrakardiyak olarak alınan 2 ml kan kullanılarak belirlenmiştir. Tam kan 1500 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatant olarak elde edilen serum örnekleri ölçümlerde kullanılmıştır.

Hazırlanan karaciğer örneklerindeki protein konsantrasyonları Bradford Analizi (ABT Bradford Assay, Kat No W04-01-50; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) ile üreticinin talimatlarına göre belirlenmiştir. Buna göre;

- Kit bileşeni olan bovin serum albümin (BSA) stok standardından moleküler saflıkta su yardımıyla 2-0 μ g/ μ l konsantrasyonlarında ara dilüsyonda standartlar hazırlanmıştır.

- Daha sonra, hazırlanan standartların 5'er µl'si bir mikrolaka içerisinde kit bileşeni olan 200 µl Bradford test reaktifi ile karıştırılmıştır.
- Karışım oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
- Süre sonunda, bir mikrolaka okuyucu (MB-580 Full-Automatic Micro-Plate Reader; Nanbei, Çin) yardımıyla, 595 nm'de optik dansite (optical density; OD) değerleri elde edilmiştir.
- Elde edilen absorbans ve ilgili konsantrasyonlar kullanılarak eğri uydurma algoritması ile belirleme katsayısı ve eğri için matematiksel formül elde edilmiştir (Şekil 3.2). Bu formül yardımıyla protein konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

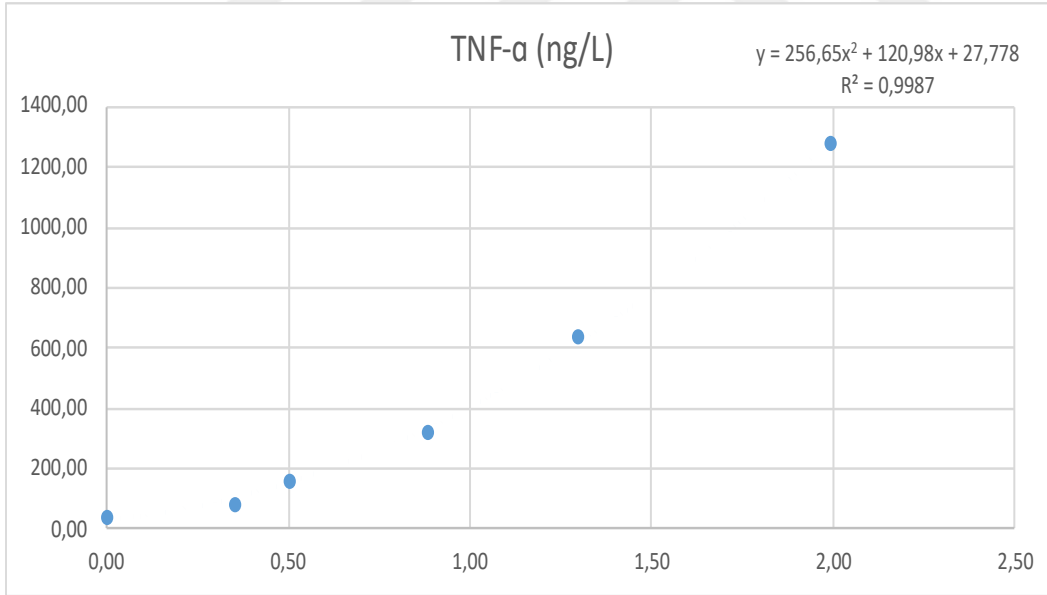


Şekil 3.2. Örneklerin protein konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.4.2.2. TNFα seviyelerinin belirlenmesi

Tüm gruptaki hayvanlardan elde edilen karaciğer dokusunda TNFα seviyeleri, sıçan TNFα ELISA Kiti (Katalog No: E0764Ra; Bioassay Technology Laboratory; BT Lab, Güney Kore) yardımıyla üreticinin talimatlarına göre belirlenmiştir. Buna göre, kit bileşeni olan standart solüsyonundan (1280 ng/L) seri dilüsyonla 640, 320, 160, 80 ve 40 ng/L konsantrasyonlu standartlar hazırlanmıştır. Standartlardan 50 µl, kit bileşeni olan ve

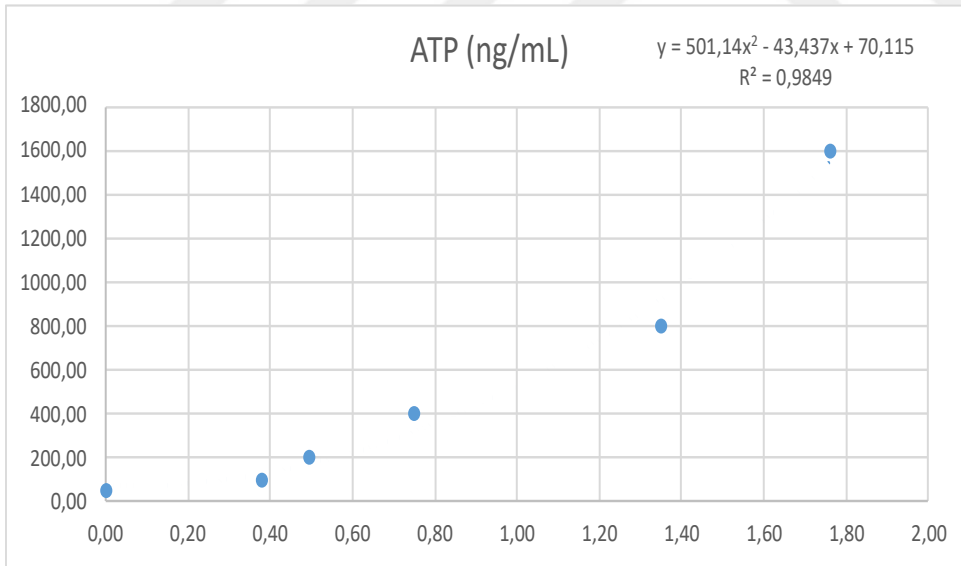
kullanıma hazır plakanın kuyucuklarına eklenmiştir. Örneklerden ise final 40'ar µl kuyucuklara konulmuştur. Örnekler üzerine 10 µl sıçan TNFα antikor eklenmiştir. Standartlarda bu antikoru hali hazırda olduğu belirtildiği için standartlar üzerine antikor eklenmemiştir. Daha sonra, tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiştir. Solüsyonlar karıştırıldıktan sonra kuyucukların üzeri bir kaplama (sealer) yardımıyla kapatılmıştır ve 37°C'de 60 dk inkübasyon sağlanmıştır. Süre sonunda, kuyucuklardaki solüsyonlar aspire edilmiştir ve 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapılmıştır. Kuyucuklara 50'şer µl substrat solüsyonu A ve B eklenmiştir ve karanlık bir ortamda 37°C'de 10 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Son olarak bu solüsyonlar üzerine 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir 10 dk içerisinde bir mikropilaka okuyucu yardımıyla 450 nm'de OD değerleri elde edilmiştir. Standartlar için elde edilen OD değerleri ve ilgili konsantrasyonlar kullanılarak eğri uydurma algoritması ile belirleme katsayısı ve eğri için matematiksel formül elde edilmiştir (Şekil 3.3). Bu eğri aracılığıyla elde edilen denklem, absorbans değerleri ve başlangıç konsantrasyon oranları kullanılarak örneklerin TNFα seviyelerinin belirlenmesini sağlamıştır.



Şekil 3.3. Örneklerin TNFα konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.4.2.3. ATP seviyelerinin belirlenmesi

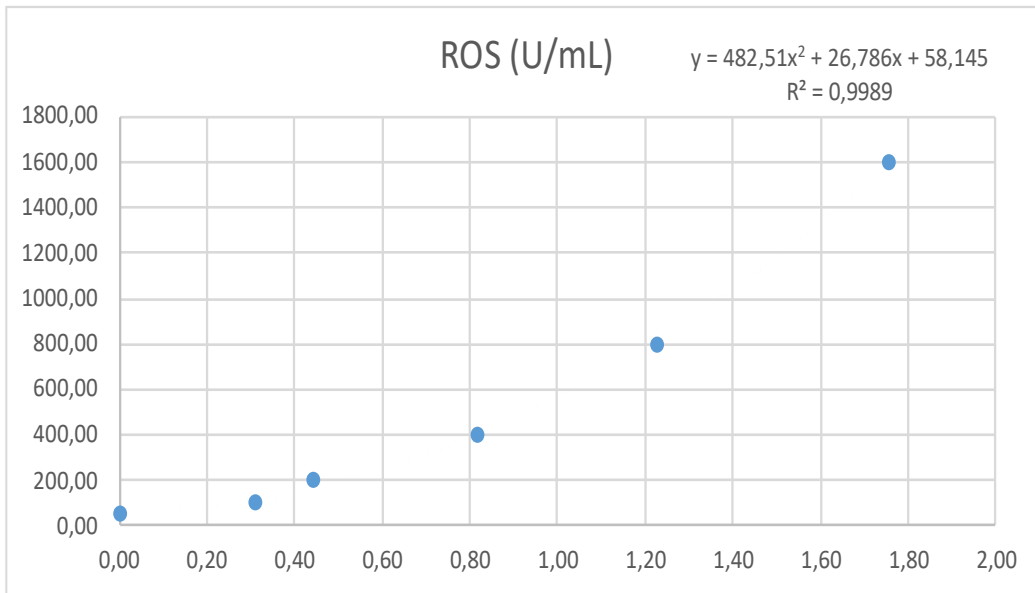
Örneklerdeki ATP seviyeleri, sıçan ELISA kiti (Katalog No: E0920Ra; Bioassay Technology Laboratory; BT Lab, Güney Kore) kullanılarak belirlenmiştir. Protokolde, 1600 ng/ml konsantrasyonundaki standart stok solüsyonundan seri dilüsyonlarla 800, 400, 200, 100 ve 50 ng/ml konsantrasyonlarında ara standart solüsyonları hazırlanmıştır. Standartlar 50 µl ve örnekler 40 µl hacimle kullanıma hazır ELISA plakasının kuyucuklarına aktarılmıştır. Örnekler üzerine 10 µl anti-ATP antikoru eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklendikten sonra plaka 37°C’de 60 dk inkübe edilmiştir. Kuyucuklar, 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrası tüm kuyucuklara 50 µl substrat solüsyonu A ve B eklenmiştir. 37°C’de 10 dk inkübasyon sonrası kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir ve 450 nm’de OD değerleri elde edilmiştir. Standartlar için elde edilen OD değerleri ve ilgili konsantrasyonlar kullanılarak eğri uydurma algoritması ile belirleme katsayısı ve eğri için matematiksel formül elde edilmiştir (Şekil 3.4). Bu eğri aracılığıyla elde edilen denklem, absorbans değerleri ve başlangıç konsantrasyon oranları kullanılarak örneklerin ATP seviyelerinin belirlenmesini sağlamıştır.



Şekil 3.4. Örneklerin ATP konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.4.2.4. ROS seviyelerinin belirlenmesi

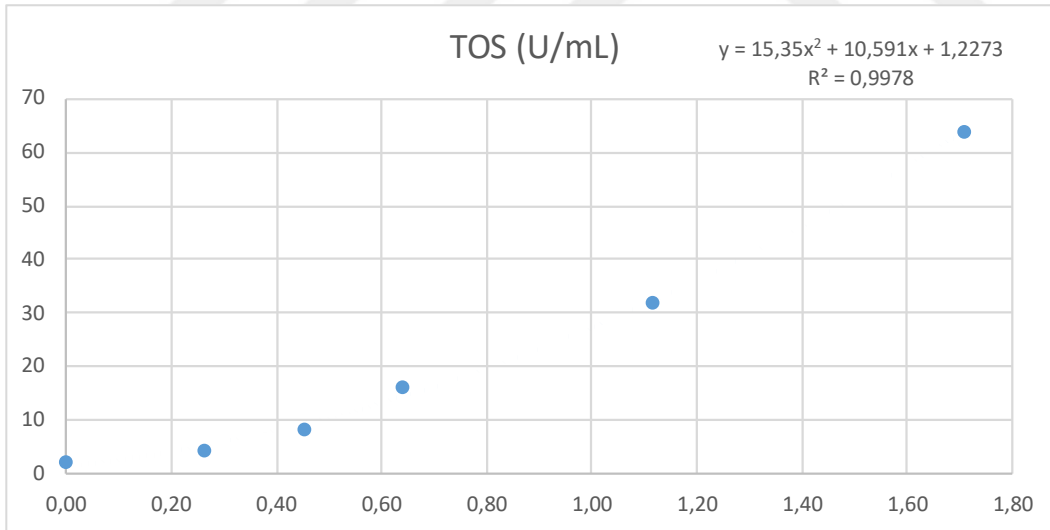
Örneklerdeki ROS seviyeleri sıçan ROS ELISA kiti (Katalog No: E0304Ra; Bioassay Technology Laboratory; BT Lab, Güney Kore) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre belirlenmiştir. 1600 U/ml konsantrasyonundaki stok standart solüsyonundan seri dilüsyonlarla 800, 400, 200, 100 ve 50 U/ml konsantrasyonlarında ara standart solüsyonları hazırlanmıştır. Örneklerden 40'ar µl ve standartlardan 50'şer µl kullanıma hazır ELISA plakalarının kuyucuklarına eklenmiştir. Örnekler üzerine 10 µl anti-ROS antikoru eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiştir ve karışımlar 37°C'de 60 dk inkübe edilmiştir. 5 kez 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkama işlemlerinden sonra kuyucuklara 50'şer µl substrat solüsyonu A ve B eklenmiştir. 37°C'de 10 dk inkübasyon sonrası, kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklenmiş ve 450 nm'de OD değerleri elde edilmiştir. Standartlar için elde edilen OD değerleri ve ilgili konsantrasyonlar kullanılarak eğri uydurma algoritması ile belirleme katsayısı ve eğri için matematiksel formül elde edilmiştir (Şekil 3.5). Bu eğri aracılığıyla elde edilen denklem, absorbans değerleri ve başlangıç konsantrasyon oranları kullanılarak örneklerin ROS seviyelerinin belirlenmesini sağlamıştır.



Şekil 3.5. Örneklerin ROS konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.4.2.5. TOS seviyelerinin belirlenmesi

Örneklerdeki TOS seviyeleri sıçan TOS ELISA kiti (Katalog No: E1512Ra; Bioassay Technology Laboratory; BT Lab, Güney Kore) yardımıyla belirlenmiştir. Protokolde, 64 U/ml konsantrasyonundaki stok standart solüsyonundan seri dilüsyonlarla 32, 16, 8, 4 ve 2 U/ml konsantrasyonlarında ara standart solüsyonları hazırlanmıştır. Standartlar 50'şer ve örnekler 40'ar µl hacimlerle kullanıma hazır ELISA plakalarının kuyucuklarına eklenmiştir. Örnekler üzerine 10 µl anti-TOS antikoru ve tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiştir. Karışımlar 37°C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Kuyucuklar 5 kez 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklara 50'şer µl substrat solüsyonu A ve B eklenmiş ve 37°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Son olarak kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklenmiş ve 450 nm'de OD değerleri elde edilmiştir. Standartlar için elde edilen OD değerleri ve ilgili konsantrasyonlar kullanılarak eğri uydurma algoritması ile belirleme katsayısı ve eğri için matematiksel formül elde edilmiştir (Şekil 3.6). Bu eğri aracılığıyla elde edilen denklem, absorbans değerleri ve başlangıç konsantrasyon oranları kullanılarak örneklerin TOS seviyelerinin belirlenmesini sağlamıştır.

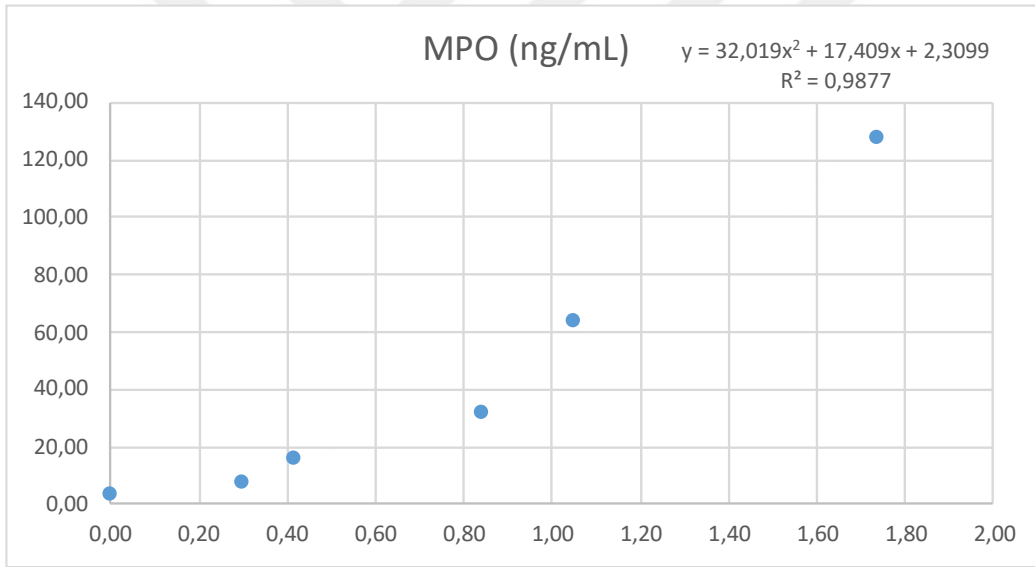


Şekil 3.6. Örneklerin TOS konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.4.2.6. MPO seviyelerinin belirlenmesi

Örneklerin MPO seviyeleri, sıçan MPO ELISA kiti (Katalog No: E0574Ra; Bioassay Technology Laboratory; BT Lab, Güney Kore) kullanılarak belirlenmiştir. Üreticinin

protokolüne göre 128 ng/ml ana standart solüsyonundan seri dilüsyonlarla 64, 32, 16, 8 ve 4 ng/ml konsantrasyonlarında ara standartlar oluşturulmuştur. Standartların 50’şer ve örneklerin 40’ar µl’si ELISA plakalarının kuyucuklarına eklenmiştir. Örneklerin üzerine 10 µl anti-MPO antikor eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklendikten sonra 37°C’de 60 dk inkübasyon sağlanmıştır. 300 µl yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 5 kez yıkanmıştır. Kuyucuklar içerisine 50 µl substrat solüsyonu A ve B eklenmiştir ve reaksiyon 50 µl stop solüsyonu ile sonlandırılmıştır. 450 nm’de OD değerleri elde edilmiştir. Standartlar için elde edilen OD değerleri ve ilgili konsantrasyonlar kullanılarak eğri uydurma algoritması ile belirleme katsayısı ve eğri için matematiksel formül elde edilmiştir (Şekil 3.7). Bu eğri aracılığıyla elde edilen denklem, absorbans değerleri ve başlangıç konsantrasyon oranları kullanılarak örneklerin MPO seviyelerinin belirlenmesini sağlamıştır.

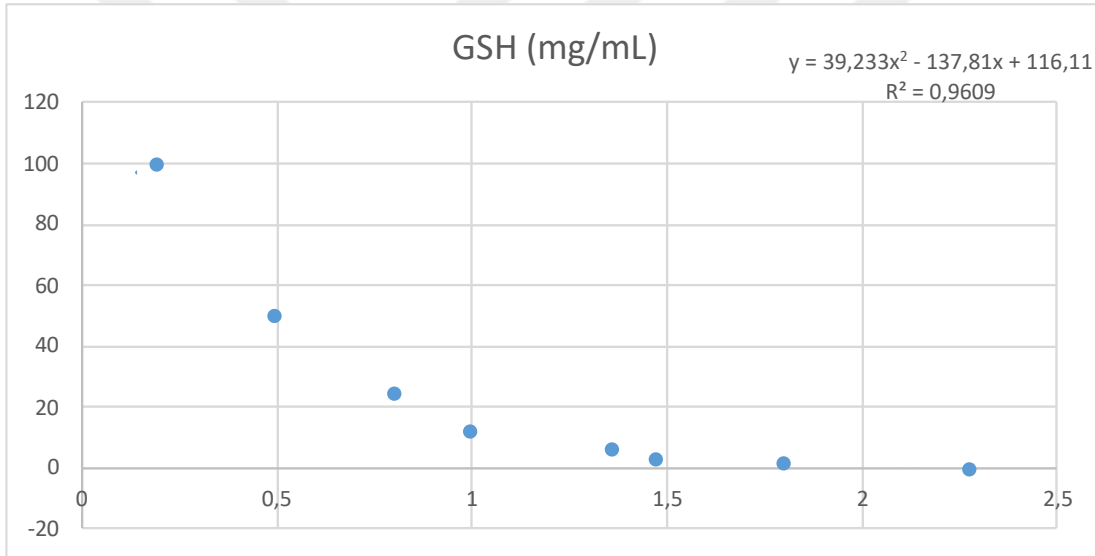


Şekil 3.7. Örneklerin MPO konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.4.2.7. GSH seviyelerinin belirlenmesi

Örneklerin GSH seviyeleri, yarışmacı bağlanma üzerinden tespit olanağı veren sıçan GSH ELISA kiti (Katalog No: ELK8577; ELK Biotechnology, Çin) kullanılarak belirlenmiştir. Üreticinin protokolüne göre 100 ng/ml ana standart solüsyonundan seri dilüsyonlarla 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ve 1.57 ng/ml konsantrasyonlarında ara standartlar oluşturulmuştur. Standartlardan ve örneklerden 50’şer µl ELISA plakalarının kuyucuklarına

eklenmiştir. Tüm kuyucuklar üzerine 50 µl biyotin konjugatı eklenmiş ve plakalar 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 3 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası kuyucuklar içerisine 100 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiş ve 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar 5 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve üzerlerine 90 µl TMB substrat solüsyonu eklenmiştir. Plakalar 37°C’de 20 dk inkübe edildikten sonra reaksiyon 50 µl stop solüsyonu ile sonlandırılmıştır. Son olarak 450 nm’de OD değerleri elde edilmiştir. Standartlar için elde edilen OD değerleri ve ilgili konsantrasyonlar kullanılarak eğri uydurma algoritması ile belirleme katsayısı ve eğri için matematiksel formül elde edilmiştir (Şekil 3.8). Bu eğri aracılığıyla elde edilen denklem, absorbans değerleri ve başlangıç konsantrasyon oranları kullanılarak örneklerin GSH seviyelerinin belirlenmesini sağlamıştır.

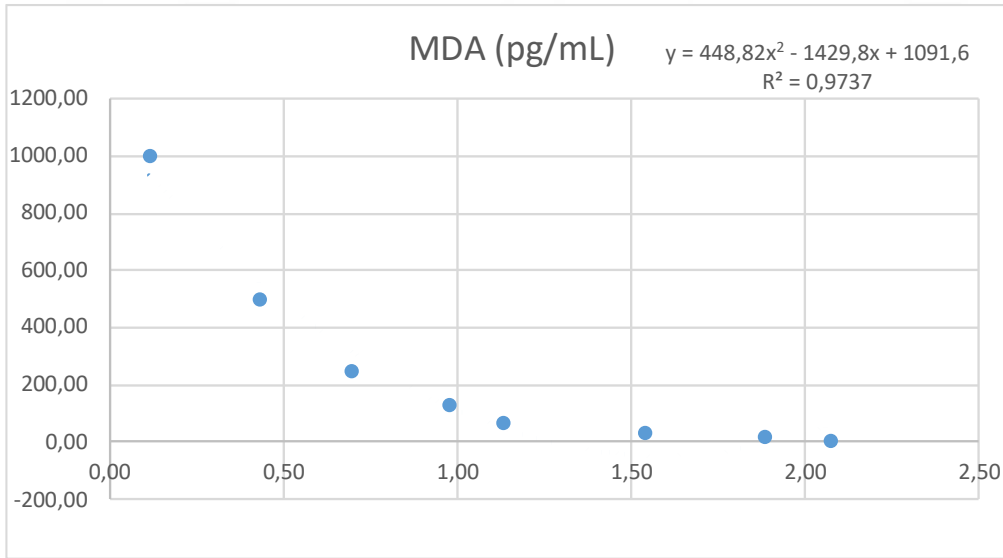


Şekil 3.8. Örneklerin GSH konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.4.2.8. MDA seviyelerinin belirlenmesi

Örneklerin MDA seviyeleri, yarışmacı bağlanma üzerinden tespit olanağı veren sıçan GSH ELISA kiti (Katalog No: ELK8612; ELK Biotechnology, Çin) kullanılarak belirlenmiştir. Üreticinin protokolüne göre 1000 pg/ml ana standart solüsyonundan seri dilüsyonlarla 500, 250, 125, 62,5, 31,25 ve 15,63 pg/ml konsantrasyonlarında ara standartlar oluşturulmuştur. Kullanıma hazır ELISA plakalarına standartlardan ve örneklerden 50’şer µl eklenmiştir. Daha sonra, tüm kuyucuklar üzerine 50 µl biyotin konjugatı eklenmiştir.

