



**T.C**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON DENEYSEL  
MODELİNDE 'PREGABALİN'İN İSKEMİK HASAR ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. Veysel Umman**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Ertuğrul Göksoy**

**İSTANBUL - 2019**

## ÖNSÖZ

Karaciğerin iskemik reperfüzyon hasarı gerek travma, myokard enfaktüsü, sepsis, şok gibi beklenmedik durumlarda ya da karaciğer transplantasyonu, karaciğer rezeksiyon cerrahisi gibi operasyonlarda planlı olarak oluşabilmektedir. Özellikle karaciğer nakillerinden sonra bu hasarın planlı bir şekilde önüne geçilebilmesi nakil yapılan graft fonksiyonunun sağlığında ve operasyonun başarısında çok önem taşımaktadır. İskemi ve takiben reperfüzyonla geçen sürede karaciğerde ve uzak organlarda hasara sebep olan bir inflamatuvar kaskad başlamaktadır. Şayet iskemi süresi uzunsa iskemik hasarın yarattığı değişiklikler de hayati olabilmektedir. Bu çalışmada pregabalin'in karaciğer iskemik reperfüzyon hasarını engellemedeki rolünü araştırmak amaçlanmıştır. Pregabalin birçok organda iskemik reperfüzyona bağlı hasarı engellemede çalışılmıştır. Pregabalin ön tedavisinin kaspaz bağımlı apoptoz ve inflamatuvar markerlar ile oksidatif stres markerlarını azaltarak IR üstünde nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bana bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ertuğrul Göksoy'a ve tüm öğretim üyelerine, ayrıca tezimin hazırlanma süresince hiçbir yardımı esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hafize Uzun'a ve Prof. Dr. Ufuk Çakatay'a, Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Ethem Erginöz'e ve Dr. Hazal Cansu Acar'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Nuray Kepil'e, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden Doç. Dr. Mutlu Küçük'e ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Dr. Selim Saraçoğlu'na ve Dr. Sibel Yaman'a teşekkür ederim.

**Dr. Veysel Umman**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
ÖZ.....	vi
ABSTRACT .....	ix
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER .....	5
GEREÇ ve YÖNTEM.....	12
BULGULAR .....	19
TARTIŞMA .....	26
SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	32

## ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 1.** Pringle manevrası

**Şekil 2.** Karaciğer iskemi reperfüzyonu sonrasında inflamatuvar karaciğer hasarına sebep olacak olaylar

**Şekil 3.** Karaciğerin anatomik rezeksiyon tipleri

**Şekil 4.** Heksogonal karaciğer lobülü

**Şekil 5.** Deney düzeneği

**Şekil 6.** Laparotomi

**Şekil 7.** Hepatik arter, ven klempajı sonrasında karaciğer renk değişimi

**Şekil 8.** Suzuki skorlaması

**Şekil 9.** Hematoksilen eozin boyama ile ışık mikroskopi 40X büyütme, zon 3

**Şekil 10.** Hematoksilen eozin boyama ile ışık mikroskopi 400x büyütme, apoptoz

**Şekil 11.** Hematoksilen eozin boyama ile ışık mikroskobu 400x büyütme, çatı çökmesi

## TABLolar LİSTESİ

**Tablo 1.** Deney grupları

**Tablo 2.** Sonuçların karşılaştırılması

## KISALTMALAR

- ALT** : Alaninaminotransaminaz  
**AST** : Aspartataminotransferaz  
**DAMP** : Hasar-ilişkili moleküler paternler  
**GABA** : Gamma-aminobutirik asit  
**GSH** : Glutasyon  
**HE** : Hemotoksilen Eozin  
**HMGB1** : High Mobility Group Box 1  
**IL** : Interlökin  
**İR** : İskemi Reperfüzyon  
**KC** : Karaciğer  
**LDH** : Laktat Dehidrogenaz  
**MAPK** : Mitojen aktive protein kinaz  
**NAS** : N-Asetilsistein  
**NO** : Nitrik Oksit  
**NF-KB** : Nükleer Faktör Kappa B  
**PAMP** : Patojen-kaynaklı moleküler paternler  
**PMNL** : Polimorf Nüveli Lökosit  
**SOD** : Süperoksit Dismutaz  
**SOR** : Serbest Oksijen Radikali / Radikalleri  
**TLR** : Toll like reseptör  
**TNF** : Tümör Nekrozis Faktör

## ÖZ

### Giriş

Karaciğerin kan akımının belirli bir süre boyunca kesilip iskemiye uğraması ve sonradan perfüzyonun tekrar devam etmesi sonucu ortaya çıkan hasar iskemik reperfüzyon hasarıdır. Karaciğer transplantasyonu ve karaciğer rezeksiyon cerrahisi, kronik karaciğer hastalığı ve karaciğer kanseri olan hastalara sunduğu artmış hayat kalitesi ve süresi sebebiyle dramatik oranda artmıştır. Her iki cerrahi prosedürde de karaciğer bir süre iskemi reperfüzyon hasarına maruz kalmaktadır. Ayrıca miyokard enfarktüsü, travma, sepsis, şok gibi klinik durumlarda da yine karaciğere gelen kan akımı belirli bir süre bozulabilmektedir. Bu süre içinde karaciğerde ve uzak organlarda hasara sebep olan bir inflamatuvar kaskad başlamaktadır. Şayet iskemi süresi uzunsa iskemik hasarın yarattığı değişiklikler de hayati olabilmektedir.

### Amaç

Karaciğer cerrahisinin başarısını etkileyen en önemli faktörün iskemi reperfüzyon hasarı olduğu düşünülmektedir. Pregabalin birçok organda iskemik reperfüzyona bağlı hasarı engellemede çalışılmıştır. Pregabalin ön tedavisinin kaspaz bağımlı apoptoz, ve inflamatuvar ile oksidatif stres markerlarını azaltarak IR üstünde nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada pregabalin'in karaciğer iskemik hasarını engellemedeki rolünü araştırmak amaçlanmıştır.

## **Yöntem ve Gereçler**

40 adet Wistar-Albino 6-8 haftalık erkek sıçan 5 gruba ayrıldı ve kontrol grubu dışındaki 4 grubun hepsine 1 saat karaciğer iskemisini takiben 2 saat reperfüzyon uygulandı. İlk kontrol grubuna sadece laparotomi yapıldı. İkinci gruba herhangi bir medikasyon verilmeden 1 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı. 3, 4 ve 5. gruplara operasyondan 30 dakika önce terapötik ajanlar uygulandı. 3. gruba iskemiden 30 dakika önce 150mg/kg intraperitoneal NAS, 4. gruba 30mg/kg pregabalin ve 5. gruba 60mg/kg pregabalin uygulandı. Reperfüzyonun tamamlanmasında sonra hayvanlardan intrakardiyak kan örnekleri alındı. Daha sonra ise biyokimyasal ve patolojik çalışmalar için doku örnekleri alındı. Tüm sıçanlardan iskemi öncesi ve sonrasında kan örnekleri alınarak AST, ALT değerleri bakıldı. Tüm gruptaki sıçanlardan apoptozis belirteçleri olarak kaspaz-3 ve bcl-2 ve bax ticari olarak mevcut olan ELISA kitleri ile çalışıldı. Ayrıca deney sonrasında doku örnekleri histopatolojik inceleme ile iskemi açısından değerlendirildi.

## **Bulgular**

60 mg pregabalin tedavisinin biyokimyasal belirteçlerden AST değerlerine göre N-asetilsistein tedavisinden ve 30 mg pregabalin tedavisinden iskemi reperfüzyon hasarını engellemede belirgin şekilde üstün olduğu görüldü ( $p=0.0003$ ). ALT değerlerine göre pregabalin tedavisi ve N-asetilsistein iskemi reperfüzyonu inhibe etmekte anlamlı etkili olmakla birlikte pregabalin'in N-asetilsistein'e üstün olmadığı bulundu ( $p=0.0003$ ,  $0.004$ ). Kan TNF- $\alpha$  değerleri incelendiğinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında N-asetilsistein, 30 mg pregabalin, 60 mg pregabalin tedavilerinden en üstün olanın 60 mg pregabalin tedavisi olduğu bulundu ( $p=0.003$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ). Kanda bakılan NF-KB sonuçlarına göreyse N-asetilsistein tedavisi pregabalin gruplarına üstün

bulunmakla birlikte pregabalin tedavisi de yüksek anlamlı derecede etkili bulunmuştur (p= 0.001, 0.007). Dokudaki TNF- $\alpha$  seviyeleri de pregabalin tedavisinin etkili olduğunu fakat N-asetilsistein'den üstün olmadığını göstermiştir (p=0.011, 0.0003).

## **Sonuçlar**

İskemi reperfüzyonun karaciğerde hasara sebebiyet verdiği, hiçbir tedavi alınmadığında bu hasarın ciddi olarak ortaya çıktığı ve bu hasarın hem biyokimsal belirteçlerle kanda hem doku apoptoz ve inflamasyon belirteçlerinde görüldüğü bulunmuştur. Ayrıca N-asetilsistein tedavisinin literatürle de uyumlu şekilde iskemi reperfüzyon hasarını engellemede etkili olduğu görülmüştür. Çalışma grubumuz olan pregabalin molekülünün de iskemi reperfüzyon hasarını engellemede anlamlı derecede etkin olduğunu ve N-asetilsistein'e terapötik üstünlüğünün olabildiği bulunmuştur.



## **ABSTRACT**

### **Introduction**

Ischemic reperfusion injury is the result of interruption blood flow to the liver causing ischemia for a certain period of time and later continuation of the flow thus the reperfusion. Liver transplantation and liver resection surgery increased dramatically due to increasing the survey as well as quality of life in patients with chronic liver disease and liver. In both surgical procedures, the liver is exposed to ischemia reperfusion injury for a period of time. In addition, in clinical conditions such as myocardial infarction, trauma, sepsis and shock, the blood flow to the liver may deteriorate for a certain period of time. During this time, an inflammatory cascade starts causing damage to the liver and distant organs. If duration of the ischemia is long, changes caused by ischemic injury may increase mortality.

### **Aim**

Ischemia reperfusion injury is thought to be the most important factor affecting the success of liver surgery. Pregabalin has been studied to prevent ischemic reperfusion injury in many organs. Pregabalin pretreatment has been shown to have neuroprotective effects on IR by reducing caspase-dependent apoptosis, and inflammatory and oxidative stress markers. The aim of this study was to investigate the role of pregabalin in preventing liver ischemic injury.

## **Materials and Methods**

40 Wistar-Albino 6-8 week old male rats were divided into 5 groups. 4 groups other than the control group underwent hepatic ischemia for 1 hour followed by 2 hours of reperfusion. Only laparotomy was performed in the first sham group. The second group received 1 hour ischemia and 2 hours of reperfusion without any medication. Therapeutic agents were administered to groups 3, 4 and 5, 30 minutes before the operation. The third group received 150 mg/kg intraperitoneal administration of NAS, fourth group received 30 mg/kg pregabalin and fifth group received 60 mg/kg pregabalin. After completion of the reperfusion, blood samples were taken via intracardiac route and after exsanguination and decapitation tissue samples were taken for biochemical and pathological studies. Blood samples were taken before and after ischemia. Apoptosis was measured via caspase-3 and bcl-2 and bax by commercially available ELISA kits. In addition, tissue samples were evaluated for ischemia by histopathological examination.

