



The Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Ischemia Post-Conditioning on the Injury Induced by Ischemia/Reperfusion in the Rat Liver

Neda Ghasemi Pour Afshar^{1✉}, Hossein Ali Arab^{2✉}, Akram Vatannejad^{2✉}, Ghorbangol Ashabi^{3✉},
Ali Akbar Golabchifar^{2✉}

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Comparative Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 4 March 2023, Accepted: 7 June 2023

doi [10.22059/jvr.2022.348794.3302](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.348794.3302)  [20.1001.1.20082525.1402.78.3.6.2](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.348794.3302)

Abstract

BACKGROUND: Ischemia-reperfusion injury (IRI) can induce major changes in the function of different organs, including the liver. Studies have indicated that ischemic post-conditioning (HIPO) can protect the tissues against ischemia-reperfusion injury.

OBJECTIVES: To investigate the antioxidant and anti-inflammatory effects of ischemia post-conditioning against the IRI of the rat liver through four 30-second cycles of alternating ischemia and reperfusion, before 24-hour persistent reperfusion.

METHODS: Fifteen rats were randomly divided into 3 groups 1) operation control group, 2) ischemia-reperfusion (IR) group whose liver was exposed to 60-minute ischemia of by 24-hour reperfusion and 3) ischemic post-conditioning (IR+IPO) group underwent the same procedure as the second group except that before persistent reperfusion, the rats were subject to post-conditioning by four 30-second cycles of alternating ischemia and reperfusion. The changes induced by IRI and the antioxidant and anti-inflammatory effects of ischemic post-conditioning were assessed by the serum level of IL-6 using the ELISA method, malondialdehyde (MDA), and total antioxidant capacity (TAC).

RESULTS: Ischemic post-conditioning potentiated antioxidant effects and reduced the inflammation caused by the IR in the liver. The serum level of IL-6 reduced from 394.4 ± 126.4 to 124.4 ± 29.07 pg/ml (post-conditioning group), and the tissue MDA reduced from 431.4 ± 76.53 to 207.2 ± 25.77 nmol/g compared to the IR group. The data revealed that the levels of the indices returned almost to the level of the operation control group ($P < 0.001$). Additionally, the total antioxidant capacity of the liver significantly improved ($P < 0.01$) from 11.58 ± 1.87 (in the IR group) to 17.53 ± 2.51 mmol/mg (in the IR+IPO group).

CONCLUSIONS: The study demonstrates that the protective effect of ischemic post-conditioning against IR-induced injury may be mediated through decreasing inflammation and improving antioxidant activities.

Keywords: Inflammation, Ischemia/reperfusion, Ischemic post-conditioning, Liver, Oxidative stress

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Hossein Ali Arab, Tel/Fax: +9821-61117130/ +9821-66933222



How to cite this article:

Ghasemi Pour Afshar N, Arab HA, Vatannejad A, Ashabi G, Golabchifar AA. The Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Ischemia Post-Conditioning on the Injury Induced by Ischemia/Reperfusion in the Rat Liver. J Vet Res, 2023; 78(3): 213-222. doi: 10.22059/jvr.2022.348794.3302

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The serum level of IL-6 changes in different experimental groups of 1) The operation control 2) IR, and 3) IR+IPO. Data are expressed as the mean \pm SD. (***) $P < 0.001$.

Figure 2. Malondialdehyde level changes in different experimental groups of 1) The operation control 2) IR, and 3) IR+IPO. Data are expressed as the mean \pm SD. (***) $P < 0.001$.

Figure 3. The changes in the level of TAC in different experimental groups of 1) The operation control 2) IR, and 3) IR+IPO. Data are expressed as the mean \pm SD. (**) $P < 0.01$ and (*) $P < 0.05$.

اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی پس‌شرطی‌سازی ایسکمی بر ضایعات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد کبد موش صحرائی

ندا قاسمی پورافشار^۱، حسینعلی عرب^۲، اکرم وطن‌نژاد^۲، قربانگل اصحابی^۳، علی‌اکبر گلابچی‌فر^۲


^۱ دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۵ فروردین ماه ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۱۷ خرداد ماه ۱۴۰۲

doi: [10.22059/jvr.2022.348794.3302](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.348794.3302)

 [20.1001.1.20082525.1402.78.3.6.2](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.3.6.2)

چکیده

زمینه مطالعه: آسیب ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد باعث تغییرات عمده در عملکرد اعضای بدن از جمله کبد می‌شود. مطالعات نشان داده که پس‌شرطی‌سازی ایسکمی یک عضو، قادر به حفاظت آن در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد است.

هدف: بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی پس‌شرطی‌سازی ایسکمی بر ضایعات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد کبد موش صحرائی که از طریق ۴ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای متناوب ایسکمی و پرفیوژن مجدد، قبل از خونرسانی مجدد طولانی مدت، انجام شد.

روش کار: پانزده سر موش صحرائی به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند که شامل: (۱) گروه کنترل جراحی، (۲) گروه Ischemia Reperfusion (IR) که کبد آن‌ها در معرض یک ساعت ایسکمی و ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد قرار داشت و (۳) گروه Ischemic post conditioning (IR+IPO) که همانند گروه دوم تحت عمل قرار گرفتند، با این تفاوت که قبل از پرفیوژن طولانی با القاء ۴ دوره ۳۰ ثانیه‌ای متناوب از ایسکمی و پرفیوژن مجدد، در معرض پس‌شرطی‌سازی قرار گرفتند. تغییرات ایجاد شده ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد و اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی پس‌شرطی‌سازی ایسکمی، با اندازه‌گیری سطح سرمی اینترلوکین-۶، مالون دی‌آلدهید (MDA) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC)، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: پس‌شرطی‌سازی ایسکمی سبب تقویت اثرات آنتی‌اکسیدانی و کاهش التهاب ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد در کبد شد. به طوری که سطح سرمی اینترلوکین - ۶ (از $126/4 \pm 394/4$ به $29/07 \pm 124/4$ پیکوگرم در میلی‌لیتر) و مالون دی‌آلدهید بافتی (از $431/4 \pm 76/53$ به $25/77 \pm 207/2$ نانومول در گرم) را در مقایسه با گروه تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد کاهش داده و تقریباً به سطح گروه کنترل جراحی برگرداند ($P < 0/001$). همچنین سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی کبد را به طور معنی‌داری از $11/58 \pm 1/87$ میلی‌مول در میلی‌گرم (در گروه ایسکمی - پرفیوژن مجدد) به $17/53 \pm 2/51$ میلی‌مول در میلی‌گرم (در گروه پس‌شرطی‌سازی ایسکمی) بهبود بخشید ($P < 0/01$).