Plakalar 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir ve süre sonunda kuyucuklar 3 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası kuyucuklar içerisine 100 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiştir. Plakalar 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir ve 5 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Kuyucuklar içerisine 90 µl TMB substrat solüsyonu eklenmiş ve 37°C’de 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon 50 µl stop solüsyonu ile sonlandırılmıştır ve 450 nm’de OD değerleri elde edilmiştir. Standartlar için elde edilen OD değerleri ve ilgili konsantrasyonlar kullanılarak eğri uydurma algoritması ile belirleme katsayısı ve eğri için matematiksel formül elde edilmiştir (Şekil 3.9). Bu eğri aracılığıyla elde edilen denklem, absorbans değerleri ve başlangıç konsantrasyon oranları kullanılarak örneklerin MDA seviyelerinin belirlenmesini sağlamıştır.



Şekil 3.9. Örneklerin MDA konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için hazırlanan standart eğri. x eksenini konsantrasyon değerlerini ve y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.4.2.9. ALT ve AST seviyelerinin belirlenmesi

Serum AST ve ALT seviyeleri, intrakardiyak olarak elde edilen 2 ml kandan, literatürde belirtildiği üzere (180) otomatize sistemle tespit edilmiştir. Bu amaçla, tam kandan santrifügasyonla elde edilen serum örnekleri, Roche Cobas C701 (Roche Diagnostics, İsviçre) platformu kullanılarak insanda *in vitro* tanı için geliştirilmiş AST (Katalog No: 05850819188; Roche Diagnostics, İsviçre) ve ALT (Katalog No: 05850797188; Roche Diagnostics, İsviçre) kitleri yardımıyla süreçlendirilmiştir. Elde edilen

nümerik değerler, serumdaki total AST ve ALT seviyelerini gösteren değerler olarak belirlenmiştir.

3.4.3. Protein analizleri

IRH ve metformin koşullamasının KPCmt'ye etkisi, KPCmt belirteçlerinin protein seviyelerinin Western Blot kullanılarak tespit edilmesi ile belirlenmiştir. Western Blot, aşağıdaki adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir. İşlem sırasında, her bir gruptan 3'er örnek kullanılmıştır.

3.4.3.1. Protein örneklerinin denatüre edilmesi

- Bradford hesabına göre konulacak protein örneği üzerine 5X Pagesta Reducing SDS-Page (Katalog No: 751-001, GeneAll Biotechnology Co., Çin) eklenmiştir. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su eklenmiştir.
- Hazırlanan karışım 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir ve ardından buz üzerine alınmıştır.

3.4.3.2. Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS-PAGE

- Dikey jel sistemi tankı içerisine yerleştirilmiştir. %4-12'lik bis-tris gradiyent jeli (Katalog No: NP0321; Invitrogen, ABD) içerisindeki jel kuyucuklarını bozmadan jel tarağı dikkatlice çıkarılmıştır.
- 20X MOPS yürütme tamponundan (Katalog No: NP0050; Invitrogen, ABD) 50 ml alıp bir mezüre eklenmiştir ve üzerine 950 ml distile su ekleyerek 1X MOPS tamponu elde edilmiştir.
- Tankın içerisine, içten dışına doğru 600 ml 1X MOPS yürütme tamponu eklenmiştir.
- Örnekleri yüklemekten önce 200 µl'lik pipete temiz bir pipet ucu takılmıştır ve kuyucuklar pipetaj yapılarak temizlenmiştir.
- Jel kasetinde yer alan kuyucuklardan en baştaki ve sondakine 5 µl marker yüklenmiştir.
- Kalan kuyuculara hazırlanan protein örneğinden 20 µl yüklenmiştir.

- Dikey elektroforez sistemi ile güç kaynağı elektrot kabloları ile bağlanmıştır. 80 voltta 10 dk yürütülerek örneklerin kuyulardan çıkması sağlanmıştır. Daha sonra örnekler, 220 volt ve 150 amper elektrik ortamında 50 dk yürütülmüştür.

3.4.3.3. Blotlama

- Yürütme işlemi sonunda jel, güç kaynağı ve dikey jel sisteminin elektrot kabloları güç kaynağından çıkarılıp kapağı açılmıştır. Jel sıkıştırma aparatı çıkarıldıktan sonra jel kaseti çıkarılmıştır.
- Jel kaseti, jel bıçağı kullanılarak ve kenar bağlantıları kopartılarak açılmıştır. Jelin tarak kısımları ve alt tarafındaki kalın jel kesilerek uzaklaştırılmıştır. İçerisinde distile su bulunan bir kap içerisine dikkatlice alınmıştır.
- Blotlama kısmında iBlot2 jel transfer sistemi (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. iBlot 2 Transfer Stacks, Nitrocellulose kitinde yer alan aparat kutudan çıkartılmış ve üzerinde yer alan jelatin açılmıştır. Aparat, plastiği ile birlikte cihaza yerleştirilmiştir. İki aparat arasındaki beyaz plastik çıkarılmıştır. Aparat üzerinde yer alan membran üstüne dikkatli bir şekilde jel yerleştirilmiştir. Kit içerisinde yer alan filtre kâğıdı distile su ile ıslatılmıştır. Jelin üstüne ıslak filtre kâğıdı konulmuştur. Hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Kit içerisinde yer alan sünger üzerindeki metal, iBlot cihaz kapağında yer alan elektrota denk gelecek şekilde kapağa yerleştirilmiştir ve kapak dikkatlice kapatılmıştır. Program düğmesinden p3 programı seçilmiştir ve 7 dk'lık sürede işlem tamamlanmıştır.
- Transfer işleminin gerçekleştiği marker bantlarının hepsinin membrana geçmiş olduğu gözlenerek kontrol edildikten sonra membran dikkatli bir şekilde distile su içerisine alınmıştır.

3.4.3.4. Bloklama

- Nitroselüloz membran, Western Blotting Blocking Buffer (%5 BSA+ PBST; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) içerisine alınmıştır.
- Membran, çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

3.4.3.5. Primer antikor uygulaması

- Primer antikor uygulaması için Tablo 3.1’de belirtilen antikorlar, Western Blotting Blocking Buffer (%5 BSA+ PBST; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) kullanılarak sulandırılmıştır.
- Üzerindeki yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran 10 ml dilüe edilmiş primer antikor içerisinde gece boyunca +4°C’de inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün +4°C’den çıkarılan membranlar 2 saat boyunca oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak ekstra inkübe edilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları.

Marka	Katalog No	Antikor İsmi	Moleküler Ağırlık	Dilüsyon Oranı
Affinity Biotech, Inc., ABD	AF7018	Beta Aktin	47 kDa	1:3000
Affinity Biotech, Inc., ABD	DF12119	LONP1	100 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	AF1009	HIF1A	120 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	AF0183	HSP10	10 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	AF5466	HSP70	70 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	AF5374	HSP60	60 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	DF8448	CLPP	30 kDa	1:1000
Affinity Biotech, Inc., ABD	AF5280	DDIT3/CHOP	30 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	DF6008	ATF4	39 kDa	1:500
ELK Biotechnology, Çin	ES1723	ATF-5	31 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	S0001	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP		1:3000

3.4.3.6. Yıkama

- Primer antikor inkübasyonu bittikten sonra primer antikor solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra membran 10X PBST pH 7.6 (Katalog No: B25-01-05; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) içerisinde 3 kere ve 5 dk süre ile hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır.

3.4.3.7. Sekonder antikor uygulaması ve yıkama

- Sekonder antikor, Tablo 2.1’de belirtildiği gibi dilüe edilmiştir. Membran, yıkama sonrası 10 ml dilüe edilmiş sekonder antikor içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
- Inkübasyon sonrası membran, 5’er dk’dan 3 kez 10X PBST pH 7.6 (Katalog No: B25-01-05; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) ile yıkanmıştır.

3.4.3.8. Görüntüleme

- Yıkama işlemi bittikten sonra membranlar 2 ml ECL solüsyonu (ECL Western Blotting Substrate, SUN; Katalog No: W63-01-05; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) ile inkübe edilmiştir. ECL solüsyonu içerisinde 1 dk inkübasyon sağlanmıştır.
- Daha sonra membranlar, fazla ECL solüsyonundan arındırılarak görüntüleme cihazına (G: Box Chemi XRQ; Syngene, Hindistan) yerleştirilmiştir ve kemilüminesan sinyaller elde edilmiştir.
- Kemilüminesan sinyaller, ImageJ yazılımı (181) kullanılarak ve Beta-aktinden elde edilen sinyale korele edilerek rölatif olarak kantifiye edilmiştir.

Bir primer antikor kullanılarak gerçekleştirilen Western Blot işlemi sonrası membran, bir stripping tamponu (A.B.T.TM Stripping Buffer for Western Blot; Katalog No: W11-01-25; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) ile muamele edilmiştir. Bu sayede, membran üzerindeki primer ve sekonder antikorlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, diğer hedef proteinlerden biri için primer antikor ile inkübasyon sağlanmıştır ve bu protein için

Western Blot adımları tekrarlanmıştır. Stripping işlemi, tüm hedef proteinler taranıncaya kadar tekrar edilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmada gruplar içerisindeki hayvan sayısının etkisi, G*Power 3.1.9.7 programı (182) kullanılarak belirlenmiştir. Programda varyans analizi (analysis of variance; ANOVA) testi ile üç grup için 30 total örnek büyüklüğünün etkisi, α hata olasılığı 0,05 ve güç (1- β hata olasılığı) 0,80 iken 0,59 olarak belirlenmiştir. Bu değer, gruplar içerisinde gerekli olan minimum hayvan sayısına ulaşıldığını göstermektedir (183).

Çalışma boyunca, her bir işlem için en az 3 teknik replika kullanılmıştır. Çalışma sonucu elde edilen nümerik değerler, gruplar arasında Tek Yönlü ANOVA metodu ve çoklu kıyaslama yaklaşımı ile analiz edilmiştir. Değerler arasındaki fark, $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism (GraphPad Inc., ABD) programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sıçan Modelleri ve Örnek Hazırlanması

Çalışma kapsamında, her grupta 10'ar hayvan olacak şekilde sıçanlar hiçbir uygulama yapılmamış, IRH modellenmiş ve metformin ön koşullaması sonrası IRH modellenmiş olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Modellemeler sırasında belirlenen süreler, grubumuzun daha önceden yürütmüş olduğu ve hayvan sağkalımı açısından belirlediği en uygun zaman aralıklarıdır (yayınlanmamış veri). Buna göre iskemi süresi 45 dk, reperfüzyon süresi 6 saat ve metformin ön koşullama süresi 7 gündür. Modellemeler sırasında, hiçbir uygulama yapılmamış ve metformin ön koşullaması sonrası IRH modellenmiş hayvanlarda herhangi bir anomali kaydedilmezken IRH modellemede bir hayvanda ölüm görülmüştür ve bu nedenle çalışmadan çıkartılmıştır.

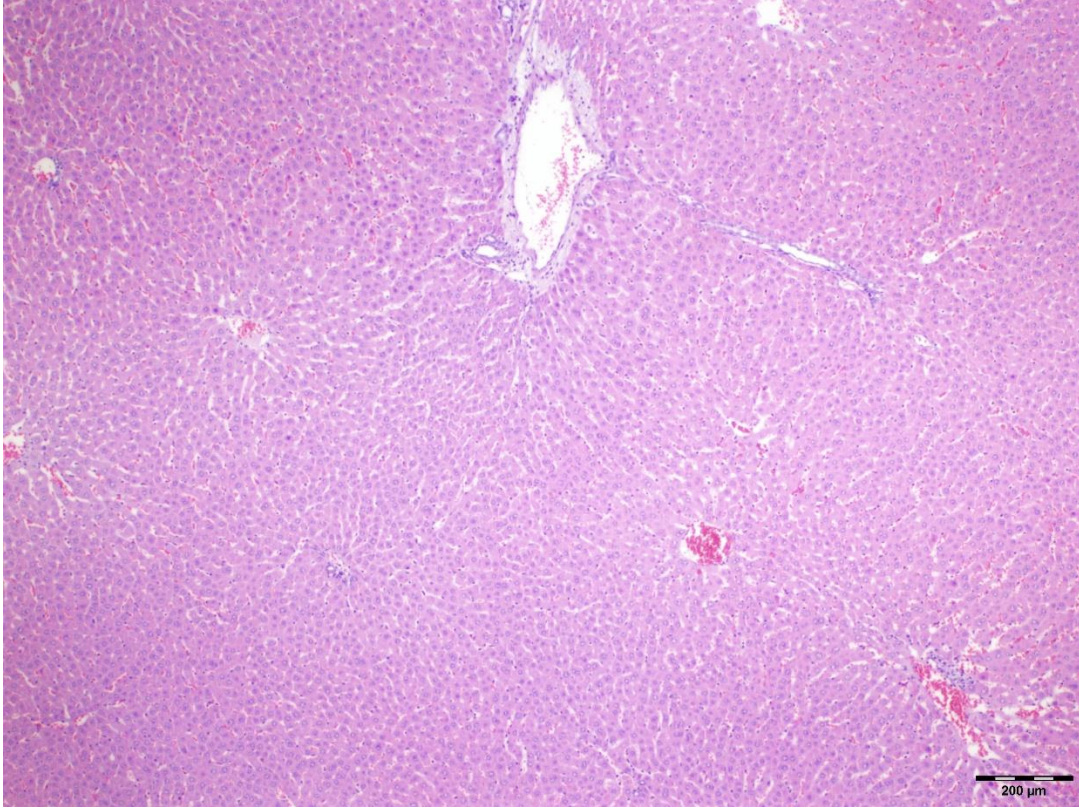
Uygulamalar sonrası her grupta sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası 2 ml intrakardiyak kan ve karaciğer dokuları ileri histolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar için hazırlanmıştır. Biyokimyasal ve moleküler çalışmalar için örneklerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole proteinler Bradford yöntemi ile kantifiye edilmiştir. Elde edilen konsantrasyon bilgileri Tablo 4.1 ve EK 2'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Karaciğer örneklerinden izole edilen protein konsantrasyonları.

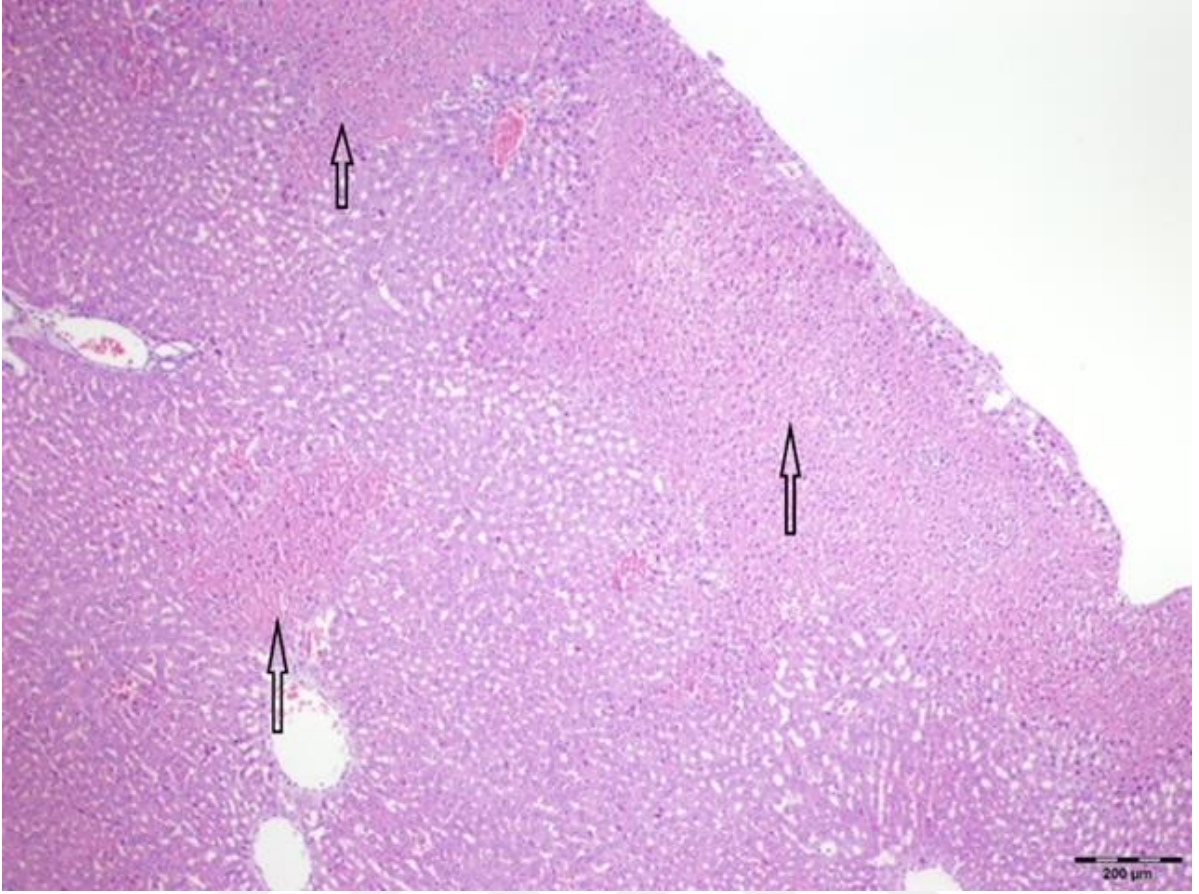
Örnek Sırası	Örnek Adı	Konsantrasyon (µg/µl)
1	Sham-1	1,55
2	Sham-2	1,46
3	Sham-3	1,44
4	Sham-4	1,51
5	Sham-5	1,29
6	Sham-6	1,66
7	Sham-7	1,54
8	Sham-8	1,69
9	Sham-9	1,51
10	Sham-10	1,52
11	IRH-1	1,56
12	IRH-2	1,61
13	IRH-3	1,40
14	IRH-4	1,56
15	IRH-5	1,54
16	IRH-6	1,40
17	IRH-7	1,59
18	IRH-8	1,50
19	IRH-9	1,49
20	Met-IRH-1	1,50
21	Met-IRH-2	1,55
22	Met-IRH-3	1,50
23	Met-IRH-4	1,21
24	Met-IRH-5	1,36
25	Met-IRH-6	1,25
26	Met-IRH-7	1,63
27	Met-IRH-8	1,32
28	Met-IRH-9	1,55
29	Met-IRH-10	1,21

4.2. IRH ve Metformin Ön Koşullama Sonrası IRH Modellemelerinin Histolojik ve Biyokimyasal Etkileri

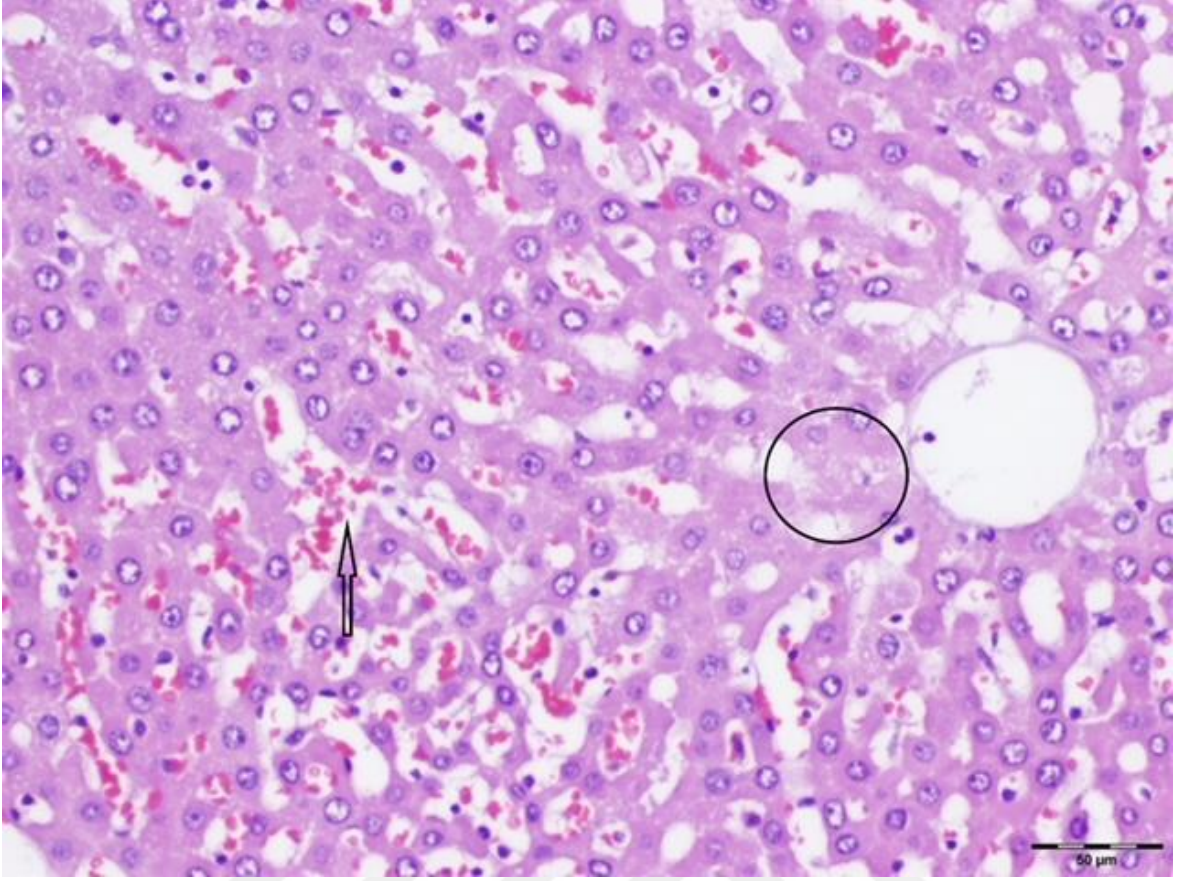
Modellemeler sonrası karaciğer dokuları, histopatolojik olarak incelenmiştir. Bu amaçla, H& E boyaması ile konjesyon, vakuolizasyon, nekroz ve nötrofil infiltrasyonu parametreleri, Suzuki kriterleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar (Şekil 4.1-4.4), konjesyon, vakuolizasyon ve nekroz parametreleri için gruplar arasında anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Beklentinin aksine, metformin ön koşullama ile nötrofil infiltrasyonunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p=0,037$) arttığı görülmüştür (EK 3-6).



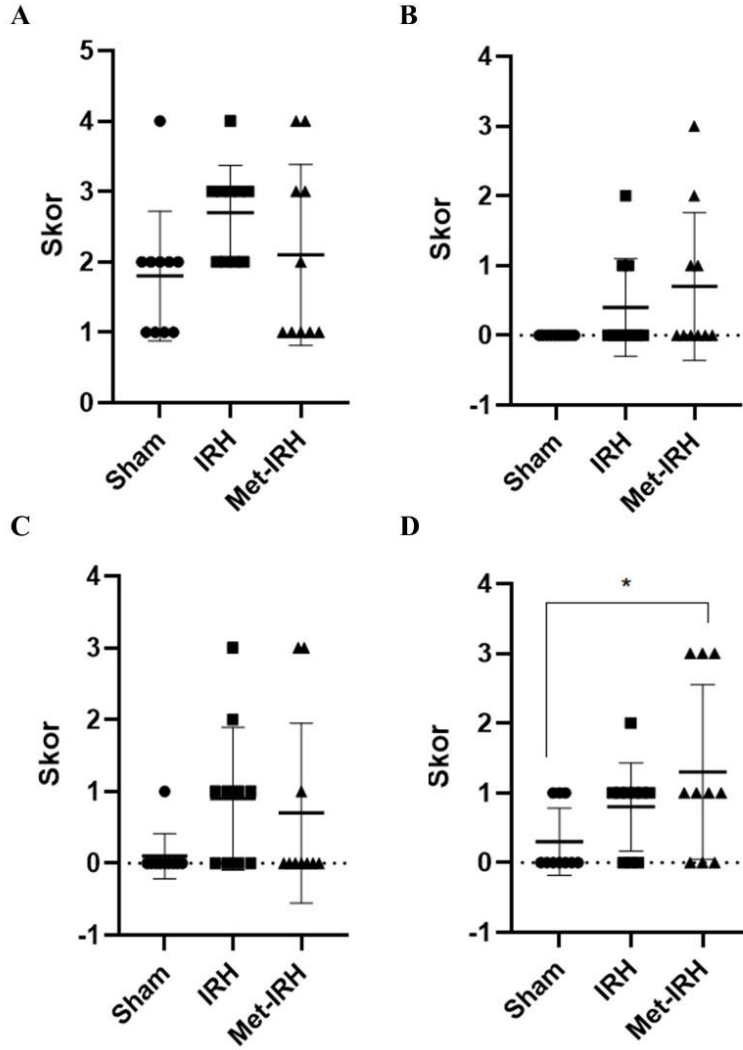
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait H& E boyama görüntüsü. Hafif venüler ve sinüzoidal konjesyon dışında normal görünen karaciğer dokusu. 40X orijinal büyütme.



Şekil 4.2. IRH modelinde geniş nekroz alanlarını gösteren H& E boyama sonucu. 40X orijinal büyütme. Oklar nekrotik alanları göstermektedir.

