T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL KOLİT MODELİNDE TRANSAURICULAR VAGAL STİMÜLASYONUN ENTERİK SİNİR SİSTEMİ SİNAPS OLUŞUMU VE BAĞIRSAK MORFOMETRİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. AYŞE SOYLU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MELTEM BAHÇELİOĞLU
EŞ TEZ DANIŞMANI
Öğr. Gör. Dr. ECE ALİM

ANKARA
HAZİRAN 2022

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL KOLİT MODELİNDE TRANSAURICULAR VAGAL STİMÜLASYONUN ENTERİK SİNİR SİSTEMİ SİNAPS OLUŞUMU VE BAĞIRSAK MORFOMETRİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. AYŞE SOYLU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MELTEM BAHÇELİOĞLU
EŞ TEZ DANIŞMANI
Öğr. Gör. Dr. ECE ALİM

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU-2021-7301 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
HAZİRAN 2022

T.C

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Anatomi Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi Olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/04/2022

BAŞKAN

İmza

Prof. Dr. MELTEM BAHÇELİOĞLU

Gazi Üniversitesi / Anatomi Anabilim Dalı

ÜYE

İmza

Prof. Dr. Tuncay V. PEKER

Gazi Üniversitesi

ÜYE

İmza

Prof. Dr. İ. Nadir GÜLEKON

Gazi Üniversitesi

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimi süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tez konumun belirlenmesi aşamasından tüm basamaklara kadar bana yol gösteren, yardım ve desteğini esirgemeyen asistanı olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum, Danışman Hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Sevgili Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU'na ve yetişmemde çok emeği geçen kıymetli Eş Danışman Hocam Öğr. Gör. Dr. Ece ALİM'e, yetişmemdeki destek ve katkılarından dolayı çok değerli hocalarım Prof. Dr. Tuncay V. PEKER'e, Prof. Dr. İ. Nadir GÜLEKON'a ve Doç. Dr. Z. Kutay COŞKUN'a, Dr. Öğr. Üyesi Kerem ATALAR'a, Öğr. Gör. Dr. Kaan NEDER'e ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Tezimin birçok aşamasında bana yol gösteren, yardım ve desteğini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Özen AKARCA DİZAKAR'a, Dr. Öğr. Üyesi Kerem ATALAR'a, doktora öğrencileri Birce ERÇELEN ÖZÖZTÜRK'e Özgenur KOÇAK'a ve Hasan KILINÇ'a, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM) çalışanlarına,

Bana verdikleri sevgi ve emekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme, bu uzun ve yorucu süreçte her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen sevgili eşime, yaşam kaynağım biricik kızım Beste'ye ve biricik oğlum Serdar'a tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

Arş. Gör. Dr. Ayşe SOYLU

İÇİNDEKİLER

Teşekkür
İçindekiler
Tablo Dizini
Şekillerin Listesi
Grafiklerin Listesi
Simgeler Ve Kisaltmalar

1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Nervus Vagus Anatomisi 4
2.2. Nervus Vagus Stimülasyonu 10
2.3. Transauricular Vagal Sinir Stimülasyonu 18
2.4. Enterik Sinir Sistemi 21
2.5. Nöroligin (NLGN) ve Nöroksin (NRXN) Protein Aileleri 23
2.6. Kolit 25

3. GEREÇ ve YÖNTEM 27
3.1. Deney Grupları 27
3.2. Hayvanların Bakım Koşulları 27
3.3. Deney Protokolü 28
3.4. Transauricular Vagal Sinir Stimülasyonu 29
3.5. Cerrahi İşlem 30
3.6. Işık Mikroskobik Yöntem 30
3.7. Hematoksilen&Eosin (H&E) Boyama Protokolü 30
3.8. İmmunohistokimyasal Analizler 31

4. BULGULAR 33
4.1. Makroskopik Bulgular 33
4.2. Histolojik Bulgular 33
4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları 35

4.3. Bağırsak Duvarında Yapılan Morfometrik Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması 36

4.4. Nöroligin-1 ve Nöroksin 2-α Pozitif Hücre Sayımının Gruplar Arası İstatistiksel Analizleri 37

4.5. Nöroligin-1 ve Nöroksin 2-α İmmünreaktivite Yoğunluk Yüzdelerinin Gruplar Arası İstatistiksel Analizleri 39

4.6. Deney Gruplarına Ait İmmunohistokimyasal Görüntüler 41

5. TARTIŞMA 44

6. SONUÇ 54

7. KAYNAKLAR 57

8. ÖZET 68

9. SUMMARY 70

10. EKLER 72

11. ÖZGEÇMİŞ 76

TABLO DİZİNİ

Tablo **Sayfa**

Tablo 1. Deney grupları. 27
Tablo 2. Histopatolojik skorlama [89] [90]. 35
Tablo 3. Deney gruplarına ait mikroskobik hasar skorlaması. 35

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 1. Kraniyal sinirler [13]..... 5

Şekil 2. Boyun bölgesinden T1 seviyesinden geçen transvers kesitte vagina carotica içerisinde n. vagus'un görünümü [13]. 6

Şekil 3. a. Nervus vagus'un medulla oblongata'dan çıkışı, **b.** Nervus vagus'un çekirdekleri [15]. 8

Şekil 4. Servikal VSS yöntemi [32]. 13

Şekil 5. Gamma Core cihazı kullanılarak boyun bölgesinde transkutanöz servikal VSS [38]. 15

Şekil 6. Concha aracılığı ile transauricular n. vagus sinir stimülasyonu [38]..... 15

Şekil 7. NEMOS cihazı kullanılarak kulak memesi ve concha yolu ile tVSS [38]. 16

Şekil 8. Kulağın duyusal innervasyonu [15]. 19

Şekil 9. Sol; Tragus aracılığı ile tVSS [38], Sağ; NET-1000 kulaklık kullanılarak meatus acusticus externus yolu ile tVSS [38]. 21

Şekil 10. ESS'nin yapısı [76]. 23

Şekil 11. Sıçanlara intrakolonik yolla TNBS indüksiyonu. 28

Şekil 12. Sıçanların intrakolonik TNBS uygulamasını takiben baş aşağı pozisyonda tutulması 29

Şekil 13. Deney de kullanılan Vagustim® firmasına ait tVSS Cihazı [88]. 29

Şekil 14. Anestezi altındaki sıçanlara tVSS uygulanması. 30

Şekil 15. Deney gruplarına ait kolon makroskopik görüntüleri. 33

Şekil 16. Deney gruplarına ait kolon histolojik görüntüleri..... 34

Şekil 17. Gruplara ait **Nöroligin-1** immunohistokimyasal görüntüleri, plexus myentericus'lar (➔), muskular tabaka (**m**), serosa tabakaları **(s)** izlenmekte..... 42

Şekil 18. Gruplara ait **Nöroksin-2**α immunohistokimyasal göüntüleri, plexus myentericus'lar (➔), muskular tabaka (**m**), serosa tabakaları **(s)** izlenmekte..... 43

GRAFİKLERİN LİSTESİ

Grafik **Sayfa**

Grafik 1. Deney gruplarında mukoza ölçümlerini gösteren sütun grafik..... 36

Grafik 2. Deney gruplarında kas kalınlığı ölçümlerini gösteren sütun grafik..... 37

Grafik 3. Deney gruplarında Nöroligin-I pozitif hücre sayımlarını gösteren sütun grafik. 38

Grafik 4. Deney gruplarında Nöroksin-IIα pozitif hücre sayımlarını gösteren sütun grafik. 39

Grafik 5. Deney gruplarında Nöroligin-I immunreaktivite yoğunluk yüzdelerini gösteren sütun grafik. 40

Grafik 6. Deney gruplarında Nöroksin-IIα immunreaktivite yoğunluk yüzdelerini gösteren sütun grafik. 41

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat (derece)
µm	Mikrometre
a.	Arteria
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
aVS	Auricular vagal sinir
CE	Conformite Europeenne
CH	Crohn hastalığı
cm	Santimetre
DAB	Diaminobenzedin
DAI	Hastalık aktivite indeksi
DNCB	Dinitroklorobenzen
DSS	Dekstran sodyum sülfat
EA	Elektroakupunktur
ESS	Enterik sinir sistemi
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FMLP	Formil-metiyonil-lösil-fenilalanin
fMRI	Fonksiyonel manyetik rezonans
GÜDAM	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
H&E	Hematoksilen & Eosin
HDF.	Sitrat tamponu
HRV	Heart rate variability (kalp hızı değişkenliği)
Hz	Hertz
IBH	İnflamatuar barsak hastalığı
IBS	İnflamatuar bağırsak sendromu
IFN-y	İnterferon-y
IL-1α	İnterlökin-1alfa
IL-18	İnterlökin-18

IL-6	İnterlökin-6
im.	İntramüsküler
kg	Kilogram
m.	Musculus
mA	Miliamper
M-CSF	Makrofaj-koloni uyarıcı faktör
mg	Miligram
ml	Mililitre
MPO	Miyeloperoksidaz
MSS	Merkezi sinir sistemi
n.	Nervus
NTS	Nucleus tractus solitarii
OSS	Otonom sinir sistemi
PBS	Phosphate Buffer Saline
PSS	Periferik Sinir Sistemi
RA	Romatoid artrit
ST36	Diz eklemi altında fibula başının 5 mm altında, arka bacağın tibia ön tüberkülünün 2 mm lateralinde akupunktur noktası
TA-125-HP	Hidrojen peroksit
Th1	Tip I yardımcı T lenfosit
Th2	Tip II yardımcı T lenfosit
TNBS	Trinitrobenzen sülfonik asit
TNF	Tümör nekroz faktör
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
tVSS	Transauricular vagal sinir stimülasyonu
ÜK	Ülseratif kolit
v.	Vena
VS	Nervus vagus
VSS	Nervus vagus sinir stimülasyonu

1. GİRİŞ

Nervus vagus stimülasyonu (VSS), manuel veya elektriksel stimülasyon dahil olmak üzere nervus vagus'u uyaran bir tekniği ifade eder [1]. Nervus vagus stimülasyonu çevredeki belirli sensörleri ve efektörleri merkezi sinir sistemi (MSS)'ne bağlar. Çeşitli sinaptik bağlantılarla erişilebilen n. vagus'un dolaylı bağlantıları, daha yüksek beyin bölgeleri olan hypothalamus ile beyin korteksine olan bağlantıları içerir. Böylece nervus vagus'un subkortikal ve kortikal beyin alanlarına modülatif erişimi sağlanır. Bu nedenle, nervus vagus'ta üretilen sinyaller, çok çeşitli temel beyin işlevlerini ve dolayısıyla tüm organizmayı etkileme potansiyeline sahiptir [2].

Otonom sinir sisteminin (OSS) simpatik ve parasimpatik bileşenleri, vücuttaki çeşitli organların, bezlerin ve istemsiz kasların işlevlerini düzenler (örn. ses çıkarma, yutma, kalp hızı, solunum, mide salgısı ve bağırsak hareketliliği gibi). Nervus vagus'un, %20'si "efferent" liflerden (beyinden vücuda sinyaller gönderen) ve %80'i "afferent" (duyusal) liflerden (bilgileri vücuttan beyne taşıyan) oluşan karma bir sinirdir. Efferent kolinerjik lifler, OSS'nin ana parasimpatik bileşenidir. Ancak nervus vagus'un önemli bir işlevi duyusal bilgiyi vücudun birçok yerinden beyne iletmek ve/veya ona aracılık etmektir [1]. Sağ ve sol nervus vagus beyin sapından çıkarak, boyun bölgesinde (vagina carotica içinde a. carotis communis/ a. carotis interna ile v. jugularis interna arasında), üst göğüs bölgesinde (trachea boyunca), alt göğüs ve diyafragma bölgesinde (oesophagus boyunca) ilerleyerek karın boşluğuna doğru seyrederler [3]. Bu istikamet boyunca larynx, pharynx, kalp, akciğerler ve gastrointestinal sistem gibi çeşitli yapılara dallar verirler. Beyin sapında, duyusal afferent lifler nucleus tractus solitarii (NTS)'de sonlanır ve daha sonra farklı beyin bölgelerine doğrudan veya dolaylı olarak bağlanan lifler gönderir. Bu bölgeler arasında nuclei raphe dorsales, locus coeruleus, corpus amygdaloideum, hypothalamus, thalamus ve orbitofrontal korteks bulunur [4]. Nervus vagus, OSS'nin önemli bir bileşenidir. Metabolik homeostazın düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Afferent ve efferent yollarıyla homeostazı sürdürmek için nöro-endokrin-immün eksende anahtar bir rol oynar [5].

Dış kulak, n. vagus'un periferik dalını gönderdiği vücuttaki tek yerdir. Nervus vagus'un tek deri dalı olan ramus auricularis, afferent auricular vagal sinir (aVS) olarak yüzeyelleşir, kulak kepçesinin arka yüzü, dış kulak yolunun arka bölümü ve kulak zarının buraya komşu olan bölümünden duyu alır. Böylece kulak kepçesinde yüzeyel bir alan oluşturur. Bu alan, periferik sinir uyarımı açısından dış uyaranlara duyarlıdır. Beyin sapı, beyindeki ikinci ve üçüncü sıra nöronlara kapsamlı projeksiyonlar yoluyla daha yüksek beyin bölgelerine transauricular vagal sinir stimülasyonu (tVSS) iletimine aracılık eder [6].

Enterik sinir sistemi (ESS), gastrointestinal sistemde "bağırsakların beynini oluşturan ve MSS'den bağımsız olarak işlev gören nöronların bir araya gelmesiyle oluşmuş bir sistemdir [7]. Enterik sinir sistemi, gastrointestinal motilite, sekresyon, emilim, duyu ve bağışıklık fonksiyonlarının kontrolü için önemlidir. Embriyonik gelişim sırasında, MSS'nin nöral krest hücreleri, ESS oluşturmak için gastrointestinal sisteme göç eder. Enterik sinir sistemi iki ana pleksus olan plexus myentericus ve plexus submucosus ile bazı küçük pleksuslardan meydana gelmektedir [8]. Beyin, nöronları iletişim halindeki geniş hücre ağlarına bağlayan sinapslarda sinyaller ileterek bilgiyi işler. Bu ağlarda sinapslar sadece sinyalleri iletmekle kalmaz, aynı zamanda onları dönüştürür ve iyileştirir. Nöroksinler (NRXN) ve nöroliginler (NLGN), sinapslardaki presinaptik ve postsinaptik nöronları birbirine bağlayan, sinaps boyunca sinyalleşmeye aracılık eden ve sinaptik işlevleri belirleyerek sinir ağlarının özelliklerini şekillendiren sinaptik hücre yapışma molekülleridir [9].

Kolit, hayvanlarda sülfatlanmış polisakkaritlerin (karajenan, amilopektin sülfat, dekstran sülfat) oral yoldan verilmesi, seyreltilmiş asetik asidin rektal yolla damlatılması, dinitroklorobenzen'e (DNCB) duyarlılığın ardından veya trinitrobenzen sülfonik asit'in (TNBS) rektal yolla bir kez damlatılmasından sonra gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonu ve Arthus reaksiyonu ile indüklenebilir. Kolonun kimyasal tahrişinden sonra bağışıklık komplekslerinin intravenöz enjeksiyonu ve formil-metiyonil-lösil-fenilalanin (FMLP) gibi kemoatraktan peptidler tarafından indüklenir. Sıçan, fare veya tavşandaki tüm kolon enflamasyonu modellerinin, insan kolitinde bulunana benzer şekilde artan

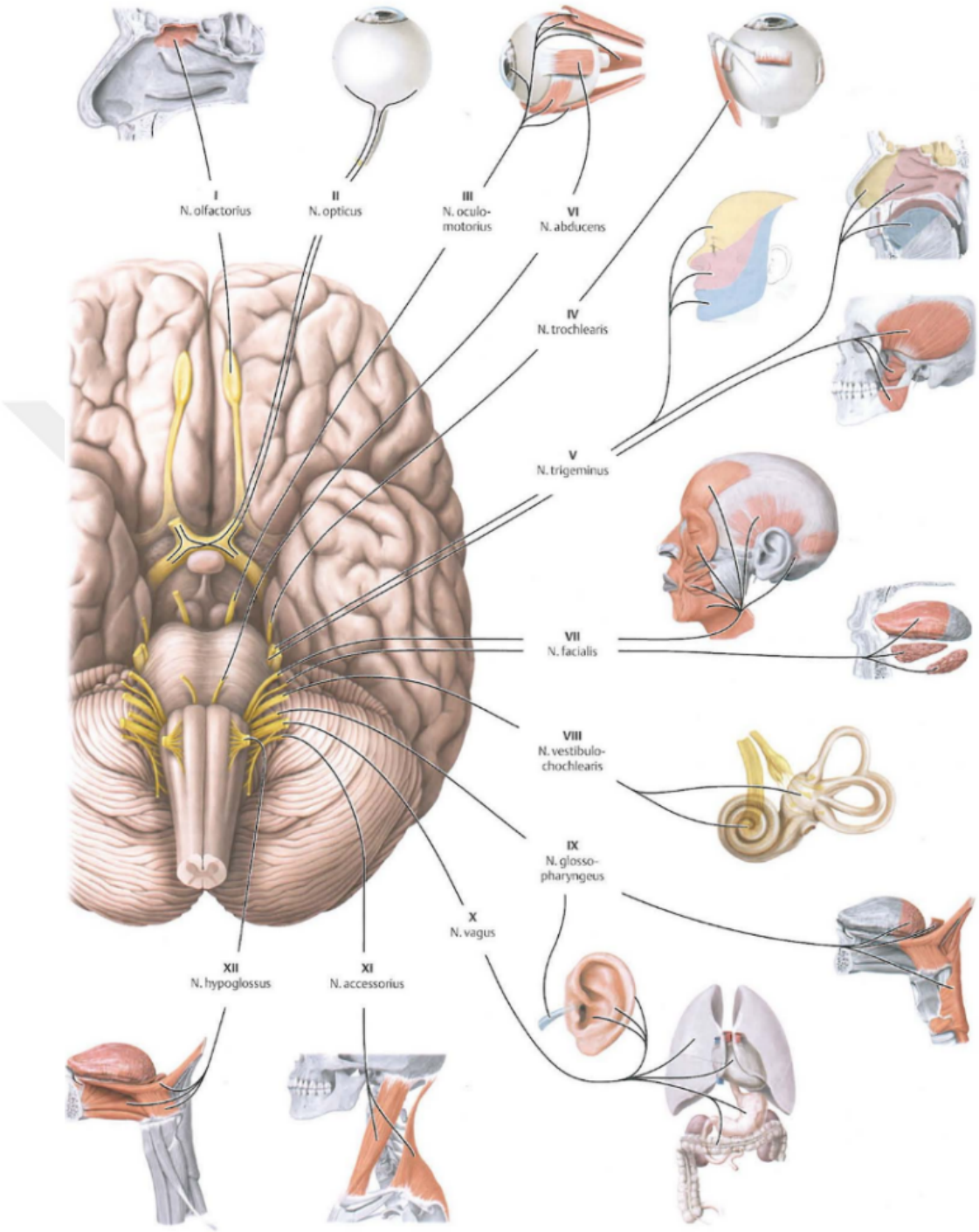
miktarlarda eikosanoid ürettiği görülmektedir. Bu nedenle hayvan çalışmaları, enflamatuar aracıların kaynağı, düzenlenmesi ve işlevi hakkında yararlı bilgiler sağlamaktadır [10].