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر نشان داد که اثر محافظتی پس‌شرطی‌سازی در برابر آسیب ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد، ممکن است به دلیل کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو باشد.

کلمات کلیدی: استرس اکسیداتیو، التهاب، ایسکمی - پرفیوژن مجدد، پس‌شرطی‌سازی ایسکمی، کبد

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی؛ دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: حسینعلی عرب، گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

کبد ارگانی با عملکردهای مختلف است که در سوخت و ساز، سم‌زدایی و ایمنی بدن نقش مهمی بر عهده دارد و اغلب در معرض آسیب‌های مختلفی قرار می‌گیرد که این آسیب‌ها می‌توانند مرگ سلول و اختلال در عملکرد آن را به دنبال داشته باشند (۱). ایسکمی یکی از این عوامل است که در آن خونرسانی به کبد کاهش می‌یابد و این امر سبب تقلیل تأمین اکسیژن و مواد مغذی به بافت‌ها شده و

آسیب بافتی رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد ریپرفیوژن (پرفیوژن مجدد) یا خونرسانی مجدد به بافت تحت ایسکمی، تنها راه برای کاهش آسیب باشد، اما برعکس، پرفیوژن مجدد، خود نیز منجر به آسیب‌های دیگری می‌شود که به آن آسیب ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد (IRI) می‌گویند (۲). تغییرات ناشی از آسیب‌های ایسکمی - پرفیوژن مجدد در دو فاز مشخص اتفاق می‌افتد: فاز اولیه که حدود ۲ ساعت پس از شروع پرفیوژن مجدد و فاز ثانویه که ۶ تا ۴۸ ساعت پس از شروع پرفیوژن مجدد، رخ می‌دهد. اما دو حالت از ایسکمی می‌تواند زمینه‌ساز آسیب‌های ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد کبدی باشد. در حالت اول، در شرایط آنوکسی (فقدان اکسیژن) که موقع برداشتن و پیوند کبد رخ می‌دهد و دومین حالت، در نتیجه هیپوکسی سیستمیک یا شرایطی که باعث کاهش جریان خون به کبد می‌شود، بروز می‌کند (۳). مطالعات حاکی است، هنگامی که کبد دچار ایسکمی در معرض خونرسانی مجدد قرار می‌گیرد، تعداد زیادی گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) و گونه‌های واکنش‌پذیر نیتروژن (RNS) تولید می‌شود که می‌تواند زمینه ساز بروز شرایط پاتولوژیکی استرس اکسیداتیو، باشد. عوامل ایجاد شده در شرایط استرس اکسیداتیو عمدتاً بر روی پروتئین‌ها، لیپید، آنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک، اسکلت سلولی اثرگذار بوده که می‌تواند منجر به اختلال در عملکرد میتوکندری و پراکسیداسیون لیپیدی شود (۴).

نتایج بعضی مطالعات حاکی از آن است که چنانچه خونرسانی به طور متناوب و آهسته در بافت‌های قلب، روده، کلیه‌ها، ریه، مغز و کبد صورت گیرد، می‌تواند صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو از جمله التهاب و آپوپتوز را کاهش دهد. روش‌هایی که در درمان ضایعات ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد به کار می‌رود، استفاده از شرطی‌سازی است که به اشکال مختلف پیش‌شرطی‌سازی یا Ischemic preconditioning (IPC) و پس‌شرطی‌سازی یا ischemic post-conditioning (IPO) انجام می‌شود. پیش‌شرطی‌سازی ایسکمی روش مناسبی است که در مطالعات مختلف نشان داده شده که آسیب ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد را کاهش می‌دهد. در واقع پیش‌شرطی‌سازی یک روش جراحی می‌باشد که قبل از این که عضو، تحت ایسکمی طولانی مدت قرار گیرد، ابتدا در معرض دوره‌های کوتاه و متناوبی از ایسکمی و پرفیوژن قرار می‌گیرد. این روش شرطی‌سازی که باعث کاهش جراحات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد می‌شود، از دهه ۱۹۸۰ تاکنون مطالعات و تجربیات زیادی در خصوص چگونگی و مکانیزم عمل حفاظتی این روش انجام شده است (۵-۸). در راستای این روش محافظتی، مطالعاتی نیز در خصوص کاربرد دوره‌های کوتاه و متناوب ایسکمی و پرفیوژن مجدد پس از ایسکمی طولانی مدت انجام شده که به آن پس‌شرطی‌سازی ایسکمی (IPO) گفته می‌شود. مطالعات اولیه حاکی است که این روش نیز می‌تواند دارای اثر محافظتی در جلوگیری از ضایعات ناشی از پرفیوژن مجدد، از جمله کاهش شدت انفارکتوس، حفظ عملکرد اندوتلیال عروقی و کاهش آپوپتوز، باشد (۵).

اجرای پرفیوژن مجدد کوتاه مدت و کنترل شده با هدف پس‌شرطی‌سازی ایسکمی، می‌تواند تولیدات مستمر و متواتر گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن، که به دنبال اکسیژن‌رسانی ناگهانی سلول اتفاق می‌افتد را کاهش دهد و در نتیجه سبب تحریک ترشح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی و جاروب کننده‌های رادیکال‌های آزاد شود. کاربرد این روش احتمالاً سبب کاهش تجمع نوتروفیل، پاسخ التهابی و استرس اکسیداتیو می‌شود که بدین طریق می‌تواند حفاظت بافتی را در برابر ضایعات ایسکمی - پرفیوژن مجدد به دنبال داشته باشد (۹، ۱۰). به‌رغم مطالعات قابل توجهی که در مورد روش درمانی پس‌شرطی‌سازی ایسکمی برای کاهش ضایعات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد در کبد صورت گرفته است، هنوز ابهام‌های مختلفی در خصوص مکانیزم اثر و نقش واسطه‌ها و سیستم‌های پیام‌رسانی و تعداد دوره‌های متناوب مورد نیاز ایسکمی و پرفیوژن مجدد، وجود دارد. مطالعات انجام گرفته عمدتاً بر پایه تغییرات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد در فاز اولیه (۲ ساعت پس از شروع پرفیوژن مجدد) بوده است. با عنایت به این موارد و با توجه به این یافته‌ها و به دلیل اهمیت بالای ایسکمی - پرفیوژن مجدد در بروز ضایعات ناشی از جراحی‌های مختلف از جمله عمل پیوند و ضرورت بهینه‌سازی این روش برای کاهش آسیب در بافت‌ها در حین عمل جراحی، مطالعه حاضر در پی آن بوده است تا اثرات حفاظتی پس‌شرطی‌سازی ایسکمی بر کاهش اثر التهابی و استرس اکسیداتیو ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد در کبد موش صحرایی را در فاز دوم (۲۴ ساعت پس از شروع پرفیوژن مجدد) طی ۴ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش کار