## **Findings**

60 mg pregabalin treatment was found to be significantly superior to N-acetylcysteine treatment and 30 mg pregabalin treatment according to AST values for preventing ischemia reperfusion injury ( $p=0.0003$ ). According to ALT values, pregabalin treatment and N-acetylcysteine were significantly effective in inhibiting ischemia reperfusion but pregabalin was not superior to N-acetylcysteine ( $p= 0.004, 0.0003$ ). When blood TNF- $\alpha$  values were examined, it was found that 60 mg pregabalin treatment was superior to N-acetylcysteine, 30 mg pregabalin and 60 mg pregabalin treatments when compared with control group ( $p=0.003, 0.01, 0.001$ ). According to NF-KB results, N-acetylcysteine treatment was superior to pregabalin groups, but

pregabalin treatment was found to be highly effective ( $p = 0.001, 0.007$ ). TNF- $\alpha$  levels in the tissue also showed that pregabalin treatment was effective but not superior to N-acetylcysteine ( $p = 0.011, 0.0003$ ).

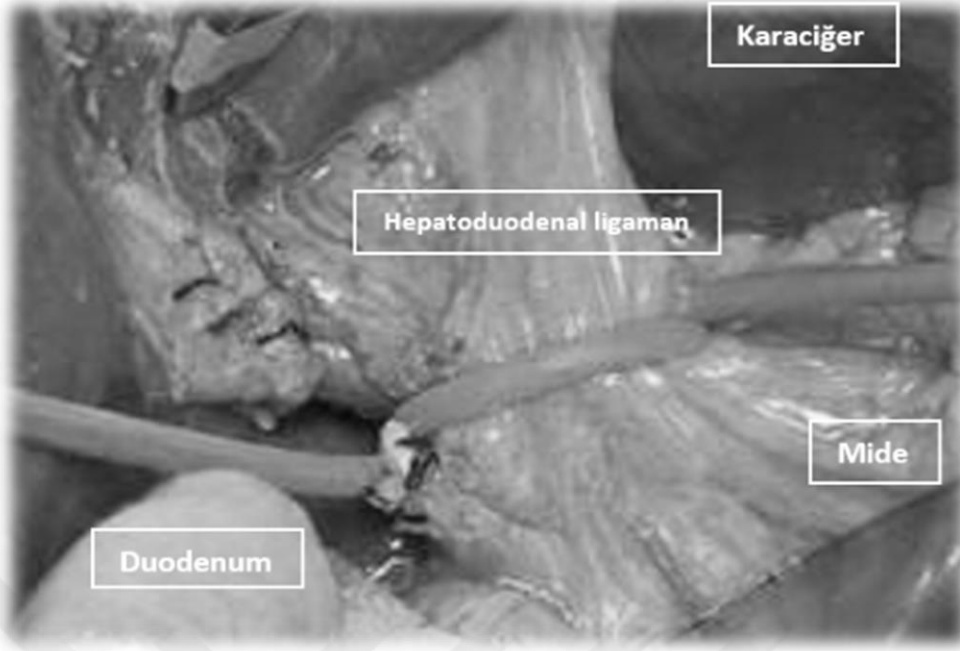
## **Results**

It has been found that ischemia reperfusion causes damage to the liver and this damage might be irreversible when no treatment is given. This damage can be seen both in biochemical markers as well as in blood and tissue apoptosis, inflammation markers. In addition, N-acetylcysteine treatment was found to be effective in preventing ischemia reperfusion injury in accordance with the literature. Our study group, pregabalin molecule, was found to be significantly effective in preventing ischemia reperfusion injury and could have a therapeutic advantage over N-acetylcysteine.

## GİRİŞ

İskemi bir organın aldığı arteriyel kan akımının herhangi bir sebeple sekteye uğraması, reperfüzyon ise kan akımının tekrar sağlanması olarak tanımlanmaktadır. İskemi sonucunda karşılanamayan oksijen ve ortaya çıkan metabolik ürünler sonucunda hücre ölümleri ve organ yetmezlikleri görülebilir. Reperfüzyon ile dokudaki kan akımı normale dönüp gerekli enerji kaynakları ve oksijen sağlanabilmekle birlikte bu evrede de serbest radikallerin yarattığı ek hasarla mikrosirkülasyon bozukluğu, takiben nekroz ve hücre ölümü olmaktadır (1).

Karaciğer transplantasyonu ve karaciğer rezeksiyon cerrahisi, kronik karaciğer hastalığı ve karaciğer kanseri olan hastalara sunduğu artmış hayat kalitesi ve süresi sebebiyle dramatik oranda artmıştır. Her iki cerrahi prosedürde de kanama kontrolünü sağlayabilmek için hepatik arter ve portal veni içeren hepatik pedikülün geçici klemplenmesi ile (Pringle manevrası) karaciğer bir süre iskemi reperfüzyon hasarına maruz kalmaktadır (Şekil 1). Ayrıca miyokard enfarktüsü, travma, sepsis, şok gibi klinik durumlarda da yine karaciğere gelen kan akımı belirli bir süre bozulabilmektedir (2). Bu süre içinde karaciğerde ve uzak organlarda hasara sebep olan iskemi ve reperfüzyona bağlı bir inflamatuvar kaskad başlamaktadır. İskemi süresi uzunsa iskemik hasarın yarattığı değişiklikler de hayati olabilmektedir.



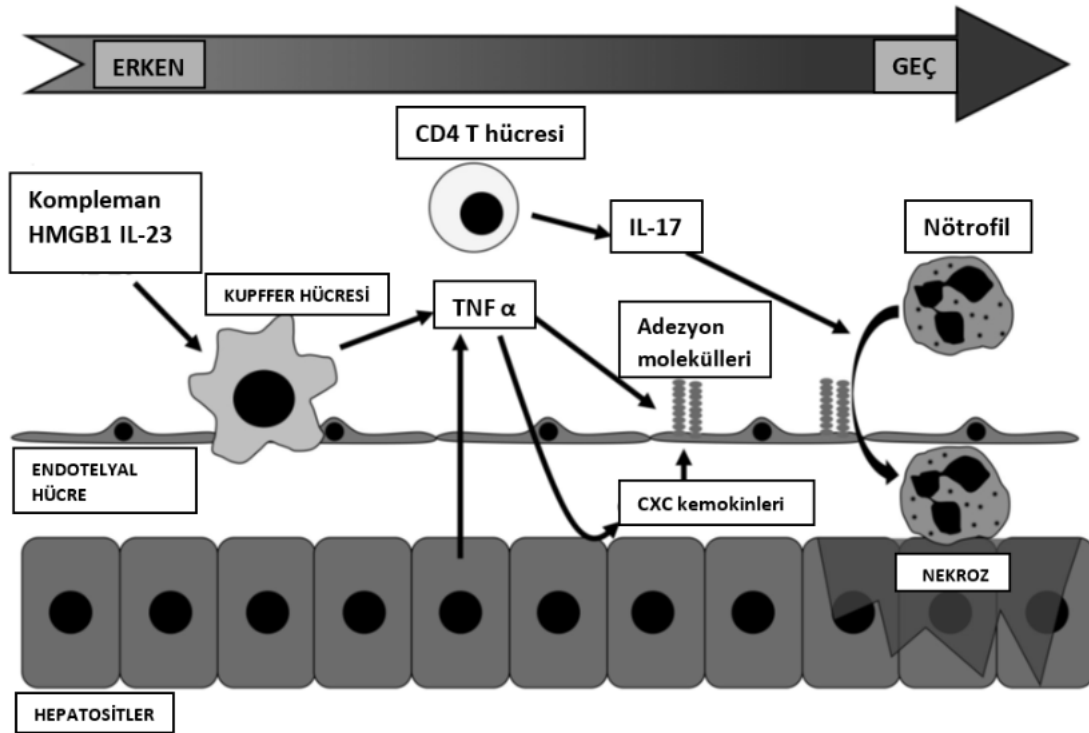
Şekil 1. Pringle manevrası: Hepatik arter ve Portal veni oklüde ederek kanama esnasında karaciğerin arteriyel ve venöz akımını kontrol eder. Devam eden kanama durumunda kaynak olarak hepatic ven düşünülmelidir. \* Yan L.N., *Operative Techniques in Liver Resection*. (2016)'dan değiştirilerek alıntılanmıştır.

Kupffer hücrelerinin, mitokondriyal reaktif oksijen ürünlerinin, toll-like reseptörlerinin, high mobility group box 1 (HMGB1) yolağının ve otofajinin karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında rolleri gösterilmiştir (3).

Hepatositlere oksijen sağlanamadığında mitokondriyal oksidatif fosforilasyon bozulur ve ATP'nin azalması hücre içi elektrolit balansının sağlanamayıp  $Ca^{+2}$  artışı ve H, Na dengelerinin bozulmasıyla devam eder (4). Bu konuda yapılan son araştırmalar iskemik reperfüzyon hasar kaskadının hasarlı veya ölen hücrelerden salgılanan patojen-kaynaklı moleküler paternlerinin (PAMPs) veya hasar-ilişkili moleküler paternlerinin (DAMPs), bağışıklık sistemine ait hücreler ve sinyal yolları tarafından tanınmasıyla gerçekleştiğini göstermiştir (5).

Serbest oksijen radikalleri iskemi reperfüzyon (IR) hasarında ana rollerden birine sahiptir. Bu radikaller sitokinleri, makrofajları ve inflamatuvar yolağın diğer elemanlarını

aktive ederler. Yüksek miktarlarda salgılandıklarında direk hücresel hasara da sebebiyet verebilirler. Karaciğer makrofajları da (Kupffer hücreleri) hem toll like reseptörleri 4 (TLR-4) üzerinden, hem de sitokinler ve reaktif oksijen türleri üreterek bu iskemi reperfüzyon kaskadı üzerinde etkilidir (Şekil 2). Superoksit gibi reaktif oksijen türleri vazodilatasyonda önemli role sahip nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek mevcut NO seviyesinin düşürüp bir yandan da daha reaktif hidroksil radikalleri oluşturur. Bu mekanizmalar aracılığıyla karaciğer mikrosirkülasyonu ve buradaki hepatositler ve sinüzoidal endotel hücreleri hasar görür. Bu hasar nötrofil göçü, platelet agregasyonu ve takiben değişen kapiller geçirgenlikle ilerler (6,7). İskemi ve reperfüzyon, aynı zamanda ısı şok proteinleri ve nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) gibi transkripsiyon faktörlerinin aracılığıyla hepatositlerde birçok genin transkripsiyonunu da arttırdığı gösterilmiştir (8).



Şekil 2. Karaciğer iskemi reperfüzyonu sonrasında inflamatuvar karaciğer hasarına sebep olacak olaylar.

\* Konishi, et al. Gene expression. (2017)'den değiştirilerek alıntılanmıştır.

I/R stresi kompleman, high-mobility group box 1 (HMGB1) ve IL-23 salınımına sebep olur, bunlar da Kupffer hücrelerini aktive eder ve TNF- $\alpha$  üretimini indükler. TNF- $\alpha$ , endotel hücreleri üzerindeki adezyon moleküllerini upregüle ederek ve hepatositler tarafından CXC kemokinlerinin ekspresyonunu indükleyerek inflamasyon tepkisini yayar. Aynı zamanda, CD4 T hücreleri, karaciğere geçici olarak görevlendirilir ve CXC kemokinleri ile adezyon moleküllerinin artmış ekspresyonuna ek olarak karaciğer parankimine nötrofil birikimini de hızlandırır. Nötrofiller daha sonra oksidanlar, ve proteazlar ile direkt hepatosit hasarına sebep olabilirler.

Pregabalin gamma-aminobutirik asitin (GABA) yapısal bir analogudur. Günümüzde pregabalin diyabetik periferik nöropatiye bağlı nöropatik ağrıda, postherpetik nöraljide, anksiyete ve fibromiyalji hastalarında kullanılmaktadır (9,10). Pregabalin karaciğer enzimleriyle etkileşime girmez ve %95'i böbreklerden atılır.