Transauricular VSS'nin noninvaziv yöntemleri, afferent vagal stimülasyonun etkilerini değerlendirmek için güvenli, daha az maliyetli ve daha erişilebilir bir alternatiftir. Bildirilen sadece birkaç küçük yan etki ile güvenli ve kullanışlıdır. Bununla birlikte, etki mekanizması net değildir. Kulakta non-invaziv tVSS'nin, MSS'de invaziv servikal vagus sinir stimülasyonu'na benzer şekilde nervus vagus projeksiyonlarını aktive ettiği gösterilmiştir. Dış kulağın yüzeyel duyu innervasyonunu sağlayan n. vagus'un ramus auricularis dalını elektriksel olarak uyarma kavramı, servikal VSS ile karşılaştırıldığında nispeten daha yenidir. İşleyişini ve işlevselliğini çevreleyen göreceli bir literatür eksikliği vardır. Bu ihtiyaç doğrultusunda çalışmamızda deneysel kolit modeli oluşturulan sıçanlarda tVSS ile nervus vagus'un uyarılması sonucu kolon dokusu'nda meydana gelen makroskopik değişimler ve ESS üzerindeki presinaptik-postinaptik proteinlerin (nöroligin-I, nöroksin-IIα) immunreaktivite yoğunluklarındaki değişikleri gözlemlemeyi ve değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

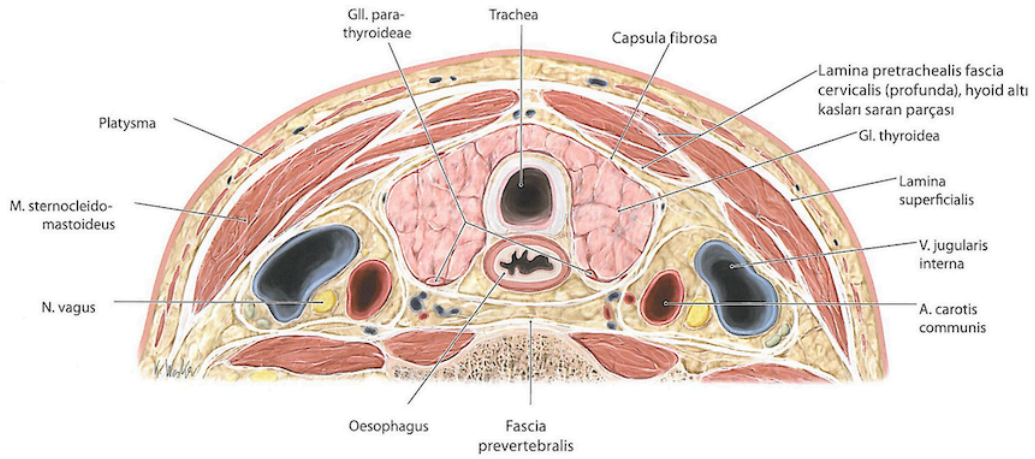
2.1. Nervus Vagus Anatomisi

Beyin ve beyin sapından çıkan 12 çift kranial sinir vardır. Bu sinirlerden biri olan nervus vagus, X. kraniyal sinirdir (Şekil 1). Nervus vagus, 8-10 kök olarak medulla oblongata da yer alan sulcus retroolivaris'ten IX. ve XI. kraniyal sinirler ile birlikte çıkar (Şekil 3.a). Fossa crani posterior'da seyreder ve foramen jugulare' den IX. ve XI. kraniyal sinirler ile birlikte kafayı terk eder. Nervus vagus'un biri foramen jugulare içinde, biri de foramen jugulare'nin altında bulunan iki adet duyu ganglionu vardır: Ganglion superius (ganglion jugulare), periferden genel somatik afferent duyuyu alır, beyin sapında nuclei spinalis nervi trigemini'ye taşır; Ganglion inferius (ganglion nodosum), periferden aldığı genel visseral afferent duyuyu beyin sapında NTS'ye taşır [11][12].



Şekil 1. Kraniyal sinirler [13].

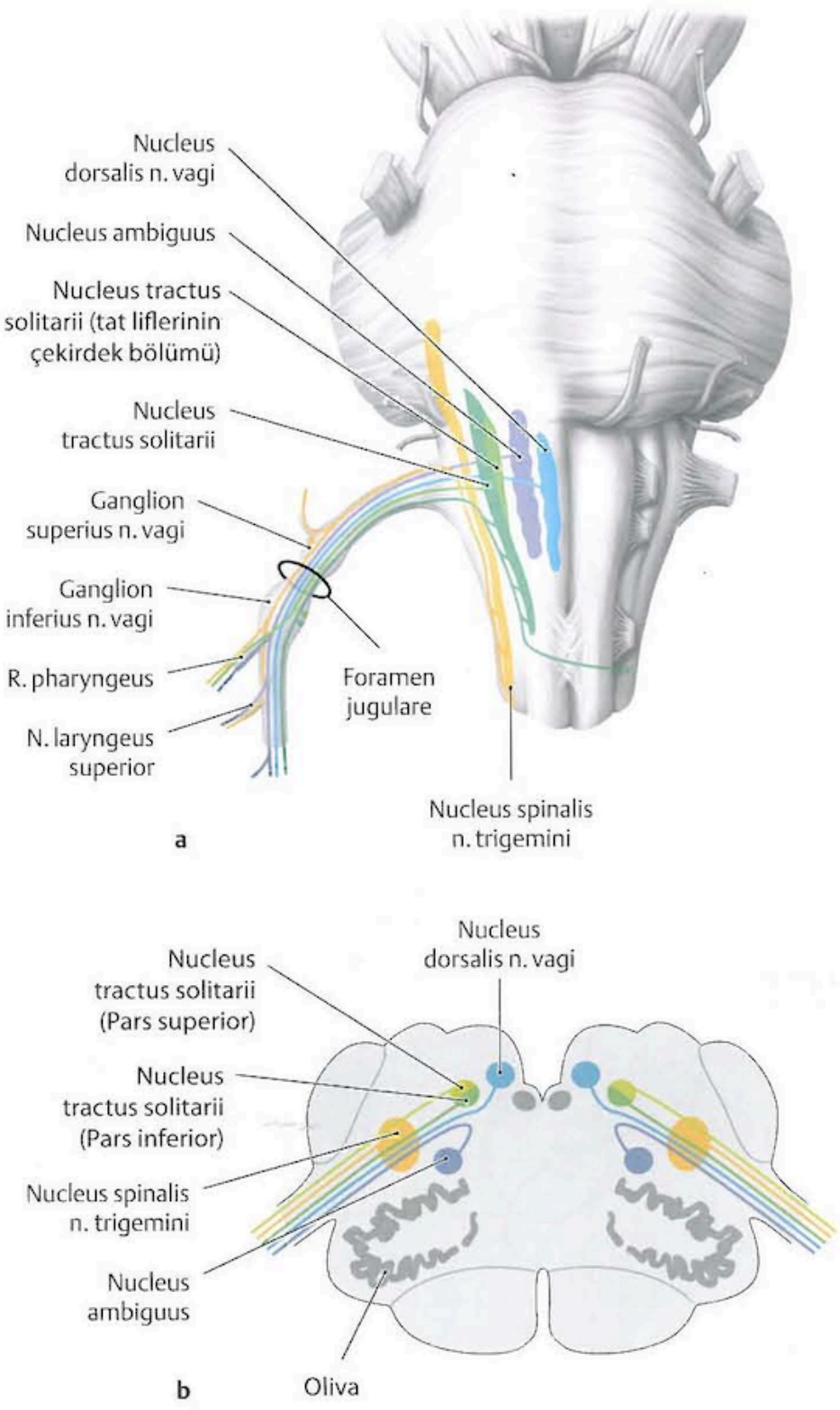
Boyun bölgesinde cartilago thyroidea hizasının üstünde, v. jugularis interna ile a. carotis interna arasında, cartilago thyroidea hizasının altında ise v. jugularis interna ile a. carotis communis arasında vagina carotica ile sarılı şekilde vertikal olarak aşağıya doğru uzanır [14] (Şekil 2). Sağ n. vagus, thorax bölgesinde plexus pulmonalis'i oluştururur. Daha sonra oesophageus'un arkasında ilerleyip plexus oesophagealis'i oluşturarak, diaphragma'daki hiatus oesophageus'tan geçip abdomen'e girer. Truncus vagalis posterior adını alarak mide arka yüzü, duodenum, böbrekler, karaciğer, ince bağırsak ve colon transversum'un 2/3 proksimal parçası da dahil olmak üzere kalın bağırsakları innerve eder. Sol n. vagus thorax'ta plexus pulmonalis'i oluşturur. Daha sonra oesophagus'un önünde ilerleyip plexus oesophagealis'i oluşturarak, diaphragma'daki hiatus oesophageus'tan geçip abdomen'e girer. Turuncus vagalis anterior adını alarak mide ön yüzü, duodenum üst bölümü, karaciğer ve pancreas'a dallar verir [11].



Şekil 2. Boyun bölgesinden T1 seviyesinden geçen transvers kesitte vagina carotica içerisinde n. vagus'un görünümü [13].

Motor, duyusal ve parasimpatik karakterli olan n. vagus' un beyin sapında yer alan 3 adet çekirdeği vardır. Bunlardan birincisi nucleus ambiguus (motor çekirdek), ikincisi nucleus dorsalis nervi vagi (parasimpatik çekirdek) ve üçüncüsü NTS (duyu çekirdeği)'dir (Şekil 3.b). Motor çekirdek (nucleus ambiguus), bulbus'ta formatio reticularis'in derininde bulunur ve her iki hemisferden tractus

corticonuclearis aracılığı ile lifler alır [11]. Nucleus ambiguus'un orta bölümünden başlayan efferent lifler plexus pharyngeus'a katılır. Musculus stylopharyengeus (n. glossopharyngeus tarafından innerve olur) ve m. tensor veli palatini (n. trigeminus tarafından innerve olur) hariç tüm pharynx, larynx ve yumuşak damak kaslarını innerve eder [14]. Parasimpatik çekirdek (nucleus dorsalis nervi vagi), ventriculus quartus'un tabanın alt bölümünde nucleus nervi hypoglossi'nin arka dış kısmında bulunur ve hypothalamus'tan afferent lifler alır [11]. Parasimpatik çekirdekten başlayan efferent lifler, cavitas thoracis'te yer alan tüm organlar ile cavitas abdominalis'te yer alan colon transversum 1/3 distal parçası, colon descendens, colon sigmoideum, rectum ve anüs dışındaki tüm organların parasimpatik innervasyonunu sağlar. Duyusal çekirdek (NTS), bulbus'ta yer alır. NTS; n. facialis (VII. kraniyal sinir), n. glossopharyngeus (IX. kraniyal sinir) ve n. vagus (X. kraniyal sinir)'un ortak duyu çekirdeğidir [14]. Tat duyusu (dil kökü, epiglottis çevresi ve damak mukozasından) nervus vagus'un ganglion inferius'una ait periferik uzantılar ile taşınır ve bunların santral uzantıları NTS'de sinaps yapar [11]. Pharynx, larynx ve yumuşak damaktan alınan visseral afferent duyular NTS'ye taşınır. Concha auriculae'dan ve dura mater cranialis (fossa crani posterior)'den alınan somatik afferent lifler nucleus spinalis nervi trigemini'ye taşınır [14].



Şekil 3. a. Nervus vagus'un medulla oblongata'dan çıkışı, **b.** Nervus vagus'un çekirdekleri [15].

Beyin ve beyin sapından çıkan kraniyal sinirler çoğunlukla baş ve boyun bölgesindeki yapılara gider. Bununla birlikte n. vagus, thorax bölgesi ve abdominal bölgedeki organların çoğunun parasimpatik, visseral efferent ve visseral afferent innervasyonunu sağlar [14]. En uzun kraniyal sinir olan nervus vagus, otonomik, kardiyovasküler, solunum, gastrointestinal, immün ve endokrin sistemlerle ilgilidir ve "büyük gezgin koruyucu" olarak adlandırılır [16].

Nervus vagus, seyri boyunca baş, boyun, göğüs ve karın olmak üzere dört bölümde incelenir. Kafa içinde yer alan kısmı, bu bölgede ramus meningeus (dura mater cranialis'i innerve eder) ve ramus auricularis (concha auriculae, kulak kepçesinin arka yüzü, dış kulak yolunun arka bölümü ve kulak zarının buraya komşu olan bölümünden duyu alır) olmak üzere iki dal verir. Boyun bölümü; foramen jugulare'den çıktıktan sonra vagina carotica içinde boyun köküne kadar devam eder. Ramus pharyngeus (plexus pharyngeus'a motor dal taşır), rami cardiaci cervicales superiores, rami cardiaci cervicales inferiores (parasimpatik lifler taşır), nervus laryngeus superior (motor ve duyu lifler taşır) ve sağ nervus laryngeus recurrens bu bölümde verdiği dallardır. Göğüs bölümü; apertura thoracis superior'dan geçip hiatus oesophageus'a kadar devam eder. Burada sol nervus laryngeus recurrens, rami cardiaci thoracici, rami bronchiales ve plexus oesophageus dallarını verir. Karın bölümü hiatus oesophageus'tan geçtikten sonraki kısmıdır. Rami oesophageales, rami gastrici anteriores, rami gastrici posteriores, rami hepatici, rami coeliaci, rami pylorici, rami renales ve rami intestinales (flexura coli sinistra' ya kadar) bu bölümde verdiği dallardır [12].

Nervus vagus, iç organlar için geniş bir afferent ve efferent innervasyon ağı sağlar ve daha yüksek MSS devreleri ile beyin sapının otonom kontrol devresi arasında bir arayüz olarak kilit bir rol oynar. Nervus vagus anatomisi ve uzantıları hakkında çoğu bilgi, sıçanlarda nervus vagus'un seyrinin izlenmesi yoluyla keşfedilmiştir ve genellikle insanlara benzer olduğu varsayılmaktadır. Nervus vagus'un innervasyonu tüm detayları ile tam olarak bilinmemektedir [16]. Nervus vagus, beyin ve bağırsak arasında bağlantı sağlamaktadır. Afferentleri aracılığıyla hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseni aktive eden, efferentleri aracılığıyla kolinerjik antiinflamatuar yolu aktive eden karışık bir sinirdir [17].

Nervus vagus'un afferent lifleri, MSS' nin diğer bölgelerine bağlantı yapmadan önce, beyin sapı seviyesinde NTS'de sinaps yapar. Vagus Sinir Stimülasyonu'nun MSS'yi nasıl modüle ettiği konusunda bilgiler hala yeterli değildir. Beyin sapı, MSS ve periferik organlar arasındaki sinyallerin entegre edilmesinde ve geçişinde kritik bir rol oynamaktadır [18].

2.2. Nervus Vagus Stimülasyonu

Nervus vagus stimülasyonu, çevredeki belirli sensörleri ve efektörleri MSS'ye bağlar. Nervus vagus'un dolaylı bağlantıları, daha yüksek beyin bölgeleri olan hypothalamus'a ve beyin korteksine olan projeksiyonlar içerir. Böylece n. vagus'un subkortikal ve kortikal beyin alanlarına modülatif erişimini sağlanır. Bu nedenle, n.vagus'ta üretilen sinyaller, çok çeşitli temel beyin işlevlerinin etkilenmesi ve dolayısıyla korunması açısından tüm organizmayı etkileme potansiyeline sahiptir [2].

Genel olarak, OSS'deki dengesizlik, parasimpatik aktivitenin azlığı ile ilişkili olup, nispeten daha yüksek simpatik aktiviteyi içermektedir [19]. Otonom Sinir Sistemi'nin beyin aktivitesini modüle etme üzerindeki etkisini anlamak için 1930'lar ve 1940'larda elektriksel VSS çalışmaları yapılmıştır. Kediler ve maymunlar üzerinde yapılan araştırmalar, VSS'nin beyin elektriksel aktivitesini etkilediğini göstermiştir. Daha sonraki çalışmalarda, köpeklerde deneysel olarak indüklenen nöbetler üzerinde VSS'nin antikonvülsan etkilerinin olduğu belirlenmiştir [5].

Nervus vagus stimülasyonunun gelişimi 19. yüzyılda başlamıştır. 1990'larda, birkaç erken klinik çalışmanın başarısı ile VSS, dirençli epilepsi tedavisi için ve daha sonra dirençli depresyon için onay almıştır. Amerikalı nörolog James Corning, 19. yüzyılın sonlarında epilepsiyi tedavi etmek için VSS'yi ilk kullanan kişidir. İyi sonuçlar alamasa da VSS fikrini dünyaya ilk tanıtan kişi olmuştur [20]. Vagus Sinir Sistemi, 1988 yılında Penry ve Dean tarafından tedaviye dirençli epilepsi tedavisi için uygulanmıştır. Tıbbi olarak inatçı kompleks parsiyel nöbetleri olan ilk tedavi edilen hastaların sonuçları, Amerikan Epilepsi Derneği'nin 1989'daki yıllık toplantısında rapor edilmiştir. Bu ön sonuçlar, ciddi

komplikasyonlar olmaksızın nöbet sıklığında ve nöbetlerin süresi ile şiddetinde bir azalma olduğunu göstermiştir [21]. Murphy ve arkadaşları tarafından yapılan, bir çalışmada 12 yaşından küçük ve daha büyük çocukların sonuçları geriye dönük olarak icelenmiş ve bu iki yaş grubu arasında nöbet kontrolünde hiçbir fark bulunmamıştır. Daha genç ve daha yaşlı gruplar için sırasıyla 50 hastanın 23' ünde ve 34 hastanın 16'sında nöbetlerde %50'den fazla azalma olduğu tespit edilmiştir [21].

Nörogörüntüleme ve diğer nörobiyolojik çalışmalar, NTS'nin aktivasyonunun VSS tedavisinde anahtar bir rol oynadığını ileri sürmüştür. Nervus vagus'un afferent liflerinin hedefi olan NTS'nin beyindeki yaygın bağlantıları, VSS'nin epilepsi ve depresyondaki etkinliğini açıklamaktadır. Beynin noradrenerjik çekirdeği olan locus coeruleus'un, VSS'nin MSS'deki etkilerinin çoğuna aracılık ettiğine inanılmaktadır. Locus coeruleus lezyonlarının, VSS'nin antiepileptik ve antidepresan etkilerinin ortaya çıkmasını engellediği gözlenmiştir [22]. Noradrenalin ve serotonin, duyguların ve duygusal davranışın modülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu rol göz önüne alındığında, NTS'nin locus coeruleus ve nucleus raphe dorsalis ile olan bağlantıları, VSS'nin terapötik etkinliğini aktive etmektedir. Sıçan'da nucleus raphe dorsalis ve locus coeruleus'taki nöronların uyarılabilirliliklerinin, VSS ile uzun süreli tedaviden sonra arttığı gösterilmiştir. Oysaki, locus coeruleus'ta norepinefrin'in tükenmesi VSS'nin nöbet baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmıştır [23][22]. Vagus Sinir Stimülasyonu ile tedavi edilen hastaların beyin omurilik sıvısında serotonin metabolitlerinin konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur [24]. Vagus Sinir Stimülasyonu ile sıçan prefrontal korteksindeki noradrenelin konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur [25]. Bu gözlemlere dayanarak, VSS'nin doğrudan beyin sapı yapılarını uyararak ve dolaylı olarak duygu durum modülasyonunda rol oynayan limbik ve kortikal bölgelerdeki nöronların aktivitesini düzenlediği fikri desteklenmektedir.

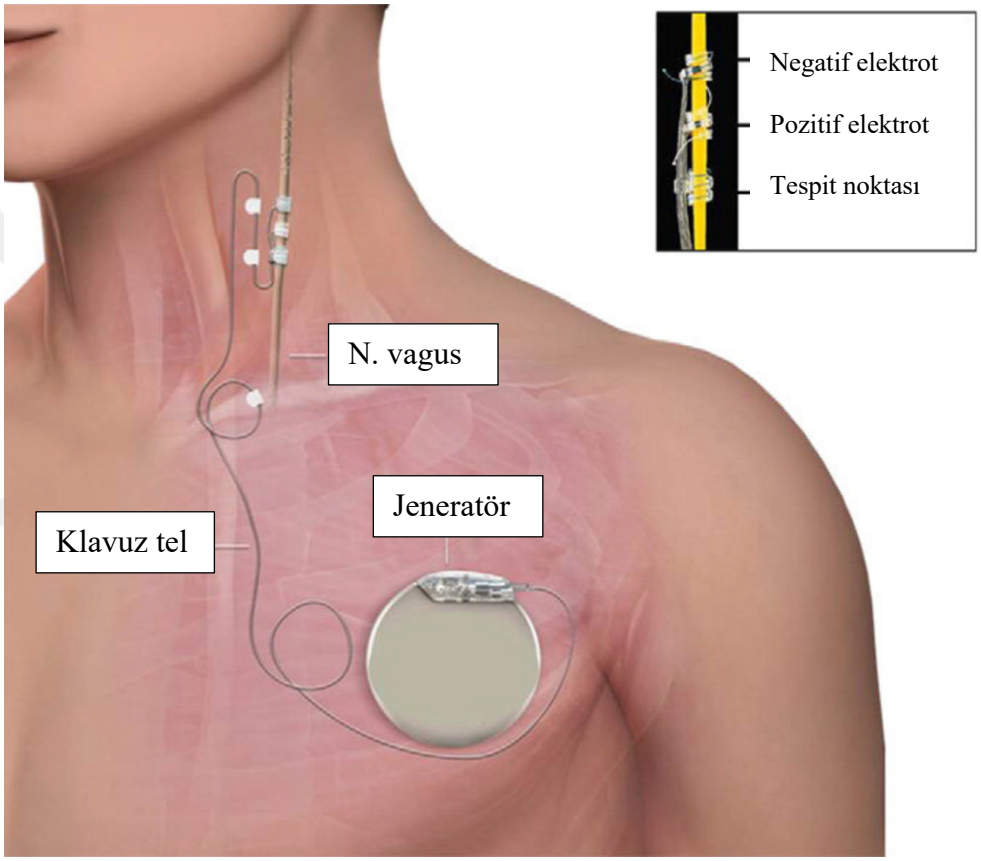
Son yıllarda yapılan fonksiyonel MR çalışmalarında, dış kulağın elektriksel olarak uyarılması ile n. vagus'un merkezi projeksiyonlarına erişimi gösterilmiştir [26]. Fonksiyonel MR çalışmalarının bulguları, noninvaziv VSS ile n.vagus'un

somatik afferent dalının uyarılması sonucunda n. vagus'un, hem visseral hem de somatik projeksiyonlarını aktive ettiği gösterilmiştir [6].