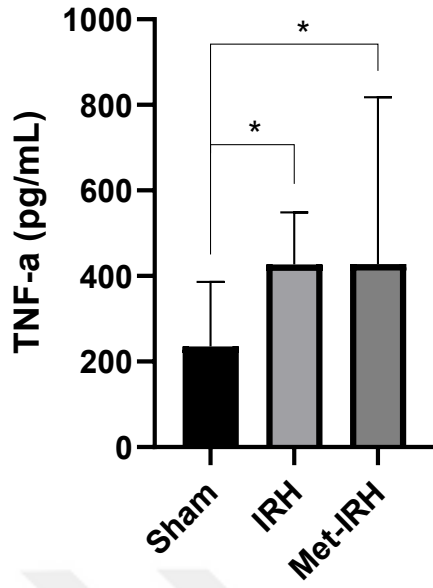


Şekil 4.3. Sinüzoidler içinde yaygın nötrofil varlığı. 200X orijinal büyütme. Ok konjesyonu ve daire vakuolizasyonu göstermektedir.



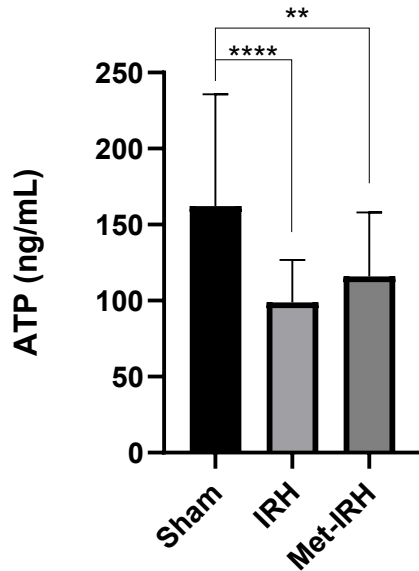
Şekil 4.4. Histopatolojik değerlendirmeler ile elde edilen Suzuki kriterlendirmesi. A. Konjesyon, B. Vakuolizasyon, C. Nekroz ve D. Nötrofil infiltrasyonu.

Modellemeler sonrası karaciğer örneklerinden izole edilen proteinler kullanılarak, hiçbir uygulama yapılmamış hayvan grubundan (sham) elde edilen proteinler varlığında, ELISA yardımıyla farklı analitlerin seviyeleri tespit edilmiştir. IRH ve metformin ön koşullaması sonrası IRH modellerinde TNF α seviyeleri, hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde (sırasıyla p=0,02 ve p=0,01) artmıştır (Şekil 4.5 ve EK 7).



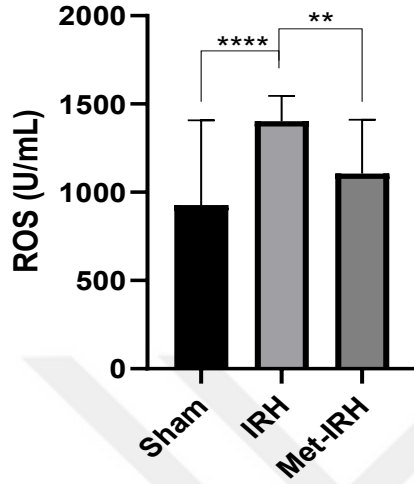
Şekil 4.5. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, TNF α seviyelerindeki değişim.

IRH ve metformin ön koşullama sonrası IRH modelleme ile ATP seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak (sırasıyla $p < 0,0001$ ve $p = 0,002$) azalmıştır. Kontrol grubuna göre IRH modelinde ATP seviyelerindeki azalışın metformin ön koşullama ile gerçekleşen azalıştan daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.6 ve EK 8).



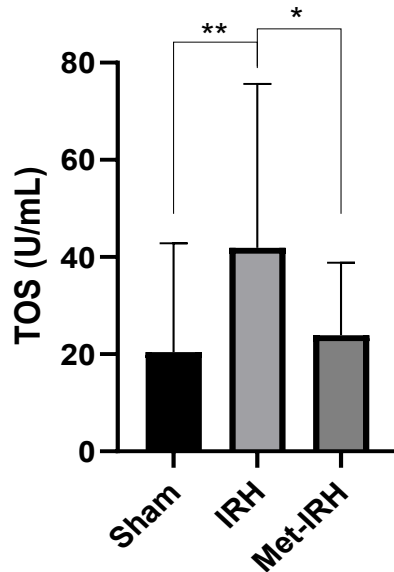
Şekil 4.6. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, ATP seviyelerindeki değişim.

IRH modelleme ile ROS seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,0001$) bir artış gözlenmiştir. Kritik olarak, metformin ön koşullama, IRH ile ROS seviyelerinde görülen artışı istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,0045$) bir şekilde azaltmıştır (Şekil 4.7 ve EK 9).



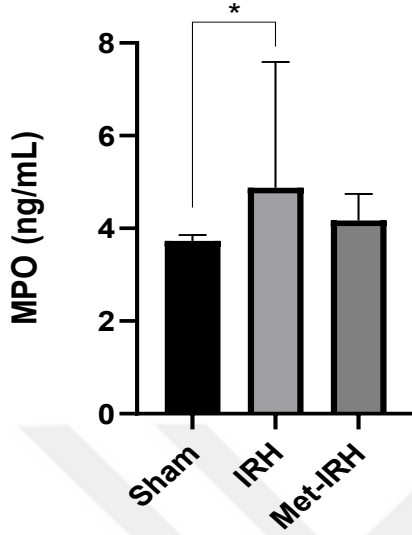
Şekil 4.7. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, ROS seviyelerindeki değişim.

ROS seviyelerine benzer şekilde, IRH modelleme TOS seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı ($p=0,004$) bir şekilde arttırmıştır. Fakat metformin modelleme ile TOS seviyeleri anlamlı ($p=0,019$) bir azalışa uğramıştır (Şekil 4.8 ve EK 10).



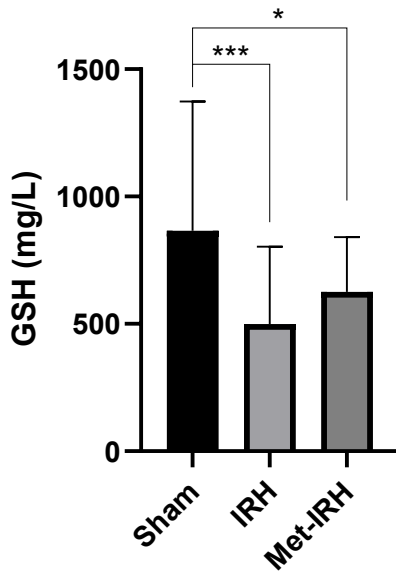
Şekil 4.8. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, TOS seviyelerindeki değişim.

MPO seviyeleri, IRH modelleme ile anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,016$) fakat metformin ön koşullama, kontrol grubuna ve IRH modeline kıyasla herhangi anlamlı bir değişime neden olmamıştır (Şekil 4.9 ve EK 11).



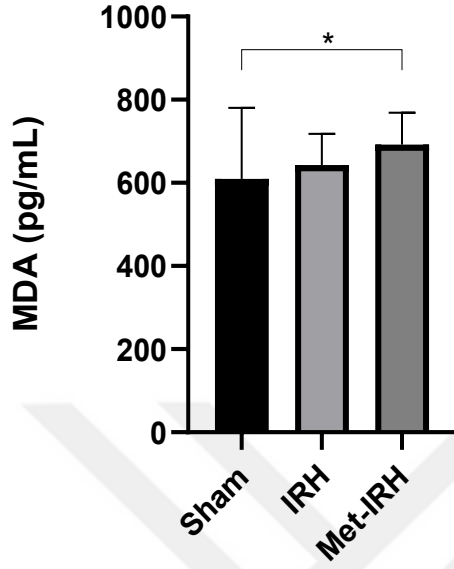
Şekil 4.9. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, MPO seviyelerindeki değişim.

IRH modelleme, GSH seviyelerini önemli ölçüde ($p=0,0009$) azaltmıştır. GSH seviyeleri metformin ön koşullamaya rağmen kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p=0,03$) azalsa da bu azalış IRH grubuna göre daha az olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.10 ve EK 12).



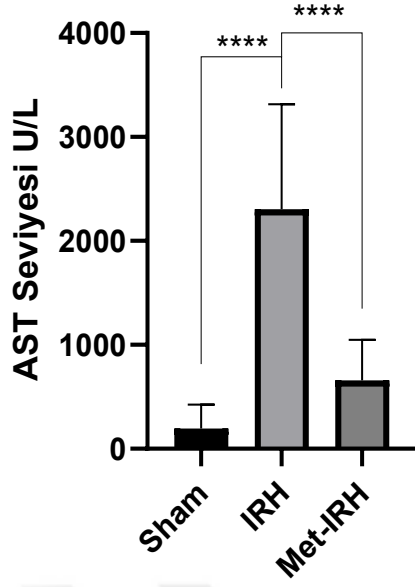
Şekil 4.10. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, GSH seviyelerindeki değişim.

IRH modelleme ile MDA seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak değişmezken metformin ön koşullama sonrası IRH modelinde MDA seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p=0,03$) değişmiştir (Şekil 4.11 ve EK 13).

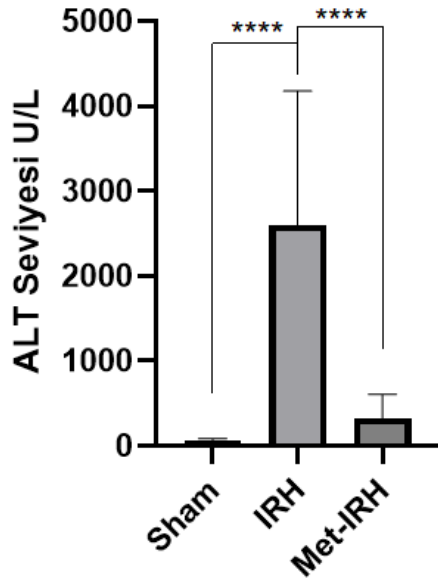


Şekil 4.11. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, MDA seviyelerindeki değişim.

Çalışmada intrakardiyak kanlardan elde edilen serumlarda AST ve ALT düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, AST ve ALT seviyelerinin IRH ile anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) arttığını göstermiştir (Şekil 4.12 ve 4.13; EK 14 ve 15). Metformin ön koşullama, IRH ile düzeyleri artan AST ve ALT'yi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p<0,0001$) azaltmıştır.



Şekil 4.12. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, AST seviyelerindeki değişim.



Şekil 4.13. Sham, IRH ve Met-IRH gruplarında, ALT seviyelerindeki değişim.

ELISA metoduyla elde edilen tüm sonuçlar, Tablo 4.2’de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma sonucunda elde edilen ve modellemelerin kümülatif etkisini gösteren sonuçların özeti.

Parametre	Kontrol/IRH	Kontrol/Met-IRH	IRH/Met-IRH
AST	Artış: $p<0,0001$	$p>0,05$	Azalış: $p<0,0001$
ALT	Artış: $p<0,0001$	$p>0,05$	Azalış: $p<0,0001$
TNF α	Artış: $p=0,02$	Artış: $p=0,01$	$p>0,05$
ATP	Azalış: $p<0,0001$	Azalış: $p=0,002$	$p>0,05$
ROS	Artış: $p<0,0001$	$p>0,05$	Azalış: $p=0,0045$
TOS	Artış: $p=0,004$	$p>0,05$	Azalış: $p=0,019$
MPO	Artış: $p=0,016$	$p>0,05$	$p>0,05$
GSH	Azalış: $p=0,0009$	Azalış: $p=0,03$	$p>0,05$
MDA	$p>0,05$	Artış: $p=0,03$	$p>0,05$

4.3. IRH ve Metformin Ön Koşullama Sonrası IRH Modellemelerinin Hipoksik ve KPCmt Yolaklarına Etkisi

Western Blot analizi ile gruplar içerisinde 3'er örnek seçilerek hipoksi belirteci (HIF1A), KPCmt belirteçleri (ATF4, ATF5 ve CHOP), mitokondriyal proteaz (LONP1 ve CLPP) ve şaperon (HSP10, HSP60 ve HSP70) protein seviyeleri incelenmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15; EK 16-24). Western Blot ile elde edilen ham membran görüntüleri EK 25-34'te sunulmuştur.

IRH modelleme ile hipoksi belirteci olan HIF1A'nın ekspresyon seviyesi hiçbir uygulama yapılmamış (sham) gruba kıyasla anlamlı bir şekilde ($p=0,016$) artmıştır. Metformin ön koşullaması ile IRH modellemeye kıyasla HIF1A seviyelerindeki artış, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p=0,042$) azalmıştır.

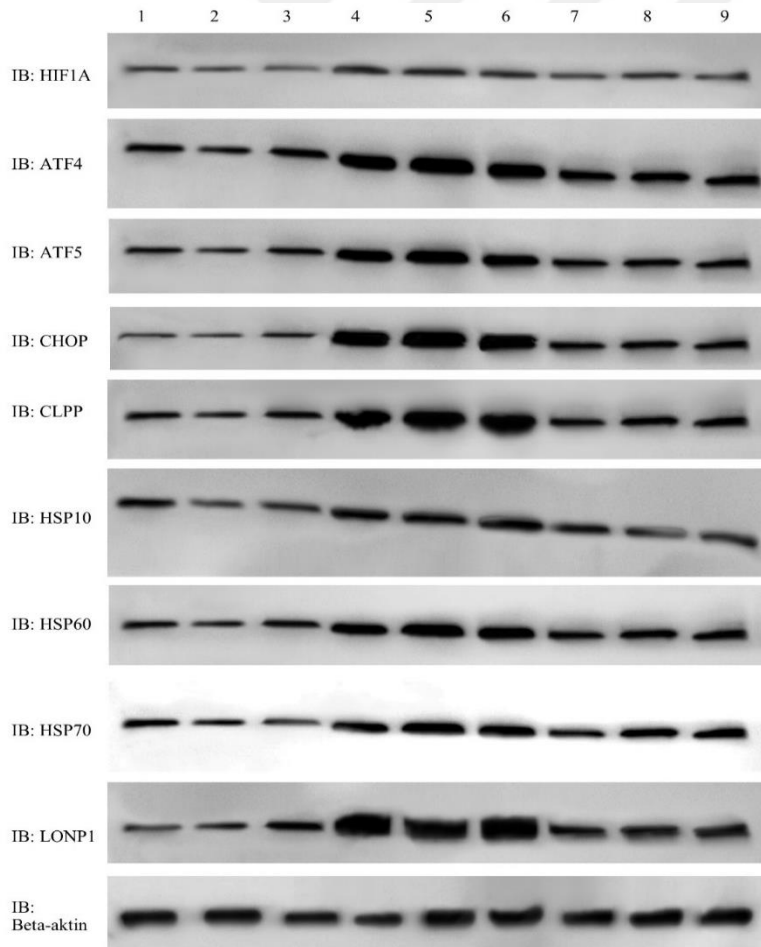
ATF4 ve LONP1 seviyelerinde gruplar arası anlamlı bir değişiklik kaydedilmemiştir ($p>0,05$).

ATF5 protein seviyeleri, IRH modelleme ile kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($p=0,015$) artmıştır. Metformin ön koşullama ile ATF5 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmese de IRH modellemeye göre azalma eğilimi göstermiştir.

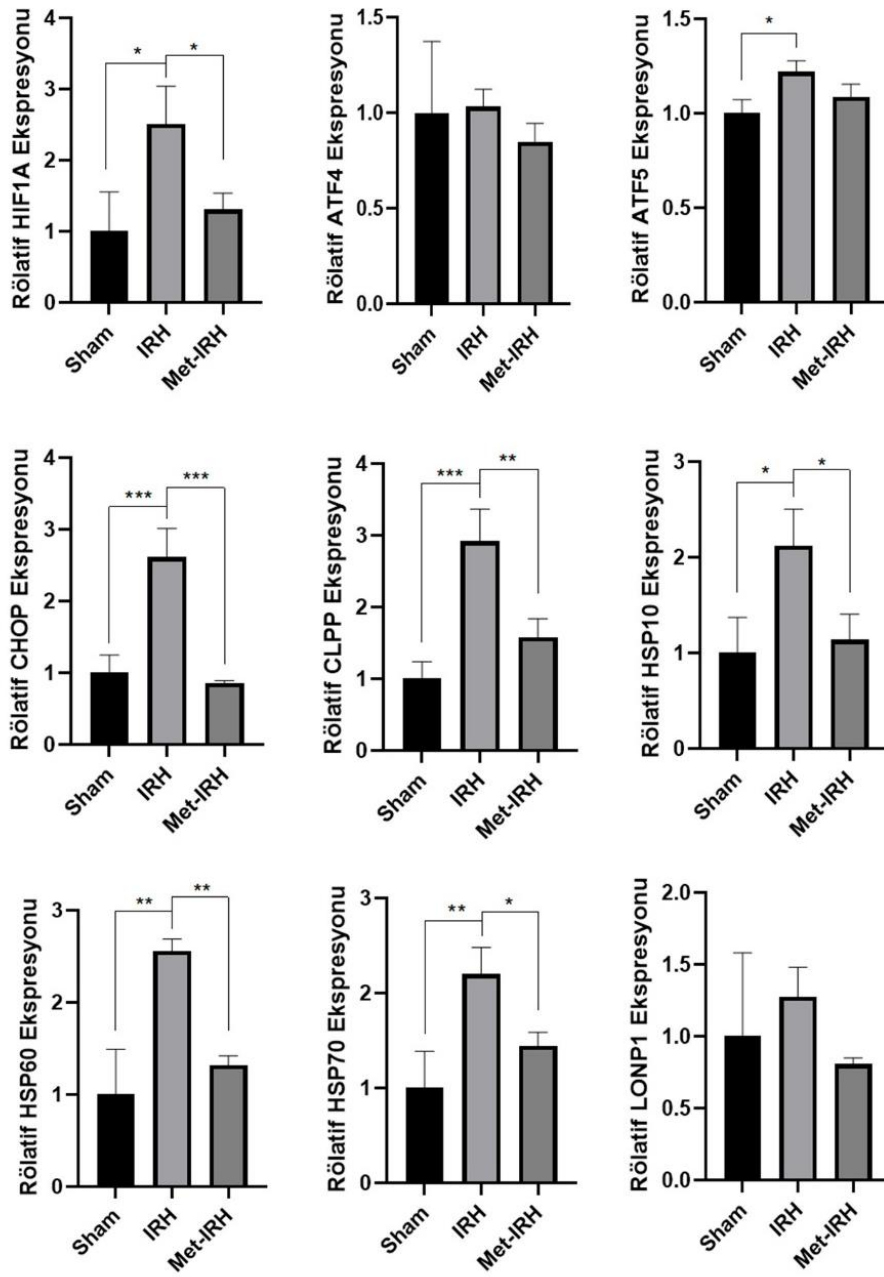
IRH modelleme ile CHOP seviyeleri, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde ($p=0,0008$) artmıştır. Metformin ön koşullama, sadece IRH ile kritik derecede artan CHOP seviyelerini kontrol grubununkine çevirmiştir ($p=0,0005$).

CLPP protein seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla IRH modellemesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p=0,0009$) artmıştır. Metformin ön koşullama ile bu artış, önemli ölçüde ($p=0,006$) azalmıştır.

Şaperon protein seviyeleri IRH modellemesi ile kontrol grubuna kıyasla önem ölçüde artmıştır (HSP10, HSP60 ve HSP70 için sırasıyla $p=0,016$, $p=0,001$ ve $p=0,005$). Metformin ön koşullaması sonrası IRH modelleme ile şaperonların seviyeleri sadece IRH modellemeye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde (HSP10, HSP60 ve HSP70 için sırasıyla $p=0,029$, $p=0,005$ ve $p=0,043$) azalmıştır.



Şekil 4.14. Western Blot görüntüleri. 1-3: sham, 4-6: IRH ve 7-9: Met-IRH. IB: İmmünoblat.



Şekil 4.15. Western Blot ile elde edilen bant kalınlıklarının rölatif kantifikasyonu.

Elde edilen sonuçlar, Tablo 4.3'te özetlenmiştir.

Tablo 4.3. Modellemelerle KPCmt yolağının etkilenmesi amacıyla belirteç proteinlerin seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analiz özeti.

Protein	Fonksiyon	Kontrol/IRH	Kontrol/Met-IRH	IRH/Met-IRH
ATF4	Transkripsiyon faktörü	p>0,05	p>0,05	p>0,05
ATF5	Transkripsiyon faktörü	Artış: p=0,015	p>0,05	p>0,05
CHOP	Transkripsiyon faktörü	Artış: p=0,0008	p>0,05	Azalış: p=0,0005
CLPP	Proteaz	Artış: p=0,0009	p>0,05	Azalış: p=0,006
HSP10	Şaperon	Artış: p=0,016	p>0,05	Azalış: p=0,029
HSP60	Şaperon	Artış: p=0,001	p>0,05	Azalış: p=0,005
HSP70	Şaperon	Artış: p=0,005	p>0,05	Azalış: p=0,043
LONP1	Proteaz	p>0,05	p>0,05	p>0,05

5. TARTIŞMA

Sunulan çalışma, H-IRH'de, KPCmt mekanizmalarının nasıl değiştiğini ve bu değişikliğe metformin ön koşullamasının nasıl etki ettiğini araştırmayı amaçlamıştır.

H-IRH ve metformin ön koşullama sonrası IRH, hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubu varlığında sıçanlarda modellenmiştir. Sıçanlar, NAFLD (184), sirotik karaciğer (185), hepatosellüler karsinom (186) ve kronik karaciğer hastalığı (187) gibi farklı patofizyolojilerin moleküler mekanizmasında sıkça tercih edilmiş bir organizmadır. İnsan fizyolojisine yakınlığı ile uygulama ve bakım kolaylığı nedeniyle (164) çalışma çerçevesinde sıçanlar tercih edilmiştir. Ayrıca, hayvan yaşı ve cinsiyeti deney sonuçlarını etkileyebilecek faktörlerdendir. Bu parametreler için 14-16 haftalık ve dişide döngüye bağlı değişikliklerin ekarte edilebilmesi adına erkek sıçanların tercih edilmesinin doğru olacağı bildirilmiştir (166,167). Bu nedenlerle, çalışmada 14-16 haftalık (~250 g) ve erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Klinikte, karaciğer patofizyolojisi ve/veya karaciğer müdahale ile en sık gelişen iskemi türü, sıcak iskemi olarak isimlendirilen durumdur. Sıcak iskemi, organ transplantasyonu öncesinde donörden alınan karaciğerin saklama koşuluna bağlı olarak gelişen ve soğuk iskemi olarak isimlendirilen durumdan farklı olarak karaciğer rezeksiyonu ve hemorajik şok gibi koşullarda da gelişebilir (188). Ayrıca soğuk iskemi, organın transplantasyon öncesi saklama koşullarının ve sürelerinin optimizasyonu ile göreceli olarak kontrol edilebilir bir durumdur (189). Bu nedenlerle, gerek karaciğerde transplantasyon haricindeki diğer patofizyolojik durumlarla gelişen iskeminin anlaşılabilmesi için sıcak iskeminin modellenmesi önem arz etmektedir ve sunulan çalışmada sıcak iskemi modellenmesi gerçekleştirilmiştir.

Sıçanda hepatic sıcak IRH modellemede farklı stratejiler izlenebilir. Bu stratejiler içerisinde transplantasyon yöntemi, klinik geçerliliği birebir yansıtması açısından en etkili olanıdır. Fakat, operasyonel ve teknik zorluklar bu yaklaşımı sınırlamaktadır (169). Alternatif stratejiler içerisinde ise kontrol edilebilirliği ve farklı yüzdelere iskemi/reperfüzyon modellenenebildiği için parsiyel iskemi yaklaşımı literatürde tercih edilmiştir (176,177). Bu nedenle, sunulan çalışmada belirli sürelerle iskemi ve reperfüzyon

yaratılmıştır. Bir ön çalışmanın sonuçları doğrultusunda, hayvan sağkalımı ve model parametreleri açısından en uygun iskemi ve reperfüzyon süreleri sırasıyla 45 dk ve 6 s olarak belirlenmiştir ve %100 iskemi gerçekleştirilmiştir (Yayınlanmamış veri).

Karaciğer IRH'nin oluşturulmak istenilen iskemi yüzdesinde süreler ve hedef karaciğer bölgesi oldukça önemlidir (190). İskemi için en çok tercih edilen süreler 30, 45, 60 ve 90 dakika şeklindedir. İşlem sonrası ötenazi ya iskemik periyodun sonunda ya da 1, 6 ve 24 saat gibi değişen sürelerin ardından reperfüzyon sonucunda gerçekleştirilir (191). İskemi yüzdelerinde zamana ek olarak seçilen bölgenin kansızlaştırılması belirleyici bir parametredir. Buna göre; %10 iskemi için kaudat, %20 için sağ, %30 için medyan, %40 için sol lateral, %70 için sol lateral ve medyan ve %100 için tüm loblar kansızlaştırılacak şekilde operasyonlar gerçekleştirilir (179). Literatürde farklı zaman aralıkları ve yüzdelerle iskeminin farklı moleküler mekanizmaları tetikleyebileceği bildirilmiştir. Bu çalışmalar çerçevesinde; ilgili süreler ve yüzdelerle iskemik koşullamanın ardından değişen sürelerde reperfüzyon sonrası oksidatif stres, lipit stresi, inflamasyon ve ALT/AST/MDA seviyeleri ortak kabul edilebilecek şekilde artmıştır. Ek olarak, özellikle glutasyon seviyelerinin ortak olarak azalabildiği de görülmüştür (179).