Son çalışmalarda pregabalin'in birçok farklı organda iskemik reperfüzyona bağlı hasarı engellemedeki rolü çalışılmıştır. Pregabalin ön tedavisinin kaspaz bağımlı apoptoz, ve inflamatuvar ile oksidatif stres markerlarını azaltarak IR üstünde nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Peristatik dolaşım bozukluğuna özgü kısır döngülerin kırılması organın transplantasyon sonrası perfüzyonunu iyileştirir. Daha iyi perfüzyon ve mikrovaskülatürün daha fazla korunması, erken ve geç dönemde transplante edilen organın yapı ve fonksiyonlarını korur, "reperfüzyon hasarını" azaltır. Pregabalin'in HMGB1 yolağı ve kaspaz enzimlerinin aktivasyonunu bloke etmesi aracılığıyla karaciğer iskemik hasarını engellemede bir rolünün olması karaciğerin iskemiye maruz kalacağı durumlarda terapötik olarak kullanımına olanak sağlayacaktır. Bu sebeple çalışmamızda pregabalin'in karaciğer iskemik hasarını engellemedeki rolünü araştırmak amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### *a. Karaciğer anatomisi*

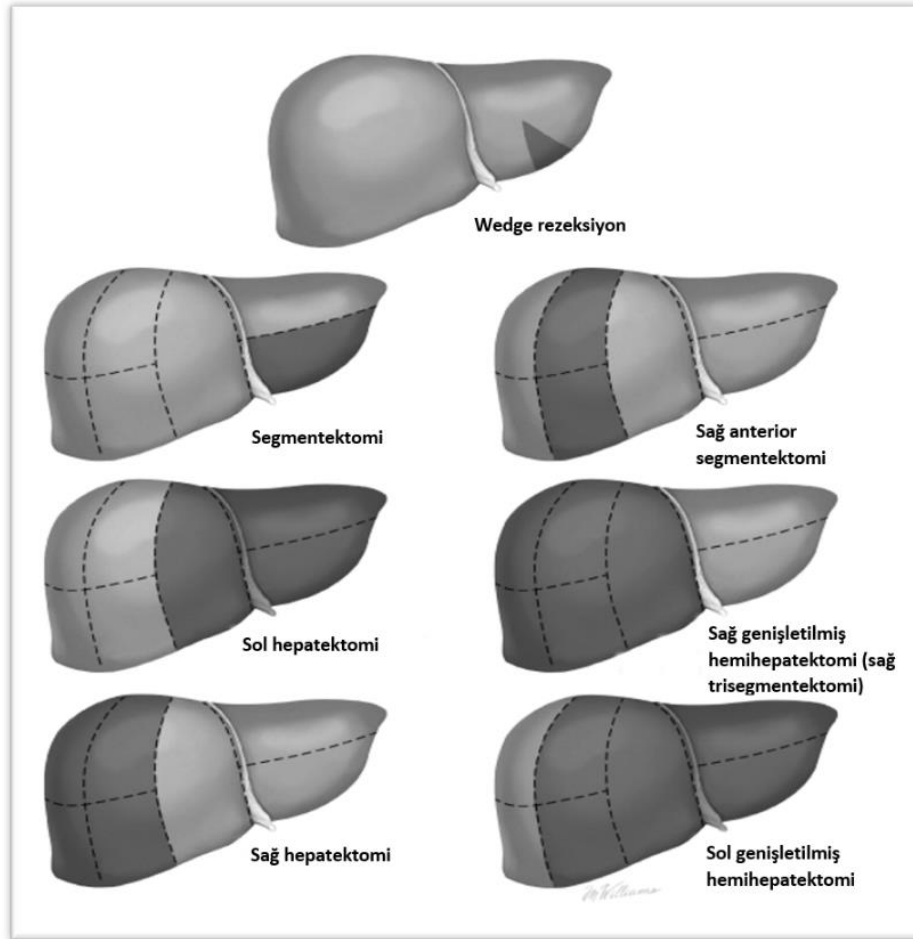
Karaciğerin kan akımı çift kaynaktan olduğu için özeldir. Oksijen miktarı düşük fakat metabolitlerden zengin kanı getiren portal ven ile oksijenden zengin olup karaciğere erişen oksijenin %50'sini getiren hepatik arter tarafından sağlanmaktadır. Fakat buna rağmen hepatik arterin akımının kesilmesi durumunda kolleteral akım ve portal venden devam eden akım ile genellikle karaciğerde bir sorun görülmemektedir.

Karaciğer sağ ve sol yarım loblara bölünmektedir ayrıca vasküler veya safra dağılımına göre de 8 ayrı segmente bölünebilir. Sağ ve sol karaciğer lobları simetrik değildir ve sağ karaciğer genellikle 2/3 olarak toplam karaciğerin büyük kısmını kapsar. Kalan 1/3 sol lobu içerirken aynı zamanda yaklaşık %1 oranda kaudat lob bulunmaktadır. Sağ karaciğer lobu ayrıca anterior ve posterior sektörlere ve sol karaciğer lobu lateral ve medial sektörlere bölünebilmektedir. Bu bölünmelere göre inferiorda kalan segment V ve superiorda kalan segment VIII sağ anterior kısımda yer almaktadır. Inferiorda segment VI ve süperiorda segment VII ise sağ posterior karaciğer lobuna denk gelmektedir. Segment II ve III ise sol lateral karaciğerde bulunmaktadır. Üç ana hepatik damar yapısı bulunmaktadır.

Sağ hepatik ven, sağ karaciğeri (segment V'den VIII'e kadar) drene eder, orta hepatik ven segment IV'ü drene eder ve sol hepatik ven, segment II ve III'ü drene eder. Sol hepatik ven segment II ve III arasından sol lateral karaciğeri transvers olarak kateder. Orta hepatik ven ana hattı oluşturur ve sol ve sağ karaciğer lobları arasındaki bölünmeyi yapmaktadır. Sağ veya sol hepatektomi bu plandan yapılmaktadır. (Şekil 3) Kaudat lob ise, embriyolojik olarak farklı bir anatomik üniteden oluştuğu için, kendi



venöz drenajı mevcuttur ve kısa venler ile direkt olarak vena kava inferiora dökülmektedir.



Şekil 3. Karaciğerin anatomik rezeksiyon tipleri

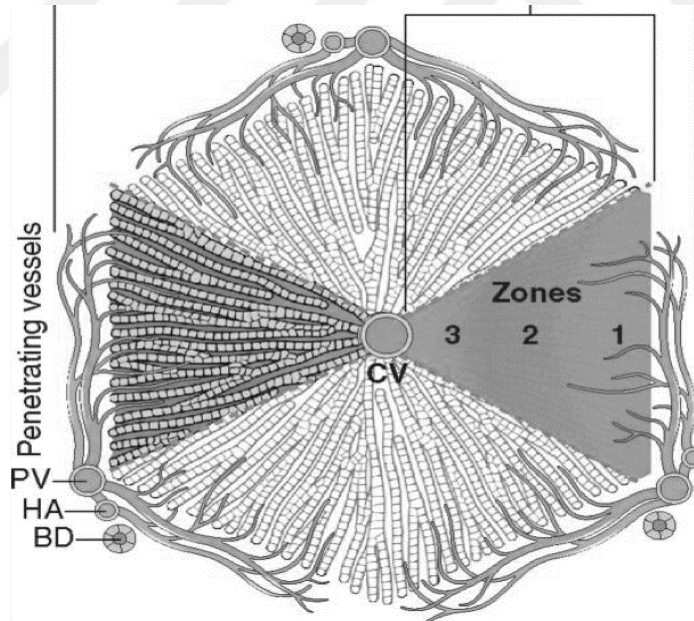
\*Curley, S. Overview of hepatic resection. In: UpToDate (2019)'den değiştirilerek alıntılanmıştır.

Hepatik parankimin mimarisi ise diğer organlardan ayrılmaktadır. Bu yapıyı anlatmak için iki model sunulmuştur, lobül modelinde terminal hepatik venülleri hepatik mikro dolaşımın merkezi kabul edilmiştir. Terminal portal venler ve hepatik venüller sinüzoidler arasında birleşir. "Lobül" modeli, terminal hepatik venülleri hepatik mikro dolaşımın merkezi olarak kabul ederken, "asiner" modelde ise bu hepatik venülleri çevre olarak tanımlamıştır. Asiner modelde portal triad adı altında bir bölgeye kan

beslemesinin ve onu boşaltan safra kanalının hepsi portal triad olarak bulunmaktadır. Hepatik bir arteriyol, bir hepatosit ve terminal venülün dalları bir asinüsü meydana getirmektedir.

### ***b. İskemi ve reperfüzyon***

İskemik reperfüzyon hasarında önemli bir ayrım ise bu asinüslerin konumlarına göre farklı derecelerde besin ve oksijen mikro sirkülasyonuna maruz kalışıdır. Asinusların merkezi olan periportal zon 1, çevresindeki perivenüler zon 3 ve arada kalan bölge ise zon 2 olarak tanımlanmıştır. Zon 1 en yüksek oksijen ve metabolitlere ulaşırken, zon 3 ise dolaşım değişikliklerine en maruz kalan alandır (Şekil 4)



Şekil 4. Heksagonal karaciğer lobülü

\*W. B.Saunders. 1999'den değiştirilerek alıntılanmıştır.

Hepatik oksijen değişimi, karaciğeri perfüze eden kanın oksijen içeriğine ve toplam hepatic kan akışı ile ilişkilidir. Kan akımının sekteye uğradığı durumlarda adaptif mekanizma olarak hepatositler tarafından oksijen ekstraksiyonu artmaktadır. Kan akışının otoreğülasyonundaki mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte hepatic arteriyolleri çevreleyen düz kas hücreleri kan akışında önemli rol oynamaktadır. Portal venöz akımda ise otoreğülatör kontrol yoktur. Kan akımında azalmayla adenozin konsantrasyonu sinüzoidal kan akımına göre belirlenir ve sinüzoidal lümendeki kontraksiyonla birlikte buradaki kan dolaşımı bozulunca nitrik oksit ve endotelin dengesi de bozulmaya başlar. Kan dolaşımı azaldıkça anaerobik metabolizma artışı, adenozin trifosfat (ATP) üretiminde azalma, mitokondriyal hasar, nötrofil birikimi, nötrofillerden kemokin ve Kupffer hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin (ROT), TNF- $\alpha$ , IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, adezyon molekülleri ve vazoaaktif ajanların üretimi, intraselüler kalsiyum birikimi geręekleřerek iskemik reperfüzyon hasarını oluşurmaya başlar. İskemik reperfüzyon hasarı erken nakil başarısızlıklarının yaklaşık %10'unu oluşturur ve akut ve kronik rejeksiyona sebep olabilir (11).

Karaciğer iskemik reperfüzyon hasarında inflamatuvar bir kaskat başlamakta ve bunda nötrofil infiltrasyonunun temel etmenlerden biri olduğu düşünölmektedir. İskemi ve takiben reperfüzyonda gelişen hasarda, patojen ilişkili moleküler modellere (PAMP) benzer şekilde, hasar ilişkili moleküler modeller (DAMP) endojen molekülleri salınır. High mobility group box 1 (HMGB1), deoksiribonökleik asit (DNA), ATP, üre, mitokondriyal formil peptitler ve S100 proteinleri DAMP molekülleri arasında bulunmaktadır. Bu moleküller çeşitli bağışıklık reseptörleri tarafından algılanır ve bağışıklığın ilk aktivasyonunda önemli rol oynarlar, Kupffer hücrelerini uyararak kemokin, sitokin ve ROT gibi medyatörlerin salınımı arttırırlar. Reperfüzyon fazında fazla sayıda nötrofil görevlendirilmesi ve aktivasyonu olur. Kemokinler reperfüzyonu

takiben nötrofillere güçlü bir şekilde kemoatraktan olarak etki etmeye başlar ve nötrofil birikimi gerçekleşir. Nötrofil temelli karaciğer hasarı birkaç evrede gerçekleşir, öncelikle nötrofil aktivasyonu olur, sonra bu hücrelerin damarsal yapılardan buraya yönlendirilmesi, transendotelyal göç başlar ve son olarak da parankimal hücrelerle iletişim neticesinde ROT ve proteaz salınımı gerçekleşir (12).