Vagus Sinir Stimülasyonu tedavisi 1994 yılında Avrupa'da ve 1997 yılında Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da dirençli epilepsi tedavisi için onay almıştır. Vagus Sinir Stimülasyonu 'nun epilepsi için güvenli ve etkili olduğunu destekleyen kanıtlar 1999 yılında Amerikan Nöroloji Akademisi Terapötik ve Teknoloji Değerlendirme Alt Komitesi tarafından sınıf I olarak sınıflandırılmıştır [21]. Özel klinik deneyler sonucunda, 1997'de dirençli epilepsi tedavisi için endike olan implante edilmiş bir VSS cihazı ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır [27]. Aynı cihaza daha sonra 2005 yılında kronik tedaviye dirençli depresyonun tedavisi için FDA tarafından onay verilmiştir. 2021 yılında da transkutanöz VSS için kullanılan Gamma Core cihazı'na, epizodik küme baş ağrıları ve migren tedavisi için FDA tarafından onay verilmiştir [28]. Küçük açık uçlu çalışmalar hızlı döngüsel bipolar bozukluk tedavisi için VSS kullanımını tanımlamış ancak dirençli anksiyete bozuklukları, alzheimer hastalığı, obezite gibi hastalıklar için FDA tarafından onay verilmemiştir [29] [1]. Transkutanöz VSS, FDA onayı almamış olsa da, migren ve küme baş ağrıları için akut ve önleyici tedavide uygulama umut verici sonuçlarla değerlendirilmiştir [28].

Vagus Sinir Stimülasyonu'nun, hem invaziv (cerrahi olarak implante edilmiş) hem de non-invazif (transkutanöz) teknikleri mevcuttur [30]. İnvazif yöntemlerden birisi olan servikal VSS, göğüs duvarına programlanabilir bir impuls üreteci cihazın cerrahi implantasyonunu ve elektrotların sol (tipik olarak) servikal n. vagus etrafına yerleştirilmesini içerir [31]. Jeneratör, sol üst göğüs veya sol koltuk altı sınırına deri altından implante edilir. Elektrot kurşun teli, sol boyun bölgesinde ikinci bir kesi ile sol orta servikal n. vagus'a bağlanır. Kılavuz teli deri altı bir tünelden geçirilir ve impuls üretecine bağlanır (Şekil 4). El bilgisayarı, impuls üreteci stimülasyon parametrelerini, cihazın üzerindeki cilt üzerine yerleştirilmiş bir programlama çubuğu aracılığıyla programlar. Olası cerrahi komplikasyonlar arasında, hastaların yaklaşık %1'inde meydana gelen yara enfeksiyonu ve ses kısıklığı (geçici veya kalıcı sol vokal kord paralizisine bağlı) yer alır. Sol servikal n. vagus'tan gelen uyarı en sık olarak ses değişikliği, öksürük,

dispne, disfaji ve boyun ağrısı veya paresteziye neden olur. Sol servikal VSS'nin bradikardi veya asistoli gibi potansiyel kardiyak etkilerini en aza indirdiğine inanılır. Stimülasyon parametreleri, yan etkileri daha tolere edilebilir hale getirmek için ayarlanabilir, ancak tolerans genellikle kronik stimülasyonla ortaya çıkmaktadır [1].



Şekil 4. Servikal VSS yöntemi [32].

Sağ servikal VSS; invazif yöntemlerden birisidir, programlanabilir cihaz sağ göğüs duvarına implante edilir. Tercihen vagal efferent lifleri (kalp fonksiyonunu etkilemeye yönelik) aktive etmek için tasarlanmış bir manşet kullanılarak nervus vagus'un sağdaki servikal bölümüne bağlanır. Stimülatör, kalp atış hızını algılar ve önceden belirlenmiş bir bradikardi eşiğinde kapanır. Klinik öncesi çalışmalar ve bir faz II insan çalışması, kronik sağ servikal VSS'nin kalp yetmezliği tedavisinde güvenli ve etkili olduğunu ileri sürmektedir [33][34]. Sol nervus vagus daha çok atriyoventriküler düğümü (AV) ve sağ nervus vagus

sinoatriyal düğümü (SA) innerve etmektedir [35] [36]. Geleneksel olarak, sağ VSS'nin daha yüksek derecede bradikardi ile sonuçlandığını gösteren hayvan çalışmaları sırasındaki gözlemlerden kaynaklanan güvenlik endişeleri nedeniyle sol n.vagus çoğunlukla tercih edilen stimülasyon bölgesi olarak tercih edilmiştir [20].

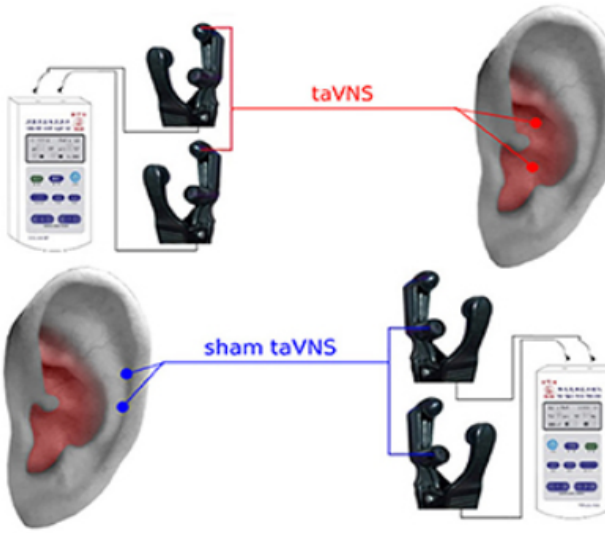
Abdominal VSS; invazif yöntemlerden bir diğeridir. Nervus vagus'un subdiyafragmatik bölgede truncus vagalis anterior ve posterior dalları oesophagus'tan disseke edilerek elektrot dizisi rami hepatici ve rami coeliaci dallarına implante edilir ve stabilizasyonu sağlamak için oesophagus'a dikilir. Perkütan konektör, lumbal vertebral bölgenin bağ dokusuna tutturulur. İmplantasyon süresi boyunca in vivo elektrikle uyarılarak nöral tepkileri değerlendirilir [37].

İnvaziv VSS'lerin birçok potansiyel riskleri bulunmaktadır. Yaklaşık 1000 implantasyondan 1'inde meydana gelen n. vagus'un kardiyak dallarının doğrudan uyarılmasının bir sonucu olarak intraoperatif lead testi sırasında ortaya çıkan bradikardi ve asistoli raporları vardır [31]. Cerrahi müdahaleden kaynaklanan potansiyel yan etkiler arasında cihazın yerleştirilmesi sırasında meydana gelen bradiaritmiler, peritracheal hematom gelişimi ve vokal kord disfonksiyonu ve dispne dahil olmak üzere diğer solunum komplikasyonları yer alır [38]. Postoperatif dönemde, periinsizyonel hematom, dispne ve yara bölgesi çevresinde lokal enfeksiyonlar görülebilmektedir [39]. Hastaların üçte ikisi geçici disfoniden (ses kısıklığı) şikayetçidir. Bazı hastalar parestezi ve ağrı yaşayabilmektedir [40] [41] [42]. Vagus Sinir Stimülasyonu ayrıca uyku sırasında solunum düzeninde değişikliklere neden olarak obstrüktif uyku apnesi ve hipopne sayısında artışa neden olabilir [43][39] ve nadiren de olsa atrioventriküler blok nedeniyle geç başlangıçlı bradiaritmiler ve şiddetli asistoliye neden olabilir [44]. Vagus Sinir Stimülasyonu ile ilişkili yaygın yan etkiler, öncelikle stimülatörün darbeleri ilettiği dönemlerle sınırlı olduğu belirlenmiştir. Bunlar ses kısıklığı, boğaz ağrısı ve öksürüktür. Bu yan etkilere ek olarak, birkaç semptomun da VSS ile ilgili olduğu görülmüştür. Bunlar karın ağrısı, mide bulantısı, nefes darlığı ve göğüs ağrısıdır [21].

Vagus Sinir Stimülasyonu'nun noninvaziv formu transkutanöz servikal vagus sinir stimülasyonudur. En yaygın olarak nervus vagus'un auricular dalını ve boyundaki n. vagus'un servikal dalını hedef alan, belirli konumlarda yüzey elektrotları aracılığıyla elektrik akımlarının uygulanmasını içeren, invaziv olmayan bir tekniktir (Şekil 5). Bu teknik, hem kulakta hem de boyunda n. vagus'u hedefleyerek kulak çınlaması, migren ve ağrı dahil olmak üzere diğer bazı rahatsızlıklar için de araştırılmıştır [38].

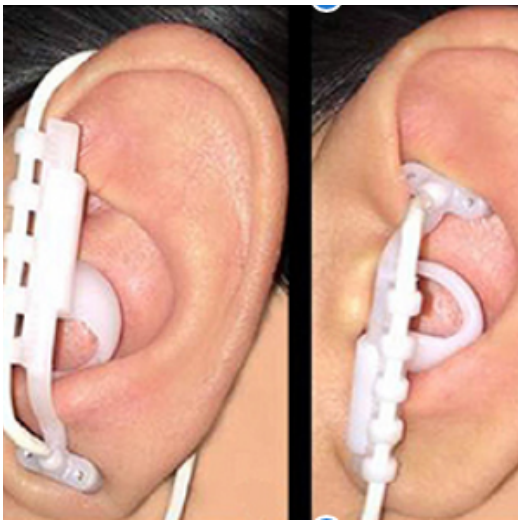


Şekil 5. Gamma Core cihazı kullanılarak boyun bölgesinde transkutanöz servikal VSS [38].



Şekil 6. Concha aracılığı ile transauricular n. vagus sinir stimülasyonu [38].

Elektrot ve nörostimülatörün cerrahi implantasyonunu gerektirmeyen yeni invaziv olmayan VSS tekniklerinin geliştirilmesi ilgi çekicidir. Bu, n. vagus tarafından innerve edilen concha auriculae'nın transkutanöz stimülasyonunu içerir [26], kulağın bu anatomik kısmının uyarılması ilgi çekicidir. Cerbomed NEMOS cihazı (Erlangen, Almanya), n. vagus'un ramus auricularis'ini uyaran özel bir kulak içi elektrot (kulaklık gibi) şeklinde harici bir cihazdır (Şekil 7) [45]. Bu cihaz 2010 yılında epilepsi için Avrupa izni almıştır ve şu anda Almanya, Avusturya, İsviçre ve İtalya'da kullanımı mevcuttur. Benzer şekilde, Electro Core LLC Gamma Core cihazı (Basking Ridge, NJ, ABD), birincil baş ağrısını tedavi etmek için özel elektrik sinyallerini kullanan, invaziv olmayan bir n. vagus uyarıcısıdır. Bu cihaz IBH tedavisi için kullanılabilir [46]. Lerman ve arkadaşları tarafından, Electro Core cihazı ile noninvaziv tVSS'nin sağlıklı kontrol deneklerinin kanındaki sitokin ve kemokin düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir [47]. Bu nedenle, Gamma Core ve Nemos cihazları, IBH ve Romatoid Artrit gibi iltihaplı durumların tedavisi için potansiyel ilgi konusudur [48]. Bu noninvaziv cihazlarla ilgili önemli ve ciddi bir yan etki bildirilmemiştir [49].



Şekil 7. NEMOS cihazı kullanılarak kulak memesi ve concha yolu ile tVSS [38].

Vagus Sinir Stimülasyonu'nun başarısı, ilgi alanlarını elektriksel olarak uyarmak yerine uyarmanın dolaylı olması olabilir. Nervus vagus kendisi iletici bir işleve sahiptir. Nervus vagus "doğal olmayan" elektriksel blok darbelerini "doğal"

aksiyon potansiyellerine çevirir. Sonuç olarak, ilgi alanları hasar görmeden işlevsel olarak modüle edilir ve uyarı fibröz doku tarafından lokal olarak engellenmez [21].

Hem hayvan hem de insan çalışmaları, nervus vagus'un MSS'deki hedef bölgelerine iki taraflı olarak çıktığını ve bu sinirler tarafından taşınan visseral ve somatik bilgilerin geniş bir merkezi entegrasyonu olduğunu göstermektedir. Şimdiye kadar sunulan veriler, n. vagus'un invaziv stimülasyonunun tersine, kulak stimülasyonunda bir tarafı veya diğerini tercih etmenin bir anlamı olmadığını göstermektedir [36] [6].

Yakın zamanda, düşük frekanslı stimülasyon (5 Hz) ile kemirgenlerde gerçekleştirilen VSS'nin fMRI görüntüleri üzerinde bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, beynin büyük bölümlerinde ve özellikle n. vagus'un afferent liflerinin ilk merkezi olan NTS'de yüksek derecede anlamlı VSS ile ilgili deaktivasyonlar bulunmuştur [50]. Sonuç olarak, n. vagus'un hem afferent hem de efferent liflerinin VSS tarafından etkilendiği gözlenmiştir [51].

Vagus Sinir Stimülasyonu'nun birçok alanda yararlı bir tedavi olduğu kanıtlanmıştır, Yetişkinlerde epilepsi ve depresyonu tedavi etmek için etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bazı otoimmün veya inflamatuar hastalıklarda inflamasyonu bastırmaya yardımcı olmak için kullanılabileceğini gösteren birikmiş kanıtlar vardır ve bu da VSS'yi daha geniş bir hasta yelpazesi için faydalı hale getirmektedir. Ön çalışmalar, VSS'nin inme, otoimmün hastalıklar, kalp ve akciğer yetmezliği, obezite ve ağrı yönetimi için kullanılması için umut vaat etmektedir. Ancak, VSS'nin bu hastalıkların tedavisindeki potansiyel rolünü açıklayabilmek ve tam olarak aydınlatabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [18].

Nervus vagus'un anatomisi ve fizyolojisine ilişkin geniş bilgiye rağmen, VSS tedavisinin etkinliğinden sorumlu mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Hayvan modelleri üzerindeki etkilerini inceleyen bazı araştırmalar olmasına rağmen, kulak nöromodülasyonu, nörofizyolojik, nörotrofik, serebrovasküler, kardiyovasküler ve metabolik fonksiyonlarla ilişkili fizyolojik biyobelirteçler üzerindeki potansiyel olumlu etkileri konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [6].

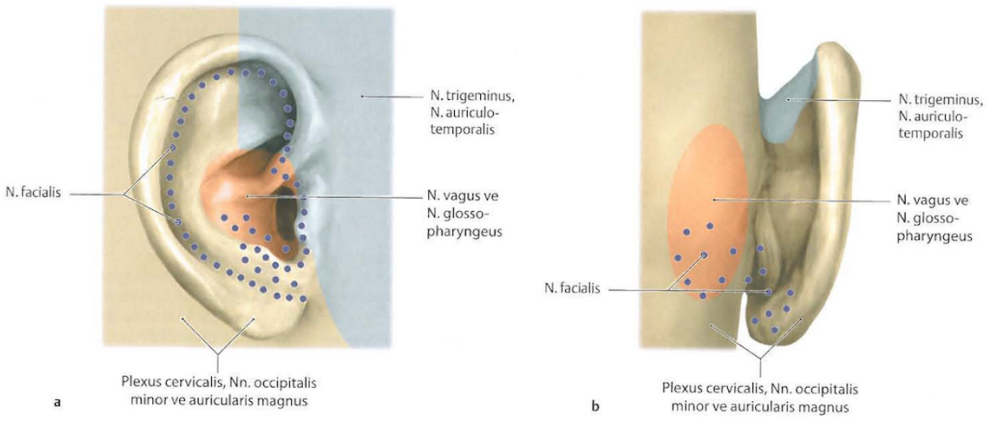
2.3. Transauricular Vagal Sinir Stimülasyonu

Nervus vagus'un r. auricularis dalı (aVS)'nın elektriksel stimülasyonu, terapide uygulamalarla birlikte biyoelektronik tıp alanında gelişen bir teknolojidir. Nervus vagus'un afferent dalının modülasyonu, beyin ve vücut arasındaki bilgi aktarımı ile ilişkili çok sayıda fizyolojik süreci ve bedensel durumu etkiler. Bunlar, kronik ağrıya sebep olan hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve metabolik hastalıklardan inflamatuar ve kardiyovasküler hastalıklara kadar çeşitli hastalıkları hafifletici etkiler ve sürdürülebilir terapötik uygulamaları içerir [2].

Biyoelektronik tıp, farmasötik ajanların yan etkileri olmadan ve uyum problemlerinden kaçınarak organ fonksiyonunu ve sağlığını geri kazanmak için sinir sisteminin elektriksel aktivitesini modüle eden cihazları kullanan yeni bir terapötik yaklaşımdır [52]

İnsan vücudunda kulak, nervus vagus'un yüzeyel dağılımının bulunduğu tek yerdir [26]. Nervus vagus'un r. auricularis dalı, Arnold veya Alderman siniri olarak da bilinir [53]. Nervus glossopharyngeus'un ganglion inferius'undan (petröz ganglion) ve nervus vagus'un ganglion jugulere'sinden çıkan liflerin birleşmesi ile oluşur. Ramus auricularis'in ilk dalı, fossa cranii posterior'da dura mater cranialis'in duyusunu alırken, ikinci dalı meatus acusticus externus' un arka duvarının ve buraya bitişik membrana tympanica' nın duyusunu alır. İkinci dal, foramen stylomastoideum' dan çıktıktan sonra nervus facialis'in ramus auricularis posterior'una bağlanan bir alt dal vermektedir [30].

İnsan dış kulağı, nervus auriculotemporalis, nervus auricularis magnus ve nervus vagus'un ramus auricularis dalı olmak üzere üç duyu siniri tarafından innerve olur. Nervus vagus'un ramus auricularis dalı 'nın concha auriculae boşluğunu önemli ölçüde innerve ettiği ortaya konmuştur [54] (Şekil 8). Meatus acusticus externus, cymba conchae ve cavum conchae esas olarak aVS tarafından innerve olur. Transauricular VSS yöntemi, aVS'nin kutanöz alıcı alanını hedefler. Sol cymba conchae'ya elektriksel bir stimulus uygulamak (duyusal algılama eşiğinin üzerinde, ancak ağrı eşiğinin altında bir stimulus yoğunluğu kullanarak), sol servikal VSS'den farklı olmayan bir beyin aktivasyon paterni ile sonuçlanır [55] [56] [57].



Şekil 8. Kulağın duyusal innervasyonu [15].

Kulakta non-invaziv tVSS'nin, MSS'de invaziv servikal VSS'ye benzer şekilde n. vagus projeksiyonlarını aktive ettiği gösterilmiştir [58]. Vagus Sinir Stimülasyonu'nun noninvaziv yöntemleri, afferent vagal stimülasyonun etkilerini değerlendirmek için güvenli, daha az maliyetli ve daha erişilebilir bir alternatiftir. Nervus vagus'a noninvaziv erişimin ek bir yararı, patolojik olmayan popülasyonlarda temel araştırmalara izin vermesidir [28].

Beyin sapı, beyindeki ikinci ve üçüncü sıra nöronlara kapsamlı projeksiyonlar yoluyla daha yüksek beyin bölgelerine tVSS girdisine aracılık eder [6]. Transauricular VSS periferik, farmakolojik olmayan ve minimal invaziv bir nöromodülasyon tekniğidir, Merkezi Sinir Sistemi'ndeki sinyal işlemeyi değiştirir, refleks devrelerini aktive eder, beyin plastisitesini farklı terapötik amaçlar için kullanır ve böylece beynin son derece farklı alanlarını etkiler [2].

Güncel çalışmalar, kulak akupunkturunun antinosiseptif etkilerinin bile aVS'nin uyarılmasıyla gerçekleştiğini göstermektedir [59]. Doğu tıbbı kulak akupunkturunun analjezik etkilerinden binlerce yıldır yararlanmış olsa da [60] [61] [59], kulak kepçesini elektriksel olarak uyarma kavramı daha yenidir [62]. Kulaktan tVSS'nin uygulanabilirliği ilk olarak, kafa derisinden n.vagus somatosensoriyel uyarılmış potansiyellerinin kayıtları kullanılarak gösterilmiştir [63]. O zamandan beri epilepsi dahil depresyon [64], migren [65] ve kulak çınlaması gibi çeşitli klinik bozuklukların yönetiminde etkili bir terapötik strateji olarak önerilmiştir [66] [67].