İskemi modellemeleri sonrası reperfüzyonun, model hayvan mortalitesine etki edebileceği çalışmalarda raporlanmıştır. Örneğin 45 dakika %70 iskemik koşullama sonrası reperfüzyon ile %3 oranında mortalite görülmüştür (192). 90 dakika ve %70 iskemik koşullama sonrası reperfüzyon ile 7 günlük takip sürecinde ise hayvan sağkalımının %29 oranlarında olduğu bildirilmiştir (193). Başka bir çalışmada, 90 dakika %100 iskemi ve sonrasında reperfüzyon ile model hayvan sağkalımı %25 olarak tahmin edilmiştir (194). Diğer yandan bir diğer çalışmada, 120 dk %70 ya da %100 iskemik koşullama sonrası reperfüzyon gerçekleştirildiğinde hayvan mortalitelerinin çok yüksek ve sağkalımın %0'a yakın olduğu sonucuna ulaşılmıştır (195).

Çalışma kapsamında tercih edilen 45 dk'lık %100 iskemi ve 6 s'lik reperfüzyon ile istatistiksel geçerliliği sağlamak adına her grup (sham, IRH ve Met-IRH) içerisinde tercih edilen 10 sıçandan, sadece IRH grubu içerisinde bir hayvan kaybı gözlenmiştir. Belirtilen sürelerle global hepatik iskemi ve reperfüzyon, literatürde önceki çalışmalarda modellenmiştir. Bir çalışmada, karaciğerde 45 dk %100 iskemi ve 6 s'lik reperfüzyon sonrası, sıçan modellerinin kalp ritimlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik

saptanmamıştır ve herhangi bir hayvan kaybı raporlanmamıştır (196). Sunulan çalışmada düşük yüzdeli (IRH grubu içerisinde %10 ve tüm gruplarda %0,3) kaybın operasyonel bir aksaklıktan kaynaklandığı düşünülmektedir ve belirlenen iskemi ve reperfüzyon sürelerinin ideal olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Metformin, tip 2 diyabet tedavisinin ilk basamak tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir biguaniddir. Diğer biguanid türevlerine kıyasla toksik özellik sergilememesi ve düşük maliyeti nedeniyle sıkça tercih edilmektedir (197). Plazma glukoz seviyelerini düşürmesinin yanı sıra son yıllardaki çalışmalar, metforminin özellikle ROS seviyelerini azaltarak ve inflamatuvar yolları baskılayarak kanser (198), kardiyovasküler hastalıklar (199), karaciğer hastalıkları (200), nörolojik hastalıklar (201) ve renal anomaliler (202) başta olmak üzere farklı patofizyolojilerin tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Metforminin anti-inflamatuvar rolü, NFkB'nin ekspresyon düzeylerini azaltması ile gerçekleşir. NFkB, içerisinde hücre adezyon proteinlerinin ve pre-inflamatuvar proteinlerin de bulunduğu farklı proteinlerin ekspresyon seviyelerini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Farklı çalışmalar, metformin uygulamasının NFkB aracılı inflamasyonu inhibe ettiğini göstermiştir (203–206). NFkB yolağına ek olarak metforminin C-reaktif protein (CRP), TNF α , IL-6 ve siklooksijenaz 2 (cyclooxygenase-2; COX2) seviyelerini de azaltarak inflamasyonu engelleyebildiği bildirilmiştir (207,208).

Metforminin en önemli sekonder etkileri arasında anti-oksidan özelliği yer almaktadır. Moleküler düzeyde metformin mitokondriyal respiratuvar zincirinin kompleks I'ini inhibe eder ve bu sayede, oksijen tüketim oranları azalır (133). Kompleks I, elektron akışları sayesinde süperoksit anyonlarını üretir (209). Metformin, bu elektron akışını bozarak ROS üretimini azaltır (210). ROS, oksidatif hasar adı verilen bir reaksiyonla DNA'da, lipidlerde ve proteinlerde anomalilere neden olabilecek reaksiyonları tetikler. Bu nedenle, oksidatif fosforilasyonla ATP üretimi, oksidatif hasar riskini beraberinde getirir (211). Ancak metformin, bu süreci baskılayarak aşırı ROS üretimini ve bu nedenle oksidatif hasarı minimize eder (134).

Mitokondriyal respiratuvar zincirinin kompleks I'ini baskılamasıyla oksidatif fosforilasyonu ve bunun sonucunda enerji üretimini baskılamasının yanı sıra metforminin, hepatik glukogenez baskıladığı literatürde sıkça bildirilmiştir. Metformin, mitokondriyal

gliserofosfat dehidrojenazı inhibe ederek laktat ve gliserolün glukozaya dönüşümünü engeller ve hepatic glukogenezini baskılar. Bu enzimatik inhibisyon sayesinde metformin, sitozolik redoksu artırırken mitokondriyal redoksu azaltır (212). Ek olarak, metforminin kanser hücrelerinde ve izole mitokondrideki etkilerine odaklanılan bir çalışmada, bu ajanın aerobik glikolizi arttırdığı ve sitrik asit döngüsünü baskıladığı gösterilmiştir (213).

IRH’de inflamasyon ve aşırı ROS üretimi, bu anomalinin en önemli karakteristik özelliklerindendir. Etkilenen hücre tipine bağlı olarak değişen iskemi sürelerinin uzaması kaçınılmaz bir şekilde nekrozu tetikler. Ayrıca iskemi ile membran potansiyeli ve iyon dağılımı değişir; hücre içi iskelet organizasyonu bozulur; ATP üretimi azalır; GSH seviyeleri düşer; ve hücresel asidoz gerçekleşir. Tüm bu durumlar, hücreleri besleyen kan damarlarının hasar görmesi ile sonuçlanır ve damar içerisine hücre bileşenlerinin geçişine neden olur. Böylece, sistemik bir inflamatuvar cevap gerçekleşir (214,215). Süreye bağlı olarak hücre ölümüne neden olmayan ancak hasara yol açan iskemi sonrası reperfüzyon, iskemi ile oluşan hasarı daha da artırır (216). Reperfüzyonla, iskemi sırasında miktarı azalan ROS seviyeleri çok hızlı artar ve sistemik inflamasyonu arttırabilecek sitokin üretimi devam eder (217,218). Ayrıca, iskemi sırasında oluşan hücresel asidoz, reperfüzyonla birlikte ani bir normale dönüş sağlar. Bu durum, paradoksal bir şekilde hücre toksisitesinin artmasına neden olur (219). İnflamasyon ve ROS süreçlerinin negatif etkilenmesi, metformin uygulamasının IRH’de potansiyel bir çözüm olarak öne çıkmasını sağlamıştır. Bu kapsamda, metformin ön koşullaması ile IRH modellemeleri sıkça çalışılmıştır. Bir çalışmada Wang ve arkadaşları, sıçan miyokardiyal IRH modelinde 100 µM metformin uygulamasının apoptozu engellediğini ve SOD ve katalaz gibi anti-oksidan proteinlerin ekspresyonunu arttırdığını raporlamışlardır (220). Sıçanda renal IRH’nin modellendiği başka bir çalışmada 3 gün 125 µg/kg/gün dozajda metformin koşullamasının IRH ile artan inflamatuvar (IL-6 ve TNFα) ve epitelial-mezenkimal geçiş (epithelial–mesenchymal transition; EMT) belirteçlerinin (dönüştürücü büyüme faktörü beta-1; transforming growth factor beta-1; TGF-β1 ve vimentin) ekspresyon seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (221). Metformin uygulaması sonrası IRH ile değişen moleküler mekanizmaların nasıl etkilendiği kalp (222), beyin (223), yumurtalık (224) ve testis (162) gibi organlar hedeflenerek de çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, farklı konsantrasyonlarda metformin uygulamaları göze çarpmaktadır.

H-IRH’de metformin koşullamasının moleküler mekanizmalara etkileri literatürde çalışılan konular arasındadır. Bu çalışmalarda tercih edilen metformin dozları ve uygulama

süreleri sıçan için intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün; 3 gün, enteral yolla 150 mg/kg/gün; 10 hafta ve belirtilmemiş yolla 10-250 mg/kg/gün; 7 gün şeklindedir (225–227). Metformin koşullamasında sürelerin ve dozların, moleküler düzeyde gerçekleşen etkileri etkileyebileceği bildirilmiştir. Buna göre sıçanda >600 mg/kg/gün dozajının, yan etki olarak minimal nekrozu, inflamasyonu ve metabolik asidozu tetiklediği raporlanmıştır. Ek olarak, >900 mg/kg/gün dozajının toksisite ile sonuçlanabileceği kanıtlanmıştır (228).

Belirlenen parametrelerle modellemeler gerçekleştirildikten sonra, IRH ve metformin ön koşullaması sonrası IRH'nin etkileri öncelikle histopatolojik yöntemlerle belirlenmiştir. Elde edilen histopatoloji görüntüleri konjesyon, vakuolizasyon, nekroz ve nötrofil infiltrasyonu parametreleri açısından Suzuki kriterleri ile kantifiye edilmiştir. Suzuki kriterleri, parametrelerin varlığını ve yoğunluğunu 0-4 arasında belirlemektedir. Buna göre, ilgili parametreye yönelik herhangi bir işaret yoksa 0, genel imaj içerisinde hedef parametrenin dağılımı %0-10 arasında ise 1, %11-30 arasında ise 2, %31-60 arasında ise 3 ve %60'tan fazla ise 4 olarak kantifiye edilir (229). Seçilen parametrelerden konjesyon, artan merkezi venöz basıncı nedeniyle hepatik damarlarda basınç artışı olarak ifade edilir ve karaciğer hasarının takibinde sıkça kullanılır (230). Bir diğer parametre olan vakuolizasyon, hücre membranı geçirgenliğinin artmasıyla intraselüler su içeriğinin yükselmesini ve bu nedenle hücre hacminin artmasını tarif eder. Vakuolizasyon, hücre hasarının belirteçleri arasında yer alır (231). Nekroz, hücrenin inflamasyon yaratacak şekilde kontrolsüz ölüm mekanizması olarak adlandırılır ve bu ölüm yoluyla intraselüler bileşenler kontrolsüz bir şekilde yakın dokulara ya da dolaşıma dahil olur (232). Sunulan çalışmada, histopatolojik görüntülerin Suzuki kriterleri ile değerlendirilmesi sonrası IRH modellemeye konjesyon, vakuolizasyon, nekroz ve nötrofil infiltrasyonu açısından kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. İlginç bir şekilde, metformin uygulaması ile konjesyon, vakuolizasyon ve nekroz parametrelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmesi de nötrofil infiltrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Nekrotik hücre ölümü, hücrenin kontrolsüz denilebilecek şekilde membran integritesini kaybetmesini ve ATP başta olmak üzere inflamasyonu tetikleyebilecek intraselüler bileşenlerinin mikroçevreye yayılmasını tanımlar. Bu nedenle nekroz, inflamasyonu tetikleyen hücre ölüm biçimidir (233). Bu açıdan, IRH modelinde kontrol grubuna göre nekroz ve inflamasyon belirteci olan nötrofil infiltrasyonunun aynı anda artmaması birbirlerini doğrular niteliktedir. Literatürde, iskemiye takiben uygulanan reperfüzyonun 6 saati aşması durumunda inflamasyonun tetikleneceği belirtilmiştir (234). Bu durum, sunulan

çalışmada tercih edilen reperfüzyon süresinin, histolojik düzeyde nekrozu ve inflamasyonu tetiklemede yetersiz kalabileceğine işaret etmektedir. Nekrotik hücre ölümü üzerine gerçekleştirilen çalışmalar, nekroz ile membran integritesinin bozulması için 6 saatten fazla zaman gerektiğini raporlamıştır (235). Bu nedenle, sunulan çalışmada tercih edilen reperfüzyon süresi ile ATP miktarının azalması ve ROS seviyelerinin artması ile nekrotik hücre ölümünün moleküler düzeyde tetiklenmeye başladığını ancak membran integritesinin bu süreler içerisinde korunduğunu göstermektedir. H-IRH'nin, karaciğer hücrelerinde erken nekroza neden olduğunu belirten çalışma (236), bu eleştiriyi doğrular niteliktedir. Önceki çalışmalar, erken nekrotik evrede bile konjesyon ve vakuolizasyonun arttığını göstermiştir (237). Ancak, sunulan çalışmada IRH modelleme ile kontrol grubuna kıyasla konjesyon ve vakuolizasyon parametrelerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Her ne kadar, gruplar içerisindeki bireylerden elde edilen sonuçlar homojen bir dağılım göstermese de (Şekil 19) elde edilen bu sonuçların, uygulama yapılan deneklerdeki öngörülemez parametrelerden kaynaklandığını düşündürmüştür. Metformin ön koşullaması sonrası IRH modelinde, beklenmedik bir şekilde, nötrofil infiltrasyonunda kontrol grubuna göre bir artış görülmüştür. Bu grupta, nekroz parametresi için artış olmaması, inflamasyonda görülen bu artışın nekroz kaynaklı olmayacağına işaret etmektedir. Metforminin, elde edilen bu bulgunun aksine anti-inflamatuar etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (238). Pro-inflamatuar etki ise sadece yüksek metformin dozajları için bildirilmiştir (239). Sunulan çalışmada metformin ön koşullamanın inflammatuar etki sadece denekler arasındaki farklarla ya da metforminin uygulama yöntemi olan gavaj yoluyla açıklanabilir (240).

H-IRH'nin moleküler etkilerini iki fazda incelemek mümkündür. Reperfüzyonun başlangıcından itibaren ilk iki saate işaret eden başlangıç fazı oksidatif stres ile ilişkilidir. Bu fazda ROS üretimi artar ve NO üretimi azalır. Bunun sonucunda, artan ROS, hücrede makromoleküllere atığa geçer ve hepatosellüler hasar gerçekleşir (234,241). Reperfüzyon başlangıcından itibaren 6 saat ve sonrasında kapsayan geç faz ise inflamasyonun gerçekleştiği evredir. Bu evrede aktive nötrofiller hepatositlere hasar verir ve sitotoksikite görülür (234). Bu süreçte görülen hücre ölümü çoğunlukla nekrozdur, ancak apoptoz da gerçekleşebilir (237). Fakat, IRH ile açığa çıkan bu moleküler süreçler, iskemi ve reperfüzyon sürelerine ve iskemi yüzdesine bağlı olarak değişir (179).

Sunulan çalışmadakine benzer şekilde, literatürde reperfüzyon süreleri farklı olsa da 45 dk ve %100 iskemi gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur. Total hepatik iskeminin 45 dk

boyunca modellendiği ve 60 dk reperfüzyon gerçekleştirilen bir çalışmada, IRH modelleme ile plazma ALT, AST, MDA ve MPO seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı ve GSH seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (242). IRH ile AST ve ALT seviyelerindeki artış 45 dk %100 iskemi ve 45 dk reperfüzyon modelinin çalışıldığı başka bir çalışmada da raporlanmıştır (243). ALT ve AST, L-alaninin ve L-aspartatın amino grubunun α -ketoglutarata transferini katalizleyen enzimlerdir. ALT karaciğere spesifik bir enzimken AST karaciğere ek olarak kas, böbrek ve beyin gibi farklı organları oluşturan hücrelerde eksprese edilir. Serum ALT ve AST seviyeleri normal koşullarda düşüktür (<30-40 U/L). Ancak serumda artan ALT ve AST seviyeleri karaciğer hasarına işaret etmektedir (244,245). Normal koşullar altında intraselüler olan bu enzimlerin seruma geçişi karaciğer hücrelerinin nekrozu ile gerçekleşir (246). Bu nedenle, serum ALT ve AST seviyelerinin belirlenmesi, olası karaciğer hasarının belirteci olarak kabul edilir (244,245). Sunulan çalışmada, beklenildiği üzere IRH modellemesi ile ALT ve AST seviyeleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Tablo 4). Normal koşullarda <30-40 U/L olan ALT ve AST seviyelerinin IRH modellemesi ile 2000 U/L seviyelerine çıktığı görülmüştür. Kritik bir öneme sahip olacak şekilde metformin ön koşullaması sonrası IRH modellemesi, sadece IRH modellemeye kıyasla ALT ve AST seviyelerini anlamlı şekilde azaltabilmiştir ve kontrol grubuna yaklaştırmıştır (Tablo 3). Elde edilen bu sonuç, 30 dk parsiyal hepatik iskeminin modellendiği ve metformin uygulamasının AST ve ALT seviyelerini azalttığına gösterildiği çalışmayı (9). Literatür bilgileri eşliğinde, sunulan çalışmada elde edilen sonuç, metformin ön koşullamasının H-IRH ile oluşan karaciğer hasarını önleyebildiğini göstermektedir.

H-IRH’de olası nekroza bağlı olarak AST ve ALT seviyelerinin yükselişine ek olarak, oksidatif stres ve inflamasyon IRH’nin diğer belirgin özelliklerindendir. ROS, TOS, GSH, MDA ve MPO seviyeleri, oksidatif stresin belirlenmesinde kullanılan belirteçlerdendir. MDA, ROS’un etki mekanizmasında olduğu gibi proteinler başta olmak üzere makromoleküllere zarar veren bir çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunu ürünüdür (247). MPO, genellikle nötrofillerde ve monositlerde eksprese edilen hem peroksidaz (heme peroxidase) ailesinin bir üyesidir ve bu enzim ile gerçekleşen reaksiyonlar sonucu serbest radikaller oluşur (248). Öte yandan, MDA ve MPO oksidatif stres sonrası inflamasyonun tetiklenmesinde de rol oynarlar (247,248). Bu bileşen ve proteinin aksine, memelilerde en sık bulunan tiyol olan GSH, reaktif nükleofillerin detoksifikasyonunu sağlayan önemli bir antioksidandır (249). Önceki çalışmalar, H-IRH modellemesi ile karaciğerde ROS, TOS,

MPO ve MDA seviyelerinde artışı ve GSH seviyelerinde azalışı raporlamışlardır (Tablo 3) (179). Bu sonuçlarla uyumlu bir şekilde, sunulan çalışmada, IRH modellemesi ile ROS, TOS ve MPO seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış ve GSH seviyelerinde azalış göstermiştir (Tablo 4). ROS'lar ile direkt etkileşimi ve AMPK aracılı sinyal yolağı sayesinde antioksidan özellik gösteren (250) metformin uygulaması ise ROS ve TOS seviyelerini, IRH modellemeye kıyasla anlamlı bir şekilde azaltmıştır (Tablo 4). Bu sonuçlar, metforminin nekrozu önleme katkısına ek olarak IRH ile gelişen oksidatif stresi önlediğine işaret etmektedir. Ancak, MDA seviyeleri kontrol grubuna göre IRH modelinde değişmezken metformin ön koşullaması sonrası IRH modelleme grubunda anlamlı bir artış göstermiştir. MDA, etanolün ilk metaboliti olan asetaldehit varlığında, hepatik hücrelerde protein eklentileri (adduct) oluşturur. Bu nedenle, MDA ile alkolik karaciğer hasarı arasında bir ilişki kurulmuştur. Bu nedenle, karaciğer hasarı varlığında MDA seviyelerinin artması beklenir (251). Ancak bu artışın, metformin uygulaması ile azalması gerektiği öngörülebilmektedir. Tip 2 diyabet hastalarıyla gerçekleştirilen bir çalışma, metformin tedavisinin hastalarda serum MDA seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir. Benzer şekilde, metformin uygulaması MDA seviyelerini böbrek IRH modelinde de düşürmüştür (252,253). Bu nedenle, sunulan çalışmada MDA özelinde elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu değildir. Ancak MDA'nın inflamasyonla ilişkisi ve histopatolojik sonuçlara göre metformin ön koşullaması ile inflamasyonun tetiklendiğinin gösterilmesi, bu iki metot sonucunun, seçilen metformin dozu ve ön koşullama zamanına bağlı olarak birbirlerini desteklediğini kanıtlamaktadır. Metformin ön koşullaması ile inflamasyon ve MDA seviyelerindeki artış bireyler arasındaki öngörülemeyen farklılıklarla açıklanabilir, ancak bu sonuçların olası nedenlerinin daha detaylı araştırılması için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Moleküler düzeyde inflamasyon, MDA ve MPO'ya ek olarak interlökin ve sitokin gibi pro-inflamatuar belirteçlerin tespiti ile gerçekleştirilebilir (254). $TNF\alpha$, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması ve apoptoz da dahil olmak üzere özellikle inflamasyonda görev alan pro-inflamatuar bir sitokindir. $TNF\alpha$, reseptörleriyle etkileşimi aracılığıyla tetiklediği sinyal transdüksiyonu sonrası, vazodilasyon ve lökosit etkileşimi başta olmak üzere inflamatuvar süreçleri başlatabilir (255). Bu nedenle, IRH modelleme çalışmalarında inflamasyonun izlenmesi için önemli parametrelerden bir tanesi olmuştur ve bu çalışmalarda IRH ile $TNF\alpha$ seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (179). Sunulan çalışmada da $TNF\alpha$ seviyeleri, kontrol grubuna göre IRH modelleme ile anlamlı bir artış göstermiştir (Tablo 3). Ancak MDA için geçerli olduğu üzere, metformin ön koşullaması ile de $TNF\alpha$ seviyeleri

kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Elde edilen bulgular, histopatolojik sonuçlarla uyum gösterse de önceki çalışmalar, metformin uygulamasının TNF α seviyelerini azalttığını göstermektedir (221). MDA ve TNF α için elde edilen sonuçlar için metforminin uygulanma süresi, dozajı ve bireyler arasındaki farklılıklar ile yapılabilecek açıklamalara ek olarak, uygulama metodu da bu sonuçların eldesinde bir parametre olabilir. Metformin uygulaması için tercih edilen gavaj yolunun, karaciğerde inflamasyonu tetikleyebildiği bildirilmiştir (240). Bir çalışmada oral gavaj yoluyla ancak yüksek dozda (1200 mg/kg/gün) ve 13 hafta metformin uygulaması ile inflamasyonun tetiklenebileceği bildirilse de (239) sunulan çalışmada inflamatuvar belirteçlerin metformin ile değişiminin doğrulanması ve olası mekanizmaların anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

H-IRH'de iskemi ile gerçekleşen hipoksik koşulda oksijen kısıtlılığı, hücrenin oksidatif fosforilasyon olmadan ATP üretmesini gerektirir. Bu nedenle, IRH ile ATP üretimi azalır (256). Sunulan çalışmada da ATP seviyeleri, IRH modelleme ile kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır (Tablo 4). Metformin uygulaması ile daha düşük bir azalış görülse de metformin ATP üretimini IRH modellemeye kıyasla anlamlı derecede arttıramamıştır. Metforminin mitokondride kompleks I'ı inhibe etmesi ve ATP üretimini normalde azaltmaya çalışması (8), bu durumun açıklaması şeklinde yorumlanabilir.

H-IRH'de iskemi ile gerçekleşen hipoksik koşula adaptasyonun, HIF-1 proteini ile gerçekleştiği belirtilmiştir. HIF, heterodimer oluşumu ile aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. Normoksik koşullarda HIF proteinleri üretilir ve hızlıca degrade edilir. Oksijen varlığı, proteinin oksijene bağlı degradasyon domaininde hidroksilasyon reaksiyonunu indükler ve protein ubiquitinlenerek degrade edilir. Hipoksik koşullarda ise hidroksilasyon reaksiyonu gerçekleşemez ve protein stabil kalır. Stabil HIF proteini heterodimerler oluşturarak DNA'daki hipoksi cevap elementlerine (hypoxia response elements; HRE) bağlanır. HIF heterodimerleri hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez, ilaç dirençliliği ve enerji metabolizması gibi önemli mekanizmalarda rol oynayan genlerin ekspresyon seviyelerini düzenler (257,258). İskemi ile hipoksinin HIF-1'in ekspresyon seviyesini arttırdığı ve bu sayede oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz süreçlerinin azaltıldığı gösterilmiştir (259). Ayrıca, H-IRH sırasında gerçekleşen hipoksi ile artan HIF-1 ekspresyonunun anjiyogenezi, glikolizisi, kolajen matriks regülasyonu ve oksijen taşınımını arttırabildiği raporlanmıştır (260). Bu çalışmalar, HIF-1'in IRH'de hipoksik koşullara adaptasyonu için kritik bir belirteç olduğunu kanıtlamaktadır. Sunulan çalışmada, IRH

modellemesi ile HIF-1 seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu durum, IRH modellemesi ile karaciğerde hipoksik koşulların gerçekleştiğini kanıtlar niteliktedir. Literatürde farklı hastalık modelleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda, metformin uygulamasının hipoksi ile artan HIF-1 seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (261–263). Bu çalışmalarla uyumlu olacak şekilde, sunulan çalışmada metformin ön koşullaması, IRH modellemesi oluşan hipoksik koşullarla artan HIF-1 seviyelerini azaltmıştır.