İmmün sistemdeki tüm hücreler patern tanıma reseptörlerini eksprese eder ve DAMP'ları tanır. Toll-benzeri reseptörleri (TLR'ler), DAMP reseptörlerinden birisidir. Karaciğerdeki tüm hücre türlerinde TLR bulunmaktadır ve DAMP'ları algılayarak, bu reseptörler, reperfüzyonu takiben enflamatuar bir tepkiye neden olmaktadır. TLR uyarılması nükleer faktör-kappa B yolağının aktive olmasıyla sitokinlerin ve kemokinlerin üretimine yol açar ve daha fazla lökosit görevlendirilmesine sebep olur. Bu endojen ligandlardan biri olan DNA, hasar görmüş hepatositlerden salınır ve TLR9'a bağlanarak, daha fazla nötrofil aktivasyonunu teşvik eder.

### *c. Pregabalin*

Pregabalin, kimyasal olarak gama-aminobütirik aside benzerlik taşıyan ve analjezi, antiepilepsi, diyabetik nöropati, nevralji ve kompleks bölgesel ağrı sendromu dahil olmak üzere çeşitli klinik durumlarda, özellikle de nörojenik ağrıyı kontrol etmek için kullanılmakta olan bir ilaçtır (13). Etki mekanizması olarak pregabalin GABA reseptörlerine bağlanmaz ve glutamat ve noradranelin gibi çeşitli nörotransmitterlerin salınımını azaltır. Bunu voltaj kontrollü kalsiyum kanallarının  $\alpha_2\delta$  alt ünitesine bağlanarak presinaptik sinir uçlarında  $Ca^{2+}$  akışını azaltarak sağlar.

Son çalışmalarda ise pregabalin'in iskemik reperfüzyona bağlı hasarı engellemedeki rolü çalışılmıştır. Pregabalin ön tedavisinin kaspaz bağımlı apoptoz, ve inflammatuar ile oksidatif stres markerları azaltarak IR üstünde nöroprotektif etkilerinin

olduğu gösterilmiştir (14). 50 sıçan üzerinde yapılan çalışmada, spinal kord hasarı yaratılarak pregabalin tedavisinin etkisi incelendiğinde, spinal mikroglia ve astrositlerin tedavi alan grupta daha az olduğu gösterilmiştir. Pregabalin tedavisi ile kaspaz-3 ve fosforile edilmiş p38 mitojen active protein kinazın (MAPK) azalan üretimi ayrıca astrosit proliferasyonunun azaldığı grlmştir (14). Başka bir çalışmada ise geçici orta serebral arter tıkanıklığı/reperfüzyonunun yaratılmasını takiben, reperfüzyondan 30-90 dakika sonra intraperitoneal pregabalin enjeksiyonu uygulanmış ve tıkanıklık sonrası 24 saatte iskemik penumbra da nöronal ölüm, enfarkt volümü ve nörolojik defisitlerde azalma olduğu grlmştir (15). Bu etkiyi antanoizma ile kalsiyum kontrollü proteolizi azaltarak yaptđı gösterilmiştir.

Periferal sinir hasarı yaratılarak pregabalinin etkisinin incelendiği bir başka deneysel modelde, histopatolojik, fonksiyonel ve moleküler veriler, aksonotek ve anostomoz gruplarında 30 mg / kg pregabalin tedavisinin, sinir rejenerasyonunu iyileştirdiğini ve antiinflamatuvar sitokin TGF-21'i aktive ederek periferik sinir yaralanmalarında siyatik fonksiyonel indeksi arttırdığını göstermiştir (16).

Başka bir çalışmada ise hiperglisemi modelini takiben serebral iskemi yaratılmıştır. Pregabalin ile tedavi edilen sıçanlar, daha gelişmiş nörolojik fonksiyon (skorda %31 azalma), daha düşük enfarktüs büyüklüğü (%33 oranında), daha az apoptotik hücre (% 63 oranında) ve daha düşük HMGB1, TLR4, p-NF-κB ekspresyon seviyeleri göstermiştir (17). Ayrıca bcl-2, bax ve kaspaz 3 seviyelerinde de düşüş grlmştir.

Pregabalin moleklnn hangi dozunun daha efektif olabileceği de araştırılmış ve iskelet kası üzerinde yapılan iskemik reperfüzyonda pregabalin 50mg ve pregabalin 200mg çalışılmış, her iki dozun da iskemik hasarı engellemede etkin olmakla birlikte 200mg pregabalin iyi daha iyi sonuçlar alındığı belirtilmiştir (18).

Pregabalinin farmakolojik etkileri incelendiğinde, plasma proteinlerine bağlanmadığı ve neredeyse tamamen değişmemiş olarak böbreklerden atıldığı görülmüştür. (19) Hepatik metabolizmaya uğramaması ve karaciğer sitokrom p450 sistemi gibi enzimlerle ilişkiye girmemesi özellikle karaciğer yetmezliği, rezeksiyonu, nakli gibi klinik durumlarda da kullanılabilirliği açısından da olumlu bir özelliktir.

Pregabalinin uygulanacağı yöntemi seçerken daha önce pregabalin kullanılarak yapılan çalışmalar ve sıçanlarda farmakolojik ajanın uygulama yöntemlerinden biyoyararlanımını değerlendiren çalışmalar göz önüne alınarak intraperitoneal olarak solüsyonun uygulanmasına karar verildi (20).

#### ***d. Sıçanlarda karaciğer iskemi reperfüzyon modeli***

Sıçanlarda iskemik reperfüzyon hasarı modelinin incelenmesinde ağırlıklı olarak kullanılan yöntem parsiyel iskemik hasarının hepatic arter ve venin atravmatik klip ile klemplenmesiyle oluşturulması şeklindedir (21)

Ayrıca kliniğimizde daha önce Prof. Dr. Ertuğrul Göksoy danışmanlığında yürütülmüş tez çalışmalarında kullanılmış olan iskemik reperfüzyon modeli aynı şekilde kullanılmıştır. (22-25)

Pregabalin'in spinal kord hasarında HMGB1/TLR-4 yolağı ve kazpaz enzimlerinin aktivasyonunu bloke etmesi aynı yolak üzerinden karaciğer iskemik hasarını da engellemede bir rolünün olabileceğini düşündürmüştür. Karaciğer üzerinden metabolize olmayan ve aynı zamanda analjezi ve kompleks ağrı kontrolü amacıyla kullanabilen bu molekülün, karaciğerin iskemiye maruz kalacağı durumlarda terapötik olarak kullanımı incelenebilir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan (HADYEK) 2018/25 sayılı onayı ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından TTU-2018-31521 proje koduyla fon alınarak projeye başlanmıştır. İstanbul Aziz Sancar Deneysel Araştırma Enstitüsü'nden 40 adet Wistar-Albino 6-8 haftalık erkek sıçan temin edildi ve deneyler burada gerçekleştirildi.

### *a. Deney grupları*

40 hayvan 5 gruba ayrıldı ve kontrol grubu dışındaki 4 grubun hepsine 1 saat karaciğer iskemisini takiben 2 saat reperfüzyon uygulandı. İlk kontrol grubuna sadece laparotomi (sham) yapıldı ve iskemi yapılmaksızın batın kapatıldı. İkinci gruba herhangi bir medikasyon verilmeden 1 saat iskemi ve takiben 2 saat reperfüzyon uygulandı. 3, 4 ve 5. gruplara operasyondan 30 dakika önce terapötik ajanlar uygulandı. 3. gruba iskemiden 30 dakika önce 150mg/kg intraperitoneal NAS, 4. gruba 30mg/kg pregabalin ve 5. gruba 60mg/kg pregabalin uygulandı (Şekil 5).

Deney Grupları	Protokol		
Grup 1 (sham/kontrol) (n=8)			
Grup 2 (İskemi – reperfüzyon sadece grubu) (n=8)		60 dak iskemi	2 saat
Grup 3 (NAS grubu) (n=8)	30 dak önce 150mg NAS	60 dak iskemi	2 saat
Grup 4 (Pregabalin 30mg grubu) (n=8)	30 dak önce 30mg PGB	60 dak iskemi	2 saat
Grup 5 (Pregabalin 60mg grubu) (n=8)	30 dak önce 60mg PGB	60 dak iskemi	2 saat

Tablo 1. Deney Grupları

### ***b. Pregabalin süspansiyonunun hazırlanması***

Pregabalin'in IV formu bulunmadığı için süspansiyon hazırlandı. Pregabalin karaciğerde metabolize olmayıp %95'den fazla oranda böbrekten atılan bir moleküldür. Deney hayvanlarının ortalama ağırlığı 250 gram civarındaydı. Pregabalin gruplarındaki dozlar mevcut literatür taramasıyla uyumlu olacak şekilde iki çalışma grubu için 30 mg/kg ve 60 mg/kg olarak seçilmişti (16). Daha yüksek Pregabalin dozlarında periferik ödem olduğu ve etkinliğin azaldığı belirtilmiştir bu sebeple en sık kullanılan bu iki doz seçilmiştir.

Ağırlık başına doz hesabı yapıldığında hayvan başına 7.5 mg pregabalin düştüğü hesaplanmıştır. Ticari olarak mevcut olan pregabalin ürünü 75 mg pregabalin içermektedir ve bunun içerisinde ek katkıları da mevcut olmaktadır. Suda çözünür olması sebebiyle 1 tableti 10 ml %0.9 fosfatlı salin aracı solüsyonu içerisinde çözülmüştür. Daha sonra süspansiyonun 7.5 mg Pregabalin dozu içereceği şekilde her sıçana 1 ml intraperitoneal enjeksiyon verilmiştir. (75mg/10 = 7.5mg).



İkinci grup içinse Pregabalin 60mg/kg olacak şekilde 75 mg'lık iki tablet 10 ml'lik salin içerisinde çözüldükten sonra 1 ml olarak her sıçana verilmiştir.

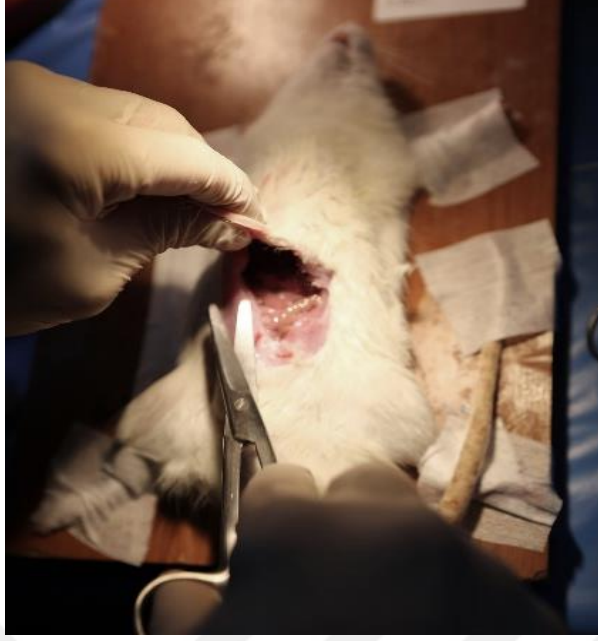
Oral alım yerine biyoyararlanımın daha yüksek olması ve bir kerede daha hızlı plazma konsantrasyonuna ulaşılmasına olanak sağlaması ayrıca hepatik metabolizmaya uğramaması sebepleriyle intraperitoneal rotadan verilmesi tercih edilmiştir.