Simpatik ve parasimpatik dallardan oluşan OSS, kardiyovasküler, solunum ve immünolojik fonksiyonların sistemik parametrelerini homeostatik sınırlar içinde yönettiğinden ve diğer yandan tVSS parasimpatik kulak kepçesini modüle ettiğinden, tVSS'nin vücut üzerindeki etkilerinin sistemik olması beklenir [2]. AVS'nin stimülasyonu, zararlı simpato-dominant süreçleri inhibe ederek vücudun parasimpatik aktivitesini düzenler, azalan simpatik aktivite nedeniyle periferik perfüzyonu iyileştirir ve aşırı inflamasyonu azaltır. Tartışmalı olarak tVSS, OSS ile bağlantılı çok sayıda hastalığı tedavi etmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Transauricular VSS nihayetinde kronik hastalıkta opioid kullanımını azaltmak için bir alternatif olarak hizmet edebilir ve potansiyel olarak opioid kriziyle mücadeleye yardımcı olabilir [2]. Giderek artan çalışmalarda, tVSS'nin çeşitli hastalıklar üzerinde terapötik etkilerinin olduğu ve disfonksiyonel hastalarda homeostatik dengeyi yeniden düzenleyebileceği bildirilmektedir [6].

Kulakta ramus auricularis liflerinin doğrudan uyarılması, cerrahi girişim olmaksızın benzer bir etki oluşturabilir. İnsan fizyolojisini etkileyen non-invaziv n. vagus stimülasyonu, invaziv n. vagus stimülasyonuna göre basit ve ucuz bir alternatif olabilir [61]. Transauricular VSS ye bağlı baş ağrısı, stimülasyon bölgesinde ağrı ve cilt tahrişi ayrıca baş dönmesi gibi hafif yan etkilerin ortaya çıkabildiği gözlenmiştir [68].

Transauricular VSS'nin terapötik kullanımlarını araştıran artan araştırmalara rağmen, n. vagus'un ramus auricularis dalı'na ait liflerin kutanöz, intrakraniyal ve merkezi dağılımının kapsamlı bir incelemesi bugüne kadar yapılmamıştır. Ramus auricularis'in kutanöz haritasının daha da rafine edilmesi ve çeşitli stimülasyon parametrelerinin ve stimülasyon bölgelerinin etkilerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır [30]. Kulağın kutanöz sinirsel innervasyonu karmaşıktır, concha ve tragusun iç kısmının n. vagus stimülasyonu için en uygun yerler olduğu kabul edilmektedir (Şekil 9) [30]. Bizim çalışmamızda da tVSS için sıçanlarda kulakta tragus'un iç bölgesi kullanılmıştır.



Şekil 9. Sol; Tragus aracılığı ile tVSS [38], Sağ; NET-1000 kulaklık kullanılarak meatus acusticus externus yolu ile tVSS [38].

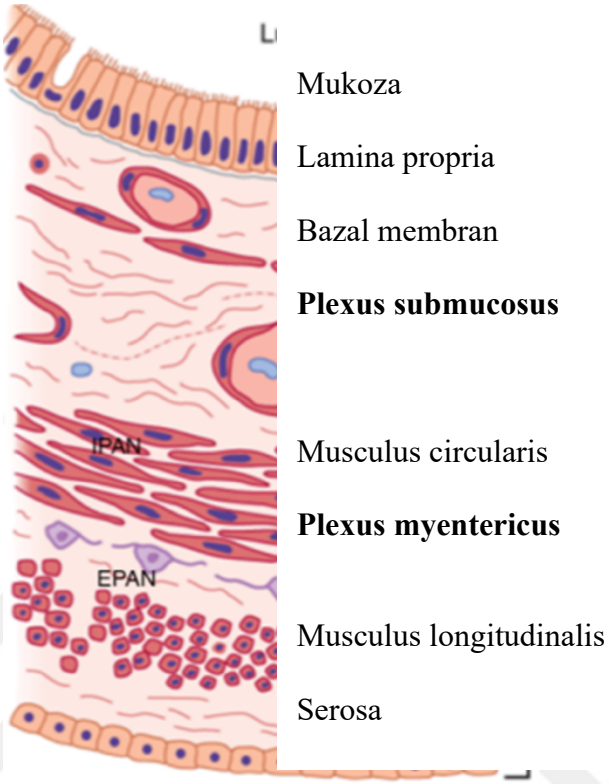
2.4. Enterik Sinir Sistemi

Gastrointestinal sistem, ESS olarak bilinen kendi bağımsız sinir sistemi ile evrimleşmiş tek iç organdır [69]. Enterik Sinir Sistemi, gastrointestinal sistemde "bağırsakların beynini" oluşturan ve MSS'den bağımsız olarak işlev gören nöronların bir araya gelmesiyle oluşmuş bir sistemdir [7]. Enterik Sinir Sistemi'nin başlangıçta periferik sinir sisteminin otonom bileşeninin bir parçası olduğu ve bağırsak duvarındaki nöronların postganglionik parasimpatik nöronlar olduğu düşünülmekteydi. Bağırsak peristaltiğinin intramural sinirleri içeren koordineli refleksler olduğu ve enterik nöronların çoğunun bağırsakların parasimpatik aksonlarıyla temas etmediğinin bulunmasıyla birlikte, bağırsağın "kendi başına bir beyni" olduğu fikri 1900'lerin başında ortaya çıkmıştır. Enterik nöronların fonksiyonel ve kimyasal çeşitliliğinin daha sonra incelenmesi, ESS'nin MSS'ye çok benzediğini ortaya çıkarmıştır [70]. Enterik Sinir Sistemi nöronları, bağırsak duvarına gömülüdür. Enteroendokrin ve gastrointestinal bağışıklık sistemi, periferik sinir sistemi (PSS), MSS ve bağırsak mikrobiyotası ile bağlantılıdır. Enterik Sinir Sistemi, mukozal bariyer arasına ve kas katmanları içine entegre edilmiştir. Sadece gastrointestinal motiliteyi değil, aynı zamanda sekresyon, besin emilimi, bağışıklığın düzenlenmesi ve savunma gibi çok çeşitli gastrointestinal fonksiyonları da düzenlemektedir [71].

Enterik sinir sistemi'nde en az omurilikteki kadar nöron bulunur. Ancak diğer herhangi bir periferik ganglion grubundan, daha fazla nörona sahiptir. Periferik Sinir Sistemi'ne özgü olan ESS, intrinsik primer afferent nöronları (IPAN'lar) ve refleksleri başlatabilen internöronları olan mikro devrelerde düzenlenir. Enterik nöronların fenotipik çeşitliliği çok geniştir ve MSS'de bulunan hemen hemen her nörotransmitter sınıfı ESS'de tanımlanmıştır [72]. Bağırsak ve beyin arasındaki n. vagus liflerinin %90'ı afferenttir. Bu da beyin ile bağırsak arasındaki iletişimde vericiden çok alıcı olduğunu düşündürmektedir [72] [73].

Otonom refleks aktivitesi olan devreleri oluşturan MSS dışındaki nöronların tek önemli gruplanması olması nedeniyle ESS, özellikle ilgi çekicidir. İnsanlarda, yaklaşık 20 fonksiyonel sınıfa giren yaklaşık 500 milyon nöron bulunmaktadır. Büyüklüğü, karmaşıklığı ve belirli yapısal benzerlikleri nedeniyle, ikinci bir beyine benzetilmiştir [74].

Embriyonik gelişim sırasında, MSS nöral krest hücreleri, ESS'yi oluşturmak için gastrointestinal sisteme göç eder. Enterik Sinir Sistemi iki ana pleksus olan plexus myentericus **(**Auerbach pleksusu) ve plexus submucosus (Meissner pleksusu) ile bazı küçük pleksuslardan düzenlenmiştir [8]. Plexus myentericus, dışta longitudinal ve içte sirküler kas tabakaları arasında bulunur. Oesophageus'tan rektum'a kadar sindirim sisteminin tüm uzunluğu boyunca uzanır. Plexus submucosus ise sadece kalın ve ince bağırsaklarda bulunur [75]. Genel olarak, plexus myentericus'un rolü, içeriğin itilmesinin altında yatan kas hareketlerini koordine etmektir. Plexus submucosus ise sekresyon ve absorpsiyonda geniş ölçüde görev almaktadır [69] (Şekil 10).



Şekil 10. ESS'nin yapısı [76].

2.5. Nöroligin (NLGN) ve Nöroksin (NRXN) Protein Aileleri

Beyin, nöronları iletişim halindeki geniş hücre ağlarına bağlayan sinapslarda sinyaller ileterek bilgiyi işler. Bu ağlarda sinapslar sadece sinyalleri iletmekle kalmaz, aynı zamanda onları dönüştürür ve iyileştirir. Nöroksin'ler ve Nöroligin'ler, sinapslardaki presinaptik ve postsinaptik nöronları birbirine bağlayan, sinaps boyunca sinyalleşmeye aracılık eden ve sinaptik işlevleri belirleyerek sinir ağlarının özelliklerini şekillendiren sinaptik hücre yapışma moleküllerdir [9].

Nöroksinlerin prototipik bir etkileşim ortağı olan nöroliginler, büyük ölçüde postsinaptik terminalde ifade edilir; presinaptik nöroksinlere bağlanma, fonksiyonel sinapsların oluşumu, farklılaşması, olgunlaşması ve plastisitesine katılmak için transsinaptik kompleksler oluşturur [77] [78].

Nöroksin'ler, merkezi sinapslarda heterofilik, Ca^{2+} bağımlı bir kompleks oluşturmak için NLGN'leri bağlayan hücre yüzeyi moleküllerdir. Bu transsinaptik

kompleks, verimli nörotransmisyon için gereklidir ve sinaptik temasların oluşumunda rol oynar. Ayrıca her iki molekülde otizm için aday genler olarak tanımlanmıştır [79]. Kara dul örümceğinin zehiri, α-latrotoksin adı verilen omurgalılara özgü bir toksin içerir. α-latrotoksin, presinaptik reseptörlere bağlanan ve büyük miktarda nörotransmitter salınımını indükleyen büyük bir proteindir. NRXN'ler, α-latrotoksin için reseptörler olarak keşfedilmiştir. Nöroksin'ler, NRXN I, NRXN II ve NRXN III olmak üzere 3 nöroksin geni ürünleri olan yüksek derecede polimorfik beyin spesifik proteinleridir. Nöroksin 'ler, tip I membran proteinleridir ve iki tipte sınıflandırılabilir: α-NRXN'ler ve β-NRXN'ler. α-NRXN'ler, β-NRXN'lerden daha büyüktür. Nöroksin'in iki türü, farklı amino-terminal hücre dışı diziler içerir. Ancak, aynı karboksi-terminal transmembran bölgeleri ve sitoplazmik kuyruklar içerir [80] [9].

Nöroligin'ler endojen NRXN ligandlarıdır [81]. Nöroksin'ler gibi tip I membran proteinleridir. Ancak, daha basit bir alan yapısına sahiptirler ve daha az çeşitlidirler. Memeliler, X kromozomuna lokalize insanlarda NLGN 1, NLGN 2, NLGN 3 ve NLGN 4 ile NLGN'leri kodlayan dört geni ifade eder. İnsanlarda, NLGN 4, benzer bir gen olan NLGN 5 tarafından Y kromozomu üzerinde tamamlanır [9].

Nöroksin'ler ve NLGN'lerin sinapslarda tam olarak nasıl çalıştığına dair bir hipotez şöyledir; NRXN'ler ve NLGN'lerin aracılık ettiği trans-sinaptik hücre yapışmasının ya birbirine bağlanarak, ya da diğer ligandlara bağlanarak sinaptik işlevi aktive eden ve sinaptik özellikleri belirleyen presinaptik ve postsinaptik sinyal iletim olaylarını tetiklemektedirler. Bu aktivasyon olmadan sinapslar bir araya gelir, ancak düzgün çalışmaz. Aktivasyon açıkça basit bir evet-veya-hayır anahtarı değildir. Bunun yerine, NRXN'ler ve NLGN'ler sinaptik etkinliği ve plastisiteyi şekillendirir [9].

Hücre yapışması, beyindeki sinaptik bağlantıyı koordine etmenin en doğrudan yolunu temsil eder. Son kanıtlar, postsinaptik nöroliginler ve presinaptik nöroksinler arasındaki trans-sinaptik bir etkileşimin önemini vurgulamaktadır. Bu transmembran moleküller, dendritler ve aksonlar arasındaki yapışmayı desteklemek için hücre dışı olarak birbirine bağlanır. Dikkat çekici bir şekilde, tek başına

nöroliginler, aksonlarla temas halinde tamamen işlevsel presinaptik terminallerin oluşumunu indükleyebilir. Tersine, nöroksinler tek başına dendritlerde postsinaptik farklılaşmayı ve reseptörlerin kümelenmesini indükleyebilir. Bu nedenle, nöroligin-nöroksin etkileşimi, sinaps oluşumunun iki yönlü tetikleyicisi olarak hareket etme konusunda benzersiz bir yeteneğe sahiptir [82].

Sinaps spesifikasyonu, oluşumu, olgunlaşması ve plastisitesinde rol oynayan eksitatör ve inhibitör sinapslarda, nöroliginlere bağlı olan nöroksin izoformları trans-sinaptik kompleksler oluşturabilirler. Nöroksin-nöroligin kompleksindeki mutasyonların neden olduğu tıbbi bozukluklar [9], şizofreni [83]ve otizm spektrum bozukluğu [84] patofizyolojisinde rol oynayan nöronal devrelerde inhibitör ile eksitatör aktivite dengesizliğine yol açmaktadır [83].

2.6. Kolit

İnflamatuar barsak hastalığı (IBH) araştırması, insan in vitro çalışmalarda ve in vivo çalışmalarda uygun hayvan modelleri kullanılarak yapılmıştır. Bu tür hayvan modelleri, inflamatuar süreçlerin (hem erken hem de geç olayların) incelenmesine ve yeni tedavi yöntemlerinin değerlendirilmesine izin verir. Bu IBH hayvan modelleri 5 farklı kategoriye ayrılabilir;

1) Antijen kaynaklı kolit ve mikrobiyallerin neden olduğu kolit
2) Diğer indüklenebilir kolit formları (kimyasal, immünolojik ve fiziksel)
3) Genetik kolit modelleri (transgenik ve nakavt modeller),
4) Adoptif transfer modelleri
5) Spontan kolit modelleri

Toplam model sayısının yüksek olmasına rağmen, bunların hiçbiri mükemmel model değildir. Bu nedenle belirli bir çalışma için bir model seçerken birçok yönün dikkate alınması gerekir [85].

İmmünolojik, biyokimyasal, mikrobiyolojik ve epidemiyolojik yönleriyle ilgili kapsamlı araştırmalara rağmen, ülseratif kolit (ÜK) ve Chron hastalığı (CH) ile IBH etiyolojisi ve patogenezi hala bilinmemektedir. Sonuç olarak, terapötik yaklaşım ampirik kalmaktadır. İnflamatuar barsak hastalığı ile ilgili çalışma yapmak için ideal hayvan modeli de bilinmemektedir. Bununla birlikte,

hayvanlarda yapılan çalışmalarla insan hastalığının doğasına ilişkin önemli bilgiler elde edilebileceği düşünülmektedir [10]. İnsan in vitro çalışmalarının yanı sıra immünohistolojik çalışmalar, son yıllarda IBH hakkındaki bilgimizi geliştirmiş olsa da, IBH patobiyolojisini anlamamızdaki çoğu ilerleme IBH hayvan modelleriyle sağlanmıştır [86] [87].

Kolit, hayvanlarda sülfatlanmış polisakkaritlerin (karajenan, amilopektin sülfat, dekstran sülfat) oral yoldan verilmesi, seyreltilmiş asetik asidin rektal yolla damlatılmasıyla kimyasal tahrişe sebep olma, dinitroklorobenzen'e (DNCB) duyarlılığın ardından veya trinitrobenzen sülfonik asit'in (TNBS) tek bir uygulamasından sonra gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonu ve Arthus reaksiyonu ile indüklenebilir. Kolonun kimyasal tahrişinden sonra bağışıklık komplekslerinin intravenöz enjeksiyonu ve formil-metiyonil-lösil-fenilalanin (FMLP) gibi kemoatraktan peptidler tarafından indüklenir. Sıçan, fare veya tavşandaki tüm kolon inflamasyon modellerinin, insan kolitinde bulunana benzer şekilde artan miktarlarda eikosanoid ürettiği görülmektedir. Bu nedenle hayvan çalışmaları, inflamatuar aracıların kaynağı, düzenlenmesi ve işlevi hakkında yararlı bilgiler sağlamaktadır. Bununla birlikte, pamuk tepeli tamarin haricinde, kolonun indüklenmiş veya spontan inflamasyonunun hiçbir hayvan modeli etiyoloji, hastalık aktivitesi veya histoloji açısından insan ÜK ile benzer değildir [10].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneysel kolit modeli oluşturulan sıçanlarda tVSS uygulanmış ve ESS'deki sinaps oluşumu ve bağırsak morfometrisi üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği çalışmamız Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından 26.08.2021 tarihli TTU-2021-7301 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Deney Grupları

Çalışmanın deneysel bölümü, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (GÜDAM), Haziran 2021-Ağustos 2021 tarihleri arasında yapılmıştır. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. (Onay No: G.Ü.ET-21.041).

Çalışmada ağırlıkları 180-230 gram arasında değişen erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Gruplar randomize olarak her biri 9 sıçandan oluşan 4 ana gruba ayrılmıştır.

Tablo 1. Deney grupları.

GRUP 1 9 Sprague-Dawley albino erkek sıçan	Salin enjeksiyonu (1. gün)	tVSS –
GRUP 2 9 Sprague-Dawley albino erkek sıçan	Salin enjeksiyonu (1. gün)	**tVSS +**
GRUP 3 9 Sprague-Dawley albino erkek sıçan	**TNBS** enjeksiyonu (1. gün)	tVSS-
GRUP 4 9 Sprague-Dawley albino erkek sıçan	**TNBS** enjeksiyonu (1. gün)	**tVSS+**

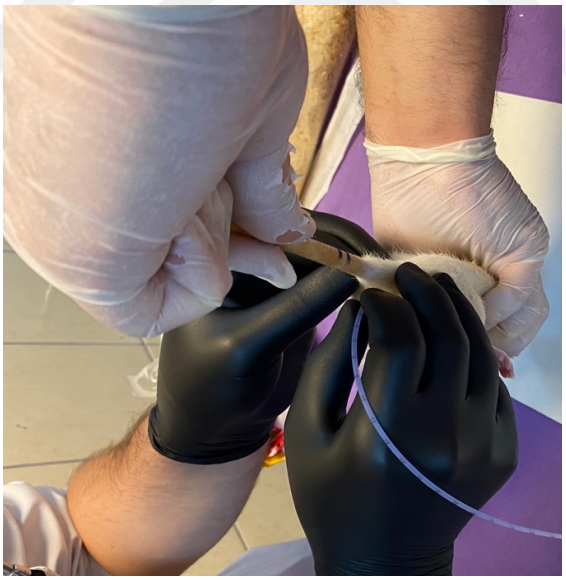
3.2. Hayvanların Bakım Koşulları

Sıçanlar, sabit sıcaklık (22°C) ve nem kontrollü ortamda 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüde (ışıklar 08:00'de açılıp 20:00'de söndürülmüştür) muhafaza edilmiş, standart gıda ve su ile ad libitum ile beslenmiş sıçanların yerleştirilmesi için kabuk/talaş altlıklı kafes kullanılmıştır. Sıçanların deneylere

dahil edilmeden önce en az 7 gün boyunca bu koşullara alışmalarına izin verilmiştir. Deneyin başında ve sonunda hayvanlar tartılmıştır.

3.3. Deney Protokolü

Kolit indüksiyonu, Morris ve arkadaşları tarafından geliştirilen klasik TNBS kolit modeline dayanmaktadır (1989). 12 saat boyunca yiyecekten yoksun bırakılan sıçanlara anestezi uygulandı (50 mg / kg ketamin ve 0.05 mg / kg asepromazin i.m.). Kolona 8 cm uzunluğunda bir kauçuk kanül yerleştirildi ve TNBS, sıçan başına 10 mg'lık bir dozda %50 etanol (toplam hacim, 0.25 ml) içinde damlatıldı (Şekil 11). Kolon içinde TNBS'nin tutulmasını sağlamak için sıçanlar, intrakolonik uygulamayı takiben baş aşağı pozisyonda tutuldu (Şekil 12). Kontrol grubundaki sıçanlara kolon içine salin enjekte edildi.