Modellemeler sonrası KPCmt yolağının nasıl etkilendiği, belirteç proteinlerin seviyelerinin Western Blot yöntemi ile tespit edilmesi aracılığıyla belirlenmiştir. Buna göre, ATF4 ve LONP1 seviyeleri gruplar arasında anlamlı bir şekilde değişmemiştir; ATF5 seviyeleri kontrol grubuna göre IRH modelleme ile anlamlı bir şekilde artmıştır; CHOP, CLPP, HSP10, HSP60 ve HSP70 seviyeleri kontrol grubuna göre IRH modelleme ile artmış ve metformin ön koşullaması ile bu artış tersine dönmüştür.

H-IRH’de KPCmt’nin nasıl etkilendiğine dair literatürde herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle sunulan çalışma özgündür. Bir derleme çalışmada, KPCmt mekanizması ile H-IRH ilişkilendirilmeye çalışılsa da ilgili bölümde sadece KPCmt belirteci olan ATF4’ün H-IRH’deki ekspresyon değişimi bildirilmiştir ve bu konu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır (264).

Memelide KPCmt, birden fazla moleküler yolakla indüklenebilir. Bunlar, ilk aydınlatılan ve kanonik yolak olarak bilinen ATF4/ATF5-CHOP, SIRT3, ER- α , ısı şoku transkripsiyon faktörü 1 (heat shock transcription factor 1; HSF1)/mitokondriyal tek zincir DNA bağlanma proteini 1 (single stranded DNA binding protein 1; SSBP1) ve çok daha az çalışılmış olan fibroblast büyüme faktörü 21 (fibroblast growth factor 21; FGF21)/büyüme farklılaşma faktörü 15 (growth differentiation factor 15; GDF15) yolaklarıdır. Bu yolaklar içerisinde en iyi aydınlatılmış KPCmt mekanizmasında bir transkripsiyon faktörü olan CHOP önemli bir rol oynar. Bu yolakta, intra- ya da ekstraselüler stres koşullarına bağlı olarak ER ve mitokondrinin dahil olduğu bir ISR oluşur. ISR ile aktive olan sitozolik PRK benzeri ER kinazı (PERK), eIF2 α ’nın nükleusa lokalize olmasını sağlar. Bir transkripsiyon faktörü olan eIF2 α , diğer transkripsiyon faktörleri olan ATF4’ün, ATF5’in ve CHOP’un ekspresyonları artırır (31).

Normal koşullarda altında ATF5, mitokondriye lokalize olarak Lon peptidaz 1 (LONP1) adı verilen proteaz tarafından degrade olur. Ancak, stres koşullarında, ATF5'in mitokondriye lokalizasyonu, henüz bilinmeyen faktörlerce engellenir. ATF5'in sitoplazmik birikimi sonrasında nükleer translokasyon gerçekleşir. ATF5 nükleusta, bir transkripsiyon faktörü olarak KPCmt elementlerine bağlanır ve spesifik genlerin ekspresyonunu artırır. Bu genler, stres koşuluna bağlı olarak mitokondride biriken katlanmamış ya da hatalı katlanmış protein eliminasyonunu sağlayabilecek mitokondriyal ısı şok proteinlerini (heat shock protein; HSP; HSP10, HSP60 ve mtHSP70), LONP1'i ve kazeinolitik mitokondriyal matriks peptidaz preolitik alt birim (caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit; CLPP) proteazını kodlarlar (265). Bu açıdan, sunulan çalışmada, ATF5 ve CLPP seviyelerinin artması, KPCmt'nin kanonik yolağının aktivasyonuna işaret etmektedir.

Kanonik KPCmt yolağında amaç, HSP'lerin ekspresyon seviyesini arttırmak ve mitokondriyal bütünlüğü korumaktır (31). HSP'ler, keşfedilişleri itibariyle ısı stresinde devreye giren proteinleri ifade eder (266). Daha sonra bu proteinler, moleküler şaperonlar sınıfına dahil edilmişlerdir. HSP'ler ve diğer şaperonlar, yeni sentezlenen polipeptidlerin doğru katlanmasına, yarı kararsız proteinlerin tekrar katlanmasına, protein agregatlarının ayrıştırılmasına ve yanlış katlanan proteinlerin degradasyonuna katkıda bulunan entegre sistemlerdir. Şaperon fonksiyonlarına ek olarak HSP'ler, hücre sinyal transdüksiyonuna, hücre döngüsüne ve apoptozun regülasyonuna dahil olurlar. HSP'leri kodlayan genlerin promoter bölgelerinde bulunan HSP elementleri, stres koşullarında HSF adı verilen spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına izin verin vererek HSP sentezini kontrol altına alır (267). HSP'ler içerisinde en çok dikkat çeken üyelerden bir tanesi HSP60'dır. HSP60, mitokondride lokalize olur ve mitokondriyal proteinlerin katlanma problemlerini ortadan kaldırır. HSP60, HSP10 ile koopere çalışır. Geniş hücre içi lokalizasyon yetenekleri ile HSP70 de sitoplazma, nükleus ve ER'nin yanı sıra mitokondriye lokalize olabilir (268). HSP'ler ısı, hipoksi, oksidatif stres, DNA hasarı ve yanlış katlanmış protein birikimi gibi stres koşulları altında devreye girerek çevresel koşulları tamponlayarak hücre yapısını ve metabolizmasını korurlar (269). Stres altında, HSF'ler sensör özelliği görürler. Buna göre, normal koşullarda HSP ile kompleks oluşturarak inaktif halde tutulurlar. Ancak, stres koşullarının varlığı ile HSP'lerden ayrılırlar ve nükleusa lokaliz olurlar. Burada, ani ve daha fazla HSP üretimi tetiklerler (270). HSP'lerin hücre yapısını ve metabolizmayı regüle ederek ve anti-apoptotik proteinlerle etkileşerek hücre sağkalımını sağladığı vurgulansa da HSP60 ve HSP70 gibi proteinlerin, stres koşulları altında farklı moleküler yollarla apoptozu

tetikleyebileceği de belirtilmiştir (271,272). Sunulan çalışmada, IRH modelleme ile ATF5 ve CHOP ekspresyonunun artışına bağlı olarak HSP10, HSP60 ve HSP70 seviyeleri kontrol grubuna göre artmıştır. Bu proteinlerin seviyelerindeki artış, IRH ile KPCmt yolağının kanonik aktivasyonunun kanıtı niteliğindedir.

Sunulan çalışma kapsamında, KPCmt yolaklarından kanonik mekanizmaya odaklanılmıştır. Bu amaçla, ATF4, ATF5 ve CHOP transkripsiyon faktörleri hedef belirteç olarak seçilmiştir. Ancak bu proteinler, sadece KPCmt’de değil endoplazmik KPC’de de görev alabilmektedir. ER’de görülen KPC ile KPCmt, ortaklaşabilen mekanizmalardır ve iki cevap birden ISR’nin birer bileşenidir (273,274). Bu transkripsiyon faktörlerine benzer şekilde LONP1 ve HSP’ler de her iki organelde görülen KPC’de ortaklaşır (275). Ancak CLPP, KPCmt’nin diferansiyel bir belirteçidir (276). Bu açıdan, IRH modelleme ile KPCmt’nin kesin olarak aktive edildiği belirtilebilir. Yine de IRH ile mitokondriyal fonksiyonun ve bütünlüğünün nasıl etkilendiği açığa çıkartılmalıdır ve bu husus grubumuzca araştırılmaya devam edilmektedir.

ATF4, ER ve mitokondride ortak aktive KPC’de rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. ATF4 stres koşulu varlığında, içerisinde CHOP’un da olduğu farklı proteinlerin ekspresyonunu artırır (277). CHOP, proteazları ve şaperonları içeren proteinlerin ekspresyonunu arttırarak stres koşullarında oluşan katlanmamış proteinlere cevap oluşturabilen bir diğer transkripsiyon faktörüdür (278). Bu iki transkripsiyon faktörüne odaklanan H-IRH çalışmaları, bu proteinlerin ekspresyon seviyelerinin IRH ile arttığını göstermiştir. Bir çalışmada ATF4’ün ekspresyon seviyesinin azaltılmasının IRH’nin etkilerinin ortadan kaldırılmasına katkı sağladığı raporlanmıştır (279). Benzer bir çalışmada, H-IRH ile artan ATF4 ve CHOP düzeylerinin apoptozu tetikleyerek karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (280). Sunulan çalışmada ATF4 seviyeleri, gruplar arasında anlamlı bir şekilde değişmemiştir. Ancak, CHOP seviyeleri kontrol grubuna göre IRH modelleme ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarken metformin ön koşullaması bu durumu tersine çevirebilmiştir. CHOP, bir diğer transkripsiyon faktörü ve KPC belirteci olan ATF5 ile ikili bir ilişki üstlenir ve bu iki transkripsiyon faktörü birbirlerinin ekspresyon seviyelerini düzenleyebilir. Buna göre, CHOP-ATF5 ekspresyon seviyesinin stres koşullarına bağlı olarak artışı, apoptozu tetikler (281,282). Sunulan çalışmada IRH modelleme ile ATF5’in ekspresyon seviyesi anlamlı şekilde artmıştır. Bu nedenle, IRH modelleme ile artan CHOP seviyelerinin artan ATF5 ekspresyonuna bağlı olduğu

düşünülebilir. Stres koşullarında ekspresyonu değişebilecek olan bir diğer önemli protein CLPP'dir. CLPP, ATP kullanımı gerektiren bir serin proteazdır (283). CLPP ekspresyonunun, mitokondriyal fizyon ve füzyon olaylarını azaltarak mitokondri yapısının ve fonksiyonunun korunmasında önemli olduğu vurgulanmıştır (284). Sunulan çalışmada CLPP seviyeleri IRH modelleme ile kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir. Bu durum, IRH ile mitokondri yapı ve/veya fonksiyonunun negatif etkilendiğinin göstergesi niteliğindedir. CLPP ekspresyonu ATF5 ile kontrol edilir (285). Bu bakımdan, IRH modelinde artan ATF5 seviyelerinin CLPP ekspresyonunu arttırdığı görülmektedir. Metformin ön koşullaması ile ATF5 seviyeleri kontrol grubuna göre değişmediğinden, CLPP seviyelerinin artmaması beklenen bir durumdur. ATF5 aktivasyonuna bağlı olarak bir diğer proteaz olan LONP1 ve HSP10, HSP60 ve HSP70 gibi şaperonların ekspresyon seviyeleri artmaktadır. Bu sayede, herhangi bir stres koşulu varlığında mitokondride hasar oluşumu minimize edilmeye çalışılır (286). Sunulan çalışmada da bu bulguları destekleyecek şekilde şaperonların ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Ancak LONP1 seviyeleri gruplar arasında değişmemiştir. Metformin ön koşullaması, bu artışları anlamlı derecede azaltabilmiştir. LONP1 karaciğerde aynı zamanda glukogenezin kontrolünde rol oynamaktadır (287). Metabolik bir sürece dahil olması nedeniyle LONP1 seviyelerinin IRH modelleme ile değişmeyeceği düşünülebilir.

Literatürde, metabolik ya da yaşlılıkla ilişkili hastalıklarda KPCmt'nin geçici aktivasyonunun, enerji homeostazisi ve mitokondriyal bütünlüğün korunması açısından yararlı olabileceği bildirilmiştir (27). Fakat, uzayan stres koşulu süresine bağlı olarak KPCmt'nin uzun süreli aktivasyonunun, özellikle kanserde stres koşullarına adaptasyonu arttırabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, uzun süreli KPCmt aktivasyonu, mitokondriyal hasar artarken stres koşulunun devam etmesi ile önce mitofaji ve ardından hücre ölüm mekanizmalarının devreye girmesi ile sonuçlanabilir (288). Çalışma ile IRH'nin KPCmt'yi tetiklemesi ve metformin uygulaması ile KPCmt'nin ve karaciğer hasarının azaltılabilmesi, H-IRH'de belirtilen modelleme süreleri ile KPCmt'nin negatif bir rol oynadığına işaret etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğerdeki I/R mekanizmalarının anlaşılması, karaciğer transplantasyonu sonrası görülebilecek organ reddinin nedenlerinin ortaya çıkarılmasını mümkün kılar. Transplantasyon sonrası gelişen süreçler, doku uyumuna rağmen, donöre, alıcıya ve organ saklama koşullarına bağlı olarak değişir. Transplantasyon sonrası doku reddinde, bu parametrelere bağlı olarak en sık gerçekleşen mekanizma IRH'dir. Literatürde H-IRH'nin moleküler olarak hangi yolları etkilediği, hayvan modellemeleri ile çalışılmaya devam edilmektedir.

H-IRH'de, literatürde özellikle enerji metabolizması üzerine yoğunlaşmıştır. Hücresel düzeyde enerji metabolizması, mitokondrinin rol oynadığı süreçlerle yönetilir. Bu bakımdan, mitokondriye yönelik yolların aydınlatılması karaciğer fizyolojisinin ve transplantasyonla görülecek IRH'nin anlaşılabilmesine ve bu anomalinin yönetimine katkı sağlayacaktır. Ancak IRH gibi stres koşulları altında, KPCmt yolağının nasıl etkilendiğine dair detaylı bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Bu noktadan hareketle, sunulan proje KPCmt yolağını H-IRH'de araştırmayı amaçlamıştır. Olası bir çözüm olarak ise IRH ile bir problem olarak açığa çıkacağı bilinen oksidatif stresi baskılayabileceği savı ile bilinen metformin tercih edilmiştir. Üç grup halinde ayrılan hayvanlarda, kontrol grubu varlığında IRH ve metformin ön koşullama ile IRH modellenmiştir.

Modellemeler sonrası karaciğer dokularındaki kümülatif etki histopatolojik metotlarla incelenmiştir. Ancak Suzuki kriterleri ile kantifiye edilen konjesyon, vakuolizasyon ve nekroz parametreleri için gruplar arasında bir fark görülmemiştir. Bu durum, gruplar içinde kullanılan bireylere deneklere ait sonuçların homojen olmaması ve deviasyonun fazla olması ile açıklanabilir. Yine de olası nedenlerin anlaşılmasına yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Beklentinin aksine, nötrofil infiltrasyonu parametresi için IRH modelleme ile bir artış gözlenmezken metformin ön koşullaması sonrası IRH modelinde artış görülmüştür. İnflamasyonun bu grupta tetiklenmesi, biyokimyasal olarak gösterilmiştir. Düşük doz metformin uygulamasının inflamasyonu tetiklemesi literatürle uyumlu değildir. Olası açıklamalar arasında, metformin uygulaması için tercih edilen gavaj yolu gösterilebilir. Fakat, metforminin bu etkisinin daha da netleştirilmesi için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

H-IRH modelinde, beklendiği üzere karaciğer hasarı görülmüştür. Bu durum, IRH modelinde artan ALT ve AST seviyeleri ile gösterilmiştir. Ayrıca IRH, ROS, TOS ve MPO seviyelerini arttırarak ve GSH seviyelerini azaltarak oksidatif strese neden olmuştur. Kritik bir öneme sahip olacak şekilde metformin uygulaması, IRH ile oluşan karaciğer hasarını ve oksidatif stresi baskılayabilmiştir.

KPCmt belirteçleri üzerinden elde edilen sonuçlara göre IRH karaciğerde KPCmt yolağını tetikler. Bu artışın, karaciğer hasarına neden olacak apoptoz ile sonuçlanacağı düşünülmektedir. Metformin ön koşullaması ise KPCmt'yi baskılar ve bu sayede apoptoz ve neticesinde karaciğer hasarı minimize edilir. Bu nedenle, transplantasyon öncesi alıcıya, insana korele dozajlar ve sürelerle metformin ön koşullamasının H-IRH'yi baskılayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Campbell I. 51 ANAESTHESIA AND INTENSIVE CARE MEDICINE 7:2 Liver: metabolic functions Functions of the liver. 2006.
2. Ozougwu JC. Physiology of the liver. Vol. 4, International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences. 2017.
3. Zarrinpar A, Busuttil RW. Liver transplantation: Past, present and future. Vol. 10, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2013. p. 434–40.
4. Merion RM, Schaubel DE, Dykstra DM, Freeman RB, Port FK, Wolfe RA. The survival benefit of liver transplantation. American Journal of Transplantation. 2005 Feb;5(2):307–13.
5. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation-from bench to bedside. Vol. 10, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2013. p. 79–89.
6. Dar WA, Sullivan E, Bynon JS, Eltzschig H, Ju C. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: Cellular and molecular mechanisms. Vol. 39, Liver International. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 788–801.
7. Jiang A, Du P, Liu Y, Pu J, Shi J, Zhang H. Metformin regulates the Th17/Treg balance by glycolysis with TIGAR in hepatic ischemia-reperfusion injury. J Pharmacol Sci. 2021 May 1;146(1):40–8.
8. Osorio-Llanes E, Villamizar-Villamizar W, Ospino Guerra MC, Díaz-Ariza LA, Castiblanco-Arroyave SC, Medrano L, et al. Effects of Metformin on Ischemia/Reperfusion Injury: New Evidence and Mechanisms. Vol. 16, Pharmaceuticals. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
9. Piao C, Wang Y, Lu X, Liu T, Ma Y, Li Y, et al. Met-Exo attenuates mitochondrial dysfunction after hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by modulating AMPK/SIRT1 signaling pathway. Free Radic Biol Med. 2024 Mar 1;213:430–42.
10. Koumenis C, Bi M, Ye J, Feldman D, Koong AC. Hypoxia and the Unfolded Protein Response. Vol. 435, Methods in Enzymology. 2007. p. 275–93.

11. Shpilka T, Haynes CM. The mitochondrial UPR: Mechanisms, physiological functions and implications in ageing. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 109–20.
12. Tagliavacca L, Caretti A, Bianciardi P, Samaja M. In vivo up-regulation of the unfolded protein response after hypoxia. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2012 Jul;1820(7):900–6.
13. Bartoszewska S, Collawn JF. Unfolded protein response (UPR) integrated signaling networks determine cell fate during hypoxia. Vol. 25, *Cellular and Molecular Biology Letters*. BioMed Central Ltd.; 2020.
14. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. Vol. 21, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research; 2020. p. 421–38.
15. da Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Ramos MJ, Antunes A. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*. 2008 Mar 4;9.
16. Yalçın Y, Ataç FB. “Mitokondri ve Peroksizom.” In *İnsan Moleküler Biyolojisi*. Editors: Aydos OS, Ataç FB, Yurter HE, Sunguroğlu A. Hipokrat Kitabevi. 2023.
17. Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. Vol. 15, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 634–46.
18. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: From proteomics to functional mechanisms. Vol. 11, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. p. 655–67.
19. Morio B, Panthu B, Bassot A, Rieusset J. Role of mitochondria in liver metabolic health and diseases. *Cell Calcium*. 2021 Mar 1;94.
20. Gong J, Tu W, Liu J, Tian D. Hepatocytes: A key role in liver inflammation. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
21. Bragoszewski P, Turek M, Chacinska A. Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin - Proteasome system. Vol. 7, *Open Biology*. Royal Society of London; 2017.

22. Hanif Sayyed UM, Mahalakshmi R. Mitochondrial protein translocation machinery: From TOM structural biogenesis to functional regulation. Vol. 298, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2022.
23. Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. Vol. 20, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 267–84.
24. Song J, Herrmann JM, Becker T. Quality control of the mitochondrial proteome. Vol. 22, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research; 2021. p. 54–70.
25. Zhou Z, Fan Y, Zong R, Tan K. The mitochondrial unfolded protein response: A multitasking giant in the fight against human diseases. Vol. 81, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2022.
26. Casteilla L, Rigoulet M, Pénicaud L. Mitochondrial ROS metabolism: Modulation by uncoupling proteins. Vol. 52, *IUBMB Life*. Taylor and Francis Inc.; 2001. p. 181–8.
27. Yi HS, Chang JY, Shong M. The mitochondrial unfolded protein response and mitohormesis: A perspective on metabolic diseases. Vol. 61, *Journal of Molecular Endocrinology*. BioScientifica Ltd.; 2018. p. R91–105.
28. Castro JP, Wardelmann K, Grune T, Kleinridders A. Mitochondrial chaperones in the brain: Safeguarding brain health and metabolism? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Apr 26;9(APR).
29. Naresh NU, Haynes CM. Signaling and regulation of the mitochondrial unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019 Jun 1;11(6).
30. Muñoz-Carvajal F, Sanhueza M. The Mitochondrial Unfolded Protein Response: A Hinge Between Healthy and Pathological Aging. Vol. 12, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020.
31. Zhu MX, Ma XF, Niu X, Fan G bo, Li Y. Mitochondrial unfolded protein response in ischemia-reperfusion injury. *Brain Res*. 2022 Dec 15;1797.
32. Münch C. The different axes of the mammalian mitochondrial unfolded protein response. Vol. 16, *BMC Biology*. BioMed Central Ltd.; 2018.

33. English BC, Van Prooyen N, Örd T, Örd T, Sil A. The transcription factor CHOP, an effector of the integrated stress response, is required for host sensitivity to the fungal intracellular pathogen *Histoplasma capsulatum*. *PLoS Pathog*. 2017 Sep 1;13(9).
34. Kasai S, Shimizu S, Tatara Y, Mimura J, Itoh K. Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive oxygen species in physiology and pathology. Vol. 10, *Biomolecules*. MDPI AG; 2020.
35. Böttlinger L, Oeljeklaus S, Guiard B, Rospert S, Warscheid B, Becker T. Mitochondrial heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp10 cooperate in the formation of Hsp60 complexes. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 May 1;290(18):11611–22.
36. Moro F, Okamoto K, Donzeau M, Neupert W, Brunner M. Mitochondrial protein import: Molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with Tim44. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Mar 1;277(9):6874–80.
37. Zheng J, Shi L, Liang F, Xu W, Li T, Gao L, et al. Sirt3 ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction after intracerebral hemorrhage in diabetic rats. *Front Neurosci*. 2018 Jun 19;12(JUN).
38. Liu P, Huang G, Wei T, Gao J, Huang C, Sun M, et al. Sirtuin 3-induced macrophage autophagy in regulating NLRP3 inflammasome activation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 Mar 1;1864(3):764–77.
39. Gibellini L, Pinti M, Beretti F, Pierri CL, Onofrio A, Riccio M, et al. Sirtuin 3 interacts with Lon protease and regulates its acetylation status. *Mitochondrion*. 2014 Sep 1;18:76–81.
40. Sutandy FXR, Gößner I, Tascher G, Münch C. A cytosolic surveillance mechanism activates the mitochondrial UPR. *Nature*. 2023 Jun 22;618(7966):849–54.
41. Kenny TC, Germain D. From discovery of the CHOP axis and targeting ClpP to the identification of additional axes of the UPRmt driven by the estrogen receptor and SIRT3. *J Bioenerg Biomembr*. 2017 Aug 1;49(4):297–305.
42. Xu WN, Zheng HL, Yang RZ, Sun YF, Peng BR, Liu C, et al. The mitochondrial UPR induced by ATF5 attenuates intervertebral disc degeneration via cooperating with mitophagy. *Cell Biol Toxicol*. 2024 Dec 1;40(1).

43. Uoselis L, Lindblom R, Lam WK, Küng CJ, Skulsuppaisarn M, Khuu G, et al. Temporal landscape of mitochondrial proteostasis governed by the UPR mt [Internet]. 2023. Available from: <https://www.science.org>
44. Martinus RD, Garth GP, Webster TL, Cartwright P, Naylor DJ, Høj PB, et al. Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur J Biochem*. 1996 Jan 1;240(1):98–103.
45. Lee Y, Heo JY, Ju X, Cui J, Ryu MJ, Lee MJ, et al. General anesthesia activates the mitochondrial unfolded protein response and induces age-dependent, long-lasting changes in mitochondrial function in the developing brain. *Neurotoxicology*. 2021 Jan 1;82:1–8.
46. Soo SK, Traa A, Rudich PD, Mistry M, van Raamsdonk JM. Activation of mitochondrial unfolded protein response protects against multiple exogenous stressors. *Life Sci Alliance*. 2021 Nov 1;4(12).
47. Jovaisaite V, Mouchiroud L, Auwerx J. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. Vol. 217, *Journal of Experimental Biology*. Company of Biologists Ltd; 2014. p. 137–43.
48. Khan NA, Nikkanen J, Yatsuga S, Jackson C, Wang L, Pradhan S, et al. mTORC1 Regulates Mitochondrial Integrated Stress Response and Mitochondrial Myopathy Progression. *Cell Metab*. 2017 Aug 1;26(2):419–428.e5.
49. De Castro IP, Martins LM, Loh SHY. Mitochondrial quality control and parkinson's disease: A pathway unfolds. Vol. 43, *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc.; 2011. p. 80–6.
50. Pimenta De Castro I, Costa AC, Lam D, Tufi R, Fedele V, Moiso N, et al. Genetic analysis of mitochondrial protein misfolding in *Drosophila melanogaster*. *Cell Death Differ*. 2012 Aug;19(8):1308–16.
51. Sorrentino V, Romani M, Mouchiroud L, Beck JS, Zhang H, D'Amico D, et al. Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature*. 2017 Dec 14;552(7684):187–93.