حیوانات و گروه بندی: در مطالعه حاضر، تعداد ۱۵ سر موش صحرایی بالغ نر، نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰ تا ۲۷۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، خریداری شدند و در اتاق مخصوص، تحت کنترل و مراقبت قرار گرفتند. در طی دوره مطالعه،

شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و حیوانات در شرایط متناوب ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذای تجاری نگهداری شدند. موش‌های مورد مطالعه به‌طور تصادفی به ۳ گروه ۵ تایی شامل: (۱) گروه کنترل جراحی، (۲) گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد (IR) و (۳) گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد به همراه پس‌شرطی‌سازی ایسکمی (IR+IPO) تقسیم شدند. در مطالعه حاضر، تمام موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر طبق اصول و دستورالعمل‌های کمیته مراقبت و کار با حیوانات آزمایشگاهی سازمانی، رعایت شد.

روش جراحی و نحوه ایجاد ایسکمی _ پرفیوژن مجدد و پس شرطی سازی: موش‌ها در شب قبل از جراحی در پرهیز غذایی قرار داشتند اما دسترسی آزاد به آب وجود داشت. در روز آزمایش، موش‌ها در تمام گروه‌ها با تزریق داخل صفاقی ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کتامین ۱۰ درصد به همراه ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم زایلازین ۲ درصد بیهوش شدند. سپس با استفاده از برش عرضی کوچک که از غضروف خنجری به طرف پایین آغاز و تا سطح بالای کبد ادامه پیدا کرد، عمل لاپاراتومی انجام شد. پس از لاپاراتومی و دسترسی به محوطه بطنی، لیگامان‌هایی که کبد را به دیافراگم متصل می‌کنند، قطع شدند و سپس کبد به آرامی از محوطه بطنی خارج شد. برای این‌که ناف کبد در معرض قرار گرفته شود، کبد بر روی سطح شکمی قرار داده شد. برای ایجاد ایسکمی، ورید باب، شریان کبدی (خونسازی به لوب‌های چپ و میانی کبد را انجام می‌دهند) و مجرای صفراوی با استفاده از گیره بولداگ به مدت ۶۰ دقیقه مسدود شدند (۱۱). اما با برداشتن گیره، عمل پرفیوژن مجدد شروع گردید که تا مدت ۲۴ ساعت ادامه داشت. موش‌ها در گروه کنترل جراحی هم تحت جراحی اما بدون گیره‌گذاری قرار گرفتند. کبدهای حیوانات گروه دوم تحت یک ساعت ایسکمی و ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد قرار گرفتند. اقدامات انجام شده در گروه سوم همانند گروه دوم بود، اما قبل از شروع پرفیوژن مجدد طولانی مدت، یک چرخه ۳۰ ثانیه پرفیوژن مجدد و ۳۰ ثانیه ایسکمی با چهار تکرار، به منظور اجرای روش پس‌شرطی‌سازی بر روی کبد انجام شد. پس از طی ۲۴ ساعت با شروع پرفیوژن مجدد، ابتدا از قلب خون‌گیری انجام شد و سپس حیوانات به روش مرگ آسان کشته شدند و بلافاصله نمونه‌های بافتی از نقاط مختلف لوب‌های چپ و میانی کبد در مقاطع کوچک برداشته شدند. نمونه‌های دریافت شده به فریزر -70 درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌ها، نگهداری شدند. نمونه‌های خون در دور 2000 RPM سانتریفیوژ شدند و سرم‌های به دست آمده نیز تا زمان انجام آزمایشات در فریزر -70 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و بیومارکرهای اکسیداتیو: پس از این‌که نمونه‌های منجمد سرم به دمای اتاق رسیدند، اندازه‌گیری فاکتور التهابی اینترلوکین -6 با استفاده از کیت تجاری الیزا با اساس ساندویچی (R&D Systems, Duo Set). شماره سریال (DY506-05) انجام شد. در این تکنیک، آنتی‌بادی‌ها بر روی سطح چاهک‌ها پوشش داده شدند. سپس نمونه‌های سرم حاوی آنتی‌ژن به چاهک‌ها اضافه شد و بعد از آن، برای انجام واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی و ایجاد کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از انجام مراحل شستشو، سپس آنتی‌بادی ثانویه علامت‌گذاری شده با آنزیم را اضافه نموده تا ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق واکنش دهند. پس از سه بار شستشوی میکروپلیت الیزا محلول سوبسترا به آن اضافه گردید و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از اضافه کردن محلول متوقف‌کننده، چگالی نوری هر چاهک در طول موج 450 نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت اینترلوکین -6 (پیکوگرم در میلی‌لیتر) برای هر نمونه تعیین گردید.

برای اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت کبد، بعد از خارج نمودن نمونه‌ها از فریزر -70 درجه سانتی‌گراد، عمل همگن سازی با اضافه نمودن بافر فسفات به بافت کبد (نسبت ۱۰:۱) و با استفاده از دستگاه همگن‌ساز انجام شد. سپس مخلوط همگن شده با دور 12000 به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پس از جدا شدن محلول شفاف فوقانی، میزان مالون دی‌آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص تعیین پراکسیداسیون لیپیدی، با روش تیوباربیتوریک اسید (TBARS)، اندازه‌گیری شد. در این روش مالون دی‌آلدهید با تیوباربیتوریک اسید واکنش می‌دهد که حاصل آن ماده‌ای صورتی رنگ است و ماکزیمم جذب آن در طول موج 530 نانومتر است که با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (۱۲). به‌طور خلاصه، نمونه با معرف تری‌کلرواستیک اسید مخلوط و ورتکس گردید و سپس در بن ماری جوش (۱۵ دقیقه) قرار گرفت و پس از سرد شدن به مدت ۱۰ دقیقه با دور 1000 گرم سانتریفیوژ گردید و جذب مایع صورتی رنگ خوانده شد.

برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بافت کبد، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC)، از روش ABTS (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl) azinobis (ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) استفاده شد. در این روش ABTS در حضور پراکسیداز (مت‌میوگلوبین) و پراکسید

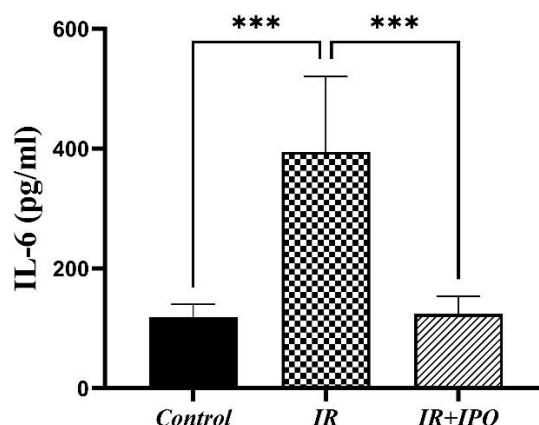
هیدروژن به $ABTS^+$ سبز اکسیده مبدل می‌شود که در حضور آنتی‌اکسیدان مهار می‌گردد. ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام نمونه با اندازه‌گیری، جذب $ABTS^+$ در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد سنجش قرار گرفت (۱۳). به‌طور خلاصه، پس از تهیه محلول $ABTS$ با غلظت ۷ میلی‌مولار، محلول پرسولفات پتاسیم اضافه گردید و مدت یک شب در تاریکی و دمای اتاق انکوبه گردید. نهایتاً نمونه با محلول آماده به کار $ABTS$ مخلوط گردید و جذب آن مورد سنجش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: برای اجرای محاسبات آماری داده‌های خام، از نسخه ۹ نرم افزار آماری GraphPad Prism استفاده شد و تمام داده‌ها براساس انحراف معیار \pm میانگین نشان داده شده‌اند. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. به منظور مقایسه بین میانگین پارامترهای مختلف، از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی (Tukey Test) استفاده شد.

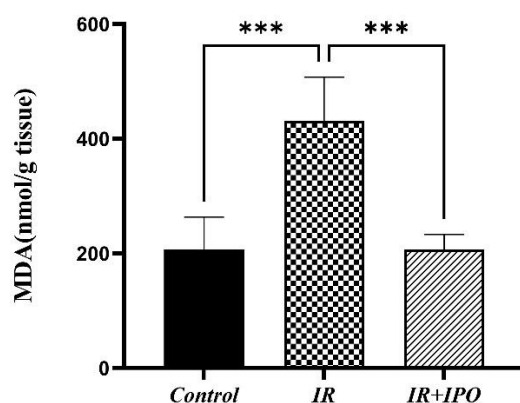
نتایج

تغییرات در میزان اینترلوکین ۶ سرم: میزان اینترلوکین ۶ در موش‌هایی که کبد آن‌ها در معرض ۶۰ دقیقه ایسکمی و ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد قرار گرفته بودند افزایش یافت، اما کاربرد پس‌شرطی‌سازی ایسکمی سبب بهبود این تغییرات شد. همان‌طور که **تصویر ۱** نشان می‌دهد، سطح اینترلوکین ۶ سرم در گروه تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد ($126/4 \pm 394/4$ پیکوگرم در میلی‌لیتر) نسبت به گروه کنترل جراحی ($20/6 \pm 119/6$ پیکوگرم در میلی‌لیتر) افزایش معنی‌داری یافت ($P < 0.001$). اما در گروه سوم که کبد تحت ایسکمی، قبل از پرفیوژن مجدد در معرض ۴ سیکل کوتاه پس‌شرطی‌سازی قرار داشتند، سطح اینترلوکین-۶، از $126/4 \pm 394/4$ پیکوگرم در میلی‌لیتر در گروه ایسکمی - پرفیوژن مجدد با میزان معنی‌داری ($P < 0.001$) کاهش یافت و به سطح $29/07 \pm 124/4$ پیکوگرم در میلی‌لیتر رسید.

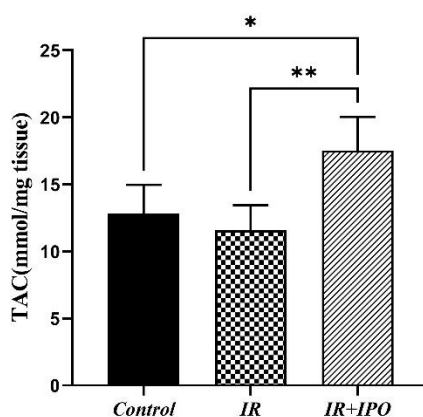
تغییرات در میزان بیومارکرهای استرس اکسیداتیو: مقایسه شاخص‌های استرس اکسیداتیو در نمونه‌های بافت کبد جمع‌آوری شده از گروه‌های مختلف تحت مطالعه، نشان داد که ایسکمی - پرفیوژن مجدد در گروه دوم به‌طور معنی‌داری باعث تغییر سطح مالون دی‌آلدئید در بافت‌های کبد حیوانات تحت درمان شد. به‌طوری که میزان آن از $56/70 \pm 206/6$ نانومول در گرم در گروه کنترل جراحی به $76/53 \pm 431$ نانومول در گروه ایسکمی - پرفیوژن مجدد، افزایش یافت ($P < 0.001$). اما در گروهی که کبد آن‌ها در معرض ایسکمی - پرفیوژن مجدد به همراه پس‌شرطی‌سازی ایسکمی قرار داشتند، میزان این شاخص به‌صورت معنی‌داری ($P < 0.001$)، از $76/53 \pm 431$ نانومول در گرم (در گروه ایسکمی - پرفیوژن مجدد) به $25/77 \pm 207/2$ (نانومول در گرم) کاهش یافت (**تصویر ۲**).



تصویر ۱. تغییرات سطح سرمی اینترلوکین ۶ در گروه‌های مختلف آزمایشی شامل گروه کنترل جراحی (control) گروهی که حیوانات آن تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد (IR) قرار داشتند و گروهی که علاوه بر ایسکمی - پرفیوژن مجدد در معرض ۴ سیکل پس‌شرطی‌سازی، ایسکمی (IR+IPO) قرار گرفتند. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار، بیان شده و علامت‌های متفاوت بر روی ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف است ($P < 0.001$).