### *c. Deney düzeneği*

Deney düzeneğimizde anestezi ile uyutulan sıçanlar ısıtıcı bir pad yapıştırılmış olan operasyon tahtası üzerine flaterlerle sabitlendi ve ısıtıcı bir lamba ile laparotomi sonrasındaki reperfüzyon süresi olan 2 saat boyunca vücut ısılarını düşmemesi sağlandı (Şekil 6,7).

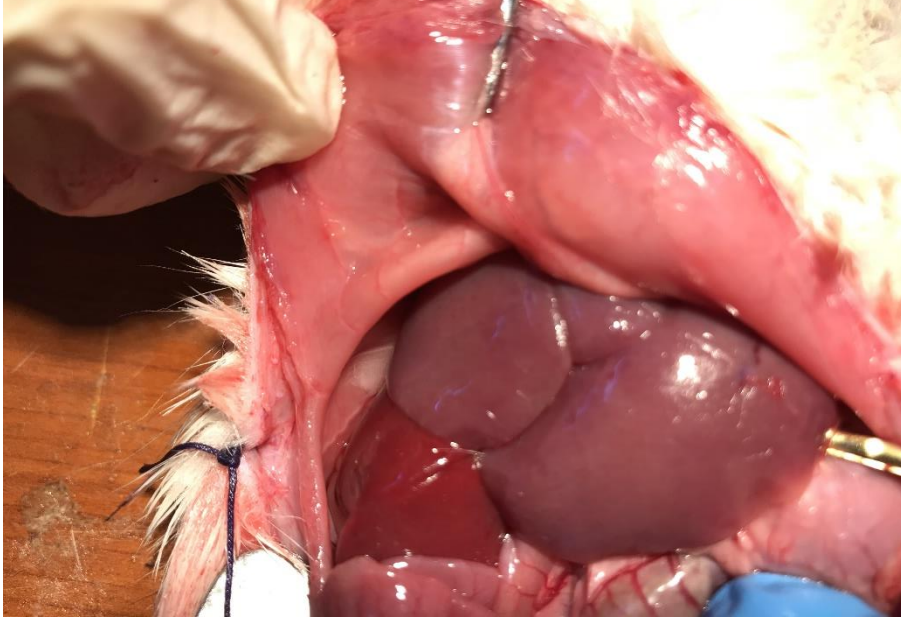


Şekil 5. Deney düzeneği



Şekil 6. Laparotomi

Operasyonda iskemi ve reperfüzyon süreleri kronometre aracılığıyla ölçülüp not edildi ve iskemi amacıyla yapılan hemihepatik klempaj sonrasında sıçanların median lob ve sol lateral lob renk değişimi görülmüştür (Şekil 8).



Şekil 7. Hepatik arter, ven klempajı sonrasında karaciğer renk değişimi

İskemi öncesinde alınan kan örnekleri kuyruk veninden elde edilirken, her hayvan için öncelikle 1 saat iskemi sonrasında 2 saatlik reperfüzyonun tamamlanmasından sonra hayvanlardan intrakardiyak kan örnekleri alındı ve bu şekilde eksanguinasyon ile sakrifikasyon gerçekleşti.

Takiben biyokimyasal ve patolojik çalışmalar için doku örnekleri alındı. Doku örnekleri beyin, karaciğer, akciğer ve böbreklerden alındı. Bu dokular sıvı nitrojenle hızlı dondurularak daha sonra -80 derecede saklandı. Ayrıca alınan tüm kan örnekleri 3000 rpm ile santrifüj edildikten sonra serum örnekleri etiketli eppendorf tüplere konularak toplu olarak çalışılmak üzere -80 derecede donduruldu.

#### *d. Biyokimyasal analizler*

Tüm sıçanlardan iskemi öncesi ve sonrasında serum AST ve ALT değerlerinin incelenmesi için ticari olarak mevcut Rat AST(Aspartate Aminotransferase) ELISA Kit ve Rat Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) ELISA Kitleri kullanılmıştır. İskemi öncesi alınan kan örnekleri kuyruk veninden elde edilirken, iskemi sonrası örnek intrakardiyak elde edildi. Tüm gruptaki sıçanlardan apoptozis belirteçleri olarak kaspaz-3 ve bcl-2 ve bax ticari olarak mevcut olan ELISA kitleri ile çalışıldı. Bcl2 için DAKO marka IS61430-2 BCL2 Oncoprotein [124] FLEX RTU 6mL, Bax için THERMO/Pierce marka MA5-13994 Bax [2D2] C.Liq. 0.5mL (1:50-100), ve kaspaz 3 için CellSignaling marka CST 9664T Caspase-3 [5A1E] Conc. 0.02mL (1:400) kitleri kullanılmıştır.

#### *e. Doku analizleri*

Doku homojenizasyonu ve biyokimyasal analizler için tüm gruplardaki sıçanların karaciğerleri ve diğer dokular 1 saat iskemi ve sonrasında takip eden 2 saat reperfüzyon

neticesinde çıkarılmıştır. Bu karaciğerler -80 °C'den çıkarılarak ağırlıkları hassas terazi (Dikomsan, FGH) ile ölçülecek ve 2 ml'lik ependorflara alınmıştır. Üzerlerine ağırlıkları (mg) kadar boncuk (bead) ve ağırlıklarının 4 katı kadar taze hazırlanmış PBS eklenerek homojenizasyon cihazında (Next Advance Bullet Blender Storm 24) 3 dk. boyunca homojenize edildi. %20'lik hazırlanan doku homojenatları 1,5 ml'lik ependorflara alındı. Ependorflar 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantta biyokimyasal parametreler çalışıldı.

#### *f. Histolojik inceleme*

Deney sonrasında alınan karaciğer dokusu formöl fiksasyonu, takibi ve hematoksilin ve eosin boyaması Tissue-tek Prisma Plus makinesi ile boyanma sonrasında histopatolojik olarak incelendi. Ayrıca kaspaz 3 boyanması ise Ventana benchmark XT IHC makinesi aracılığıyla yapıldı. Karaciğer spesimenleri, modifiye Suzuki kriterlerine göre kör gruplandırılarak ışık mikroskopunda iskemik hasar açısından değerlendirildi ve hem Suzuki hem de kaspaz boyama açısından skorlandı (Şekil 9).

SKOR	KONJESYON	VAKUOLİZASYON	NEKROZ
0	Yok	Yok	Yok
1	Minimal	Minimal	Tek hücre nekrozu
2	Az	Az	-30%
3	Orta	Orta	-60%
4	Ciddi	Ciddi	>60%

Şekil 8. Suzuki skorlaması

### *g. İstatiksel analiz*

İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics version 17.0 software programı kullanılmıştır (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Kategorik verilerin değerlendirilmesinde  $X^2$  ya da Fisher'in kesin testi kullanıldı. Gruplar arasındaki ortalama farkların analizi için tek- yönlü ANOVA testi yapıldı. Post hoc hangi grupların farklılık gösterdiğini anlamak için Tukey testi kullanıldı. Sürekli değişkenlerin öncesi-sonrası ortalamalarının karşılaştırmasında bağımlı gruplar t testi kullanıldı. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde, sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak sunuldu.  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Sıçanlardan iskemiye başlamadan önce alınan kan ve 1 saat iskemiye takiben 2 saat reperfüzyon sonrasında alınan kan örneklerinde AST, ALT, TNF- $\alpha$ , NF-KB ve IL-6 değerleri ve deney tamamlandığında tüm dokuların alınmasıyla yapılan doku biyokimyasal incelemelerinde TNF- $\alpha$ , NF-KB ve IL-6 değerleri ve ayrıca dokuların histolojik inceleme sonuçları değerlendirildi.

AST değerleri iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası 5 grup arasında karşılaştırıldığında, hiçbir tedavi almayan 2. grupta tedavi öncesi ortalama AST değeri 41.38 ( $\pm$ 5.04) iken, iskemi sonrası bunun 49.53'e ( $\pm$ 6.83) yükseldiği bulundu. NAS tedavisi alan 3. grupta iskemi öncesi ortalama AST 37.55 ( $\pm$ 1.76) iken reperfüzyon sonrasında 36.97 ( $\pm$ 1.54) bulundu. 30mg Pregabalin tedavisi alan 4. grupta iskemi öncesi 38.91 ( $\pm$ 2.12) olan ortalama AST değeri, reperfüzyon sonrası 38.64'e ( $\pm$ 2.14) geriledi. 60m pregabalin tedavisi alan 5. grupta ise iskemi öncesi ortalama AST değeri 38.36' iken ( $\pm$ 3.06) reperfüzyon sonrasında 34.84 ( $\pm$ 2.60) bulunmuştur.

Eşleştirilmiş t-testi ile her grubun kendi içinde iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası AST değerleri karşılaştırılarak anlamlı fark var mı diye incelendi. 2. grup yani herhangi bir tedavi almayan grupta iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası p değeri 0.021 bulundu. 5. grup olan 60 mg pregabalin tedavisi uygulanmış grupta da p değeri 0.024 olarak anlamlı bulundu.

Gruplar arasındaki AST değer farklılığının anlamlı olup olmadığına bakmak için öncelikle ANOVA testi yapıldı. AST değişimi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ( $p=0.0003$ ). AST değerlerindeki farkı yaratan grupları bulmak amacıyla post-hoc test yapıldı. Tukey testine göre hiçbir tedavi almadan iskemi ve reperfüzyon hasarına maruz kalan grup NAS ve pregabalin tedavi gruplarıyla

karşılaştırıldığında, NAS alan 3. grupta p değeri 0.009, pregabalin 30mg alan 4. grupta p değeri 0.013 ve pregabalin 60mg alan 5. grupta p değeri 0.0003 idi. 60mg pregabalin alan 5. grupta tedavi almayan kontrol grubu 2. grup arasında AST değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü (p=0.0003).

AST sonuçları değerlendirilerek iskemi reperfüzyon hasarının tedavi alan gruplarda daha az görüldüğü ve tedavilerin etkin olduğu sonucuna varılmaktadır. 2. grupta pregabalin 60 mg alan 5. grup arasındaki farkın p değeri 0.0003 olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur. 4. grup 30 mg pregabalin tedavisi ile 2. grup arasındaki farkın p değeri 0.013 olarak anlamlı bulunmuştur ve bu değer 3. grup olan NAS tedavisi grubunun p değeri olan 0.009'dan yüksektir. P değerlerindeki farklılıklara bakıldığında istatistiksel olarak en yüksek derecede anlamlı farkın 60 mg pregabalin grubu, daha sonra NAS grubu ve en son olarak pregabalin 30 mg tedavi grubundan olduğunu görmekteyiz.

ALT değerleri iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası 5 grup arasında karşılaştırıldığında, NAS alan 3. grupta iskemi öncesi ALT ortalaması 15.37 ( $\pm 1.65$ ) iken sonrasında 11.57'ye ( $\pm 1.96$ ) gerilemiştir. 30mg pregabalin alan 4. grupta iskemi öncesinde 16.68 ( $\pm 7.92$ ) olan ALT ortalaması, sonraki ölçümde 12.73'e ( $\pm 1.83$ ) gerilemiştir. 60mg pregabalin alan 5. grupta ise iskemi öncesi 11.50 ( $\pm 1.14$ ) olan ALT değeri sonraki ölçümde 10.59'a ( $\pm 0.95$ ) gerilemiştir.