52. Martinez BA, Petersen DA, Gaeta AL, Stanley SP, Caldwell GA, Caldwell KA. Dysregulation of the mitochondrial unfolded protein response induces non-apoptotic dopaminergic neurodegeneration in *C. Elegans* models of parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*. 2017 Nov 15;37(46):11085–100.
53. Sun X, Jefferson P, Zhou Q, Angelastro JM, Greene LA. Dominant-negative ATF5 compromises cancer cell survival by targeting CEBPB and CEBPD. *Molecular Cancer Research*. 2020 Feb 1;18(2):216–28.
54. Deng P, Haynes CM. Mitochondrial dysfunction in cancer: Potential roles of ATF5 and the mitochondrial UPR. Vol. 47, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2017. p. 43–9.
55. Chen A, Qian D, Wang B, Hu M, Lu J, Qi Y, et al. ATF5 is overexpressed in epithelial ovarian carcinomas and interference with its function increases apoptosis through the downregulation of Bcl-2 in SKOV-3 Cells. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2012 Nov;31(6):532–7.
56. Angelastro JM. Targeting ATF5 in Cancer. Vol. 3, *Trends in Cancer*. Cell Press; 2017. p. 471–4.
57. Smyrniak I. The mitochondrial unfolded protein response and its diverse roles in cellular stress. Vol. 133, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2021.
58. Wang YT, Lim Y, Matthew McCall XN, Huang KT, Haynes CM, Nehrke K, et al. RAPID REPORT Signaling and Stress Response Cardioprotection by the mitochondrial unfolded protein response requires ATF5. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2019;317:472–8. Available from: www.ajpheart.org
59. Venkatesh S, Li M, Saito T, Tong M, Rashed E, Mareedu S, et al. Mitochondrial LonP1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 Mar 1;128:38–50.
60. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. Vol. 46, *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG; 2018. p. 1650–67.

61. Carreau A, Hafny-Rahbi B El, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011 Jun;15(6):1239–53.
62. Kaufman DM, Crowder CM. Mitochondrial proteostatic collapse leads to hypoxic injury. *Current Biology*. 2015 Aug 17;25(16):2171–6.
63. Kaufman DM, Wu X, Scott BA, Itani OA, Van Gilst MR, Bruce JE, et al. Ageing and hypoxia cause protein aggregation in mitochondria. *Cell Death Differ*. 2017 Oct 1;24(10):1730–8.
64. Yan J, Sun CL, Shin S, Van Gilst M, Crowder CM. Effect of the mitochondrial unfolded protein response on hypoxic death and mitochondrial protein aggregation. *Cell Death Dis*. 2021 Jul 1;12(7).
65. Mao XR, Kaufman DM, Crowder CM. Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase promotes hypoxic survival by activating the mitochondrial unfolded protein response. *Cell Death Dis*. 2016;7(2).
66. Peña S, Sherman T, Brookes PS, Nehrke K. The mitochondrial unfolded protein response protects against anoxia in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2016 Jul 1;11(7).
67. Lim Y, Berry B, Viteri S, McCall M, Park EC, Rongo C, et al. FNDC-1-mediated mitophagy and ATFS-1 coordinate to protect against hypoxia-reoxygenation. *Autophagy*. 2021;17(11):3389–401.
68. Ivanina A V., Nesmelova I, Leamy L, Sokolov EP, Sokolova IM. Intermittent hypoxia leads to functional reorganization of mitochondria and affects cellular bioenergetics in marine molluscs. *Journal of Experimental Biology*. 2016 Jun 1;129(11):1659–74.
69. He F, Xiao H, Cai Y, Zhang N. ATF5 and HIF1 α cooperatively activate HIF1 signaling pathway in esophageal cancer. *Cell Communication and Signaling*. 2021 Dec 1;19(1).
70. Sookoian S, Pirola CJ. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. Vol. 21, *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press; 2015. p. 711–25.

71. Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. Vol. 38, *Liver International*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 2–6.
72. Abdalla EK, Noun R, Belghiti J. Hepatic vascular occlusion: Which technique? Vol. 84, *Surgical Clinics of North America*. 2004. p. 563–85.
73. Cannistrà M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, et al. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *International Journal of Surgery*. 2016 Sep 1;33:S57–70.
74. Jaeschke H. invited review Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. 2003; Available from: <http://www.ajpgi.org>
75. Dar WA, Sullivan E, Bynon JS, Eltzschig H, Ju C. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: Cellular and molecular mechanisms. Vol. 39, *Liver International*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 788–801.
76. Saidi RF, Kenari SKH. Liver ischemia/reperfusion injury: An overview. Vol. 27, *Journal of Investigative Surgery*. Informa Healthcare; 2014. p. 366–79.
77. Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly. Vol. 26, *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. Blackwell Publishing; 2011. p. 180–7.
78. Peck-Radosavljevic M. Review article: Coagulation disorders in chronic liver disease. Vol. 26, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd; 2007. p. 21–8.
79. Duffy JP, Hong JC, Farmer DG, Ghobrial RM, Yersiz H, Hiatt JR, et al. Vascular Complications of Orthotopic Liver Transplantation: Experience in More than 4,200 Patients. *J Am Coll Surg*. 2009 May;208(5):896–903.
80. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases.
81. Russo L, Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Marrone G, García-Pagán JC, García-Cardena G, et al. Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers. *Hepatology*. 2012 Mar;55(3):921–30.

82. Schön MR, Kollmar O, Wolf S, Schrem H, Matthes M, Akkoc N, et al. Liver Transplantation After Organ Preservation With Normothermic Extracorporeal Perfusion [Internet]. 2001. Available from: <http://journals.lww.com/annalsofsurgery>
83. Rauen U, Elling B, Gizewski ER, Korth HG, Sustmann R, De Groot H. Original Contribution INVOLVEMENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE PRESERVATION INJURY TO CULTURED LIVER ENDOTHELIAL CELLS. Vol. 22, Free Radical Biology & Medicine. 1997.
84. Ruan Z, Shibamoto T, Shimo T, Koizumi T, Tsuchida H, Kurata Y, et al. Effects of platelet-activating factor and thromboxane A₂ on isolated perfused guinea pig liver. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2004 Jan;73(1–2):73–85.
85. Kageyama S, Yagi S, Tanaka H, Saito S, Nagai K, Hata K, et al. Graft reconditioning with nitric oxide gas in rat liver transplantation from cardiac death donors. Transplantation. 2014 Mar 27;97(6):618–25.
86. You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. Hepatology. 2008 Sep;48(3):978–90.
87. Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, et al. Liver Inflammation Abrogates Immunological Tolerance Induced by Kupffer Cells. 2015; Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.27793>
88. Toki Y, Takenouchi T, Harada H, Tanuma SI, Kitani H, Kojima S, et al. Extracellular ATP induces P2X₇ receptor activation in mouse Kupffer cells, leading to release of IL-1 β , HMGB1, and PGE₂, decreased MHC class I expression and necrotic cell death. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Mar 20;458(4):771–6.
89. Mosher B, Dean R, Harkema J, Remick D, Palma J, Crockett E. Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury. Journal of Surgical Research. 2001;99(2):201–10.
90. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. Vol. 14, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. Nature Publishing Group; 2017. p. 397–411.

91. Stewart RK, Dangi A, Huang C, Murase N, Kimura S, Stolz DB, et al. A novel mouse model of depletion of stellate cells clarifies their role in ischemia/reperfusion-and endotoxin-induced acute liver injury.
92. Rockey DC. Hepatic Blood Flow Regulation by Stellate Cells in Normal and Injured Liver. Vol. 21, *Seminars in Liver Disease*. 2001.
93. Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4-dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *Journal of Experimental Medicine*. 2007 Nov 26;204(12):2913–23.
94. González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *Journal of Clinical Investigation*. 1993;91(2):456–64.
95. Bi J, Zhang J, Ren Y, Du Z, Li Q, Wang Y, et al. Irisin alleviates liver ischemia-reperfusion injury by inhibiting excessive mitochondrial fission, promoting mitochondrial biogenesis and decreasing oxidative stress. *Redox Biol*. 2019 Jan 1;20:296–306.
96. Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in the liver. *Compr Physiol*. 2013;3(2):977–1010.
97. Ischemic postconditioning lightening ischemia/reperfusion apoptosis of rats via mitochondria pathway.
98. Zhang L, Zhang SN, Li L, Zhang XB, Wu RC, Liu JH, et al. Prolonged warm ischemia aggravates hepatic mitochondria damage and apoptosis in DCD liver by regulating Ca²⁺/CaM/CaMKII signaling pathway [Internet]. Vol. 12, *Int J Clin Exp Pathol*. 2019. Available from: www.ijcep.com/
99. Zhang S, Rao S, Yang M, Ma C, Hong F, Yang S. Role of Mitochondrial Pathways in Cell Apoptosis during He-Patic Ischemia/Reperfusion Injury. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
100. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. Vol. 39, *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd; 2019.

101. Batandier C, Leverve X, Fontaine E. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Reactive Oxygen Species Production at the Level of the Respiratory Chain Complex I. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Apr 23;279(17):17197–204.
102. Long RT, Peng JB, Huang LL, Jiang GP, Liao YJ, Sun H, et al. Augmenter of liver regeneration alleviates renal hypoxia-reoxygenation injury by regulating mitochondrial dynamics in renal tubular epithelial cells. *Mol Cells*. 2019 Dec 31;42(12):893–905.
103. Yu X, Jia L, Yu W, Du H. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of dynamin-related protein 1 to mitochondria in hepatic ischemia reperfusion induced hippocampus injury in young mice. *Brain Res*. 2019 May 15;1711:68–76.
104. Jenner A, Peña-Blanco A, Salvador-Gallego R, Ugarte-Urbe B, Zollo C, Ganief T, et al. DRP1 interacts directly with BAX to induce its activation and apoptosis. *EMBO J*. 2022 Apr 19;41(8).
105. Zhang C, Huang J, An W. Hepatic Stimulator Substance Resists Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating Drp1 Translocation and Activation LIVER INJURY/REGENERATION A HE STUDY OF LIVER D I S E ASES T MERICAN ASSOCIATION FOR. *HEPATOLOGY* [Internet]. 2017;66(6). Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.29326>
106. Gu J, Zhang T, Guo J, Chen K, Wang G, Li H, et al. Ursodeoxycholyll lysophosphatidylethanolamide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via phospholipid metabolism-mediated mitochondrial quality control. *FASEB Journal*. 2020 May 1;34(5):6198–214.
107. Qajari NM, Shafaroudi MM, Gholami M, Khonakdar-Tarsi A. Silibinin treatment results in reducing OPA1&MFN1 genes expression in a rat model hepatic ischemia–reperfusion. *Mol Biol Rep*. 2020 May 1;47(5):3271–80.
108. Bellanti F, Mirabella L, Mitarotonda D, Blonda M, Tamborra R, Cinnella G, et al. Propofol but not sevoflurane prevents mitochondrial dysfunction and oxidative stress by limiting HIF-1 α activation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2016 Jul 1;96:323–33.

109. Li H, Sun JJ, Chen GY, Wang WW, Xie ZT, Tang GF, et al. Carnosic acid nanoparticles suppress liver ischemia/reperfusion injury by inhibition of ROS, Caspases and NF- κ B signaling pathway in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016;82:237–46.
110. Mansouri A, Gattolliat CH, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. Vol. 155, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2018. p. 629–47.
111. Lei Z, Meihong Deng X, Yi Z, Sun Q, Shapiro RA, Xu H, et al. cGAS-mediated autophagy protects the liver from ischemia-reperfusion injury independently of STING. 2018; Available from: <http://www.ajpgi.org>
112. Birk A V., Liu S, Soong Y, Mills W, Singh P, Warren JD, et al. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013 Jul 31;24(8):1250–61.
113. NOVEL, INNOVATIVE MODELS TO STUDY ISCHEMIA/REPERFUSION-RELATED REDOX DAMAGE IN ORGAN TRANSPLANTATION [Internet]. Available from: <https://conquest.health/category/nephrology-organ-transplant/>
114. Lu HI, Huang TH, Sung PH, Chen YL, Chua S, Chai HY, et al. Administration of antioxidant peptide SS-31 attenuates transverse aortic constriction-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37(5):589–603.
115. Gong WH, Zheng WX, Wang J, Chen SH, Pang B, Hu XM, et al. Coexistence of hyperlipidemia and acute cerebral ischemia/reperfusion induces severe liver damage in a rat model. *World J Gastroenterol*. 2012;18(35):4934–43.
116. Boyman L, Greiser M, Lederer WJ. Calcium influx through the mitochondrial calcium uniporter holocomplex, MCUcx. *J Mol Cell Cardiol*. 2021 Feb 1;151:145–54.
117. Nakazato PCG, Victorino JP, Fina CF, Mendes KDS, Gomes MCJ, Evora PRB, et al. Liver ischemia and reperfusion injury. Pathophysiology and new horizons in preconditioning and therapy. *Acta Cir Bras*. 2018 Aug 1;33(8):723–35.

118. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase type 2 induces apoptosis of hepatocytes after liver transplantation [Internet]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
119. Parente A, Osei-Bordom DC, Ronca V, Perera MTPR, Mirza D. Organ Restoration With Normothermic Machine Perfusion and Immune Reaction. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
120. Chi X, Zhang R, Shen N, Jin Y, Alina A, Yang S, et al. Sulforaphane reduces apoptosis and oncosis along with protecting liver injury-induced ischemic reperfusion by activating the Nrf2/ARE pathway. *Hepatol Int*. 2015 Apr 1;9(2):321–9.
121. Oshiro T, Shiraishi M, Muto Y. Adenovirus mediated gene transfer of antiapoptotic protein in hepatic ischemia-reperfusion injury: The paradoxical effect of Bcl-2 expression in the reperfused liver. *Journal of Surgical Research*. 2002;103(1):30–6.
122. Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. Vol. 33, *Critical Reviews in Toxicology*. CRC Press LLC; 2003. p. 105–36.
123. Hines IN, Hoffman JM, Scheerens H, Day BJ, Harada H, Pavlick KP, et al. Regulation of postischemic liver injury following different durations of ischemia. 2003; Available from: <http://www.ajpgi.org>
124. Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, et al. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 2004;78(2):250–6.
125. Dutta S, Shah RB, Singhal S, Bansal S, Sinha S, Haque M, et al. Metformin: A Review of Potential Mechanism and Therapeutic Utility Beyond Diabetes. Vol. 17, *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Medical Press Ltd; 2023. p. 1907–32.
126. Mahmood K, Naeem M, Rahimnajjad NA. Metformin: The hidden chronicles of a magic drug. Vol. 24, *European Journal of Internal Medicine*. 2013. p. 20–6.
127. Sahra I Ben, Marchand-Brustel Y Le, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: A new perspective for an old antidiabetic drug? Vol. 9, *Molecular Cancer Therapeutics*. 2010. p. 1092–9.
128. Rotella CM, Monami M, Mannucci E. Metformin Beyond Diabetes: New Life for an Old Drug. Vol. 2, *Current Diabetes Reviews*. 2006.

129. Emami Riedmaier A, Fisel P, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M. Metformin and cancer: From the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. Vol. 34, Trends in Pharmacological Sciences. 2013. p. 126–35.
130. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical Pharmacokinetics of Metformin [Internet]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez
131. Micic D, Cvijovic G, Trajkovic V, Duntas LH, Polovina S. Metformin: Its emerging role in oncology. Vol. 10, HORMONES. 2011.
132. Ismetforminaperfectdrug.Updatesin.
133. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. Journal of Biological Chemistry. 2000 Jan 7;275(1):223–8.
134. Vial G, Daille D, Guigas B. Role of mitochondria in the mechanism(s) of action of metformin. Vol. 10, Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media S.A.; 2019.
135. Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. Metabolic Effects of Metformin on Glucose and Lactate Metabolism in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus* [Internet]. Vol. 0, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Copyright. 1996. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/81/11/4059/2649542>
136. Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Menendez JA. Genome-wide inhibitory impact of the AMPK activator metformin on [kinesins, tubulins, histones, auroras and polo-like kinases] M-phase cell cycle genes in human breast cancer cells. Cell Cycle. 2009 May 15;8(10):1633–6.
137. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. Journal of Clinical Investigation. 2010 Jul 1;120(7):2355–69.
138. Dehkordi AH, Abbaszadeh A, Mir S, Hasanvand A. Metformin and its anti-inflammatory and anti-oxidative effects; new concepts. J Renal Inj Prev. 2019;8(1):54–61.

139. Hassan FI, Didari T, Khan F, Niaz K, Mojtahedzadeh M, Abdollahi M. A review on the protective effects of metformin in sepsis-induced organ failure. *Cell J*. 2020;21(4):363–70.
140. Paudel YN, Angelopoulou E, Piperi C, Shaikh MF, Othman I. Emerging neuroprotective effect of metformin in Parkinson's disease: A molecular crosstalk. Vol. 152, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2020.
141. Mirmiranpour H, Mousavizadeh M, Noshad S, Ghavami M, Ebadi M, Ghasemiesfe M, et al. Comparative effects of pioglitazone and metformin on oxidative stress markers in newly diagnosed type 2 diabetes patients: A randomized clinical trial. *J Diabetes Complications*. 2013 Sep;27(5):501–7.
142. Hou X, Song J, Li XN, Zhang L, Wang XL, Chen L, et al. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 28;396(2):199–205.
143. Khouri H, Collin F, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Jore D, Gardès-Albert M. Radical-induced oxidation of metformin. *Eur J Biochem*. 2004 Dec;271(23–24):4745–52.
144. Apostolova N, Iannantuoni F, Gruevska A, Muntane J, Rocha M, Victor VM. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. Vol. 34, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2020.
145. Jackson C, Escobar I, Xu J, Perez-Pinzon M. Effects of ischemic preconditioning on mitochondrial and metabolic neuroprotection: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase and sirtuins. *Brain Circ*. 2018;4(2):54.
146. Wang C, Liu C, Gao K, Zhao H, Zhou Z, Shen Z, et al. Metformin preconditioning provide neuroprotection through enhancement of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis after spinal cord injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 2;477(4):534–40.
147. Zhu XC, Jiang T, Zhang QQ, Cao L, Tan MS, Wang HF, et al. Chronic Metformin Preconditioning Provides Neuroprotection via Suppression of NF- κ B-Mediated Inflammatory Pathway in Rats with Permanent Cerebral Ischemia. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug 25;52(1):375–85.

148. Jiang T, Yu JT, Zhu XC, Wang HF, Tan MS, Cao L, et al. Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischaemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *Br J Pharmacol.* 2014;171(13):3146–57.
149. Driver C, S Bamitale KD, Kazi A, Olla M, Nyane NA, O Owira PM. Cardioprotective Effects of Metformin [Internet]. 2018. Available from: www.jcvp.org
150. Bu Y, Peng M, Tang X, Xu X, Wu Y, Chen AF, et al. Protective effects of metformin in various cardiovascular diseases: Clinical evidence and AMPK-dependent mechanisms. Vol. 26, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 4886–903.
151. Rutledge CA, Lagranha C, Chiba T, Redding K, Stolz DB, Goetzman E, et al. Metformin preconditioning protects against myocardial stunning and preserves protein translation in a mouse model of cardiac arrest. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology Plus.* 2023 Jun;4:100034.
152. Lalau JD, Arnouts P, Sharif A, De Broe ME. Metformin and other antidiabetic agents in renal failure patients. Vol. 87, *Kidney International*. Nature Publishing Group; 2015. p. 308–22.
153. Grissi M, Boudot C, Assem M, Candellier A, Lando M, Poirot-Leclercq S, et al. Metformin prevents stroke damage in non-diabetic female mice with chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2021 Dec 1;11(1).
154. Kim H, Yu MR, Lee H, Kwon SH, Jeon JS, Han DC, et al. Metformin inhibits chronic kidney disease-induced DNA damage and senescence of mesenchymal stem cells. *Aging Cell.* 2021 Feb 1;20(2).
155. Calvert JW, Gundewar S, Jha S, Greer JJM, Bestermann WH, Tian R, et al. Acute Metformin Therapy Confers Cardioprotection Against Myocardial Infarction Via AMPK-eNOS Mediated Signaling. 2007.
156. Chin JT, Troke JJ, Kimura N, Itoh S, Wang X, Palmer OP, et al. A Novel Cardioprotective Agent in Cardiac Transplantation: Metformin Activation of AMP-Activated Protein Kinase Decreases Acute Ischemia-Reperfusion Injury and Chronic Rejection. Vol. 84, *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*. 2011.

157. Higgins L, Palee S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of metformin on the heart with ischaemia-reperfusion injury: Evidence of its benefits from in vitro, in vivo and clinical reports. Vol. 858, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V.; 2019.
158. Topcu A, Balik G, Atak M, Mercantepe T, Uydu HA, Tumkaya L. An investigation of the effects of metformin on ovarian ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol*. 2019 Dec 15;865.
159. Ruan C, Guo H, Gao J, Wang Y, Liu Z, Yan J, et al. Neuroprotective effects of metformin on cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating PI3K/Akt pathway. *Brain Behav*. 2021 Oct 1;11(10).
160. Li X, Wang L, Yang X, Huang C. Metformin attenuates ischemia/reperfusion injury of fatty liver in rats through inhibition of the tlr4-nf- κ b axis. *Balkan Med J*. 2020;37(4):196–202.
161. Jia Y, Cui R, Wang C, Feng Y, Li Z, Tong Y, et al. Metformin protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via TXNIP-NLRP3-GSDMD pathway. *Redox Biol*. 2020 May 1;32.
162. Sarıbal D, Erdem E, Güngör-Ordueri NE, Usta A, Karakuş C, Karacan M. Metformin decreases testicular damages following ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 2020 Mar 1;52(2).
163. Zhang K, Wang T, Sun GF, Xiao JX, Jiang LP, Tou FF, et al. Metformin protects against retinal ischemia/reperfusion injury through AMPK-mediated mitochondrial fusion. *Free Radic Biol Med*. 2023 Aug 20;205:47–61.
164. Abdo EE, Cunha JEM, Deluca P, Coelho AMM, Bacchella T, Machado MCC. Protective effect of N2-mercaptopropionylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process. *Arq Gastroenterol*. 2003;40(3):177–80.
165. Yahanda AM, Paidas CN, Clemens MG. Susceptibility of Hepatic Microcirculation to Reperfusion Injury: A Comparison of Adult and Suckling Rats.
166. Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Ramalho FS, Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. Vol. 2012, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.

167. Gasbarrini A, Addolorato G, Campi C DI, Simoncini M, Montemagno S, Castagneto M, et al. Gender Affects Reperfusion Injury in Rat Liver. 2001.
168. Spiegel HU, Palmes D. Surgical techniques of orthotopic rat liver transplantation. Vol. 11, *Journal of Investigative Surgery*. Informa Healthcare; 1998. p. 83–96.
169. Hori T, Nguyen JH, Zhao X, Ogura Y, Hata T, Yagi S, et al. Comprehensive and innovative techniques for liver transplantation in rats: A surgical guide. *World J Gastroenterol*. 2010;16(25):3120–32.
170. Aller MA, Mendez M, Nava MP, Lopez L, Arias JLA, Arias J. The value of microsurgery in liver research. Vol. 29, *Liver International*. 2009. p. 1132–40.
171. Urakami H, Abe Y, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in partial liver transplantation: Lessons learned from reduced-size liver ischaemia and reperfusion injury. Vol. 34, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007. p. 912–9.
172. Spiegel HU, Bremer C, Boin C, Langer M. Reduction of hepatic reperfusion injury by indomethacin-mediated vasoconstriction: A rat model with temporary splenocaval shunt. *Journal of Investigative Surgery*. 1995;8(5):363–9.
173. Uhlmann D, Armann B, Gaebel G, Ludwig S, Hess J, Pietsch UC, et al. Endothelin A receptor blockade reduces hepatic ischemia/reperfusion injury after warm ischemia in a pig model. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2003;7(3):331–9.
174. Omokawa S, Arm Y, Saito H, Furuya T, Sato T, Shirayama K, et al. A Simple Experimental Model of Total Hepatectomy, Hepatic Ischemia and Extrahepatic Portal Obstruction in Rats Using Splenic Transposition.
175. Suzuki S, Nakamura S, Sakaguchi T, Mitsuoka H, Tsuchiya Y, Kojima Y, et al. Pathophysiological Appraisal of a Rat Model of Total Hepatic Ischemia with an Extracorporeal Portosystemic Shunt. 1998.
176. Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Serafin A, Rimola A, et al. Are angiotensin II receptor antagonists useful strategies in steatotic and nonsteatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009 Apr;329(1):130–40.

177. Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padriša-Altés S, Casillas-Ramírez A, Rodés J, Roselló-Catafau J, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):461–72.
178. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi', E, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia [Internet]. 2000. Available from: <http://www.ajpgi.org>
179. Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: Time and percentage-related pathophysiological mechanisms. Vol. 191, *Journal of Surgical Research*. Academic Press Inc.; 2014. p. 399–412.
180. Fonseca-Gomes J, Costa-Coelho T, Ferreira-Manso M, Inteiro-Oliveira S, Vaz SH, Alemán-Serrano N, et al. A small TAT-TrkB peptide prevents BDNF receptor cleavage and restores synaptic physiology in Alzheimer's disease. *Molecular Therapy*. 2024 Oct;
181. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis HHS Public Access. Vol. 9, *Nat Methods*. 2012.
182. Statistics textbooks in the. 2007.
183. Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: Simplified and practical approach in pre-clinical, clinical and laboratory studies. *Biochem Med (Zagreb)*. 2021;31(1):1–27.
184. Pasarín M, Abalde JG, Rodríguez-Vilarrupla A, Mura V La, Carles García-Pagán J, Bosch J. Insulin resistance and liver microcirculation in a rat model of early NAFLD.
185. Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, Hashimoto O, Taniguchi E, Inoue K, et al. Significance and Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cell Transplantation in a Cirrhotic Liver Rat Model. *Gastroenterology*. 2007;133(1).
186. Andersen JB, Loi R, Perra A, Factor VM, Ledda-Columbano GM, Columbano A, et al. Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1401–9.

187. Carvalho AB, Quintanilha LF, Dias J V., Paredes BD, Mannheimer EG, Carvalho FG, et al. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Do Not Reduce Fibrosis or Improve Function in a Rat Model of Severe Chronic Liver Injury. *Stem Cells*. 2008 May 1;26(5):1307–14.
188. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. Vol. 5, *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*. Springer Japan; 1998. p. 402–8.
189. Kosieradzki M, Pratschke J, Kupiec-Węgliński J, Rowiński W. Ischemia/Reperfusion Injury, Its Mechanisms, and Prevention. *J Transplant*. 2012;2012:1–2.
190. Arab HA, Cheung K, Hickman PE, Potter JM, Walker NI, Roberts MS. A comparison of hepatic ischemia/hypoxia-reperfusion injury models. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013 Nov;68(3):349–56.
191. Jaeschke H, Farhood A, Smith ACW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo [Internet]. Available from: www.fasebj.org
192. Shen SQ, Zhang Y, Xiong CL. The Protective Effects of 17 β -Estradiol on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Model, Associated with Regulation of Heat-Shock Protein Expression. *Journal of Surgical Research*. 2007 Jun 1;140(1):67–76.
193. Izuishi K, Tsung A, Hossain MA, Fujiwara M, Wakabayashi H, Masaki T, et al. Ischemic preconditioning of the murine liver protects through the Akt kinase pathway. *Hepatology*. 2006 Sep;44(3):573–80.
194. Akram Hossain M, Izuishi K, Maeta H. Protective effects of D-allose against ischemia reperfusion injury of the rat liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2003;10(3):218–25.
195. Rü Diger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of Ischemic Preconditioning and Intermittent and Continuous Inflow Occlusion in the Murine Liver [Internet]. 2002. Available from: <http://journals.lww.com/annalsofsurgery>
196. Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state [Internet]. Available from: www.elsevier.com/locate/jhep
197. Lv Z, Guo Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. Vol. 11, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2020.

198. Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM, Dunn BK, Ford L, DeCensi A, et al. Metformin and cancer risk and mortality: A systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. Vol. 7, Cancer Prevention Research. American Association for Cancer Research Inc.; 2014. p. 867–85.
199. Lamanna C, Monami M, Marchionni N, Mannucci E. Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes Metab*. 2011;13(3):221–8.
200. Bhat A, Sebastiani G, Bhat M. Systematic review: Preventive and therapeutic applications of metformin in liver disease. Vol. 7, *World Journal of Hepatology*. Baishideng Publishing Group Co; 2015. p. 1652–9.
201. Patrone C, Eriksson O, Lindholm D. Diabetes drugs and neurological disorders: New views and therapeutic possibilities. Vol. 2, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. Elsevier Limited; 2014. p. 256–62.
202. Neven E, Vervaet B, Brand K, Gottwald-Hostalek U, Opdebeeck B, De Maré A, et al. Metformin prevents the development of severe chronic kidney disease and its associated mineral and bone disorder. *Kidney Int*. 2018 Jul 1;94(1):102–13.
203. Cahova M, Palenickova E, Dankova H, Sticova E, Burian M, Drahota Z, et al. Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015 Jul 15;309(2):G100–11.
204. Cheng G, Li L. High-glucose-induced apoptosis, ROS production and pro-inflammatory response in cardiomyocytes is attenuated by metformin treatment via PP2A activation. *J Biosci*. 2020 Dec 1;45(1).
205. Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor κ B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension*. 2006 Jun;47(6):1183–8.
206. Pandey A, Kumar VL. Protective Effect of Metformin against Acute Inflammation and Oxidative Stress in Rat. *Drug Dev Res*. 2016 Sep 1;278–84.
207. Yan H, Zhou HF, Hu Y, Pham CTN. Suppression of experimental arthritis through AMP-activated protein kinase activation and autophagy modulation.

208. Carter AM, Bennett CE, Bostock JA, Grant PJ. Metformin reduces C-reactive protein but not complement factor C3 in overweight patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*. 2005 Sep;22(9):1282–4.
209. Wong HS, Dighe PA, Mezera V, Monternier PA, Brand MD. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. Vol. 292, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2017. p. 16804–9.
210. Batandier C, Guigas B, Demaille D, El-Mir M, Fontaine E, Rigoulet M, et al. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr*. 2006;38(1):33–42.
211. Brauersreuther V, Jaquet V. Reactive Oxygen Species in Myocardial Reperfusion Injury: From Physiopathology to Therapeutic Approaches. Vol. 13, *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012.
212. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 2014;510(7506):542–6.
213. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, St-Pierre J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab*. 2014 Dec;2(1).
214. Weiskopf RB, Collard CD, Gelman S. CLINICAL CONCEPTS AND COMMENTARY Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury [Internet]. 2001. Available from: www.anesthesiology.org.
215. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Vol. 70, *British Medical Bulletin*. 2004. p. 71–86.
216. Gögenur I, Rosenberg Official opponents J, Troelsen A, Kjaersgaard-Andersen P, Pernow J. PHD THESIS DANISH MEDICAL JOURNAL. Vol. 69, *Anaesthesia*. 2014.
217. Mcmillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common Pathway of Endothelial-Leukocyte Interaction in Shock, Ischemia, and Reperfusion.

218. B Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB, et al. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. Vol. 78, Br. J. Surg. 1997.
219. Lemasters JJ, Bondi JM, Chacon1t E, Harper IS, Kaplan2 SH, Ohata1t H, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. 1996.
220. Wang X, Yang L, Kang L, Li J, Yang L, Zhang J, et al. Metformin attenuates myocardial Ischemia-reperfusion injury via Up-regulation of antioxidant enzymes. PLoS One. 2017 Aug 1;12(8).
221. Wang M, Weng X, Guo J, Chen Z, Jiang G, Liu X. Metformin alleviated EMT and fibrosis after renal ischemia-reperfusion injury in rats. Ren Fail. 2016 Apr 20;38(4):614–21.
222. Palee S, Higgins L, Leech T, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Acute metformin treatment provides cardioprotection via improved mitochondrial function in cardiac ischemia / reperfusion injury. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2020 Oct 1;130.
223. Leech T, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. The beneficial roles of metformin on the brain with cerebral ischaemia/reperfusion injury. Vol. 146, Pharmacological Research. Academic Press; 2019.
224. Topcu A, Balik G, Atak M, Mercantepe T, Uydu HA, Tumkaya L. An investigation of the effects of metformin on ovarian ischemia-reperfusion injury in rats. Eur J Pharmacol. 2019 Dec 15;865.
225. Jia Y, Cui R, Wang C, Feng Y, Li Z, Tong Y, et al. Metformin protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via TXNIP-NLRP3-GSDMD pathway. Redox Biol. 2020 May 1;32.
226. Palee S, Higgins L, Leech T, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Acute metformin treatment provides cardioprotection via improved mitochondrial function in cardiac ischemia / reperfusion injury. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2020 Oct 1;130.
227. Asghari A, Akbari G, Meghdadi A, Mortazavi P. Protective effect of metformin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. Acta Cir Bras. 2016 Jun 1;31(6):411–6.

228. Sarmiento-Ortega VE, Brambila E, Flores-Hernández J ángel, Díaz A, Peña-Rosas U, Moroni-González D, et al. The NOAEL metformin dose is ineffective against metabolic disruption induced by Chronic cadmium exposure in Wistar rats. *Toxics*. 2018 Sep 10;6(3).
229. toledo-pereyra1993.
230. Scalzo N, Canastar M, Lebovics E. Part 1: Disease of the Heart and Liver: A Relationship That Cuts Both Ways. Vol. 30, *Cardiology in Review*. Lippincott Williams and Wilkins; 2022. p. 111–22.
231. Hashish HA. Effect of age on the sildenafil impact on the histological and ultra-structure of the liver in male albino rat. *Journal of Histology and Histopathology*. 2016;3(1):5.
232. syntichaki-tavernarakis-2002-death-by-necrosis.
233. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: A specific form of programmed cell death? Vol. 283, *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc.; 2003. p. 1–16.
234. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. Vol. 18, *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. Blackwell Publishing; 2003. p. 891–902.
235. Hill CE, Hurtado A, Blits B, Bahr BA, Wood PM, Bartlett Bunge M, et al. Early necrosis and apoptosis of Schwann cells transplanted into the injured rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. 2007 Sep;26(6):1433–45.
236. Aydogan MS, Yucel A, Erdogan MA, Polat A, Cetin A, Ucar M, et al. Effects of oral β - Glucan on liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplant Proc*. 2013 Mar;45(2):487–91.
237. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: Apoptosis or necrosis? *Hepatology*. 2001;33(2):397–405.
238. Kristófi R, Eriksson JW. Metformin as an anti-inflammatory agent: A short review. Vol. 251, *Journal of Endocrinology*. BioScientifica Ltd.; 2021. p. R11–22.

239. Quaile MP, Melich DH, Jordan HL, Nold JB, Chism JP, Polli JW, et al. Toxicity and toxicokinetics of metformin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Mar 15;243(3):340–7.
240. Chen MM, Palmer JL, Ippolito JA, Curtis BJ, Choudhry MA, Kovacs EJ. Intoxication by intraperitoneal injection or oral gavage equally potentiates postburn organ damage and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013;2013.
241. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. Vol. 190, *Journal of Pathology.* 2000. p. 255–66.
242. Sener G, Sehirli O, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Kacmaz A. Protective effect of MESNA (2-Mercaptoethane sulfonate) against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Surg Today.* 2005 Jul;35(7):575–80.
243. Caglar K, Dokuyucu R, Agturk G, Tumer C, Tutuk O, Gocmen HD, et al. Effect of thymoquinone on transient receptor potential melastatin (TRPM) channels in rats with liver ischemia reperfusion model in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2024 Mar 1;27(3):319–25.
244. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J* [Internet]. 2016;15:817–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337112>
245. Domanski JP, Harrison SA. The AST to ALT ratio: A pattern worth considering. *Curr Hepat Rep.* 2013 Mar;12(1):47–52.
246. Lynn Bajt M, Lawson JA, Vonderfecht SL, Gujral JS, Jaeschke H. Protection against Fas Receptor-Mediated Apoptosis in Hepatocytes and Nonparenchymal Cells by a Caspase-8 Inhibitor in Vivo: Evidence for a Postmitochondrial Processing of Caspase-8. 2000.
247. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Vol. 15, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* Elsevier; 2005. p. 316–28.
248. Ndrepepa G. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. Vol. 493, *Clinica Chimica Acta.* Elsevier B.V.; 2019. p. 36–51.

249. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. Vol. 295, American Journal of Physiology - Cell Physiology. 2008.
250. Buczyńska A, Sidorkiewicz I, Krętowski AJ, Adamska A. Examining the clinical relevance of metformin as an antioxidant intervention. *Front Pharmacol.* 2024;15.
251. Tuma DJ. Serial Review: Alcohol, Oxidative Stress and Cell Injury Guest Editor: Arthur Cederbaum ROLE OF MALONDIALDEHYDE-ACETALDEHYDE ADDUCTS IN LIVER INJURY. 2002.
252. ahmed sara, Ramzy M, Mohammed M, Mohamed H. Impact of metformin onto ischemia-reperfusion damage of the kidney. *Minia Journal of Medical Research.* 2024 Jan 22;0(0):0–0.
253. Singh RK, Gupta B, Tripathi K, Singh SK. Anti oxidant potential of Metformin and Pioglitazone in Type 2 Diabetes Mellitus: Beyond their anti glycemic effect. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews.* 2016 Apr 1;10(2):102–4.
254. Pugazhenth S, Zhang Y, Bouchard R, Mahaffey G. Induction of an Inflammatory Loop by Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Involves NF-kB and STAT-1 in Differentiated Human Neuroprogenitor Cells. *PLoS One.* 2013 Jul 29;8(7).
255. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. Vol. 62, *Inflammation Research.* 2013. p. 641–51.
256. Chu MJ. Effect of Hepatic Steatosis on Bioenergetic Function During Hepatic Ischemia-reperfusion: A Systematic Review. *Open Transplant J.* 2013 May 21;7(1):10–32.
257. Schumacker PT. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Crit Care Med.* 2005;33(12 SUPPL.).
258. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . Vol. 15, *Cell Death and Differentiation.* 2008. p. 621–7.
259. Zhang X, Du P, Luo K, Li Y, Liu Z, Wang W, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α protects the liver against ischemia-reperfusion injury by regulating the A2B adenosine receptor. *Bioengineered.* 2021;12(1):3737–52.

260. Guo Y, Feng L, Zhou Y, Sheng J, Long D, Li S, et al. Systematic review with meta-analysis: HIF-1 α attenuates liver ischemia-reperfusion injury. Vol. 29, Transplantation Reviews. W.B. Saunders; 2015. p. 127–34.
261. Biller ML, Tuffs C, Bleul M, Tran DTA, Dupovac M, Keppler U, et al. Effect of Metformin on HIF-1 α Signaling and Postoperative Adhesion Formation. J Am Coll Surg. 2022 Jun 1;234(6):1167–80.
262. Zhou X, Chen J, Yi G, Deng M, Liu H, Liang M, et al. Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1 α through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma These authors have contributed equally to this work [Internet]. Vol. 7. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
263. Chen G, Feng W, Zhang S, Bian K, Yang Y, Fang C, et al. Metformin inhibits gastric cancer via the inhibition of HIF1 α /PKM2 signaling [Internet]. Vol. 5, Am J Cancer Res. 2015. Available from: www.ajcr.us/
264. Zhu MX, Ma XF, Niu X, Fan G bo, Li Y. Mitochondrial unfolded protein response in ischemia-reperfusion injury. Brain Res. 2022 Dec 15;1797.
265. Torres AK, Fleischhart V, Inestrosa NC. Mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}): what we know thus far. Vol. 12, Frontiers in Cell and Developmental Biology. Frontiers Media SA; 2024.
266. Trsrs&zest A, Mitchell HK, I'racy UM! Protein Synthesis in Salivary Glands of *Drosophila melanogaster* : Relation to Chromosome PuffFs. Vol. 84, J. Mol. Biol. 1974.
267. Malik JA, Lone R. Heat shock proteins with an emphasis on HSP 60. Vol. 48, Molecular Biology Reports. Springer Science and Business Media B.V.; 2021. p. 6959–69.
268. Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, et al. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. Vol. 3, MedComm. John Wiley and Sons Inc; 2022.
269. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. Vol. 19, Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group; 2018. p. 4–19.

270. Mahat DB, Salamanca HH, Duarte FM, Danko CG, Lis JT. Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. *Mol Cell*. 2016 Apr 7;62(1):63–78.
271. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. Cutting Edge: Heat Shock Protein (HSP) 60 Activates the Innate Immune Response: CD14 Is an Essential Receptor for HSP60 Activation of Mononuclear Cells. *The Journal of Immunology*. 2000 Jan 1;164(1):13–7.
272. Binder RJ, Vatner R, Srivastava P. The heat-shock protein receptors: Some answers and more questions. Vol. 64, *Tissue Antigens*. 2004. p. 442–51.
273. Xu S, Liu H, Wang C, Deng Y, Xu B, Yang T, et al. Dual roles of UPRer and UPRmt in neurodegenerative diseases. Vol. 101, *Journal of Molecular Medicine*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023. p. 1499–512.
274. Kang Z, Chen F, Wu W, Liu R, Chen T, Xu F. UPRmt and coordinated UPRER in type 2 diabetes. Vol. 10, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
275. Li Y, Huang D, Shangguan F, Jia L, Lan L, Gong S, et al. LonP1 Links UPRmt and UPRER to Regulate Heart Function [Internet]. 2021. Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-1136819/v1>
276. Sen B, Rastogi A, Nath R, Shasthry SM, Pamecha V, Pandey S, et al. Senescent Hepatocytes in Decompensated Liver Show Reduced UPRMT and Its Key Player, CLPP, Attenuates Senescence In Vitro. *CMGH*. 2019 Jan 1;8(1):73–94.
277. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO Journal*. 2005 Mar 23;24(6):1243–55.
278. Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. Vol. 151, *Journal of Biochemistry*. 2012. p. 217–9.
279. Zhou L, Yang X, Shu S, Wang S, Guo F, Yin Y, et al. Sufentanil Protects the Liver from Ischemia/Reperfusion-Induced Inflammation and Apoptosis by Inhibiting ATF4-Induced TP53BP2 Expression. *Inflammation*. 2021 Jun 1;44(3):1160–74.

280. Yang Y, Wang P, Zhang C, Huang F, Pang G, Wei C, et al. Hepatocyte-derived MANF alleviates hepatic ischaemia-reperfusion injury via regulating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in mice. *Liver International*. 2021 Mar 1;41(3):623–39.
281. Teske BF, Fusakio ME, Zhou D, Shan J, McClintick JN, Kilberg MS, et al. CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Mol Biol Cell*. 2013 Aug 1;24(15):2477–90.
282. Yamazaki T, Ohmi A, Kurumaya H, Kato K, Abe T, Yamamoto H, et al. Regulation of the human CHOP gene promoter by the stress response transcription factor ATF5 via the AARE1 site in human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci*. 2010 Aug;87(9–10):294–301.
283. Yu AYH, Houry WA. ClpP: A distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. Vol. 581, *FEBS Letters*. 2007. p. 3749–57.
284. Wu GJ, Xiong Q, Wei XJ, Wang Y, Hu XM, He GZ, et al. Mitochondrial unfolded protein response gene CLPP changes mitochondrial dynamics and affects mitochondrial function. *PeerJ*. 2019;2019(7).
285. Lian X, Wang X, Xie Y, Sheng H, He J, Peng T, et al. ATF5-regulated Mitochondrial Unfolded Protein Response Attenuates Neuronal Damage in Epileptic Rat by Reducing Endoplasmic Reticulum Stress Through Mitochondrial ROS. *Neurochem Res*. 2024 Feb 1;49(2):388–401.
286. Deng J, Wang D, Shi Y, Lin L, Gao W, Sun Y, et al. Mitochondrial unfolded protein response mechanism and its cardiovascular protective effects. Vol. 177, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2024.
287. Wu M, Wu J, Liu K, Jiang M, Xie F, Yin X, et al. LONP1 ameliorates liver injury and improves gluconeogenesis dysfunction in acute-on-chronic liver failure. *Chin Med J (Engl)*. 2024 Jan 20;137(2):190–9.
288. Suárez-Rivero JM, Pastor-Maldonado CJ, Povea-Cabello S, Álvarez-Córdoba M, Villalón-García I, Talaverón-Rey M, et al. Activation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response: A New Therapeutic Target? Vol. 10, *Biomedicines*. MDPI; 2022.

EKLER

EK 1: Etik Onay

Ek Tarih ve Sayısı: 15.12.2023-295381


1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu

Sayı : E-94603339-604.01.02-295381
Konu : Proje Onayı

15.12.2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. F. Belgin Ataç'ın danışmanlığında Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı öğrencisi Gamze Bilgili'nin sorumluluğunda yürütülecek olan DA23/24 nolu "Sıçanlarda, metformin ile ön koşullamanın, hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde mitokondriyal katlanmamış protein cevabı mekanizmalarının araştırılması" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 04/12/2023 tarih ve 23/23 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

Not: Çalışma bildirisi ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir

— This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Research on Animals (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KARARI

TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
16	23/23	04/12/2023

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. F. Belgin Ataç tarafından yürütülecek olan DA23/24 nolu "Sıçanlarda, metformin ile ön koşullamanın, hepatic iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde mitokondriyal katlanmamış protein cevabı mekanizmalarının araştırılması" başlıklı araştırma projesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.

EK 2: Protein Konsantrasyon Hesaplaması

ÖRNEK SIRASI	ÖRNEK ADI	OD	OD-Blank	Beklene (µg/ml)	Gözlenen/ DİLUE PROTEİN KONSANTRASYONU (µg/ml)	FİNAL PROTEİN KONSANTRASYONU (µg/µl)
STD1	*	1,544	1,4332	2000	2019,276908	*
STD2	*	1,2978	1,187	1500	1489,875031	*
STD3	*	0,9948	0,884	1000	945,9573589	*
STD4	*	0,8603	0,7495	750	742,5713742	*
STD5	*	0,712	0,6012	500	545,4408985	*
STD6	*	0,4732	0,3624	250	287,7950346	*
STD7	*	0,2181	0,1073	125	94,04681904	*
Blank	*	0,1108	0	*	37,701	*
1	Sham-1	1,3291	1,2183	*	1552,829024	1,55
2	Sham-2	1,2804	1,1696	*	1455,426269	1,46
3	Sham-3	1,2741	1,1633	*	1443,050005	1,44
4	Sham-4	1,3091	1,1983	*	1512,45667	1,51
5	Sham-5	1,1922	1,0814	*	1286,830273	1,29
6	Sham-6	1,3825	1,2717	*	1663,158107	1,66
7	Sham-7	1,3241	1,2133	*	1542,687431	1,54
8	Sham-8	1,3937	1,2829	*	1686,766212	1,69
9	Sham-9	1,3102	1,1994	*	1514,663704	1,51
10	Sham-10	1,3122	1,2014	*	1518,680502	1,52
11	IRH-1	1,3345	1,2237	*	1563,818265	1,56
12	IRH-2	1,3546	1,2438	*	1605,054144	1,61
13	IRH-3	1,2506	1,1398	*	1397,337479	1,40
14	IRH-4	1,332	1,2212	*	1558,725965	1,56
15	IRH-5	1,3229	1,2121	*	1540,25826	1,54
16	IRH-6	1,254	1,1432	*	1403,907009	1,40
17	IRH-7	1,3461	1,2353	*	1587,552318	1,59
18	IRH-8	1,3031	1,1923	*	1500,445853	1,50
19	IRH-9	1,2991	1,1883	*	1492,464511	1,49
20	Met-IRH-1	1,3011	1,1903	*	1496,452595	1,50
21	Met-IRH-2	1,326	1,2152	*	1546,537427	1,55
22	Met-IRH-3	1,302	1,1912	*	1498,248921	1,50
23	Met-IRH-4	1,1498	1,039	*	1209,363086	1,21
24	Met-IRH-5	1,2304	1,1196	*	1358,615053	1,36
25	Met-IRH-6	1,1726	1,0618	*	1250,730959	1,25
26	Met-IRH-7	1,3688	1,258	*	1634,500956	1,63
27	Met-IRH-8	1,21	1,0982	*	1318,168031	1,32
28	Met-IRH-9	1,33	1,2146	*	1545,321134	1,55
29	Met-IRH-10	1,15	1,0416	*	1214,046509	1,21

EK 3: Suzuki kriterlendirmesi sonrası konjesyon tespiti için gruplar arasında gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA							
Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-0.9000	-2.001 to 0.2006	No	ns	0.1249	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-0.3000	-1.401 to 0.8006	No	ns	0.7794	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	0.6000	-0.5006 to 1.701	No	ns	0.3799	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2 q
11	Sham vs. IRH	1.800	2.700	-0.9000	0.4439	10	10 2.867
12	Sham vs. Met-IRH	1.800	2.100	-0.3000	0.4439	10	10 0.9558
13	IRH vs. Met-IRH	2.700	2.100	0.6000	0.4439	10	10 1.912

EK 4: Suzuki kriterlendirmesi sonrası vakuolizasyon tespiti için gruplar arasında gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-0.4000	-1.213 to 0.4126	No	ns	0.4516	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-0.7000	-1.513 to 0.1126	No	ns	0.1014	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	-0.3000	-1.113 to 0.5126	No	ns	0.6354	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	0.000	0.4000	-0.4000	0.3277	10	10
12	Sham vs. Met-IRH	0.000	0.7000	-0.7000	0.3277	10	10
13	IRH vs. Met-IRH	0.4000	0.7000	-0.3000	0.3277	10	10