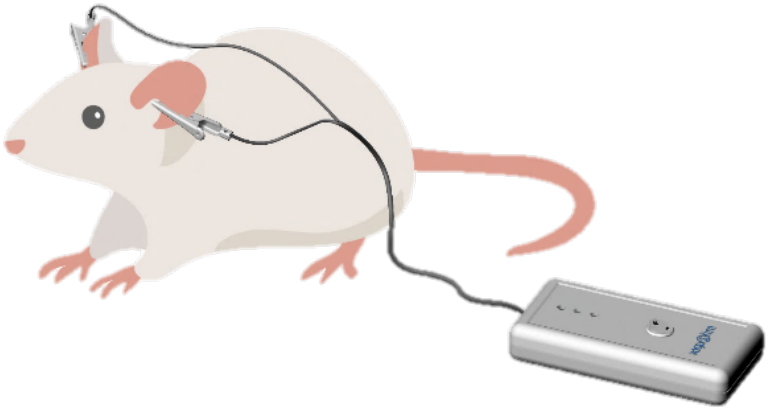
Şekil 11. Sıçanlara intrakolonik yolla TNBS indüksiyonu.



Şekil 12. Sıçanların intrakolonik TNBS uygulamasını takiben baş aşağı pozisyonda tutulması

3.4. Transauricular Vagal Sinir Stimülasyonu

Transauricular VSS, anestezi altındaki sıçanların her iki kulağında tragus'a elektrotların takılması şeklinde uygulanmıştır (Şekil 13). Transauricular VSS, grup 2 ve 4'teki sıçanlara günde 2 kere 30'ar dakika boyunca 30 saniye açık 30 saniye kapalı olacak şekilde 10 gün boyunca akım şiddeti 1 mA, atım süresi 500 µs, frekansı 10 Hz, gerilimi 5 V olarak ayarlanmış ve uygulanmıştır (Şekil 14). İlk gün, VSS intrakolik enjeksiyondan 1 saat sonra başlanmıştır. Kontrol grupları olan grup 1 ve 3'teki sıçanlara aynı prosedür uygulanarak günde 2 kere 30'ar dakika boyunca elektrotlar takıldı, ancak stimülasyon yapılmamıştır.



Şekil 13. Deney de kullanılan Vagustim® firmasına ait tVSS Cihazı [88].



Şekil 14. Anestezi altındaki sıçanlara tVSS uygulanması.

3.5. Cerrahi İşlem

Kolit indüksiyonunu takiben 10. günde sıçanlara derin anestezi uygulandı (ketamin 150 mg / kg ve acepromazin 0,15 mg / kg, i.m.) ve transkardiyal olarak salin ile perfüze edildi. Distal kolon izole edilerek, uzunlamasına açıldı. Kolonik hasarın ölçülmesi için kolorimetrik değerlendirme kullanılarak, üç alan (normal, orta ve şiddetli inflamasyon) belirlenip fotoğraflandı. Lezyon dokusu örnekleri ve hemen bitişik dokuda, histolojik ve immünohistokimyasal analizler yapıldı.

3.6. Işık Mikroskobik Yöntem

Deney gruplarına ait kolon dokuları ışık mikroskobik inceleme için % 4' lük paraformaldehit solüsyonu ile tespit edildi. Rutin histolojik takip işlemlerinin ardından elde edilen parafin bloklardan mikrotom ile (Leica RM 2245, Germany) histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar için rodajlı ve polilizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.7. Hematoksilen&Eosin (H&E) Boyama Protokolü

Deney gruplarına ait kolon kesitleri, deparafinizasyon işlemi sonrasında, azalan etil alkol serilerinde (% 100 - % 50) 10'ar dakika tutuldu. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, 10 dakika akan musluk suyu ile yıkanıp alkolün uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Yıkama sonrasında 10 dakika Harris Hematoksilen solüsyonunda bekletilen kesitler akan musluk suyu altında 10 dakika daha yıkandı.

Glasiyel asetik asit ile alkol solüsyonun batırılıp çıkarılarak, akan musluk suyu altında tekrar 10 dakika yıkama gerçekleştirildi. Eosin boya solüsyonunda 10 dakika bekletilen kesitler tekrar 10 dakika akan musluk suyu ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından dehidratasyon işlemi için artan etil akol serilerinden hızlıca geçirildikten sonra ksilolde bekletilip, kesitlerin kapama işlemi sağlandı. Boyanan kesitlerden Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda elde edilen görüntüler, Leica LAS V 4.9 programında değerlendirilerek, histopatolojik skorlama yapıldı (Tablo 2) [89].

3.8. İmmunohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal analizler için kolon dokularına ait parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığında kesitler deparafinizasyon işleminin ardından azalan alkol serilerinden (% 100, % 96, % 90, % 80 ve % 70) geçirildi. Dehidrate edilen dokular alkolden uzaklaştırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Sitrat tamponu (HDF, Türkiye) (pH 6.0) ile yüksek ısıda antijen retrival işlemi uygulandı. Kesitler 3 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Ardından dokuların çevresi doku sınırlayıcı kalem (Pap pen) ile sınırlandırıldı. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline), (Thermo, AP-9009-10, UK) (pH:7.4) ile yıkandı. Daha sonra, 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Thermo, TA-125-HP, UK) uygulandı. PBS ile yıkanan kesitler 5 dakika UltraV block (Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP, Thermo, TP-125-HP, UK) ile muamele edildi. Kesitler uygun dilüsyonda Nöroligin (Bioss, bs-4212R, 1:100) ve Nöroksin-2 (Bioss, bs-11104R, 1:100) primer antikorları ile bir gece boyunca + 4°C' de inkübe edildi. Daha sonra kesitler 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında 10 dakika biotinli sekonder antikor uygulandı ve PBS ile tekrar yıkama yapıldı. Yıkama ardından 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakılan kesitler 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkanarak, diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen DAB (Thermo, TA-125-HD, UK) kullanılarak immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyasında Mayer'in Hematoksilen'i (Thermo, TA-125-MH, UK) kullanıldı. Yıkanan kesitler artan alkol

serilerinden geçirilerek, 20 dakika ksilolde bekletildi. Sonrasında entallan ile kapatılarak Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda Leica LAS V4.9 (Germany) programı kullanılarak görüntülenmesi gerçekleştirildi. Pleksus miyenterikus'larda Nöroligin-1 ve Nöroksin-2α primer antikorlarına ait immunopozitif alan yüzdeleri ImageJ (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak, x400 büyültmede değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Grup 1 (tuz enjekte edilen tVSS yapılmayan) ve Grup 2'ye (Tuz enjekte edilen tVSS yapılan) ait kolon dokuları normal görünümde izlendi. Grup 3'teki (TNBS enjekte edilen tVSS yapılmayan) kolon dokularındaki inflamasyon makroskobik olarak oldukça belirgin olarak gözlendi, kolon dokusunun kalınlaşmış olduğu da dikkatimizi çekti. Grup 4'teki (TNBS enjekte edilen tVSS yapılan) kolon dokularında inflamasyon makroskobik olarak gözlenmezken, longitudinal yönde uzamış ve incelmiş olduğu gözlendi (Şekil 15).

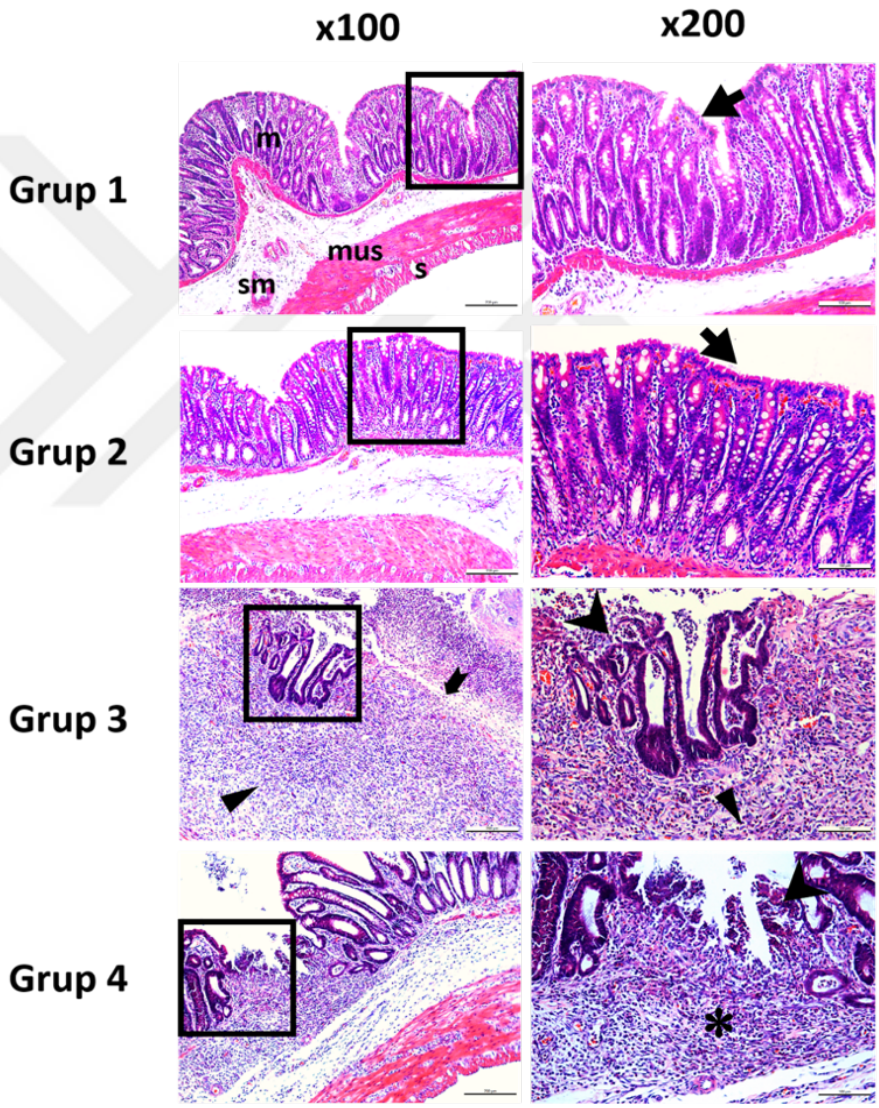


Şekil 15. Deney gruplarına ait kolon makroskopik görüntüleri.

4.2. Histolojik Bulgular

Grup 1 ve grup 2' ye ait kolon dokuları normal histolojik yapıdaydı. Kolonik mukoza tabakasında epitel ve kript yapıları düzenli görünüme sahipti (Şekil 16, Tablo 2). Tunika mukoza, submukoza, muskularis ve serosa katmanları belirgin olarak ayırt ediliyordu. Grup 3' de ülserasyon, mukoza, submukoza ve seroza

katmanlarını içeren yoğun inflamasyon, bazı alanlarda nekrotik değişimler ve submukozal ödem dikkati çekti. Epitel ve kript bütünlüğünün kaybolduğu izlendi. Grup 4' de histopatolojik değişimlerin kısmen azaldığı, ancak bazı alanlarda lenfosit infiltrasyonunun ve epitel doku kaybının devam ettiği görüldü (Şekil 16, Tablo 2).



Şekil 16. Deney gruplarına ait kolon histolojik görüntüleri.

Grup 1 ve grup 2' de epitel dokusu (➔), mukoza (m), Submukoza (sm), muskular tabaka (mus), serosa (s) tabakaları bütünlüğünü korurken, grup 3' de epitel ve kript bütünlüğünde bozulma (➤), transmural inflamasyon (►) ve ulserasyon (➡) dikkati çekti. Grup 4' de grup 3' e göre azalan hücre infiltrasyonu (*) ile birlikte mikroskobik doku hasarında azalma izlendi. (Hematoksilen-Eosin (H&E)).

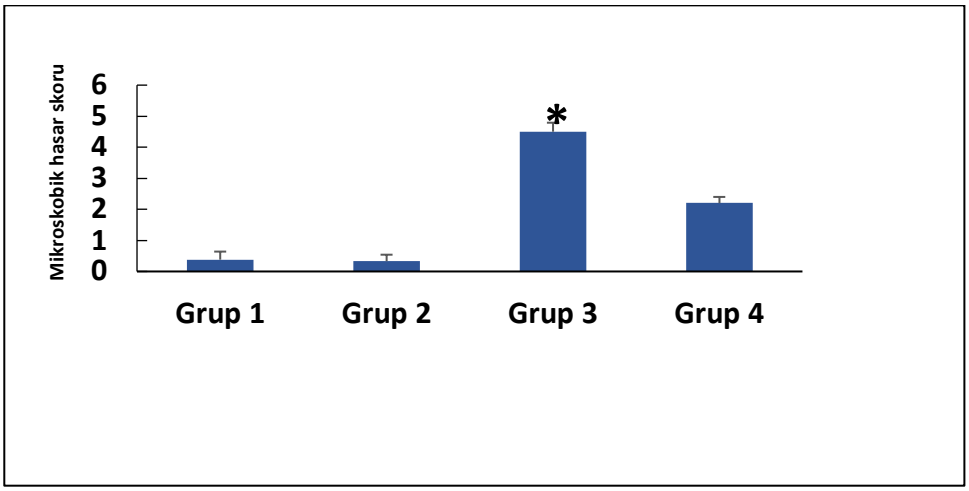
4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Tablo 2. Histopatolojik skorlama [89] [90].

Skor	Parametre
0	Normal kolon dokusu
1	Mukoza tabakasında sınırlı inflamasyon ya da fokal ulserasyon
2	Mukoza ve submukoza tabakalarında sınırlı fokal ya da yaygın ulserasyon ve inflamasyon
3	Muskularis propria ile sınırlı fokal ya da yaygın ulserasyon ve inflamasyon
4	Seroza ile sınırlı fokal ya da yaygın ulserasyon ve inflamasyon
5	Serozayı içeren yaygın ülserasyon ve transmural inflamasyon

Çalışmamızda yapılan histopatolojik skorlama sonrasında mikroskobik hasar değerlendirilmiş, Grup 1 (TNBS- tVSS-) ve grup 2 (TNBS- tVSS+) arasında istatistiksel olarak anlamlılık izlenmezken (p=1,000); grup 3'e (TNBS+ tVSS-) ait mikroskobik hasar skoru grup 1 ve grup 2'ye göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırayla; p=0,003 ve p=0,005). Grup 4'e (TNBS+ tVSS+) ait hasar skoru grup 3'e göre azalma gösterirken, istatistiksel olarak anlamlılık izlenmemiştir (p=1,000). (Şekil 16) (Tablo:2) (Tablo:3)

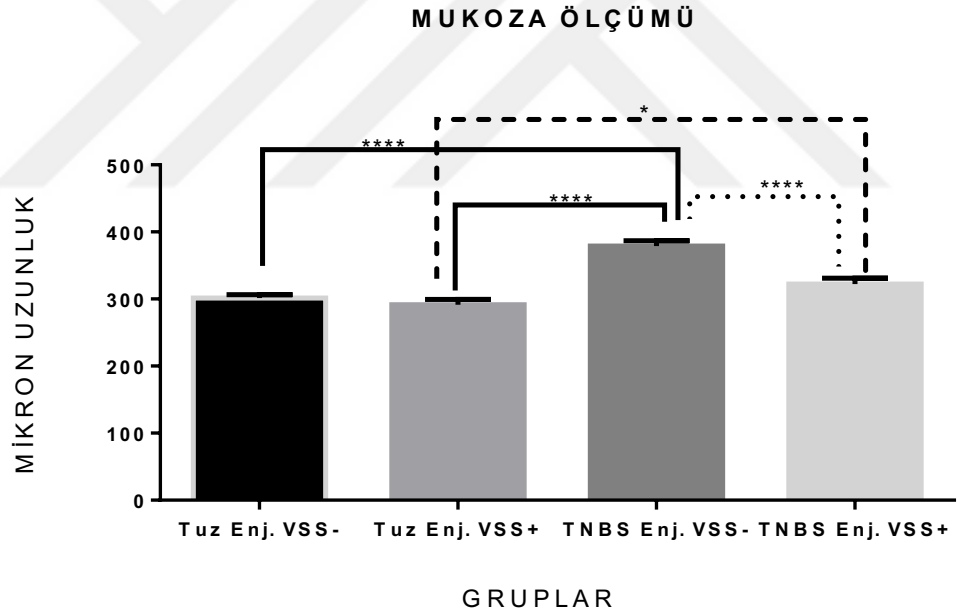
Tablo 3. Deney gruplarına ait mikroskobik hasar skorlaması.



* p<0,05, Grup 1 ve Grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sonuçlar mean ± SEM şeklinde verilmiştir.

4.3. Bağırsak Duvarında Yapılan Morfometrik Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması

Tuz enjekte edilmiş gruplar mukoza kalınlığı açısından karşılaştırıldığında, tVSS yapılan grup ile tVSS yapılmamış grup arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık görülmemiştir (p=0,9884). Trinitrobenzen Sülfonik Asit enjekte edilmiş gruplarda ise mukoza kalınlığı, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış olana göre anlamlı bir düşüş göstermiştir (p<0.001). Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise; colit modeli oluşturulmuş grup olan TNBS enjekte edilmiş grupta mukoza kalınlığının, tuz enjekte edilen gruba kıyasla arttığı görülmüştür (p<0.05) (Grafik 1).



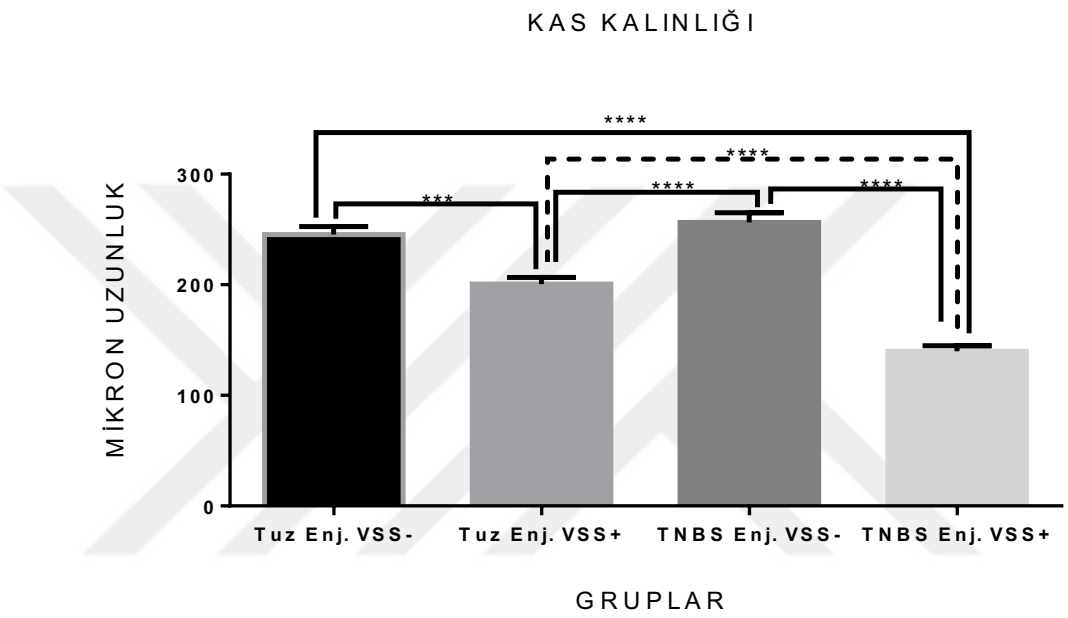
Grafik 1. Deney gruplarında mukoza ölçümlerini gösteren sütun grafik.

* p<0,05 intrakolonik salin enjekte edilip tVSS yapılan grup ile intrakolonik TNBS enjekte edilip tVSS yapılan grup arasındaki farklılık.