تصویر ۲. تغییرات سطح مالون دی‌آلدیید در گروه‌های مختلف آزمایشی شامل گروه کنترل جراحی (control) گروهی که حیوانات آن تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد (IR) قرار داشتند و گروهی که علاوه بر ایسکمی - پرفیوژن مجدد در معرض ۴ سیکل پس‌شرطی‌سازی ایسکمی (IR+IPO) قرار گرفتند. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار، بیان شده و علامت‌های متفاوت بر روی ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف است ($P < 0.001$).



تصویر ۳. تغییرات سطح ظرفیت تام‌آنتی‌اکسیدان در گروه‌های مختلف آزمایشی شامل گروه کنترل جراحی (control) گروهی که حیوانات آن تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد (IR) قرار داشتند و گروهی که علاوه بر ایسکمی - پرفیوژن مجدد در معرض ۴ سیکل پس‌شرطی‌سازی ایسکمی (IR+IPO) قرار گرفتند. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده و علامت‌های متفاوت بر روی ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف است ($P < 0.05$ و $P < 0.01$).

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که میزان TAC یا ظرفیت تام‌آنتی‌اکسیدانی در گروهی که در معرض ایسکمی - پرفیوژن مجدد قرار گرفته بودند، هرچند کاهش پیدا کرده بود، اما این کاهش معنی‌دار نبود (سطح TAC در گروه کنترل جراحی از $2/14 \pm 13/03$ میلی‌مول در میلی‌گرم به $2/51 \pm 11/53$ میلی‌مول در میلی‌گرم در گروه ایسکمی-پرفیوژن رسید). اما این میزان در گروه سوم که به‌طور هم‌زمان، تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد به همراه پس‌شرطی‌سازی ایسکمیک قرار داشتند، از میزان $1/87 \pm 11/58$ میلی‌مول در میلی‌گرم (گروه ایسکمی - پرفیوژن مجدد) به‌طور معنی‌داری ($P < 0.01$) به $2/51 \pm 17/53$ میلی‌مول در میلی‌گرم افزایش یافت (تصویر ۳).

بحث

مطالعات مختلف حاکی است، آسیب وارده در طی پرفیوژن مجدد و تأمین دوباره اکسیژن در بافتی که در معرض ایسکمی طولانی مدت قرار گرفته، به‌طور پارادوکسیکال، به مراتب بیشتر از ایسکمی به‌تنهایی می‌باشد. به این پدیده یا ضایعه ناشی از آن آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد گفته می‌شود (۱۴). از جمله مکانیسم‌هایی که در آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد نقش دارند می‌توان به افزایش میزان کلسیم داخل سلولی، استرس اکسیداتیو، نکروز، آپوپتوز و ارتشاح نوتروفیل‌ها اشاره کرد که تمام این‌ها می‌توانند منجر به تشدید آسیب‌های کبدی شوند (۱۵). با شناخت این پدیده مهم، توجه بسیاری از محققین به بررسی و کشف روش‌های نوین، جهت کاهش آسیب‌های ایسکمی-پرفیوژن مجدد جلب شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های شرطی‌سازی اشاره کرد که به دو صورت پیش‌شرطی‌سازی و پس‌شرطی‌سازی اجرا می‌شود. مطالعه حاضر در پی آن بوده است تا اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی پس‌شرطی‌سازی

ایسکمی را متعاقب ایسکمی کبد به مدت یک ساعت و پرفیوژن مجدد به مدت ۲۴ ساعت، مورد بررسی قرار دهد. نتایج نشان دادند که استفاده از پس‌شرطی‌سازی ایسکمی به‌طور معنی‌داری سبب بهبودی سطح سرمی اینترلوکین-۶ و مالون دی‌آلدهید بافتی در گروهی شد که به دلیل قرار گرفتن در معرض ایسکمی - پرفیوژن مجدد کبد، میزان آن‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده بود. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که پس‌شرطی‌سازی کبد همچنین سبب افزایش سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان در حیواناتی می‌شود که میزان آن به دلیل ایسکمی - پرفیوژن مجدد کبد، کاهش یافته بود.

هم راستا با مطالعه حاضر، مطالعات متعددی، افزایش و تغییرات سطح اینترلوکین - ۶ و آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد بافت کبد در حیوانات مختلف را نشان داده‌اند (۱۶، ۱۷). از جمله، Xiong و همکاران که در سال ۲۰۱۸، اثر ایسکمی - پرفیوژن مجدد را در بافت کبد موش صحرایی مورد بررسی قرار داده بودند، سطوح بالای از میزان اینترلوکین - ۶ همراه با افزایش آپوپتوز سلول‌های کبدی را در حیوانات تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد کبد را شاهد بودند. همچنین در مطالعه انجام شده توسط Rong و همکاران در سال ۲۰۱۷، افزایش سطح اینترلوکین-۶ در موش‌های صحرایی تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد کبدی نیز گزارش گردیده است (۱۸، ۱۹). علاوه بر این، Xu و همکاران در سال ۲۰۲۱ نیز نشان دادند که در موش‌های سوری که تحت ۳۰ دقیقه ایسکمی و به دنبال آن ۲ ساعت پرفیوژن مجدد قرار گرفته بودند، سطح اینترلوکین - ۶ و آسیب اکسیداتیو افزایش یافت (۲۰). اینترلوکین - ۶ یک واسطه مهم در پاسخ التهابی در طول ایسکمی - پرفیوژن مجدد کبدی است (۲۱-۲۳) که تغییرات آن می‌تواند نشانگر وجود واکنش‌های التهابی باشد که ظهور آسیب‌های بافتی را به دنبال داشته باشد. لذا در مطالعه حاضر اندازه‌گیری سطح سرمی اینترلوکین - ۶ به عنوان یکی از شاخص‌های تعیین کننده آسیب، انتخاب گردید و نتایج نشان داد که سطح اینترلوکین - ۶ به‌طور قابل توجهی در حیوانات تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد افزایش یافته است. نتایج مطالعه حاضر، نشان داد که درمان ایسکمی - پرفیوژن مجدد به روش پس‌شرطی‌سازی ایسکمی، می‌تواند میزان اینترلوکین - ۶ را در موش‌هایی که در معرض ایسکمی - پرفیوژن مجدد قرار گرفته بودند، به سطح کنترل بازگرداند. در مطالعه حاضر علاوه بر اینترلوکین-۶، دو شاخص دیگر یعنی مالون دی‌آلدهید بافتی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان برای ارزیابی اثر پس‌شرطی‌سازی ایسکمی بر روی تغییرات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاکی است پس‌شرطی‌سازی ضمن این که سبب کاهش مالون دی‌آلدهید گردید، سبب افزایش معنی‌دار میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان بافتی در گروهی گردید که تحت درمان ایسکمی - پرفیوژن مجدد به همراه پس‌شرطی‌سازی ایسکمی قرار داشتند.