Eşleştirilmiş t-testi ile grupların kendi içindeki iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrasında ALT değerleri karşılaştırıldığında 3. grup ve 5. grupta anlamlı fark olduğu görüldü. NAS tedavisi alan 3. grupta p değeri 0.0003, 5. grup olan 60 mg pregabalin tedavisi alan grupta ise p değeri 0.004 idi.

5 grubun ölçüm değişimlerinin karşılaştırılmasında tek-yön ANOVA testi kullanıldı. ALT değişimi açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı.

Tüm gruplardan iskemi öncesi kuyruk veninden alınan ve reperfüzyon sonrası intrakardiyak alınan kanlardan bakılan TNF- $\alpha$ , NF-KB ve IL-6 değerleri incelenmiştir. Reperfüzyon sonrasında 2. gruptaki ortalama TNF- $\alpha$  değeri 67.32 iken tedavi alan grup 3,4 ve 5'te ortalama değerler sırasıyla 49.16, 46.19 ve 46.08 bulunmuştur. Benzer şekilde tedavi almayan 2. gruptaki reperfüzyon sonrasındaki ortalama NF-KB değeri 1.55 iken, tedavi alan grup 3,4 ve 5'teki ortalama değerler sırasıyla 0.88, 0.88 ve 0.87 olarak daha düşük bulunmuştur. IL-6 değerlerine bakıldığında da aynı şekilde 2. gruptaki ortalama değer 2.34 iken, 3,4 ve 5. gruplarda sırasıyla ortalama değerler 1.68, 1.49 ve 1.54 olarak bulunmuştur.

Eşleştirmeli t-testi kullanılarak tek başlarına TNF-  $\alpha$ , NF-KB ve IL-6 iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası değerlerinin istatistiksel anlamlı olup olmadıklarına bakıldı. TNF- $\alpha$  kan değerleri iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrasında karşılaştırıldığında p değerleri grup 2 için 0.006, grup 3 için 0.017, grup 4 için 0.0004 olarak anlamlı bulundu. NF-KB iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası değerleri karşılaştırıldığında p değerleri grup 2'de 0.044, grup 3'te 0.0004 olarak anlamlı bulundu. IL-6 iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

TNF- $\alpha$ , NF-KB ve IL-6 değerlerinin iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası farkı gruplar arasında ANOVA testiyle karşılaştırılarak istatistiksel anlamlılık araştırıldı. TNF- $\alpha$  ve NF-KB değerinin gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gösterdiği görüldü (sırasıyla  $p=0.0003$ ,  $p=0.001$ ).

Bu istatistiksel farklılığın hangi gruplar arasında kaynaklandığını bulabilmek amacıyla posthoc test olarak Tukey testi yapıldı. TNF-  $\alpha$  değeri, 2. grupla 3,4 ve 5. gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla p değerleri 0.003, 0.01, 0.001). NF-KB değeri, 2. grupla tüm gruplar arasında anlamlı



farklılık gösterdi (grup 1,3,4 ve 5'e göre sırasıyla p değerleri = 0.012, 0.001, 0.006, 0.007).

Doku TNF- $\alpha$ , NF-KB ve IL-6 değerleri incelendiğinde tedavi almayan grup 2'deki ortalama TNF- $\alpha$ , NF-KB ve IL-6 değerlerinin diğer gruplara göre en yüksek olduğu görüldü. Grup 2,3,4 ve 5 ortalama TNF- $\alpha$  değerleri sırasıyla 87.13, 66.23, 73.53, ve 71.59 olarak bulundu. Aynı şekilde NF-KB ve IL-6 ortalamaları da tedavi grupları olan 3, 4 ve 5. gruplarında grup 2'ye göre daha düşük bulundu. IL-6 ortalaması grup 2,3,4 ve 5 için sırasıyla şöyleydi: 2.14, 1.72, 1.72 ve 1.67. Pregabalin 60 mg olan 5. grupta en düşük olduğu görüldü.

5 grubu kendi aralarında karşılaştırmak için ANOVA testi yapıldı ve TNF- $\alpha$  ve IL-6 değerleri açısından gruplar arasından anlamlı fark bulundu. TNF- $\alpha$  için ANOVA testi p değeri 0.0003 ve IL-6 için ANOVA testi p değeri 0.046 olarak bulundu. Gruplar arasında bu farkın nereden kaynaklandığını bulmak için post hoc test yapıldı. Tüm gruplar Tukey testi ile TNF- $\alpha$  ve IL-6 sonuçlarıyla karşılaştırıldı. TNF- $\alpha$  değerleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığına hiç tedavi almayan 2. grup diğer tüm gruplara göre anlamlı farklılık gösterdi. TNF- $\alpha$  değerleri açısından 2. grup, 3. grupta p =0.0003 çok yüksek anlamlılık, 4. grupta p =0.033 anlamlılık ve 5. grupta p= 0.011 anlamlılık gösterdi. IL-6 değerleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında Tukey testinde gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı.

Dokuların histolojik incelemeleri sonrasında gruplar içerisinde Suzuki skorlarına bakıldığında, tedavi almayan grup 2'de %62.5 oranında Suzuki 2 skoru olduğu ve %37.5 oranında Suzuki 1 skoru olduğu görüldü (Şekil 9-11). NAS tedavisi alan grup 3'te %25 oranında Suzuki 1, %62.5 oranında Suzuki 2 ve %12.5 oranında Suzuki 3 skoru görülmüştür. Pregabalin 30 mg alan 4. grupta %50 oranında Suzuki 1, ve %25'er Suzuki 2 ve 3 skorları olduğu görüldü. Pregabalin 60 mg alan 5. grupta ise %12.5 Suzuki 1, %50 oranında Suzuki 2 ve %37.5 oranında Suzuki 3 skorları olduğu görüldü.

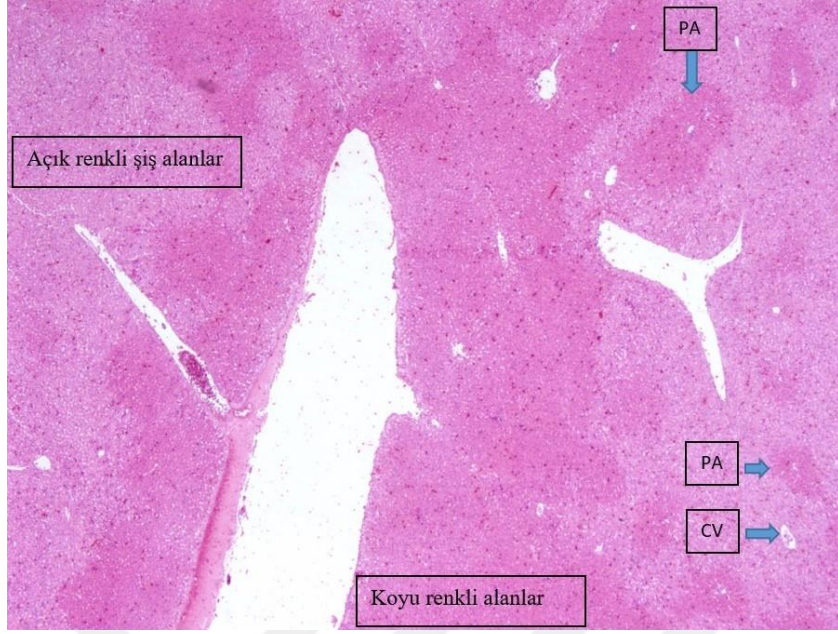
Gruplar arasında Suzuki skor dağılımının istatistiksel olarak Fisher testi ile incelendiğinde p değeri 0.134 bulundu ve anlamlı olmadığı görüldü.

Dokularda bcl-2 için yapılan çalışmalarda muhtemel kitten kaynaklanan boyamadaki hata sebebiyle anlamlı inceleme yapılmadı ve boyamalar değerlendirilemedi, bu yüzden sonuçlar çalışmaya dahil edilmedi. Dokularda kaspaz seviyelerine bakıldı ve 0,1 2 olarak skorlandı. Grup 1’de %62.5 oranında 0 skoru, %12.5 oranında 1 ve %25 oranında 2 skoru olduğu görüldü. Grup 2’de %87.5 oranında 0, %12.5 oranında 1 skoru olduğu görüldü. Grup 3’te %62,5 oranında 0, %37,5 oranında 1 skoru olduğu görüldü. Grup 4’te %75 oranında 0 skoru, %25 oranında 1 skoru olduğu görüldü. Grup 5’te ise %50 oranında 0 skoru, %50 oranında 1 skoru olduğu görüldü.

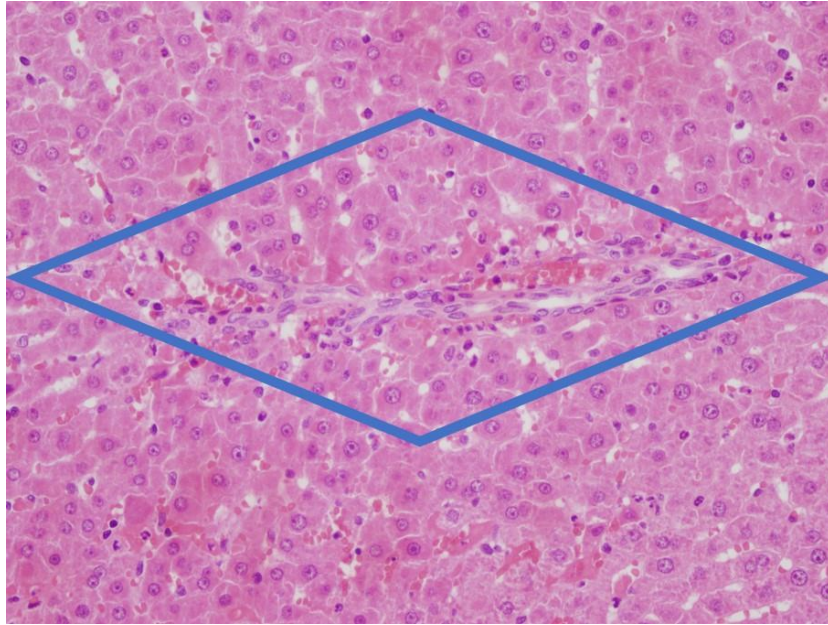
Gruplar arasında kaspaz skoru dağılımının istatistiksel anlamlılığı Fisher testi ile incelendiğinde p değeri 0.362 olarak anlamlı bulunmadı.