**** p<0,001 gruplar arasındaki farklılık.

Gruplar kas kalınlığı açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılan grupta, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılmamış gruba istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş izlenmiştir (p<0.001). Trinitrobenzen Sülfonik Asit enjekte edilmiş gruplarda ise, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış olana göre anlamlı

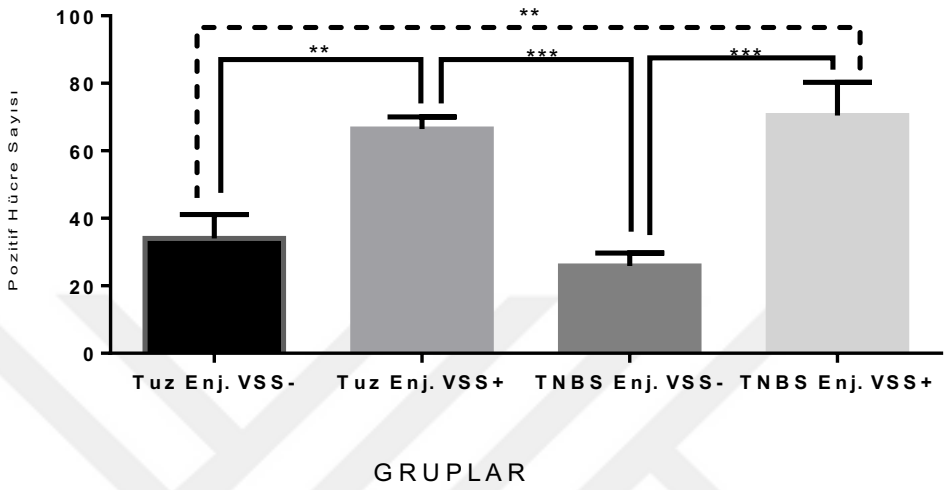
bir düşüş görülmüştür (p<0.001). Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise; TNBS enjekte edilerek kolit modeli oluşturulmuş grupta kas kalınlığının, tuz enjekte edilen gruba kıyasla azaldığı görülmüştür (p<0.001) (Grafik 2).



Grafik 2. Deney gruplarında kas kalınlığı ölçümlerini gösteren sütun grafik.
** p<0,01 intrakolonik salin enjekte edilip tVSS yapılmayan grup ile intrakolonik TNBS enjekte edilip tVSS yapılmayan grup arasındaki farklılık.
**** p<0,001 gruplar arasındaki farklılık.

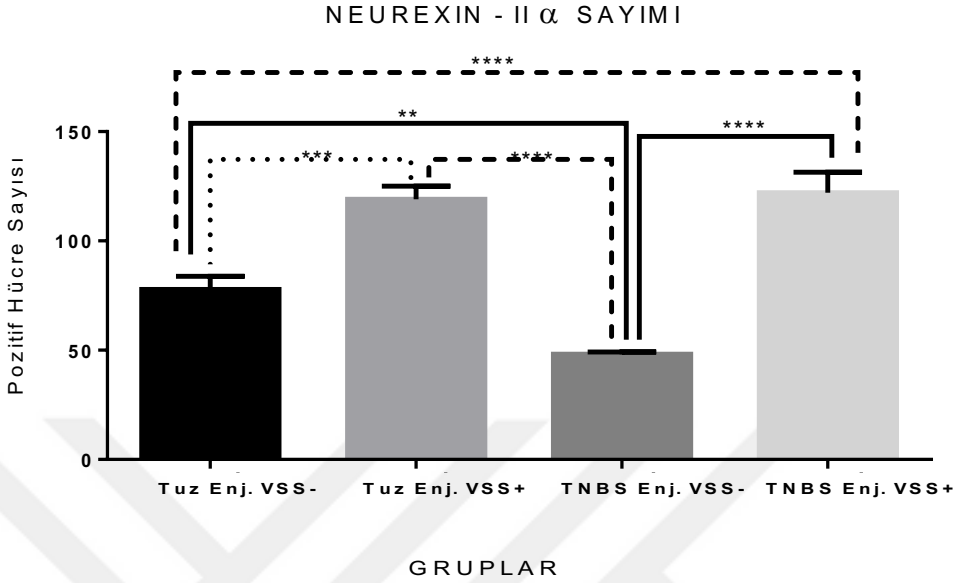
4.4. Nöroligin-1 ve Nöroksin 2-α Pozitif Hücre Sayımının Gruplar Arası İstatistiksel Analizleri

Gruplar Nöroligin-I pozitif hücre sayımları açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş gruplardan tVSS yapılanda, tVSS yapılmamış gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür (p<0.001). TNBS enjekte edilmiş gruplarda da aynı şekilde, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür (p<0.001) (Şekil 21).



Grafik 3. Deney gruplarında Nöroligin-I pozitif hücre sayımlarını gösteren sütun grafik.
** p<0,01 intrakolonik salin enjekte edilmeyip tVSS yapılmayan grup ile TNBS enjekte edilip tVSS yapılan grup arasındaki farklılık.
** p<0,01 intrakolonik salin enjekte edilmeyip tVSS yapılmayan grup ile intrakolonik salin enjekte edilip tVSS yapılan grup arasındaki farklılık.
*** p<0,001 gruplar arasındaki farklılık.

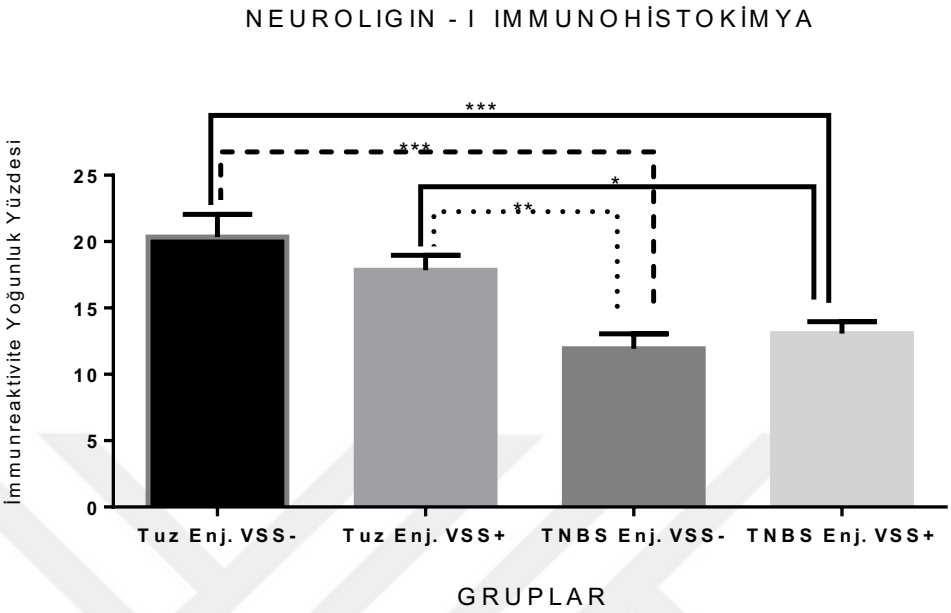
Gruplar Nöroksin-IIα pozitif hücre sayımları açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılan grupta, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılmamış gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür ($p<0.001$). Trinitrobenzen Sülfonik asit enjekte edilmiş gruplarda da aynı şekilde, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 21). Transauricular VSS yapılmayan gruplardan tuz enjekte edilen grupta pozitif hücre sayısı, TNBS ile kolit oluşturulmuş gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).



Grafik 4. Deney gruplarında Nöroksin-IIα pozitif hücre sayımlarını gösteren sütun grafik.
* p<0,05 intrakolonik salin enjekte edilip tVSS yapılan grup ile intrakolonik TNBS enjekte edilip tVSS yapılmayan arasındaki farklılık.

4.5. Nöroligin-1 ve Nöroksin 2-α İmmünreaktivite Yoğunluk Yüzdelerinin Gruplar Arası İstatistiksel Analizleri

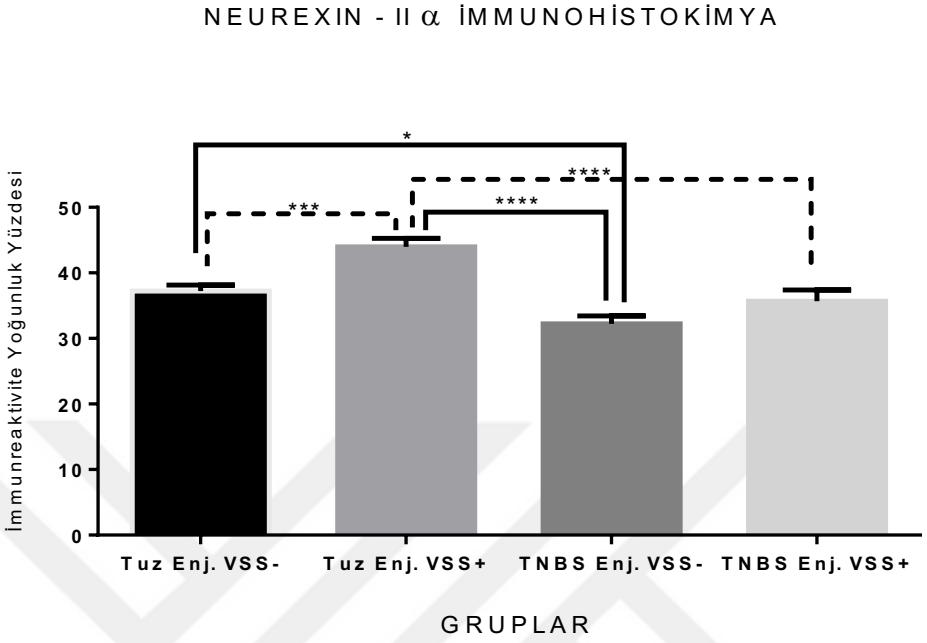
Gruplar Nöroligin-I immunreaktivitesi yoğunluk yüzdesi yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; tuz enjekte edilmiş gruplardan tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre anlamlı bir düşüş görülmüştür (p<0.001). Trinitrobenzen Sülfonik Asit enjekte edilmiş gruplarda, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre artış görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermemiştir (p=0,9356.) (Grafik 5). Transauricular VSS yapılmamış gruplardan, TNBS ile colit oluşturulmuş grupta ise, tuz enjekte edilen gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel anlamlı bir düşüş bulunmuştur (p<0,001). Tranauricular VSS yapılmış gruplar enjeksiyon çeşidine göre karşılaştırıldığında, TNBS enjeksiyonu yapılan grupta, tuz enjeksiyonu yapılan gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır (p<0,05) (Grafik 5).



Grafik 5. Deney gruplarında Nöroligin-I immunreaktivite yoğunluk yüzdelerini gösteren sütun grafik.

* p<0,05 intrakolonik tuz enjekte edilip tVSS yapılan grup ile intrakolonik TNBS enjekte edilip tVSS yapılan grup arasındaki farklılık.
** p<0,01 intrakolonik tuz enjekte edilip tVSS yapılan grup ile intrakolonik TNBS enjekte edilip tVSS yapılmayan grup arasındaki farklılık.
*** p<0,001 gruplar arasındaki farklılık.

Gruplar Nöroksin-II α immunreaktivitesi yoğunluk yüzdesi yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; tuz enjekte edilmiş gruplardan tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre anlamlı bir artış görülmüştür (p<0.001). Trinitrobenzen Sülfonik Asit enjekte edilmiş gruplarda, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre artış görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermemiştir (p=0,1116) (Grafik 6). Transauricular VSS yapılmamış gruplardan, TNBS ile colit oluşturulmuş grupta ise tuz enjekte edilen gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel anlamlı bir düşüş bulunmuştur (p<0,05). Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise, TNBS enjeksiyonu yapılan grupta, tuz enjeksiyonu yapılan gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır (p<0,001) (Grafik 6).



Grafik 6. Deney gruplarında Nöroksin-IIα immunreaktivite yoğunluk yüzdelerini gösteren sütun grafik.

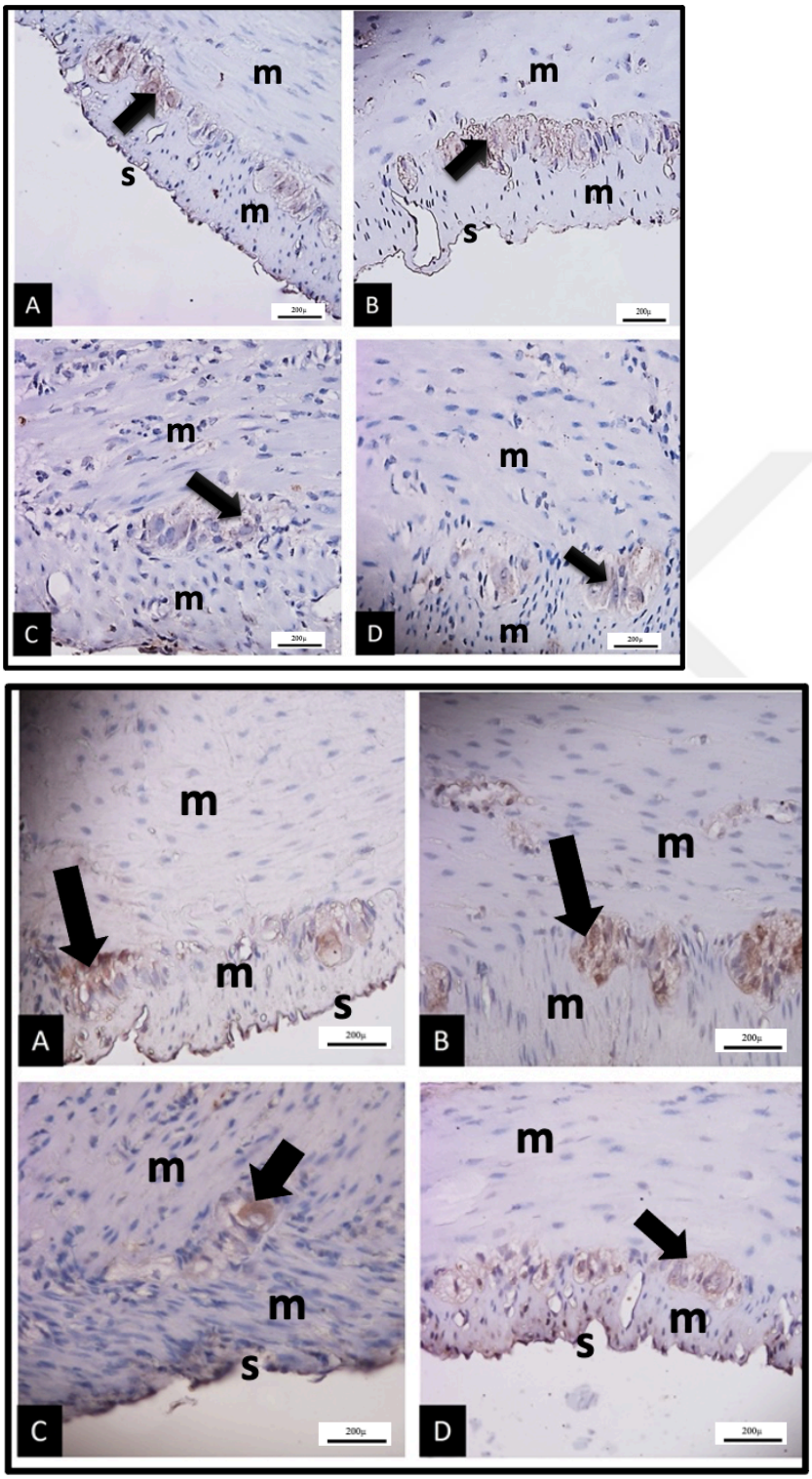
* p<0,05 intrakolonik tuz enjekte edilip tVSS yapılmayan grup ile intrakolonik TNBS enjekte edilip tVSS yapılmayan grup arasındaki farklılık.
*** p<0,001 gruplar arasındaki farklılık.
**** p<0,001 gruplar arasındaki farklılık.

Grupların ortalamaları arasındaki farklılığın anlamlılık dereceleri SPSS (Statistical Package for Social Sciences, 22. sürüm) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Verilerin dağılımı Shapiro Wilk normalite testi ile değerlendirildikten sonra normal dağılım gösterenler One way anova analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testiyle değerlendirilmiştir. Normal dağılım göstermeyenler ise, Kruskal Wallis testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

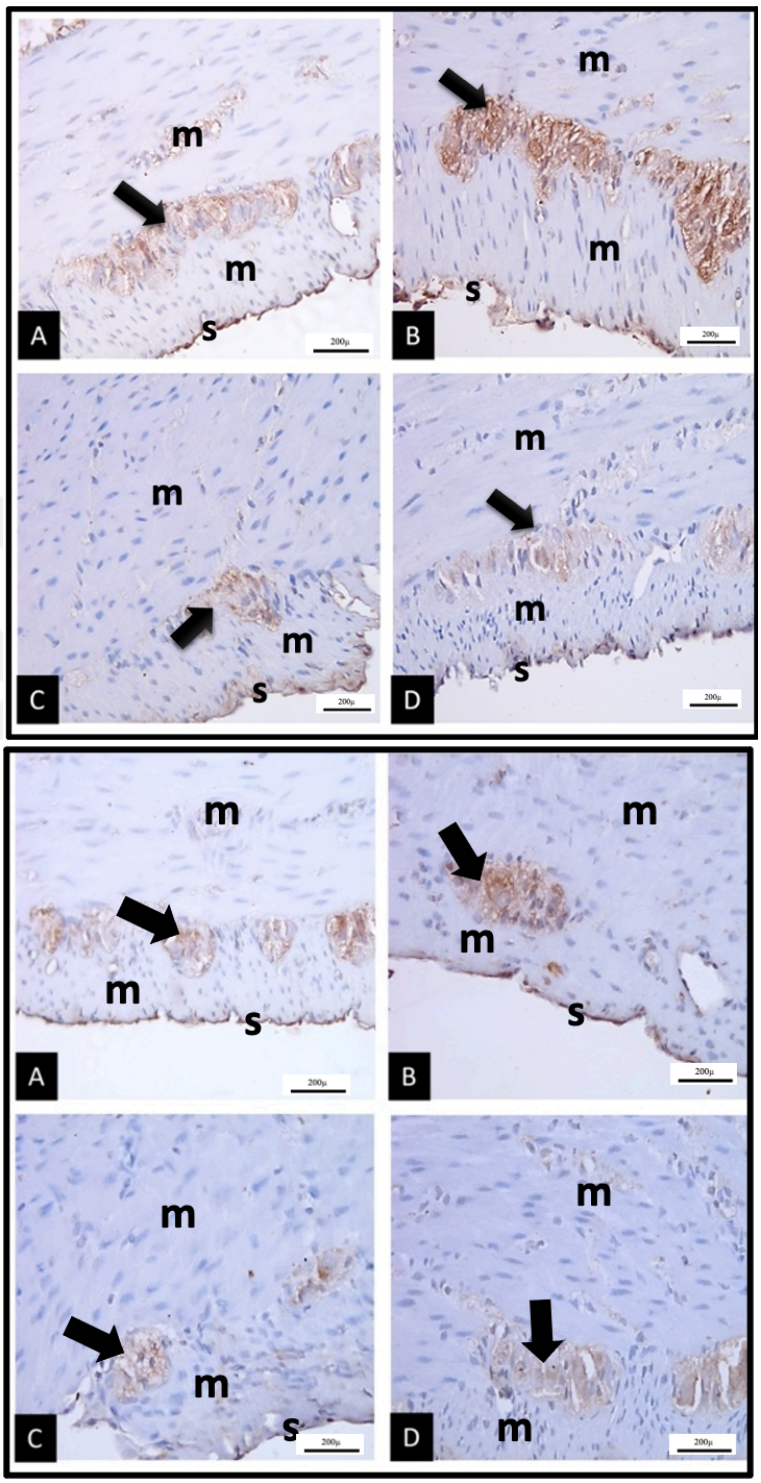
4.6. Deney Gruplarına Ait İmmunohistokimyasal Görüntüler

4 deney grubunda kolonda bulunan plexus myentericus'ta pozitif olarak boyanmış Nöroligin-1 ve Nöroksin II-α hücrelerinin immunohistokimyasal görüntülerinden örnekler Şekil 17 ve Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 17. Gruplara ait **Nöroligin-1** immunohistokimyasal görüntüleri, plexus myentericus'lar (➔), muskular tabaka (**m**), serosa tabakaları (s) izlenmekte.

(A. Grup 1, **B.** Grup 2, **C.** Grup 3, **D.** Grup 4; **HE&DAB X400**)



Şekil 18. Gruplara ait **Nöroksin-2**α immunohistokimyasal göüntüleri, plexus myentericus'lar (➔), muskular tabaka (**m**), serosa tabakaları (s) izlenmekte.

(A. Grup 1, **B**. Grup 2, **C**. Grup 3, **D**. Grup 4 **DAB & HE, X400**).