تغییرات شاخص‌های مورد بررسی در مطالعات مرتبط با ایسکمی - پرفیوژن مجدد و استفاده از روش درمانی شرطی‌سازی، مورد توجه محققین بسیاری قرار گرفته است. در مطالعه‌ای، Liu و همکاران در سال ۲۰۲۰، نشان دادند که پس‌شرطی‌سازی ایسکمی باعث افزایش نفوذ سلول‌های B و کاهش نفوذ سلول‌های T CD8 به بافت تحت ایسکمی شده و در نتیجه موجب کاهش سطح اینترلوکین - ۶ در خون می‌شود (۲۴). Tian و همکاران در سال ۲۰۲۰، پس‌شرطی‌سازی ایسکمی را به صورت ۱۰ سیکل ثانیه ایسکمی و ۱۰ ثانیه پرفیوژن مجدد با ۶ تکرار، در بافت کلیه موش‌های صحرایی تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد، اجرا کردند. پس از ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد، نتایج نشان داد که سطح اینترلوکین - ۶ کاهش می‌یابد (۲۵). همچنین در مطالعه Schewe و همکاران در سال ۲۰۲۱ که اثر پس‌شرطی‌سازی ایسکمی را بر روی بافت کبد موش صحرایی با انجام ۴ سیکل ۶۰ ثانیه ایسکمی و ۶۰ ثانیه پرفیوژن مجدد، بررسی کرده بودند، نشان داده شد که ۲ ساعت بعد از پرفیوژن مجدد، با کاهش سطح اینترلوکین - ۶ مواجه بودند (۲۳). علاوه بر این‌ها، Zhang و همکاران که در سال ۲۰۲۰ اثر پس‌شرطی‌سازی به صورت سه سیکل ۱۰ ثانیه ایسکمی و ۱۰ ثانیه پرفیوژن مجدد را بر روی بافت قلب موش‌های صحرایی تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد، ارزیابی کرده بودند، کاهش سطح اینترلوکین - ۶ رو به رو بوده‌اند (۲۶). در مطالعه انجام شده توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۹، نیز نشان داده شده که پس‌شرطی‌سازی ایسکمی به صورت ۱۰ دقیقه ایسکمی و سپس ۱۰ دقیقه پرفیوژن مجدد، طی سه سیکل در موش‌های سوری تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد در بافت مغز، با کاهش سطح اینترلوکین - ۶ همراه بوده است (۲۷). این یافته‌ها با مطالعه حاضر که پس‌شرطی‌سازی ایسکمی به صورت ۳۰ ثانیه ایسکمی و سپس ۳۰ ثانیه پرفیوژن مجدد طی ۴ سیکل، به‌طور قابل توجهی باعث کاهش سطح اینترلوکین - ۶ نسبت به گروه تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد شده، همخوانی دارد. اینترلوکین - ۶ نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مختلف در بافت‌های بدن دارد (۲۸). عملکرد فیزیولوژیک اینترلوکین - ۶ برای هموستاز و بازسازی بافتی، تقویت سیستم دفاعی و تنظیم عملکردهای متابولیک کبد بسیار مهم است (۲۹). اما تولید بیش از حد اینترلوکین - ۶، موجب افزایش ترشح ایمونوگلوبولین و تحریک تولید خود ایمنی در بافت‌ها می‌شود. چون

این ماده به‌عنوان یک عامل تحریک‌کننده مهم برای شروع پاسخ فاز حاد در سلول‌های کبدی محسوب می‌شود، فعال شدن مداوم آن در شرایط التهابی مضر است و حتی ممکن است موجب سرطان کبد شود (۲۸).

استرس اکسیداتیو به‌عنوان یک عامل مهم در آسیب ایسکمی _ پرفیوژن مجدد در بسیاری از ارگان‌ها محسوب می‌شود، که نقش مهمی در آپوپتوز سلول ایفا می‌کند. تولید بیش از حد گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در طی پرفیوژن مجدد، منجر به آسیب‌های زیادی از جمله اکسیداسیون پروتئین‌ها، آسیب DNA و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود. افزایش سطح مالون دی‌آلدئید انعکاسی از درجه پراکسیداسیون لیپیدی است. در حالی که بالا بودن سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نشان دهنده توانایی بدن در پاکسازی گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و نیتروژن می‌باشد (۳۰، ۳۱). Bilici و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مطالعه مشابهی با Eken و همکاران در سال ۲۰۱۹ در موش صحرایی نشان دادند که قرار گرفتن کبد موش‌ها در معرض ۶۰ دقیقه ایسکمی و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد، سبب افزایش میزان مالون دی‌آلدئید و کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود (۳۲، ۳۳). در مطالعه Ibrahim و همکاران در سال ۲۰۲۱ با ایجاد ایسکمی به مدت ۴۰ دقیقه و پرفیوژن مجدد به مدت ۶۰ دقیقه در بافت کبد موش صحرایی نشان داده شد که سطح مالون دی‌آلدئید افزایش و سطح آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز کاهش می‌یابد (۳۴). اما بعضی مطالعات نشان داده‌اند که پس‌شرطی‌سازی ایسکمی به‌طور قابل توجهی آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از ایسکمی _ پرفیوژن مجدد را با واسطه مهار پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش می‌دهد. در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که پس‌شرطی‌سازی ایسکمی در حالی که به‌طور قابل توجهی سطح مالون دی‌آلدئید را کاهش داد، اما باعث افزایش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های کبدی نیز شد. در مطابقت با نتایج مطالعه حاضر، He و همکاران در سال ۲۰۲۱، اثر پس‌شرطی‌سازی ایسکمی را بر روی آسیب‌های اکسیداتیو بررسی کردند، که نتایج، نشان دهنده کاهش سطح مالون دی‌آلدئید و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز بوده است (۱۰). همچنین Niu و همکاران در سال ۲۰۲۰، در مطالعه‌ای مشابه Gao و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثر حفاظتی پس‌شرطی‌سازی ایسکمی اندام حرکتی را بر روی بافت کبد در موش صحرایی بررسی کردند و نشان دادند که سطح مالون دی‌آلدئید کاهش و سطح سوپراکسید دیسموتاز افزایش می‌یابد (۳۵، ۳۶).