KONTROL GRUBU 2. GRUPLA KARŞILAŞTIRILDIĞINDA P DEĞERİ	3. GRUP	4. GRUP	5. GRUP
KANDA AST	0.009	0.013	0.0003
KANDA TNF- $\alpha$	0.003	0.01	0.001
KANDA NF-KB	0.001	0.006	0.007
DOKUDA TNF- $\alpha$	0.0003	0.033	0.011

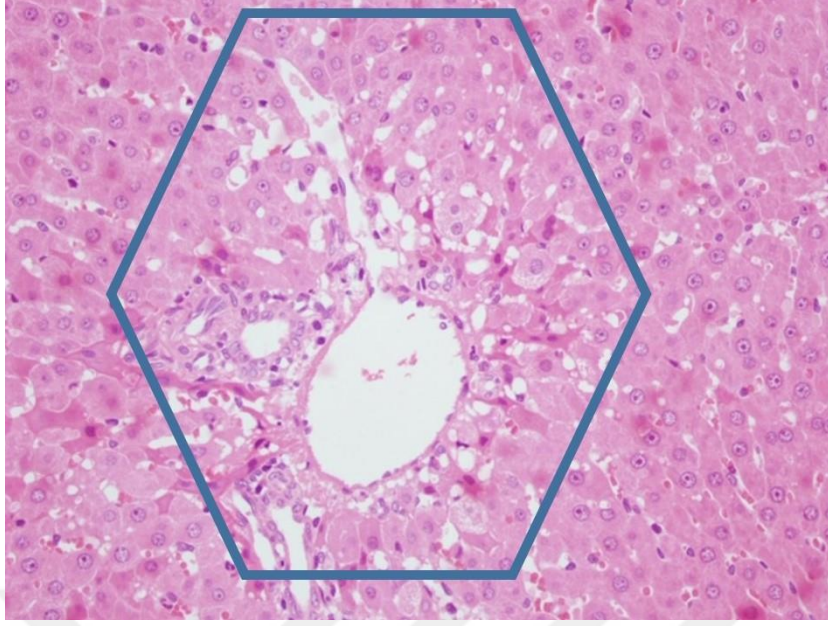
Tablo 2. Sonuçların karşılaştırılması



Şekil 9. Hematoksilen eozin boyama ile ışık mikroskopi 40X büyütme. Açık renkli alanlar (zon 3'e uyan alanlar) şiş- hasarlı alanlar



Şekil 10. Hematoksilen eozin boyama ile ışık mikroskopi 400x büyütme. Arter-ven ve safra duktusları içeren portal alan, duktal plate'deki hepatositlerde fokal nekroz ve apoptoz görülmekte.



Şekil 11. Hematoksilen eozin boyama ile ışık mikroskobu 400x büyütme. Portal alan çevresinde geniş nekroz, çatı çökmesi.

## TARTIŞMA

Karaciğer iskemik reperfüzyon hasarı birçok klinik durumda karşımıza çıkan bir sorun olup sadece karaciğeri değil, akciğer, böbrekler, bağırsaklar, adrenal bezler ve pankreas dahil tüm vücudu etkileyen bir kaskadı içermektedir (26). Bu çalışmamızda daha önce iskelet kası, spinal kord, ve serebral hasar üzerinde etkileri çalışılmış pregabalin molekülünün karaciğer iskemik reperfüzyon hasarını engellemede etkisini çalışmayı amaçladık (9,10,14,18). Yapılan çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da pregabalin molekülünün karaciğer iskemik reperfüzyon hasarını engellemede etkin olduğunu gördük.

Hiçbir tedavi almadan operasyon geçiren kontrol grubu 2. grupta, reperfüzyon tamamlanıp deney sonrasında alınan kan örneklerindeki AST değerlerinin iskemi öncesinde alınan örneklerle göre yükseliş gösterdiği görülmüştür. 1 saat boyunca gerçekleşen iskemi ve takiben 2 saatlik reperfüzyon sonrasında AST değerlerindeki bu artış beklediğimiz şekilde karaciğer hasarının gerçekleştiğini ve deneysel modelin literatürle ve kliniğimizin bu konuda yaptığı önceki çalışmalarla paralel etkinliğini göstermektedir (22-25,27).

Karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarı başta sıçan ve fare olmak üzere tavşan, köpek, domuz gibi birçok hayvan deneysel modelinde çalışılmış olup özellikle pregabalin çalışmalarıyla da paralel ilerleyebilmek ve operasyonda manipülasyonun daha kolay yapılabilmesi amacıyla bizim çalışmamızda da sıçanlar seçilmiştir. İskemi reperfüzyon hasarını engellemede birçok yöntem ve molekül denenmiş olup bunlardan biri de sıcak iskeminin etkilerini azaltmaya yönelik iskemik ön koşullandırma yoluyla hasarı engellemedir (21,28). Ayrıca organın alınmasını takiben gerçekleşen soğuk iskemi hasarını gidermek için muhafaza esnasında organı korumaya yönelik kullanılan prezervasyon sıvılarının fonksiyonunu iyileştirmeye yönelik de birçok çalışma yapılmış

ve bu sıvılara eklenen moleküllerin terapötik etkisi araştırılmıştır (29-31). Ayrıca muhafazayı ve organın alınmasından sonra gerçekleşen hasarı minimuma indirmek amacıyla domuzlarda yapılan bir çalışmada hipotermik, oksijenli ve taşınabilir bir perfüzyon makinesi iskemi ve reperfüzyon hasarını engellemede başarılı sonuçlar göstermiştir (32).

İskemi ve takip eden reperfüzyon ile gerçekleşen hasarın moleküler mekanizması çok incelenmiş ve DAMP ile PAMP moleküllerinin açığa çıkıp PRR reseptörlerine bağlanmasıyla başlayan kaskat ile karaciğerin doğal bağışıklık mekanizmasının kompleks sinyal mekanizmalarının bu hasara sebep olduğu ortaya konulmuştur (33). Bu konuda en çok çalışılan ve belirlenen DAMP moleküllerinin ve PRR reseptörlerinin başında HMGB1 molekülü ve TLR-4 reseptörü gelir. HMGB1 siRNA tedavisi alan farelerde yapılan bir çalışmada, %60-70 oranında nükleer HMGB1 ekspresyonunda azalmanın hepatik iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı, hepatik TLR4, TLR2, RAGE, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 ekspresyonunun azaldığını göstermiştir (34). Ayrıca ekstrasellüler HMGB1 oranını azaltarak bu molekülün RAGE reseptörü ile birleşmesini engelleyen ajanların da iskemi reperfüzyonu engellemede etkili olduğu görülmüştür (35,36). Ayrıca HMGB1'in TLR-4 reseptörü üzerinde ve TLR-4 ile birlikte NF-KB yolağının üzerinden iskemi reperfüzyon hasarında etkili olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir (37-39). TLR-4 reseptör antagonizmasının kullanılarak HMGB1 salınımının azaldığı ve bu etkileşimin engellenmesiyle iskemik reperfüzyon hasarının azaldığı görülmüştür (40). Pregabalinin sıçanlardaki hiperglisemik beyin hasarı ve nörotoksisiteyi engellemedeki rolünü araştırılan bir çalışmada da pregabalin tedavisi alan sıçanlarda düşük seviyede HMGB1, TLR4, NF-KB, IL-1 $\beta$ , ve TNF- $\alpha$  ekspresyonu ve gelişmiş nörolojik sonuçlar görülmüştür (17). Bizde çalışmamızda HMGB1 ile başlayan kaskadın karaciğer iskemik reperfüzyonunda etkin bir yolak olması ve pregabalin

molekölünün bu yolağa etkili olması sebebiyle pregabalinin daha önce hiç çalışılmamış bir etkisi olarak karaciğerdeki bu hasarı engellemedeki rolünü araştırmak istedik.

NAS tedavisi çalışmamızda medikal kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Pregabalin tedavisinin, literatürde oksidatif hasarı engellemede ve özellikle karaciğer iskemi reperfüzyona dair hayvan çalışmalarında birçok kez etkinliği gösterilmiş NAS'e üstünlüğünün karşılaştırılması amaçlanmıştır. NAS tedavisinin, glutatyon, malondialdehid, serum alanin aminotransferaz seviyeleri, histopatolojik değişiklikler, kaspaz-3 aktivitesi, reperfüzyon sonrası apoptoz ve reaktif oksijen parçalarına bağlı endoplazmik retikulum stresi seviyelerinde düşüş ve inhibisyona sebep olduğu gösterilmiştir. (41-43) Bizim çalışmamızda da NAS tedavisi iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrasındaki AST ve ALT değerleri ile TNF- $\alpha$  istatistiksel anlamlı düşüş göstermiştir. Ayrıca NAS tedavisi alan grupta dokularda bakılan TNF- $\alpha$  ve NF-KB seviyelerinde istatistiksel anlamlı bir düşüş bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda NAS ile karşılaştırmalı olarak pregabalin tedavisi özellikle AST sonuçları üzerinden değerlendirildiğinde, p değerlerindeki farklılıklarda istatistiksel olarak en yüksek derecede anlamlı farkın 60 mg pregabalin grubu, daha sonra NAS grubu ve en son olarak pregabalin 30 mg tedavi grubundan olduğunu görmekteyiz. ALT değerleri de AST değerlerine benzer şekilde tedavi gruplarında gerileme göstermiştir. ALT değerlerinde ise NAS alan gruptaki değişim çok yüksek derecede anlamlı ve 60 mg pregabalin alan gruptaki değişim yüksek derecede anlamlı olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize pregabalin molekülünün NAS'e üstünlüğünün olabildiğini ve farklı yollar üzerinden etki ediyor olabileceğini düşündürmüştür.

Kan örneklerinden alınan TNF- $\alpha$ , NF-KB ve IL-6 değerleri öncelikle iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası alınanlar kanlar arasındaki farklılık açısından incelendiğinde aynı doku değerlerinde olduğu gibi tüm belirteçler için tedavi almayan 2. grupta ortalamalar 3,4 ve 5. gruplara göre fark ortalaması daha yüksek bulunmuştur.



Kan örneklerinden alındı bu sonuçlar incelendiğinde özellikle TNF- $\alpha$  sonuçlarının tüm gruplar arasında 5. grup olan 60 mg pregabalin tedavisi alan grupta en anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur. 60 mg pregabalin, 30 mg pregabalin ve kontrol NAS tedavisine üstün bulunmuştur. NF-KB değerleri sonuçları TNF- $\alpha$  sonuçlarını birbir desteklememiş, NAS tedavisini, pregabalin 30 mg ve pregabalin 60 mg tedavisinden daha anlamlı bulmuştur, fakat pregabalin tedavisinin NF-KB sonuçlarında gerileme etkisi olduğu yine doğrulanmıştır. IL-6 sonuçları ise pek bir istatistiksel değer taşımamıştır.

Deney sonunda alınan dokular histolojik olarak incelenmiş ve mikroskop altında iskemi reperfüzyon hasarı konjesyon, vakuolizasyon ve nekroz seviyelerine göre puanlanarak Suzuki skor toplamı belirlenmiştir. Gruplar arasında Suzuki skorları Fisher testi ile incelendiğinde dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Daha sonra kaspaz seviyelerine bakılıp kaspaz açısından 0,1 ve 2 olarak skorlanan spesimenlerde Fisher testi ile skor dağılımının istatistiksel anlamı incelendiğinde p değeri 0.362 olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonuçların altta yatan sebebi düşünüldüğünde hematoksilen eozin ve immünohistokimyasal boyamalar otomatize makineleler aracılığıyla yapıldığı için insana dayalı bir hata düşünülmemektedir. Tüm dokular aynı patoloji uzmanı tarafından ve kör olarak incelendiği için dokuların değerlendirmesinde de gözlemciye bağlı bir yönelim düşünülmedi. Biyokimyasal testlerde belirteçlerde yükselme olmasına rağmen histolojik olarak benzer hasarların gözlenmemesi hasarın henüz doku seviyesinde yerleşmemiş olmasına ve toplam deney süresinin bunu gösterecek kadar uzun olmamasına bağlanabilir.

Sonuç olarak yara iyileşmesinde de olumlu etkilerinin olduğu gösterilen (44), karaciğer üzerinden metabolizmaya uğrayarak karaciğere ek bir yük oluşturmayan, ayrıca abdominal cerrahiden sonra sıçanlarda kognitif fonksiyonların düşmesini engellemede rolü olduğu gösterilen (45) pregabalin molekülünün iskemik reperfüzyon



hasarını engellemede olumlu etkisi olduğu görölmüş ve daha ileri çalışmalarla en etkin doz ayarının ve hangi yollar üzerinden bu etkinin tam olarak gerçekleştiğinin araştırılmasıyla klinik olarak da kullanılmasının araştırılması gerektiği kararna varılmıştır.