5. TARTIŞMA

Salzmann ve arkadaşları tarafından 1989 yılında 87 denek üzerindeki kolon biyopsi örnekleri ile morfometrik analiz yapılmıştır. Hastalar kontrol grubu (grup 1- 25 kişi), kabızlık ve/veya karın ağrısı grubu (grup 2- 36 kişi) ve ishal grubu (grup 3-26 kişi) olarak 3 grupta incelenmiştir. Morfometrik analiz, özel bir otomatik görüntü işlemcisi ile yapılmıştır. Üç grupta colon ascendens, colon transversum ve colon descendens'teki glandüler alanlar arasında fark gözlenmemiştir. Buna karşılık, rektal glandüler alan, tüm gruplarda 3 kolon bölgesinden önemli ölçüde daha büyük olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Morfometrik analiz, lamina propria selülaritesinin normal aralığının bir tanımını sağlar. Kontrol grubundaki ortalama hücre yoğunluğu, tüm biyopsi bölgelerinde 172.7±24 çekirdek/birim lamina propria alanı olarak bulunmuştur. Grup II ve III'ün hücresel yoğunlukları, grup I denekleriyle karşılaştırıldığında çıkan kolonda önemli ölçüde yüksek bulunmuştur [195.1±22.8, ($p<0.01$) ve 198.2±24.7 ($p<0.001$)]. Grup III'teki hücresel yoğunluk, grup I ile karşılaştırıldığında diğer bölgelerde önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Klinik semptomları olan hasta gruplarında hücresel yoğunlukta istatistiksel bir artış gözlenmiş ve bu da mikroskobik kolit kavramıyla tutarlı ve morfometri ile saptanabilir olarak kabul edilmiştir [91].

Hogaboam ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yapılan bir çalışmada Nitrik oksitin trinitrobenzen-sülfonik asit (TNBS) kolitindeki rolü araştırılmıştır. Trinitrobenzen Sülfonik Asit'ten sonra her 24 saatte bir, sıçanlara oral olarak NG-nitro-L-arginin metil ester (30 mg/kg)ve su verilmiş ve gıda alımı, vücut ağırlığı ve plazma nitrit seviyeleri ölçülmüştür. Altıncı günde kolonik nitrik oksit sentaz ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, histoloji, bağırsakta düz kas hipertrofisi, miyoenterik sinir fonksiyonu değerlendirilmiştir. Kolitin ilk 72 saatinde gıda alımı ve vücut ağırlığı azalmış. Trinitrobenzen Sülfonik Asit sonrası 6. günde, mukozal nitrik oksit sentazda dört kat artış, MPO'da 30 kat artış ve plazma nitritinde beş kat artış ölçülmüştür. Her iki kolon kas tabakasında düz kas hiperplazisi ve hipertrofisi, myenterik pleksusta çok sayıda diyaforez pozitif makrofaj ve myenterik sinir fonksiyonunda baskılanma da gözlenmiştir. [92]. Srdan Sanovic ve

arkadaşları ESS'nin inflamasyon sırasında büyük yapısal hasara uğradığını göstermek için bir çalışma yapmışlardır. Dinitrobenzen sülfonik asit (DNBS) ile sıçanlarda kolit oluşturulmuş ve 35 gün sonrasına kadar enterik nöronların sayısını ve dağılımını incelemek için immünohistokimya yöntemi kullanılmıştır. Dinitrobenzen sülfonik asit ile deneysel kolit oluşturulan sıçanlarda 2. günden itibaren şiddetli transmural inflamasyon ve kas duvarında kalınlaşma, 6. günde kanlı ishal gözlenmiş, salin verilen kontrol grupları normal olarak gözlenmiştir. Kolit oluşturulan sıçanlarda, ilk 2 gün kilo kaybı meydana gelmiş ancak, daha sonra bu kilo kaybı devam etmemiştir. Kontrol grubunun ağırlığında artış gözlenmiştir. Altıncı günde, ciddi mukozal hasar, submukozal ülserasyon ve belirgin inflamatuar hücre infiltrasyonu görülmüştür. Kontrol grubundaki hayvanlardan alınan dokuların histolojisinde hiçbir anormallik tespit edilmemiş. Kolit grubundaki plexus myentericus'taki gangliyon sayısı sabit kalırken, plexus submucosus'taki gangliyon sayısında belirgin azalma, myenterik nöron sayısında önemli ölçüde düşüş olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, nöron sayısındaki azalmanın iltihaplı bölge ile sınırlı olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu sıçanların kolonlarında, myenterik nöron sayısında önemli bir değişiklik olmamıştır. Azalmış nöron sayısı ve düz kas hiperplazisine rağmen, düz kas hücreleri arasındaki akson yoğunluğu inflamasyon sırasında ve sonrasında değişmeden kalmıştır [93]. Bağırsakların otonom işlevi büyük ölçüde ESS tarafından uygun şekilde düzenlenmesine bağlıdır [94]. Enterik Sinir Sistemi içindeki nöron kaybının, bağırsak iltihabının önemli bir sonucu olduğunu ve insanlarda enterit sonrası IBS'de görülen işlev bozukluğunun önemli bir nedeni olabileceğini düşündürmüştür [93]. Çalışmamızda tuz enjekte edilen gruplardan, tVSS yapılmayan Grup 1 ve tVSS yapılan grup 2'ye ait kolon dokuları normal görünümde izlenmiştir. Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilen tVSS yapılmayan Grup 3'teki inflamasyon makroskobik olarak oldukça belirgin olarak izlenmiş. Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilen tVSS yapılan Grup 4'teki inflamasyon makroskobik olarak gözlenmezken kolonların longitudinal yönde uzamış ve incelmiş oldukları gözlenmiştir. Gruplar kas kalınlığı açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş izlenmiştir ($p<0.001$). TNBS

enjekte edilmiş gruplarda ise, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış olana göre anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.001$). Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise; TNBS enjekte edilerek kolit modeli oluşturulmuş grupta kas kalınlığının, tuz enjekte edilen gruba kıyasla azaldığı görülmüştür ($p<0.001$). Gruplar kas kalınlığı açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş gruplardan tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş izlenmiştir ($p<0.001$). Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilmiş gruplarda ise, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış olana göre anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.001$). Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise; TNBS enjekte edilerek kolit modeli oluşturulmuş grupta kas kalınlığının, tuz enjekte edilen gruba kıyasla azaldığı görülmüştür ($p<0.001$).

Meregnani ve arkadaşları tarafından yapılan 2011 yılındaki çalışmada TNBS koliti oluşturulan serbest gezen sıçanlarda anestezi uygulanmadan arka arkaya beş gün boyunca günde 3 saat düşük frekanslı (5 Hz) sol servical VSS uygulanmış ve iyileşme olduğu gözlenmiştir [51]. Salin verilen kontrol grubunda rektum ve kolonda makroskopik hasar gözlenmemiştir. Uyarılmış olsun veya olmasın TNBS uygulanan hayvanlarda, anüsün 3 ila 7 cm proksimalinde kolonda makroskopik hasar gözlenmiştir. Kolondaki hasarların miktar tayini, tVSS yapılan TNBS verilen hayvanlarda hiçbir değişiklik göstermemiştir. Bizim çalışmamızda, tuz enjekte edilen tVSS yapılmayan Grup 1 ve tuz enjekte edilen tVSS yapılan grup 2'ye ait kolon dokuları normal görünümde izlenmiş. Trinitrobenzen sülfonik asit koliti oluşturduğumuz tVSS uygulanmamış Grup 3'te inflamasyon makroskobik olarak oldukça belirgin olarak gözlenmiştir. Trinitrobenzen sülfonik asit koliti oluşturduğumuz tVSS uygulanan Grup 4'te inflamasyon makroskobik olarak gözlenmezken kolonların longitudinal yönde uzamış ve incelmiş oldukları gözlenmiştir. Histopatolojik skorlama sonrasında mikroskobik hasar değerlendirilmiş; TNBS ile kolit oluşturulmuş grupta, tuz enjekte edilmiş grup 1 ve 2'ye kıyasla anlamlı yükseklik görülmüştür.

Lei Tu ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada, sıçanlarda TNBS ile kolit oluşturulmuştur. Beş gün sonra, 10 gün boyunca sakral sinir stimülasyonu (SSS) veya sham-SSS ile tedavi edilmiştir. Sakral sinir stimülasyonu'nun etki

mekanizması, ESS hücrelerinin işlevi ve OSS analiz edilerek araştırılmıştır. Sakral sinir stimülasyonu, hastalık aktivite indeksini, mikroskobik ve makroskopik skorları, miyeloperoksidaz aktivitesini ve proinflamatuar sitokinleri (TNF-α, IL-6) azaltmıştır. Aynı zamanda sakral sinir stimülasyonu, kolon dokularında asetilkolini arttırmış ve vagal efferent aktiviteyi yükseltmiştir. Sakral sinir stimülasyonu, parasimpatik aktiviteyi arttırmış, mast hücreleri de dahil olmak üzere ESS ve bağışıklık sisteminin aktivitesini modüle etmiştir. Kolon iltihabını iyileştirmiş ve kolon bariyer fonksiyonunu geliştirmiştir. Sakral sinir stimülasyonu yapılan grupta, kontrol grubuna kıyasla kolon uzunluğunun önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (14,7±1,2 cm'ye karşı 17,8±1,1 cm, $p<0.0001$), sakral sinir stimülasyonu ile tedavide kolon uzunluğunun normale döndüğü gözlenmiştir (16,7±1,16 cm; $p<0.002$). Mukozal hasar indeksi ile temsil edilen makroskopik kolon hasarı, sham-SSS grubunda 5,8±0,8 iken SSS grubunda 2,3±0,4 bulunmuş, SSS yapılan grupta önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$). SSS tedavisi yapılan grupta, tedaviden 10 gün sonra ödem, hiperemi, bağırsak duvarı kalınlaşması, mukozal erozyonlar, ülserler ve bitişik dokulara yapışmanın önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir [95]. Bizim çalışmamızda TNBS ile kolit oluşturulmuş grup 3 ve grup 4 karşılaştırıldığında; tVSS yapılan grup 4'te kolonun longitudinal yönde uzadığı makroskopik olarak tespit edilmiş, mukoza ölçümü ve kas kalınlığına göre grup 3 ile kıyaslandığında, tVSS yapılan grup 4'te sırasıyla %14,81 ve %45,31'lik düşüşler görülmüştür. Histopatolojik skorlama sonrasında mikroskobik hasar değerlendirilmiş, tuz enjekte edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık izlenmezken; grup 3'e ait mikroskobik hasar skoru grup 1 ve grup 2'ye göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Grup 4'e ait hasar skoru grup 3'e göre azalma gösterirken, istatistiksel olarak anlamlılık izlenmemiştir.

Vagal antiinflamatuar reflekse dayalı nöromodülasyon, kronik inflamatuar hastalıklar için heyecan verici bir terapötik yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Pasricha ve arkadaşları, sakral sinir stimülasyonu'nun kolit için etkili bir tedavi olacağı düşünmüş, 2020 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, dekstran sodyum sülfat (DSS) ile kolit oluşturarak, artmış inflamatuar sitokinlerin yanı sıra önemli klinik ve histolojik bozulmalar tespit etmişlerdir. Dekstran sodyum sülfat 'ın oral

yolla uygulanması, granülosit, lökosit, monosit, inflamatuar infiltratlar ve ülserasyonlar ile karakterize edilen hafif bir inflamasyona neden olmuştur. On günlük SSS'den sonra, inflamatuar infiltrasyonun yerleşimi, ülserin iyileşmesi ve kolon mimarisinin ilerleyici bir restorasyonu dahil olmak üzere kolondaki inflamasyonda bir azalma olmuştur. Genel histolojik skorlar, SSS tarafından önemli ölçüde azaltılmış ve kolonik uzunlukta iyileşmeye doğru bir eğilim olmuştur. SSS'nin tedaviden sonraki beş gün içinde klinik iyileşmeyi desteklediği, ishal, kanama ve kilo kaybını iyileştirdiği, miyeloperoksidaz aktivitesi, dokudaki histolojik değerlendirmeler, TNF-α seviyeleri ve artan M2 makrofaj popülasyonu ile kolit'in iyileşmeyi desteklediği gösterilmiştir. Otonom Sinir Sistemi fonksiyonunun ve karşılık gelen simpatovagal nörotransmitterlerin rolü değerlendirilmiştir. İlginç bir şekilde, SSS'nin kolit indüksiyonundan sonra vagal aktiviteyi önemli ölçüde arttırdığı ve simpatik aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir. Sakral Sinir Stimülasyonu ile kolon dokusunda asetilkolin artmış, inflamatuar sitokinlerin ve makrofajların ekspresyonu değişmiş ve ayrıca sistemik inflamasyonda yer alan nörotransmiterleri modüle ettiği görülmüştür. Çalışmada, SSS'nin, asetilkolinin artması (parasimpatik aktivitenin belirteci olarak) ve nörepinefrinin azalması (simpatik aktivitenin bir belirteci olarak) ile kalp hızı değişkenliği (HRV) ve nörotransmitterlerdeki değişikliklerle kanıtlanan sempatovagal dengeyi düzenlediği tespit edilmiştir [96]. Bizim çalışmamızda, tuz enjekte edilen gruplara ait kolon dokuları normal görünümde izlenmiştir. Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilen tVSS yapılmayan gruptaki inflamasyon makroskobik olarak oldukça belirgin olarak izlenirken, TNBS enjekte edilen tVSS yapılan grup'taki inflamasyon makroskobik olarak gözlenmemiş kolonların longitudinal yönde uzamış ve incelmiş oldukları gözlenmiştir. Tuz enjekte edilmiş gruplar mukoza kalınlığı açısından karşılaştırıldığında, tVSS yapılan grup ile tVSS yapılmamış grup arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık görülmemiştir. Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilmiş gruplarda ise mukoza kalınlığı, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış olana göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise; kolit modeli oluşturulmuş grup olan TNBS enjekte edilmiş grupta mukoza kalınlığının, tuz

enjekte edilen gruba kıyasla arttığı görülmüştür. Gruplar kas kalınlığı açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılan grupta, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılmamış gruba istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş izlenmiştir. Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilmiş gruplarda ise, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış olana göre anlamlı bir düşüş görülmüştür. Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise; TNBS enjekte edilerek colit modeli oluşturulmuş grupta kas kalınlığının, tuz enjekte edilen gruba kıyasla azaldığı görülmüştür.

Ghia ve arkadaşları 2007'de, dekstran sodyum sülfat (DSS) ile oluşturulan deneysel kolit modelinde n. vagus'un birkaç hafta boyunca (3 döngü şeklinde) devam eden bir antiinflamatuar etkisinin olup olmadığını belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, hastalık aktivite indeksi, makroskopik ve histolojik hasar, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve tip I yardımcı T lenfosit (Th1) ve tip II yardımcı T lenfosit (Th2) sitokin profilleri değerlendirilmiş, vagotomize edilmiş farelerde birinci ve ikinci döngü sırasında iltihabın başlangıcı ve şiddetinin hızlanmış olduğu tespit edilmiştir. Ancak, üçüncü döngüde hızlanma gözlenmemiştir. Makroskopik skorlar önemli ölçüde değişmemiş olsa da, histolojik skorların arttığı, bunun yanı sıra MPO aktivitesi ve IL-1α, TNF-α, IFN-y ve IL-18'in kolon dokusundaki seviyelerinin vagotomize edilmiş kolit farelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Kontrol farelerinde (kolit olmayan-vagotomi yapılan), vagotominin kendi başına herhangi bir inflamatuar belirteci etkilemediği gözlenmiştir. Nervus vagus'un makrofaj-koloni uyarıcı faktör (M-CSF) kaynaklı makrofajları içeren bir mekanizma ile kronik koliti azalttığı, ancak bu korumanın geçici olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte n. vagus'un kronik inflamasyon zemininde akut relapslara karşı koruma sağladığını göstermiştir.[97] [98]. Çalışmamızda tVSS yapılan kolit grubunda tVSS yapılmayan kolit grubuna göre doku düzeyinde hem makroskopik hem de mikroskopik düzeyde anlamlı derecede inflamasyonun azaldığı tespit edilmiştir. Histopatolojik skorlama sonrasında mikroskobik hasar değerlendirilmiş; TNBS ile kolit oluşturulmuş grupta, tuz enjekte edilmiş grup 1 ve 2'ye kıyasla anlamlı yükseklik görülmüştür (sırasıyla; p=0,003 ve p=0,005). Bu sonuçlar doğrultusunda

tVSS'nin kolit grubunda antiinflamatuar etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda yapılan histopatolojik skorlama sonrasında mikroskobik hasar değerlendirilmiş, Grup 1 (TNBS- tVSS-) ve grup 2 (TNBS- tVSS+) arasında istatistiksel olarak anlamlılık izlenmezken (p=1,000); grup 3'e (TNBS+ tVSS-) ait mikroskobik hasar skoru grup 1 ve grup 2'ye göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırayla; p=0,003 ve p=0,005). Grup 4'e (TNBS+ tVSS+) ait hasar skoru grup 3'e göre azalma gösterirken, istatistiksel olarak anlamlılık izlenmemiştir (p=1,000).

Akupunktur, birçok hastalığın tedavisi için yıllardır yaygın olarak kabul görmüştür. Jin ve arkadaşları tarafından 2019 yılında, sıçanlarda TNBS tarafından indüklenen kolit üzerinde ST36 (Diz eklemi altında fibula başının 5 mm altında, arka bacağın tibia ön tüberkülünün 2 mm lateralinde) akupunktur noktasında kronik olarak implante edilen elektrotlar tarafından elektroakupunktur (EA)'un etkilerini ve mekanizmalarını belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Trinitrobenzen sülfonik asit'in intrarektal uygulamasından sonra, sıçanlar 3 hafta boyunca EA ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. İnflamatuar yanıtların değerlendirilmesi olarak hastalık aktivite indeksi (DAI), makroskopik ve mikroskobik lezyonlar, TNF-α, IL-1β ve IL-6 plazma seviyeleri gözlenmiştir. Otonomik fonksiyon, kalp hızı değişkenliğinin analizi ile değerlendirilmiştir. ST36'daki EA, vagal aktiviteyi arttırmış ve simpatik aktiviteyi azaltmıştır. Kronik EA, TNBS tarafından indüklenen kolitli sıçanlarda günlük gıda alımını arttırmıştır. Günlük gıda alımındaki bu değişiklikler, elektroakupunktur'un TNBS ile indüklenen kolitli sıçanlarda gastrointestinal fonksiyonları iyileştirebileceğini düşündürmüştür. Kronik EA'nın, makroskobik olarak gözlenen ödem, hiperemi, bağırsak duvarı kalınlaşması, mukozal erozyonlar ve ülserler dahil olmak üzere TNBS tarafından indüklenen kolon mukozası hasarını iyileştirdiği gözlenmiştir. Kronik EA, TNBS kaynaklı koliti histolojik olarak iyileştirmiştir. Histolojik kesitler, TNBS'nin neden olduğu, mukoza ve submukoza boyunca uzanan, granülosit lökomonositlerinin difüzyonu, enflamatuar infiltratlar ve ülserasyonlar dahil olmak üzere şiddetli inflamasyonun olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, TNBS grubundaki histolojik skorlar, kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde artmıştır (p<0.001). Üç haftalık EA sonrasında, özellikle inflamatuar

infiltrasyonun inhibisyonu ve ülser iyileşmesinin yanı sıra mukoza tabakasında goblet hücrelerinin varlığı ve kolon mimarisinin ilerleyici bir restorasyonu dahil olmak üzere kolonik hasarda çarpıcı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Elektro akupunktur ile kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında, histolojik skorların önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. ST36'dan yapılan elektrik stimülasyonu, otonomik mekanizma yoluyla proinflamatuar sitokinleri inhibe ederek TNBS ile indüklenerek kolit oluşturulan sıçanlarda kolon iltihabını iyileştirdiği gözlenmiştir [99]. Çalışmamızda, Grup 3'teki inflamasyon makroskobik olarak oldukça belirgin olarak gözlenmiştir. Transauricular VSS uygulanmış olan Grup 4'teki inflamasyon makroskobik olarak gözlenmezken kolonların longitudinal yönde uzamış ve incelmiş oldukları gözlenmiştir. Histolojik olarak yaptığımız değerlendirme sonucu Grup 1 ve grup 2'ye ait kolon dokuları normal histolojik yapıda oldukları görülmüştür. Kolonun mukoza tabakasında epitel ve kript yapıları düzenli görünüme sahiptir. Tunica mukoza, tunica submukoza, tunica muskularis ve tunica serosa katmanları belirgin olarak ayırt edilebilmiştir. Grup 3'te ülserasyon, mukoza, submukoza ve seroza katmanlarını içeren yoğun inflamasyon, bazı alanlarda nekrotik değişimler ve submukozal ödem dikkati çekmektedir. Epitel ve kript bütünlüğünün kaybolduğu izlenmiştir. Grup 4'te histopatolojik değişimlerin kısmen azaldığı, ancak bazı alanlarda lenfosit infiltrasyonunun ve epitel doku kaybının devam ettiği gözlenmiştir.