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر نشان داد که پس‌شرطی‌سازی ایسکمی با ۴ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای ایسکمی _ پرفیوژن مجدد، می‌تواند به‌طور قابل توجهی آسیب‌های ناشی از ایسکمی _ پرفیوژن مجدد کبدی در طی ۲۴ ساعت پس از شروع پرفیوژن مجدد را از طریق کاهش التهاب و آسیب‌های اکسیداتیو، کاهش دهد. براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، به‌نظر می‌رسد که غلظت‌های فیزیولوژیکی اینترلوکین _ ۶ به جای اثر التهابی باعث ایجاد یک اثر ضدالتهابی شده است. در مطالعه حاضر نشان داده شد که پس‌شرطی‌سازی می‌تواند با واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی سبب ایجاد اثرات حفاظتی بر علیه ضایعات ناشی از ایسکمی _ پرفیوژن مجدد در طولانی مدت شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پس‌شرطی‌سازی کبد سبب افزایش سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان در حیوانات می‌شود که میزان آن به دلیل ایسکمی _ پرفیوژن مجدد کبد، کاهش می‌یابد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای تأمین اعتبار مورد نیاز مطالعه حاضر و همچنین از دکتر قربانگل اصحابی و دکتر علی‌اکبر گلابچی فر به پاس محبت و مساعدت‌های فراوانی که در انجام مراحل مختلف مطالعه حاضر داشتند، تشکر و قدردانی کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Sookoian S, Pirola CJ. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *WJG*. 2015;21(3):711. [doi: 10.3748/wjg.v21.i3.711](https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.711) PMID: 25624707
2. Lee SH, Culbertson C, Korneszcuk K, Clemens MG. Differential mechanisms of hepatic vascular dysregulation with mild vs. moderate ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(5):G1219-G26. [doi: 10.1152/ajpgi.00527.2007](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00527.2007) PMID: 18325981
3. Rodríguez A, Taurà P, Domingo MI, Herrero E, Camps J, Forcada P, Sabaté S, Cugat E. Hepatic cytoprotective effect of ischemic and anesthetic preconditioning before liver resection when using intermittent vascular inflow occlusion: a randomized clinical trial. *Surgery*. 2015;157(2):249-59. [doi: 10.1016/j.surg.2014.09.005](https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.09.005) PMID: 25616941
4. Cannistrà M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, Naso A, Grande R, Serra R, Nardo B. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *Int J Surg*. 2016;33:S57-S70. [doi: 10.1016/j.ijsu.2016.05.050](https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2016.05.050) PMID: 27255130
5. Zhang SE, Wen SH, Su YX, Zheng GS, Wang DK, Liang YJ, Liao GQ. Synergistic effects of ischemic preconditioning and immediate post-conditioning in the protection against ischemia/reperfusion injury in rabbit submandibular glands. *Eur J Oral Sci*. 2018;126(4):282-91. [doi: 10.1111/eos.12540](https://doi.org/10.1111/eos.12540) PMID: 30006965
6. Adam ANI. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Int J Gen Med*. 2014;7:483. [doi: 10.2147/IJGM.S66766](https://doi.org/10.2147/IJGM.S66766) PMID: 25382983
7. Kanoria S, Glantzounis G, Quaglia A, Dinesh S, Fusai G, Davidson BR, Seifalian AM. Remote preconditioning improves hepatic oxygenation after ischaemia reperfusion injury. *Transpl Int*. 2012;25(7):783-91. [doi: 10.1111/j.1432-2277.2012.01481.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2012.01481.x) PMID: 22533545
8. Sawashita Y, Hirata N, Yoshikawa Y, Terada H, Tokinaga Y, Yamakage M. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through unacylated ghrelin-induced activation of the JAK/STAT pathway. *Basic Res Cardiol*. 2020;115(4):1-12. [doi: 10.1007/s00395-020-0809-z](https://doi.org/10.1007/s00395-020-0809-z) PMID: 32607622
9. Theodoraki K, Karmanioliou I, Tympa A, Tasoulis MK, Nastos C, Vassiliou I, Arkadopoulos N, Smyrniotis V. Beyond preconditioning: postconditioning as an alternative technique in the prevention of liver Ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8235921. [doi: 10.1155/2016/8235921](https://doi.org/10.1155/2016/8235921) PMID: 27340509
10. He JX, Wang K, Zhou S, Fang XC, Zhang B, Yang Y, Wang N. Protective effect of ischemic postconditioning on ischemia reperfusion injury in steatotic rat livers. *Ann Transl Med*. 2021;9(16):1295. [doi: 10.21037/atm-21-2275](https://doi.org/10.21037/atm-21-2275) PMID: 34532432
11. Arab HA, Sasani F, Rafiee MH, Fatemi A, Javaheri A. Histological and biochemical alterations in early-stage lobar ischemia-reperfusion in rat liver. *WJG*. 2009;15(16):1951. [doi: 10.3748/wjg.15.1951](https://doi.org/10.3748/wjg.15.1951) PMID: 19399926
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-8. [doi: 10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3) PMID: 36810
13. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. 1993;84(4):407-12. [doi: 10.1042/cs0840407](https://doi.org/10.1042/cs0840407) PMID: 8482045
14. Saidi RF, Kenari SKH. Liver ischemia/reperfusion injury: an overview. *J Invest Surg*. 2014;27(6):366-79. [doi: 10.3109/08941939.2014.932473](https://doi.org/10.3109/08941939.2014.932473) PMID: 25058854
15. Chen JC, Ng CJ, Chiu TF, Chen HM. Altered neutrophil apoptosis activity is reversed by melatonin in liver ischemia-reperfusion. *J Pineal Res*. 2003;34(4):260-4. [doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.t01-1-00031.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2003.t01-1-00031.x) PMID: 12662347
16. Yang L, Wang W, Wang X, Zhao J, Xiao L, Gui W, Fan H, Xia J, Li Z, Yan J, Alasbahi A. Creg in hepatocytes ameliorates liver ischemia/reperfusion injury in a TAK1-dependent manner in mice. *Hepatology*. 2019;69(1):294-313. [doi: 10.1002/hep.30203](https://doi.org/10.1002/hep.30203) PMID: 30076625
17. Xiao Q, Ye Q, Wang W, Xiao J, Fu B, Xia Z, Zhang X, Liu Z, Zeng X. Mild hypothermia pretreatment protects against liver ischemia reperfusion injury via the PI3K/AKT/FOXO3a pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):7520-6. [doi: 10.3892/mmr.2017.7501](https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7501) PMID: 28944825
18. Xiong L, Yu K, Zhen S. MiR-93 blocks STAT3 to alleviate hepatic injury after ischemia-reperfusion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(16):5295-304. [doi: 10.26355/eurrev_201808_15729](https://doi.org/10.26355/eurrev_201808_15729) PMID: 30178854