EK 5: Suzuki kriterlendirmesi sonrası vakuolizasyon tespiti için gruplar arasında gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu

RM one-way ANOVA Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-0.8000	-1.712 to 0.1119	No	ns	0.0851	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	-0.6000	-1.792 to 0.5918	No	ns	0.3784	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	0.2000	-1.401 to 1.801	No	ns	0.9356	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	0.1000	0.9000	-0.8000	0.3266	10	10	3.464
12	Sham vs. Met-IRH	0.1000	0.7000	-0.6000	0.4269	10	10	1.988
13	IRH vs. Met-IRH	0.9000	0.7000	0.2000	0.5735	10	10	0.4932

EK 6: Suzuki kriterlendirmesi sonrası inflamasyon tespiti için gruplar arasında gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA							
Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-0.5000	-1.450 to 0.4495	No	ns	0.4044	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-1.000	-1.950 to -0.05046	Yes	*	0.0375	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	-0.5000	-1.450 to 0.4495	No	ns	0.4044	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2 q
11	Sham vs. IRH	0.3000	0.8000	-0.5000	0.3830	10	10 1.846
12	Sham vs. Met-IRH	0.3000	1.300	-1.000	0.3830	10	10 3.693
13	IRH vs. Met-IRH	0.8000	1.300	-0.5000	0.3830	10	10 1.846

EK 7: TNF α seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-191.9	-352.9 to -30.81	Yes	*	0.0154	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-192.8	-349.6 to -36.06	Yes	*	0.0119	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	-0.9520	-162.0 to 160.1	No	ns	0.9999	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	235.5	427.4	-191.9	67.51	30	27
12	Sham vs. Met-IRH	235.5	428.3	-192.8	65.71	30	30
13	IRH vs. Met-IRH	427.4	428.3	-0.9520	67.51	27	30
							q
							4.020
							4.150
							0.01994

EK 8: ATP seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	63.40	30.37 to 96.43	Yes	****	<0.0001	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	46.31	14.16 to 78.45	Yes	**	0.0026	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	-17.09	-50.12 to 15.93	No	ns	0.4362	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	162.2	98.78	63.40	13.84	30	27
12	Sham vs. Met-IRH	162.2	115.9	46.31	13.47	30	30
13	IRH vs. Met-IRH	98.78	115.9	-17.09	13.84	27	30

EK 9: ROS seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-475.2	-692.7 to -257.7	Yes	****	<0.0001	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	-178.1	-389.8 to 33.59	No	ns	0.1167	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	297.1	79.65 to 514.6	Yes	**	0.0045	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	927.6	1403	-475.2	91.15	30	27	7.373
12	Sham vs. Met-IRH	927.6	1106	-178.1	88.72	30	30	2.839
13	IRH vs. Met-IRH	1403	1106	297.1	91.15	27	30	4.610

EK 10: TOS seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-21.47	-36.99 to -5.943	Yes	**	0.0040	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-3.428	-18.54 to 11.68	No	ns	0.8512	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	18.04	2.515 to 33.56	Yes	*	0.0186	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	20.46	41.93	-21.47	6.507	30	27
12	Sham vs. Met-IRH	20.46	23.89	-3.428	6.333	30	30
13	IRH vs. Met-IRH	41.93	23.89	18.04	6.507	27	30



EK 11: MPO seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-1.147	-2.118 to -0.1746	Yes	*	0.0166	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-0.4433	-1.374 to 0.4878	No	ns	0.4951	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	0.7033	-0.2542 to 1.661	No	ns	0.1921	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2 q
11	Sham vs. IRH	3.727	4.874	-1.147	0.4075	30	27 3.979
12	Sham vs. Met-IRH	3.727	4.170	-0.4433	0.3904	30	32 1.606
13	IRH vs. Met-IRH	4.874	4.170	0.7033	0.4014	27	32 2.477

EK 12: GSH seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	366.2	134.9 to 597.5	Yes	***	0.0009	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	240.3	15.13 to 465.4	Yes	*	0.0337	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	-126.0	-357.3 to 105.3	No	ns	0.3994	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	865.5	499.2	366.2	96.94	30	27	5.343
12	Sham vs. Met-IRH	865.5	625.2	240.3	94.36	30	30	3.601
13	IRH vs. Met-IRH	499.2	625.2	-126.0	96.94	27	30	1.838

EK 13: MDA seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-32.86	-108.1 to 42.36	No	ns	0.5522	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-81.75	-156.3 to -7.249	Yes	*	0.0280	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	-48.89	-125.4 to 27.58	No	ns	0.2841	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	609.9	642.8	-32.86	31.51	30	27
12	Sham vs. Met-IRH	609.9	691.7	-81.75	31.21	30	28
13	IRH vs. Met-IRH	642.8	691.7	-48.89	32.04	27	28

EK 14: AST seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA							
Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-2112	-2821 to -1403	Yes	****	<0.0001	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-462.6	-1172 to 246.5	No	ns	0.2557	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	1649	939.9 to 2358	Yes	****	<0.0001	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	194.2	2306	-2112	286.0	10	10
12	Sham vs. Met-IRH	194.2	656.8	-462.6	286.0	10	10
13	IRH vs. Met-IRH	2306	656.8	1649	286.0	10	10

EK 15: ALT seviyelerinin gruplar arasında istatistiksel analizi

Ordinary one-way ANOVA							
Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-2545	-3569 to -1520	Yes	****	<0.0001	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-268.6	-1293 to 756.2	No	ns	0.7940	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	2276	1251 to 3301	Yes	****	<0.0001	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	56.90	2602	-2545	413.3	10	10
12	Sham vs. Met-IRH	56.90	325.5	-268.6	413.3	10	10
13	IRH vs. Met-IRH	2602	325.5	2276	413.3	10	10

q
8.707
0.9191
7.788

EK 16: HIF-1'in rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-1.510	-2.661 to -0.3586	Yes	*	0.0163	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	-0.3067	-1.458 to 0.8447	No	ns	0.7070	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	1.203	0.05195 to 2.355	Yes	*	0.0422	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	1.003	2.513	-1.510	0.3753	3	3	5.691
12	Sham vs. Met-IRH	1.003	1.310	-0.3067	0.3753	3	3	1.156
13	IRH vs. Met-IRH	2.513	1.310	1.203	0.3753	3	3	4.535

EK 17: ATF4'ün rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA								
Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-0.03345	-0.6062 to 0.5393	No	ns	0.9825	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	0.1512	-0.4216 to 0.7240	No	ns	0.7110	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	0.1847	-0.3881 to 0.7575	No	ns	0.6095	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	1.000	1.033	-0.03345	0.1867	3	3	0.2534
12	Sham vs. Met-IRH	1.000	0.8488	0.1512	0.1867	3	3	1.146
13	IRH vs. Met-IRH	1.033	0.8488	0.1847	0.1867	3	3	1.399

EK 18: ATF5'ün rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA								
Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-0.2202	-0.3860 to -0.05439	Yes	*	0.0154	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	-0.08840	-0.2542 to 0.07739	No	ns	0.3026	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	0.1318	-0.03401 to 0.2976	No	ns	0.1103	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	1.000	1.220	-0.2202	0.05403	3	3	5.763
12	Sham vs. Met-IRH	1.000	1.088	-0.08840	0.05403	3	3	2.314
13	IRH vs. Met-IRH	1.220	1.088	0.1318	0.05403	3	3	3.449

EK 19: CHOP'un rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA								
Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-1.615	-2.292 to -0.9380	Yes	***	0.0008	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	0.1461	-0.5309 to 0.8231	No	ns	0.7928	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	1.761	1.084 to 2.438	Yes	***	0.0005	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	1.000	2.615	-1.615	0.2206	3	3	10.35
12	Sham vs. Met-IRH	1.000	0.8539	0.1461	0.2206	3	3	0.9364
13	IRH vs. Met-IRH	2.615	0.8539	1.761	0.2206	3	3	11.29

EK 20: CLPP'nin rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA								
Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-1.917	-2.744 to -1.090	Yes	***	0.0009	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	-0.5821	-1.409 to 0.2447	No	ns	0.1575	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	1.335	0.5080 to 2.162	Yes	**	0.0062	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	1.000	2.917	-1.917	0.2695	3	3	10.06
12	Sham vs. Met-IRH	1.000	1.582	-0.5821	0.2695	3	3	3.055
13	IRH vs. Met-IRH	2.917	1.582	1.335	0.2695	3	3	7.005

EK 21: HSP10'un rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-1.123	-1.983 to -0.2620	Yes	*	0.0167	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-0.1376	-0.9983 to 0.7231	No	ns	0.8783	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	0.9851	0.1243 to 1.846	Yes	*	0.0293	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	1.000	2.123	-1.123	0.2805	3	3
12	Sham vs. Met-IRH	1.000	1.138	-0.1376	0.2805	3	3
13	IRH vs. Met-IRH	2.123	1.138	0.9851	0.2805	3	3
							q
							5.660
							0.6937
							4.966

EK 22: HSP60'ın rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	3					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6	Sham vs. IRH	-1.559	-2.307 to -0.8109	Yes	**	0.0017	A-B
7	Sham vs. Met-IRH	-0.3223	-1.071 to 0.4260	No	ns	0.4350	A-C
8	IRH vs. Met-IRH	1.237	0.4886 to 1.985	Yes	**	0.0055	B-C
9							
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2
11	Sham vs. IRH	1.000	2.559	-1.559	0.2439	3	3
12	Sham vs. Met-IRH	1.000	1.322	-0.3223	0.2439	3	3
13	IRH vs. Met-IRH	2.559	1.322	1.237	0.2439	3	3
							q
							9.042
							1.869
							7.173

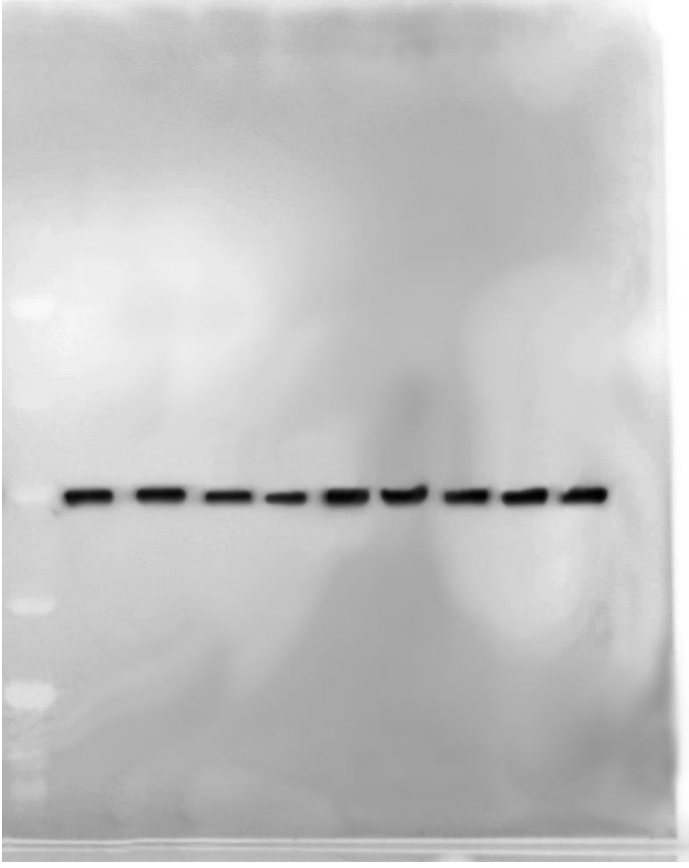
EK 23: HSP70'in rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA								
Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-1.200	-1.926 to -0.4751	Yes	**	0.0054	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	-0.4466	-1.172 to 0.2787	No	ns	0.2217	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	0.7538	0.02847 to 1.479	Yes	*	0.0431	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	1.000	2.200	-1.200	0.2364	3	3	7.181
12	Sham vs. Met-IRH	1.000	1.447	-0.4466	0.2364	3	3	2.672
13	IRH vs. Met-IRH	2.200	1.447	0.7538	0.2364	3	3	4.510

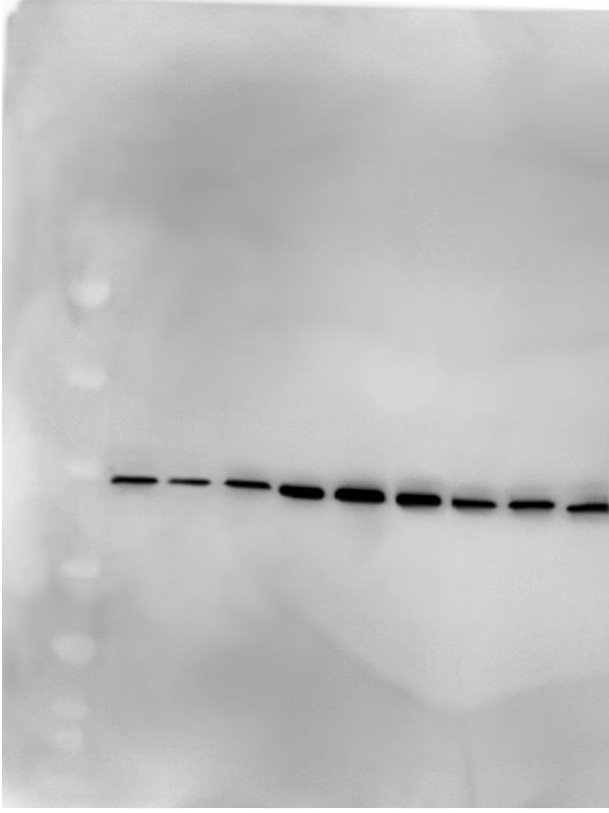
EK 24: LONP1’in rölatif protein ekspresyonunu gruplar arasında kıyaslanması ile elde edilen istatistiksel analiz sonucu

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	3						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6	Sham vs. IRH	-0.2778	-1.170 to 0.6140	No	ns	0.6284	A-B	
7	Sham vs. Met-IRH	0.1925	-0.6992 to 1.084	No	ns	0.7926	A-C	
8	IRH vs. Met-IRH	0.4703	-0.4214 to 1.362	No	ns	0.3091	B-C	
9								
10	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
11	Sham vs. IRH	1.000	1.278	-0.2778	0.2906	3	3	1.352
12	Sham vs. Met-IRH	1.000	0.8075	0.1925	0.2906	3	3	0.9369
13	IRH vs. Met-IRH	1.278	0.8075	0.4703	0.2906	3	3	2.289

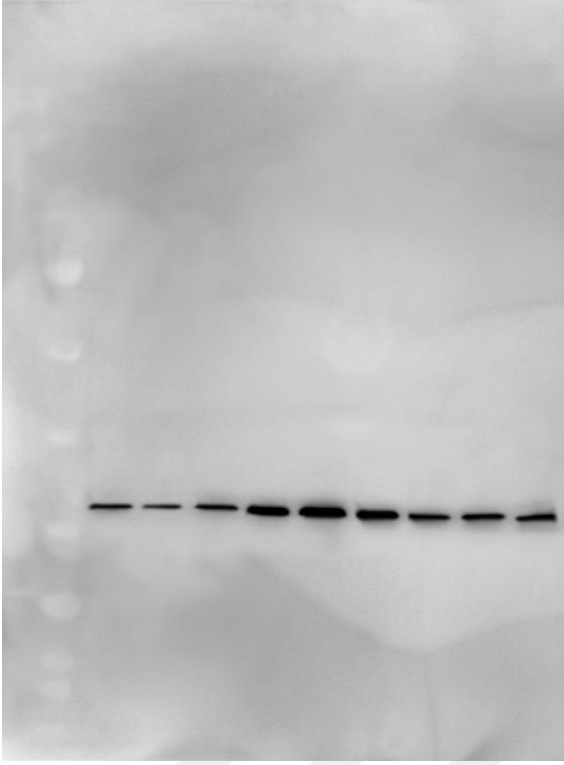
EK 25: Beta-aktin proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerekleřtirilen alıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



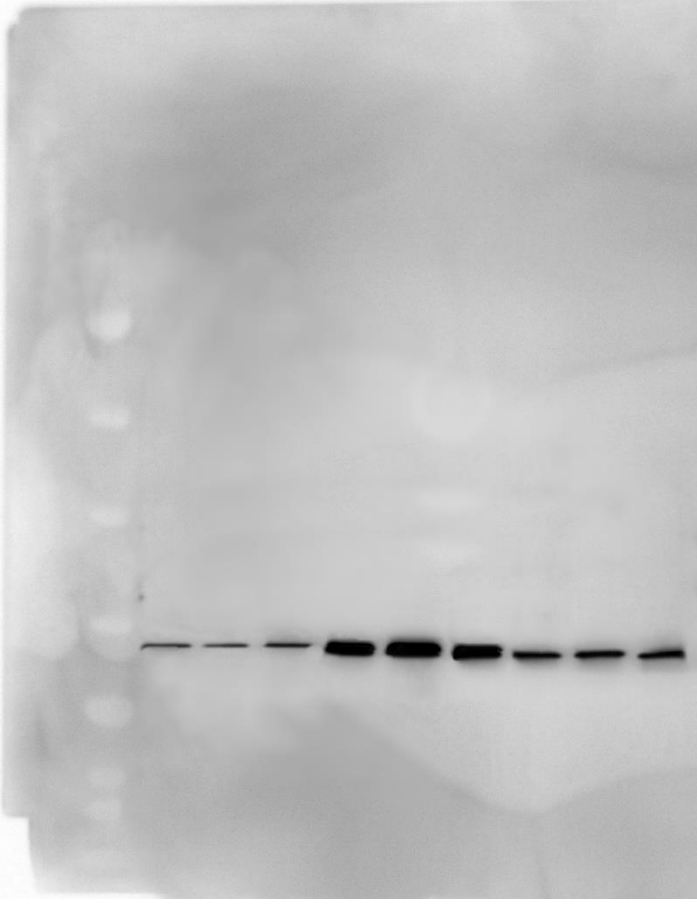
EK 26: ATF4 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



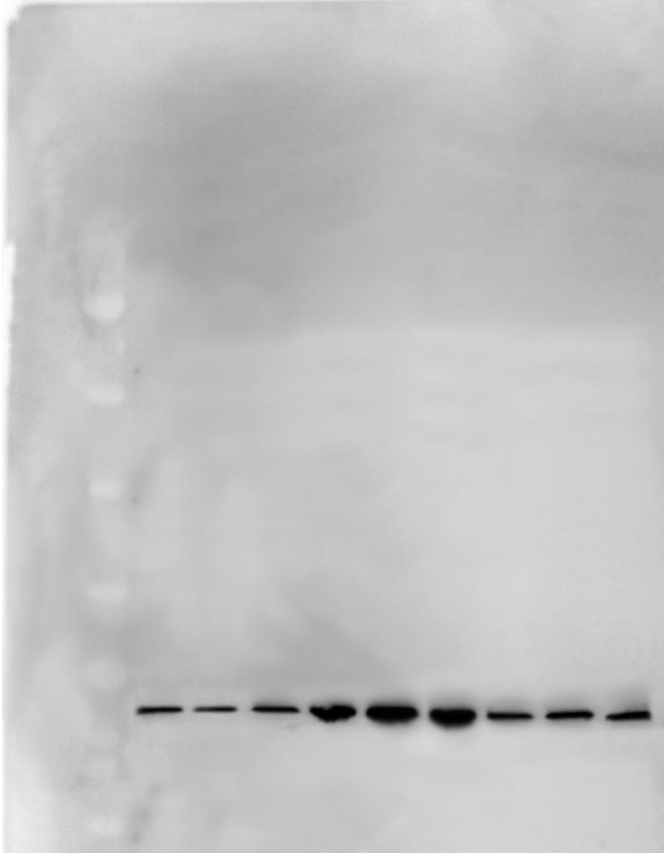
EK 27: ATF5 proteinin Western Blot ile tespiti için gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



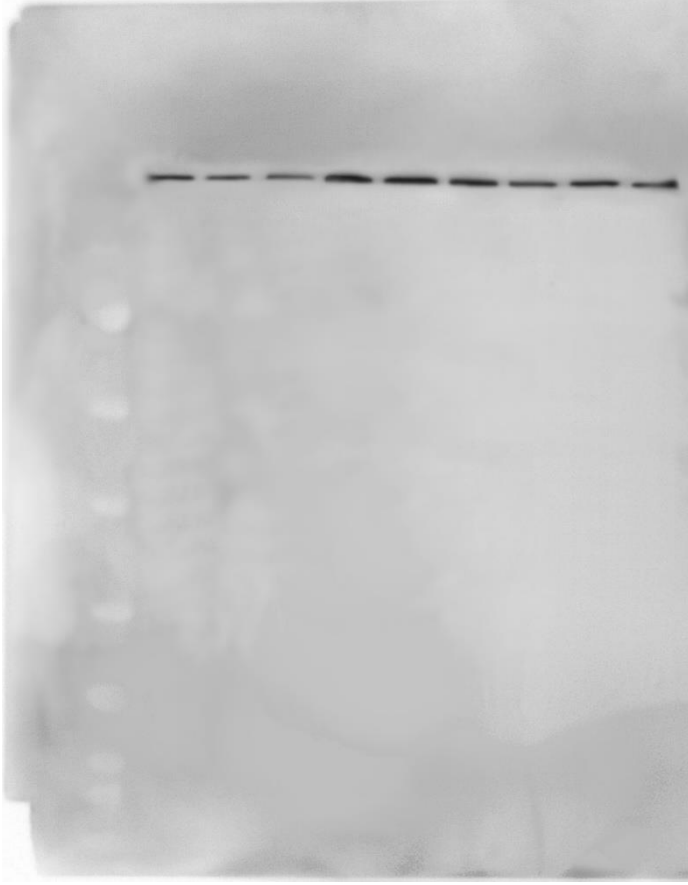
EK 28: CHOP proteinin Western Blot ile tespiti için gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



EK 29: CLPP proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



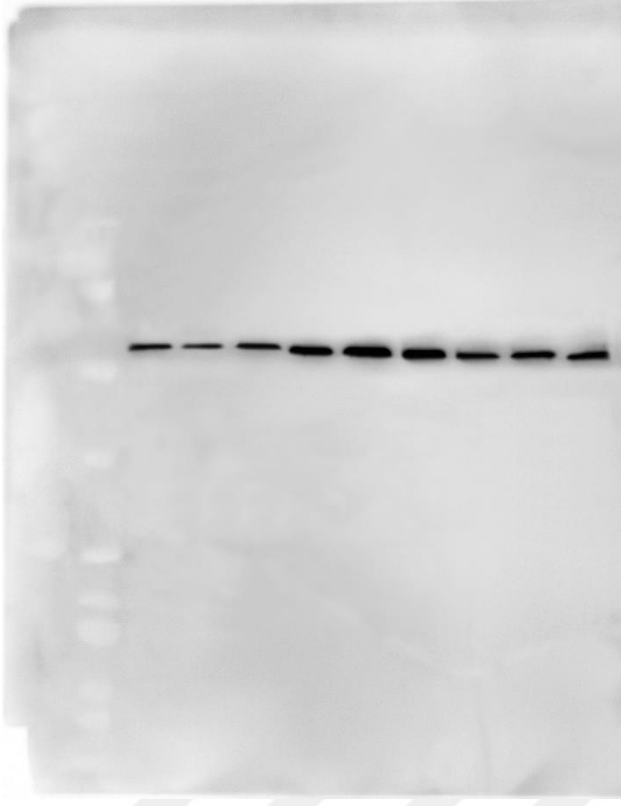
EK 30: HIF1A proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



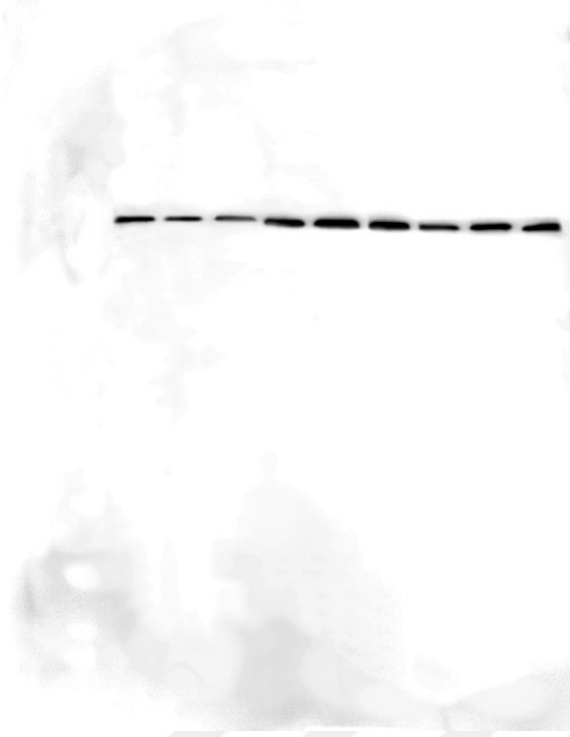
EK 31: HSP10 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



EK 32: HSP60 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



EK 33: HSP70 proteinin Western Blot ile tespitine yönelik gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.



EK 34: LONP1 proteinin Western Blot ile tespiti için gerçekleřtirilen çalıřma ile elde edilen ham membran görüntüsü.