## SONUÇ

Sıçanlarda iskemi reperfüzyon modelini 1 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon olarak uyguladığımız deneyimizde, hiçbir terapötik ajan vermediğimiz kontrol grubuyla, medikal kontrol olarak N-asetilsistein tedavisi ve 30 mg ile 60 mg pregabalin tedavisi alan grupları karşılaştırdık. Sonuçlarımız incelendiğinde, iskemi reperfüzyonun karaciğerde hasara sebebiyet verdiği, hiçbir tedavi alınmadığında bu hasarın ciddi olarak ortaya çıktığı ve bu hasarın hem biyokimsal belirteçlerle kanda hem dokuda ortaya çıktığı, N-asetilsistein tedavisinin iskemi reperfüzyon hasarını engellemede etkili olduğu literatürle uyumlu şekilde ortaya konulmuştur.

Çalışma hipotezimiz olan pregabalin molekülünün etkinliği ve hangi dozda daha etkin olduğu incelendiğinde ise, 60 mg pregabalin tedavisinin biyokimyasal belirteçlerden AST değerlerine göre N-asetilsistein tedavisinden ve 30 mg pregabalin tedavisinden iskemi reperfüzyon hasarını engellemede belirgin şekilde üstün olduğu, ALT değerlerine göre pregabalin tedavisinin N-asetilsistein'e üstün olmadığı fakat anlamlı derecede etkili olduğu, kan TNF- $\alpha$  değerlerine göre 60 mg pregabalin tedavisinin N-asetilsistein tedavisi ve 30 mg pregabalin tedavisinden belirgin şekilde üstün olduğu, NF-KB sonuçlarına göre NAS tedavisi pregabalin gruplarına üstün bulunmakla birlikte pregabalin tedavisi anlamlı derecede etkili bulunmuş, dokudaki TNF- $\alpha$  seviyeleri de pregabalin tedavisinin etkili olduğunu N-asetilsistein'den üstün olmadığını göstermiştir.

Bu sonuçlara göre pregabalin tedavisinin karaciğer iskemi reperfüzyon hasarını engellemede etkili olduğu, N-asetilsistein'e belirli parametreler üzerinden değerlendirildiğinde üstünlük gösterdiği, 60 mg pregabalin tedavisinin 30 mg pregabalin tedavisinden daha üstün olduğu görülmüştür. Daha ileri çalışmalarla pregabalinin hangi yollar üzerinden nasıl etkili olduğunun araştırılması gereklidir.

## KAYNAKLAR

- 1) Shen XD, Ke B, Zhai Y, et al. Toll- like receptor and heme oxygenase- 1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. American Journal of Transplantation. 2005 ;5(8):1793-1800.
- 2) Jeyabalan G, Klune JR, Nakao A, et al. Arginase blockade protects against hepatic damage in warm ischemia-reperfusion. Nitric Oxide. 2008;19(1):29-35.
- 3) Zhao Y, Cai H, Zhou P, Lin S, Pan Y, Liang X. Protective effect of ulinastatin on hepatic ischemia reperfusion injury through autophagy activation in Chang liver cells. J Cell Biochem. 2019 Apr 24.
- 4) Elias- Miro M, Massip- Salcedo M, Jimenez- Castro M, et al. Does adiponectin benefit steatotic liver transplantation? Liver Transplantation 2011;17(9):993-1004.
- 5) Huang H, Tohme S, Al- Khafaji AB, Tai S et al. Damage- associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. Hepatology 2015;62(2):600-614.
- 6) Ramalho FS, Fernandez-Monteiro I, Rosello-Catafau J, et al. Hepatic microcirculatory failure. Acta Cirurgica Brasileira 2006;21:48-53.
- 7) Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, et al. Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: current concepts. Arch Trauma Res. 2013 Aug;2(2):63-70.
- 8) Tacchini L, Radice L, Pogliaghi G, et al. Differential activation of heat shock and nuclear factor  $\kappa$ B transcription factors in postischemic reperfused rat liver. Hepatology 1997 ;26(1):186-191.
- 9) Aşçı S, Demirci S, Aşçı H, et al. Neuroprotective effects of pregabalin on cerebral ischemia and reperfusion. Balkan Medical Journal 2016 ;33(2):221.
- 10) Kazancı B, Ozdoğan S, Kahveci R, et al. Neuroprotective Effects of Pregabalin Against Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. Turk Neurosurg. 2017;27(6):952-961.

- 11) Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, et al. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *BioMed Research International* 2012;9:298657.
- 12) van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. The sterile immune response during hepatic ischemia/reperfusion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2012. 1;23(3):69-84.
- 13) Wang RR, Lou GD, Yu J, et al. Oral administration of pregabalin in rats before or after nerve injury partially prevents spontaneous neuropathic pain and long outlasts the treatment period. *Pharmacology* 2016;97(5-6):251-258.
- 14) Ha KY, Carragee E, Cheng I, et al. Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats: biochemical analysis and effect on glial cells. *Journal of Korean Medical Science* 2011;26(3):404-411.
- 15) Yoon JS, Lee JH, Son TG, et al. Pregabalin suppresses calcium-mediated proteolysis and improves stroke outcome. *Neurobiology of Disease* 2011;41(3):624-629.
- 16) Celik M, Kose A, Kose D, et al. The double-edged sword: effects of pregabalin on experimentally induced sciatic nerve transection and crush injury in rats. *International Journal of Neuroscience* 2015;125(11):845-854.
- 17) Song Y, Jun JH, Shin EJ, et al. Effect of pregabalin administration upon reperfusion in a rat model of hyperglycemic stroke: Mechanistic insights associated with high-mobility group box 1. *PloS one* 2017;12(2):e0171147.
- 18) Ozturk L, Dogan HT, Kilicarslan A, et al. Effect of different doses of pregabalin on skeletal muscle ischaemia-reperfusion injury in rats. *Bratislavske lekarske listy* 2017;118(7):417-422.
- 19) Ben-Menachem E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia* 2004;45 Suppl 6:13-18.
- 20) Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011;50(5):600-613.

- 21) Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, et al. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World Journal of Gastroenterology* 2005; 11(12):1825.
- 22) Ertürk S. Splenektomi işleminin karaciğer regenerasyonu üzerine etkileri. Cerrahpaşa Tıp Fak. Genel Cerrahi AD. Uzmanlık Tezi 1986.
- 23) Kaptanoğlu L. Farelerde karaciğerin iskemik hasarını önleyen bazı maddelerin hipotermik ortamdaki etkileri. Cerrahpaşa Tıp Fak. Genel Cerrahi AD. Uzmanlık Tezi 1993.
- 24) Aytac E. Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında bakteriyel translokasyon ve oksidatif hasar. Cerrahpaşa Tıp Fak. Genel Cerrahi AD. Uzmanlık Tezi 2012. (Tez No: 336420)
- 25) Tasci Y. Total hepatik vasküler oklüzyon ve pringle manevrası ile oluşturulan İskemi-Reperfüzyon modelinde oksidatif hasar ve karaciğer histopatolojisinin değerlendirilmesi. Cerrahpaşa Tıp Fak. Genel Cerrahi AD. Uzmanlık Tezi 2012. (Tez No: 331497)
- 26) Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 906965.
- 27) Saïdi SA, Abdelkafi S, Jbahi S, et al. Temporal changes in hepatic antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat liver ischemia model: Effect of dietary fish oil. *Human & Experimental Toxicology* 2015 ;34(3):249-259.
- 28) Radojkovic M, Stojanovic M, Stanojevic G, et al. Ischemic preconditioning vs adenosine vs prostaglandin E1 for protection against liver ischemia/reperfusion injury. *Braz J Med Biol Res.* 2017 Jul 20;50(8):e6185.
- 29) Martins R, Pinto Rolo A, Soeiro Teodoro J, et al. Addition of berberine to preservation solution in an animal model of ex vivo liver transplant preserves mitochondrial function and bioenergetics from the damage induced by ischemia/reperfusion. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19(1):284.

- 30) Pantazi E, Zaouali MA, Bejaoui M, et al. Sirtuin 1 in rat orthotopic liver transplantation: an IGL-1 preservation solution approach. *World Journal of Gastroenterology* 2015;21(6):1765.
- 31) Franco- Gou R, Mosbah IB, Serafin A, et al. New preservation strategies for preventing liver grafts against cold ischemia reperfusion injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2007;22(7):1120-1126.
- 32) Compagnon P, Levesque E, Hentati H, et al. An oxygenated and transportable machine perfusion system fully rescues liver grafts exposed to lethal ischemic damage in a pig model of DCD liver transplantation. *Transplantation* 2017;101(7):e205-13.
- 33) Lu L, Zhou H, Ni M, et al. Innate immune regulations and liver ischemia reperfusion injury. *Transplantation* 2016;100(12):2601.
- 34) Zhao G, Fu C, Wang L, et al. Down-regulation of nuclear HMGB1 reduces ischemia-induced HMGB1 translocation and release and protects against liver ischemia-reperfusion injury. *Scientific Reports* 2017;7:46272.
- 35) Zhang W, Li F, Ye Y, et al. Isoglycyrrhizinate magnesium enhances hepatoprotective effect of FK506 on ischemia-reperfusion injury through HMGB1 inhibition in a rat model of liver transplantation. *Transplantation* 2017;101(12):2862-2872.
- 36) Tsaroucha AK, Valsami G, Kostomitsopoulos N, et al. Silibinin effect on Fas/FasL, HMGB1, and CD45 expressions in a rat model subjected to liver ischemia-reperfusion injury. *Journal of Investigative Surgery* 2018;31(6):491-502.
- 37) Wang Y, Wu S, Yu X, et al. Dexmedetomidine protects rat liver against ischemia-reperfusion injury partly by the  $\alpha$ 2A-adrenoceptor subtype and the mechanism is associated with the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;17(7):995.
- 38) Yang H, Zhou H, Zhuang L, et al. GPBAR1/TGR5 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury via the Inhibition of TLR4 Signaling in Mice. *Liver Transpl.* 2016; 23(10):1002

- 39) Kamo N, Ke B, Ghaffari AA, et al. ASC/caspase- 1/IL- 1 $\beta$  signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2013;58(1):351-362.
- 40) McDonald KA, Huang H, Tohme S, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonist eritoran tetrasodium attenuates liver ischemia and reperfusion injury through inhibition of high-mobility group box protein B1 (HMGB1) signaling. *Molecular Medicine* 2014;20(1):639-648.
- 41) Sun Y, Pu LY, Lu L, Wang XH, Zhang F, Rao JH. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury. *World Journal of Gastroenterology* 2014;20(41):15289.
- 42) Lee EJ, Silva SM, Simões MD, Montero EF. Effect of N-acetylcysteine in liver ischemia-reperfusion injury after 30% hepatectomy in mice. *Acta Cirurgica Brasileira* 2012;27(4):346-349.
- 43) Baumann J, Ghosh S, Szakmany T, Jancso G, Ferencz A, Roth E, Bogar L. Short-term effects of N-acetylcysteine and ischemic preconditioning in a canine model of hepatic ischemia-reperfusion injury. *European Surgical Research* 2008;41(2):226-230.
- 44) Sarıtaş TB, Korkmaz M, Sevimli A, et al. Comparison of the effects of gabapentin and pregabalin on wound healing in rats. *International Wound Journal* 2016;13(5):748-753.
- 45) Kawano T, Eguchi S, Iwata H, et al. Pregabalin can prevent, but not treat, cognitive dysfunction following abdominal surgery in aged rats. *Life Sciences* 2016 ;148:211-119.