19. Rong Y-P, Huang H-T, Liu J-S, Wei L. Protective effects of geniposide on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2017;49(6):1455-1460. doi: [10.1016/j.transproceed.2017.02.063](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.02.063) PMID: 28736023
20. Xu L, Ge F, Hu Y, Yu Y, Guo K, Miao C. Sevoflurane postconditioning attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury by limiting HMGB1/TLR4/NF-κB Pathway via modulating microRNA-142 in vivo and in vitro. *Front Pharmacol.* 2021;12:646307. doi: [10.3389/fphar.2021.646307](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.646307) PMID: 33935744
21. Li J, Zhang Q, Li S, Dai W, Feng J, Wu L, Liu T, Chen K, Xia Y, Lu J, Zhou Y. The natural product fucoidan ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:687-96. doi: [10.1016/j.biopha.2017.07.109](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.109) PMID: 28797984
22. Li Z, Wang Y, Zhang Y, Wang X, Gao B, Li Y, Li R, Wang J. Protective effects of fisetin on hepatic Ischemia-reperfusion injury through alleviation of apoptosis and oxidative stress. *Arch Med Res.* 2021;52(2):163-73. doi: [10.1016/j.arcmed.2020.10.009](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.009) PMID: 33645502
23. Schewe J, Makeschin MC, Khandoga A, Zhang J, Mayr D, Rothenfußer S, Schnurr M, Gerbes AL, Steib CJ. To protect fatty livers from Ischemia reperfusion injury: role of Ischemic postconditioning. *Dig Dis Sci.* 2021;66:1349-59. doi: [10.1007/s10620-020-06328-w](https://doi.org/10.1007/s10620-020-06328-w) PMID: 32451758
24. Liu C, Yang J, Zhang C, Geng X, Zhao H. Remote ischemic conditioning reduced cerebral ischemic injury by modulating inflammatory responses and ERK activity in type 2 diabetic mice. *Neurochem Int.* 2020;135:104690. doi: [10.1016/j.neuint.2020.104690](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104690) PMID: 31981607
25. Tian Y, Shu J, Huang R, Chu X, Mei X. Protective effect of renal ischemic postconditioning in renal ischemic-reperfusion injury. *Transl Androl Urol.* 2020;9(3):1356-65. doi: [10.21037/tau-20-859](https://doi.org/10.21037/tau-20-859) PMID: 32676420
26. Zhang XY, Huang Z, Li QJ, Zhong GQ, Meng JJ, Wang DX, Tu RH. Ischemic postconditioning attenuates the inflammatory response in ischemia/reperfusion myocardium by upregulating miR-499 and inhibiting TLR2 activation. *Mol Med Rep.* 2020;22(1):209-18. doi: [10.3892/mmr.2020.11104](https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11104) PMID: 32377693
27. Liu C, Yang J, Zhang C, Geng X, Zhao H. The changes of systemic immune responses during the neuroprotection induced by remote ischemic postconditioning against focal cerebral ischemia in mice. *Neurol Res.* 2019;41(1):26-36. doi: [10.1080/01616412.2018.1523037](https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1523037) PMID: 30281410
28. Ataie-Kachoeie P, Pourgholami MH, Morris DL. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: A strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(2):163-73. doi: [10.1016/j.cytogfr.2012.09.001](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.09.001) PMID: 23107589
29. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol.* 2016;64(6):1403-15. doi: [10.1016/j.jhep.2016.02.004](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.004) PMID: 26867490
30. Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Jiménez-Castro M, Casillas-Ramírez A, Ramalho FS, Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:298657. doi: [10.1155/2012/298657](https://doi.org/10.1155/2012/298657) PMID: 22649277
31. Yao W, Han X, Ge M, Chen C, Xiao X, Li H, Hei Z. N6-methyladenosine (m6A) methylation in ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis.* 2020;11(6):478. doi: [10.1038/s41419-020-2686-7](https://doi.org/10.1038/s41419-020-2686-7) PMID: 32581252
32. Bilici S, Yazici GN, Altuner D, Aggul AG, Suleyman H. Effect of sunitinib on liver oxidative and proinflammatory damage induced by Ischemia-reperfusion in rats. *Transplant Proc.* 2021;53(7):2140-2146. doi: [10.1016/j.transproceed.2021.07.021](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2021.07.021) PMID: 34417031
33. Eken H, Kurnaz E. Biochemical and histopathological evaluation of taxifolin: An experimental study in a rat model of liver ischemia reperfusion injury. *J Surg Med.* 2019;3(7):494-7. doi: [10.28982/JOSAM.587598](https://doi.org/10.28982/JOSAM.587598)
34. Ibrahim MA, Abdelzaher WY, Ibrahim YF, Ahmed AF, Welson NN, Al-Rashed S, Batiha GE, Abdel-Aziz AM. Diacerein protects rats with liver ischemia/reperfusion damage: down-regulation of TLR4/NFκ-B signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2021;134:111063. doi: [10.1016/j.biopha.2020.111063](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111063) PMID: 33348310
35. Gao Y, Zhou S, Wang F, Zhou Y, Sheng S, Qi D, Huang JH, Wu E, Lv Y, Huo X. Hepatoprotective effects of limb ischemic post-conditioning in hepatic ischemic rat model and liver cancer patients via PI3K/ERK pathways. *Int J Biol Sci.* 2018;14(14):2037-50. doi: [10.7150/ijbs.28435](https://doi.org/10.7150/ijbs.28435) PMID: 30585267
36. Niu Q, Sun W, Chen Q, Long Y, Cao W, Wen S, Li A, Dong F, Shi H. Protective effects of ischemic postconditioning on livers in rats with limb Ischemia-reperfusion via glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3β)/Fyn/Nuclear receptor-erythroid-2-related factor (Nrf2) pathway. *Med Sci Monit.* 2020;20:26:e. doi: [10.12659/MSM.923049](https://doi.org/10.12659/MSM.923049) PMID: 32686659