Enterik Sinir Sistemi'nin gelişimsel problemleri konjenital ve sonradan çevresel faktörlere maruziyet sonucu oluşmaktadır [100]. Otizmli hastalar genellikle bağırsak sorunları yaşarlar ancak bunun nedeni bilinmemektedir. Otizmle ilişkili birçok gen mutasyonu nöronal aktiviteyi etkilemektedir. Nöroligin-3 dahil sinaptik proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar otizm ile ilişkilidir. Nöroligin-3 bulunmayan farelerde beyin fonksiyonunun değişmiş olduğu bulunmuştur. Otizmle ilişkili nöroligin-3 geninin silindiği farelerde, bunun bağırsak nöron sayılarını veya hareketliliğini etkileyip etkilemediğini belirlemek için Leembruggen ve arkadaşları tarafından 2019'da bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada, nöroligin-3'ün silinmesinin enterik nöronları etkileyip etkilemediğini belirlemek için myenterik pleksustaki nöral belirteçler boyanmıştır. Mutant farelerin incelenen

tüm bağırsak bölgelerinde benzer bağırsak yapısına ve nöron sayılarına sahip oldukları bulunmuştur. Bununla birlikte, çapı genişlemiş kolonlara ve daha hızlı kolonik kas kasılmalarına sahip oldukları bulunmuştur. Mutant farelerde nöroligin-3'te nöronal alt kümelerin sayısı korunsa da, bu bulgular Nöroligin-3'ün ESS'deki inhibitör nöral yolları modüle ettiğini göstermektedir. Bu sonucun otizmde gastrointestinal bozuklukların altında yatan mekanizmalara katkıda bulunabileceği düşünülmüştür [101].

Enterik Sinir Sistemi'nin en karakteristik doğumsal anomalisi olan Hirschsprung hastalığı, çoklu genlerdeki mutasyonlarla bağırsağın terminal bölümünde değişken uzunluklarda tüm gangliyonların yokluğu şeklinde kendini gösteren bir hastalıktır [102]. Leembruggen ve arkadaşlarının 2020 yılında yapmış oldukları çalışmada [101], Hirschsprung hastalığı'nda ESS'ndeki nöroligin ve nöroksin regülasyonunun ekspresyon seviyeleri hakkında araştırma yapılmıştır. Bu sinaptik proteinlerin ekspresyon seviyelerinin, aganglionik ve geçiş segmentlerinde normal segmentlere kıyasla önemli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir. Bu çalışmada, nöroksin ve nöroligin'in ESS'de sinapsların tetiklenmesi için gerekli olduğunu gösterilmiştir. Wang ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, fare, kobay ve Hirschsprung hastalarının plexus myentericus'undaki postsinaptik nöronlar üzerinde, nöroliginlerin eksprese edildiği ortaya konmuştur. Bu araştırmanın sonuçlarına göre, nöroliginlerdeki anormalliğin Hirschsprung hastalığı ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiş, nöroliginlerin değişmesi ve anormal ekspresyonunun sinaptik fonksiyonu etkileyerek, Hirschsprung hastalığı'nın patogenezinde önemli rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır [103]. Bizim çalışmamızda, gruplar Nöroligin-I pozitif hücre sayımları açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş gruplardan tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür ($p<0.001$). Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilmiş gruplarda da aynı şekilde, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür ($p<0.001$). Gruplar Nöroksin-IIα pozitif hücre sayımları açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş gruplardan tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür ($p<0.001$).

Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilmiş gruplarda da aynı şekilde, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür ($p<0.001$). Transauricular VSS yapılmayan gruplardan tuz enjekte edilen grupta pozitif hücre sayısı, TNBS ile kolit oluşturulmuş gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Gruplar Nöroligin-I immunreaktivitesi yoğunluk yüzdesi yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; tuz enjekte edilmiş tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.001$). Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilmiş gruplarda, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre artış görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermemiştir ($p=0,9356$). Transauricular VSS yapılmamış gruplardan, TNBS ile colit oluşturulmuş grupta ise tuz enjekte edilen gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel anlamlı bir düşüş bulunmuştur ($p<0,001$). Transauricular VSS yapılmış gruplar enjeksiyon çeşidine göre karşılaştırıldığında ise, TNBS enjeksiyonu yapılan grupta, tuz enjeksiyonu yapılan gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p<0,05$). Gruplar Nöroksin-II α immunreaktivitesi yoğunluk yüzdesi yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; tuz enjekte edilmiş tVSS yapılan grupta, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılmamış gruba göre anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0.001$). Trinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilmiş gruplarda, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmamış gruba göre artış görülmüş, ancak bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermemiştir ($p=0,1116$). Transauricular VSS yapılmamış gruplardan, TNBS ile colit oluşturulmuş grupta ise tuz enjekte edilen gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel anlamlı bir düşüş bulunmuştur ($p<0,05$). Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise, TNBS enjeksiyonu yapılan grupta, tuz enjeksiyonu yapılan gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p<0,001$).

6. SONUÇ

Çalışmamızda yapılan makroskobik, mikroskobik, histolojik ve histopatolojik değerlendirmenin sonucunda tuz enjekte edilen gruplarda kolon dokusu normal olarak değerlendirilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık izlenmemiştir. Kolit grubuna baktığımızda hem makroskobik hemde mikroskobik düzeyde yoğun inflamasyon izlenmiştir (ülserasyon, nekroz, submukozal ödem vs.). Ayrıca, histopatolojik hasar skoru tuz enjekte edilen gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Vagus Sinir Stimülasyonu yapılan kolit grubuna baktığımızda ise makroskobik olarak inflamasyon izlenmemiş, bununla birlikte bağırsaklarda uzama ve duvar yapısında incelme gözlenmiştir. Histopatolojik değişimlerin kısmen azaldığı, ancak bazı alanlarda lenfosit infiltrasyonunun ve epitel doku kaybının devam ettiği görülmüştür. Mikroskobik hasar skoru kolit grubuna göre azalma gösterirken, istatistiksel olarak anlamlılık izlenmemiştir.

Gruplar mukoza kalınlığı açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilen gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık görülmemiştir. Kolit gruplarında ise mukoza kalınlığı, tVSS yapılan grupta, tVSS yapılmayan gruba göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. Transauricular VSS yapılan gruplar karşılaştırıldığında ise; kolit modeli oluşturulmuş grupta mukoza kalınlığının, tuz enjekte edilen gruba kıyasla arttığı görülmüştür.

Gruplar kas kalınlığı açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilen gruplar arasında tVSS yapılan grupta, yapılmayan gruba göre kas kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş izlenmiştir. Kolit gruplarında ise, tVSS yapılan grupta, yapılmayan gruba göre anlamlı bir düşüş görülmüştür. Transauricular VSS yapılan gruplar karşılaştırıldığında ise; kolit grubundaki kas kalınlığının, tuz enjekte edilen gruba kıyasla azaldığı görülmüştür.

Gruplar Nöroligin-I pozitif hücre sayımları açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş gruplar arasında tVSS yapılan grupta diğer gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür. Kolit gruplarında da aynı şekilde, tVSS yapılan grupta, yapılmayan gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür.

Gruplar Nöroksin-IIα pozitif hücre sayımları açısından karşılaştırıldığında, tuz enjekte edilmiş tVSS yapılan grupta, diğer gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür. Kolit gruplarında da aynı şekilde, tVSS yapılan grupta, diğer gruba göre pozitif hücre sayısında artış görülmüştür. Transauricular VSS yapılmayan gruplardan tuz enjekte edilen grupta pozitif hücre sayısı, kolit oluşturulan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Tuz enjekte edilen gruplar arasında tVSS yapılan grupta, diğer gruba göre nöroligin-I immunreaktivitesi yoğunluk yüzdesinde anlamlı bir düşüş görülmüştür. Kolit gruplarında, tVSS yapılan grupta, yapılmayan gruba göre artış görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermemiştir. Transauricular VSS yapılmamış gruplarda, kolit grubunda tuz enjekte edilen gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş bulunmuştur. Transauricular VSS yapılmış gruplar enjeksiyon çeşidine göre karşılaştırıldığında ise, Trinitrobenzen Sülfonik asit enjeksiyonu yapılan grupta, tuz enjeksiyonu yapılan gruba göre Nöroligin- 1 immunreaktivite yoğunluk yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır.

Tuz enjekte edilen gruplar karşılaştırıldığında VSS yapılan grupta diğer gruba göre nöroksin-II α immunreaktivitesi yoğunluk yüzdesinde anlamlı bir artış görülmüştür. Kolit gruplarında, tVSS yapılan grupta, diğer gruba göre artış görülmüş, ancak bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermemiştir. Transauricular VSS yapılmamış gruplardan, kolit oluşturulan grupta ise tuz enjekte edilen gruba göre istatistiksel anlamlı bir düşüş bulunmuştur. Transauricular VSS yapılmış gruplar karşılaştırıldığında ise, kolit oluşturulan grupta, tuz enjeksiyonu yapılan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır.

Transauricular VSS'nin noninvaziv yöntemleri, afferent vagal stimülasyonun etkilerini değerlendirmek için güvenli, daha az maliyetli ve daha erişilebilir bir alternatiftir. Transauricular VSS'nin bazı durumlarda MSS'yi modüle etmenin etkili bir yolu olduğu kanıtlanmıştır. Bildirilen sadece birkaç küçük yan etki ile güvenli ve kullanışlıdır. Bununla birlikte, etki mekanizması net değildir. Kulakta non-invaziv tVSS'nin, MSS'de invaziv servikal vagus sinir stimülasyonu'na benzer şekilde n.vagus projeksiyonlarını aktive ettiği gösterilmiştir

[58]. Nervus vagus'a noninvaziv erişimin ek bir yararı, patolojik olmayan popülasyonlarda temel araştırmalara izin vermesidir [28]. Dış kulağın yüzeyel duyu innervasyonunu sağlayan n. vagus'un ramus auricularis dalını elektriksel olarak uyarma kavramı, servikal VSS ile karşılaştırıldığında nispeten daha yenidir. İşleyişini ve işlevselliğini çevreleyen göreceli bir literatür eksikliği vardır [30]. Stimülasyon parametrelerinin, stimülasyon bölgelerinin ve elektrot tiplerinin beyin aktivasyonu ve klinik sonuçlar üzerindeki etkilerini araştırmak için daha titiz ve sistematik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu noktada bizim çalışmamız özgün değer olarak, kullandığımız stimülasyon parametreleri doğrultusunda, alınan makroskopik bulgular ve anlamlı presinaptik-postinaptik protein immunreaktivite yoğunluklarını gösteren IHC sonuçları ile tVSS'nin n. vagus aracılığı ile ESS üzerindeki etkilerinin gösterildiği literatürdeki ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda nöroligin-I, nöroksin-IIα immunreaktivite yoğunluk yüzdeleri sonuçlarının güvenirliliği, projenin devam eden bölümünde yapılacak western blot bulguları ile kıyaslanarak değerlendirilecektir.

7. KAYNAKLAR

[1] R. H. Howland, "Vagus Nerve Stimulation," Curr. Behav. Neurosci. Reports 2014 12, vol. 1, no. 2, pp. 64–73, Mar. 2014, doi: 10.1007/S40473-014-0010-5.

[2] E. Kaniusas, S. Kampusch, M. Tittgemeyer, F. Panetsos, R. F. Gines, M.Papa et al., "Current directions in the auricular vagus nerve stimulation I – A physiological perspective," Frontiers in Neuroscience, vol. 13, no. AUG. Frontiers Media S.A., 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.00854.

[3] S. Stereotactic, A. A. F. Desalles, and S. E. Krahl, "Surgical Neurology International Vagus nerve stimulation for epilepsy: A review of the peripheral mechanisms," doi: 10.4103/2152-7806.91610.

[4] D. J. Lanska, "J.L. Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s," Neurology, vol. 58, no. 3. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 452–459, Feb. 12, 2002, doi: 10.1212/WNL.58.3.452.

[5] J. Zabara, "Inhibition of Experimental Seizures in Canines by Repetitive Vagal Stimulation," Epilepsia, vol. 33, no. 6, pp. 1005–1012, Nov. 1992, doi: 10.1111/j.1528-1157.1992.tb01751.x.

[6] B. Mercante, F. Ginatempo, A. Manca, F. Melis, P. Enrico, and F. Deriu, "Anatomo-Physiologic Basis for Auricular Stimulation," doi: 10.1089/acu.2017.1254.

[7] F. Ranklin, H. E. Pstein, and J. K. G. Oyal, "Mechanısms Of Dısease The Enterıc Nervous System," Massachusetts Medical Society, 1996.

[8] Y. Jiang, H. Dong, L. Eckmann, E. M. Hanson, K. C. Ihn, and R. K. Mittal, "Visualizing the enteric nervous system using genetically engineered double reporter mice: Comparison with immunofluorescence," doi: 10.1371/journal.pone.0171239.

[9] T. C. Südhof, "Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease," Nature, vol. 455, no. 7215, pp. 903–911, Oct. 2008, doi: 10.1038/NATURE07456.

[10] H. S. Kim and A. Berstad, "Experimental colitis in animal models," Scand. J. Gastroenterol., vol. 27, no. 7, pp. 529–537, 1992, doi: 10.3109/00365529209000116.

[11] R. S.Snell, Klinik Nöroanatomi, 7. Nobel tıp kitabevleri, 2010.

[12] A. F. Agur, Anne M., Dalley, Moore Temel Klinik Anatomi, 6. ANKARA, 2020.

[13] M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, and K. Wesker, Prometheus Anatomi Atlası cilt 2, 1st ed. İSTANBUL: Nobel tıp kitabevleri, 2009.

[14] T. Doğan, Fonksiyonel Nöroanatomi, 10. ANKARA: ODTÜ Yayıncılık, 2011.

[15] M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Zabel, and K. Wesker, Prometheus Anatomi Atlası cilt 3, 1. İSTANBUL: Nobel tıp kitabevleri, 2009.

[16] H. R. Berthoud and W. L. Neuhuber, "Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system," in Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, Dec. 2000, vol. 85, no. 1–3, pp. 1–17, doi: 10.1016/S1566-0702(00)00215-0.

[17] B. Bonaz, V. Sinniger, D. Hoffmann, D. Clarençon, N. Mathieu, C. Dantzer et al., "Chronic vagus nerve stimulation in Crohn's disease: a 6-month follow-up pilot study," Neurogastroenterol. Motil., vol. 28, no. 6, pp. 948–953, Jun. 2016, doi: 10.1111/NMO.12792.

[18] R. L. Johnson and C. G. Wilson, "A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention," J. Inflamm. Res., vol. 11, pp. 203–213, 2018, doi: 10.2147/JIR.S163248.

[19] D. Adam, Farmer, Ahmed Albu-Soda, Qasim, Aziz, "Vagus nerve stimulation in clinical practice," http://dx.doi.org/10.12968/hmed.2016.77.11.645, vol. 77, no. 11, pp. 645–651, Nov. 2016, doi: 10.12968/HMED.2016.77.11.645.

[20] H. Yuan and S. D. Silberstein, "Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part II," Headache, vol. 56, no. 2, pp. 259–266, 2016, doi: 10.1111/head.12650.

[21] J. P. Beekwilder and T. Beems, "Overview of the clinical applications of vagus nerve stimulation," J. Clin. Neurophysiol., vol. 27, no. 2, pp. 130–138, 2010, doi: 10.1097/WNP.0b013e3181d64d8a.

[22] S. E. Krahl, K. B. Clark, D. C. Smith, and R. A. Browning, "Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation," Epilepsia, vol. 39, no. 7, pp. 709–714, 1998, doi: 10.1111/j.1528-1157.1998.tb01155.x.

[23] A. E. Dorr and G. Debonnel, "Effect of Vagus Nerve Stimulation on Serotonergic and Noradrenergic Transmission," J. Pharmacol. Exp. Ther., vol. 318, no. 2, pp. 890–898, Aug. 2006, doi: 10.1124/JPET.106.104166.

[24] F. Biggio, G. Gorini, C. Utzeri, P. Olla, F. Marrosu, I. Mocchetti *et al.*, "Chronic vagus nerve stimulation induces neuronal plasticity in the rat hippocampus," *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, vol. 12, no. 9, pp. 1209–1221, 2009, doi: 10.1017/S1461145709000200.

[25] P. Follesa, F. Biggio, G. Gorini, S. Caria, G. Talani, L.Dazzi *et al.*, "Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain," *Brain Res.*, vol. 1179, no. 1, pp. 28–34, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.045.

[26] E. T. Peuker and T. J. Filler, "The nerve supply of the human auricle," Clin. Anat., vol. 15, no. 1, pp. 35–37, Jan. 2002, doi: 10.1002/CA.1089.

[27] G. L. Morris, D. Gloss, J. Buchhalter, K. J. Mack, K. Nickels, and C. Harden, "Evidence-based guideline update: Vagus nerve stimulation for the treatment of epilepsy: Report of the guideline development subcommittee of the american academy of neurology," Neurology, vol. 81, no. 16, pp. 1453–1459, Oct. 2013, doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a393d1.

[28] B. R. Komisaruk and E. Frangos, "Vagus nerve afferent stimulation: Projection into the brain, reflexive physiological, perceptual, and behavioral responses, and clinical relevance," Auton. Neurosci. Basic Clin., vol. 237, no. November 2021, p. 102908, 2022, doi: 10.1016/j.autneu.2021.102908.

[29] R. H. Howland, L. S. Shutt, S. R. Berman, C. R. Spotts, and T. Denko, "The emerging use of technology for the treatment of depression and other neuropsychiatric disorders." Annals of Clinical Psychiatry 23(1):48-62, Feb. 2011

[30] M. F. Butt, A. Albusoda, A. D. Farmer, and Q. Aziz, "The anatomical basis for transcutaneous auricular vagus nerve stimulation," J. Anat., vol. 236, no. 4, pp. 588–611, Apr. 2020, doi: 10.1111/JOA.13122.

[31] J. J. Asconape, D. D. Moore, D. P. Zipes, L. M. Hartman, and W. H. Duffell, "Bradycardia and Asystole with the Use of Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Epilepsy: A Rare Complication of Intraoperative Device Testing," Lippincott Williams Kr Wilkins, Inc, 1999.

[32] "Servikal VSS Yöntemi." https://www.researchgate.net/figure/Placement-of-vagus-nerve-stimulation-device-As-illustrated-in-the-insert-upper-right_fig1_305844599.

[33] G. M. De Ferrari and P. J. Schwartz, "Vagus nerve stimulation: from pre-clinical to clinical application: challenges and future directions," Heart Fail Rev 16, 195-203, 2011 doi: 10.1007/s10741-010-9216-0.

[34] Gaetano M. De Ferrari, Harry J. G. M. Crijns, M. Borggrefe, G. Milasinovic, J. Smid, M. Zabel et al., “Chronic vagus nerve stimulation: a new and promising therapeutic approach for chronic heart failure for the CardioFit Multicenter Trial Investigators,” vol. 10, p. 13, doi: 10.1093/eurheartj/ehq424.

[35] A. Straube and O. Eren, “tVNS in the management of headache and pain,” Auton. Neurosci. Basic Clin., vol. 236, no. May, p. 102875, 2021, doi: 10.1016/j.autneu.2021.102875.

[36] M. Chen, L. Yu, F. Ouyang, Q. Liu, Z. Wang, S. Wang et al., “The right side or left side of noninvasive transcutaneous vagus nerve stimulation: Based on conventional wisdom or scientific evidence?,” Int. J. Cardiol., vol. 187, no.1, pp. 44–45, May 2015, doi: 10.1016/J.IJCARD.2015.03.351.

[37] G. Mirabella, A. Yadollahpour, C. Payne, Sophie, John B Furness, O. Burns, A. Sedo et al., “Anti-inflammatory Effects of Abdominal Vagus Nerve Stimulation on Experimental Intestinal Inflammation,” 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.00418.

[38] J. Y. Y. Yap, C. Keatch, E. Lambert, W. Woods, P. R. Stoddart, and T. Kameneva, “Critical Review of Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation: Challenges for Translation to Clinical Practice,” Front. Neurosci., vol. 14, p. 284, Apr. 2020, doi: 10.3389/FNINS.2020.00284/BIBTEX.

[39] B. G. Fahy, “Intraoperative and perioperative complications with a vagus nerve stimulation device,” J. Clin. Anesth., vol. 22, no. 3, pp. 213–222, May 2010, doi: 10.1016/J.JCLINANE.2009.10.002.

[40] Linda R.Watkins, Lisa E. Goehler, Jane K. Relton, N.Tartaglia, L. Silbert, D. Martin et al., “Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication,” Neurosci. Lett., vol. 183, no. 1–2, pp. 27–31, Jan. 1995, doi: 10.1016/0304-3940(94)11105-R.

[41] B. A. Malow, J. Edwards, M. Marzec, O. Sagher, and G. Fromes, “Effects of vagus nerve stimulation on respiration during sleep,” Neurology, vol. 55, no. 10, pp. 1450–1454, Nov. 2000, doi: 10.1212/WNL.55.10.1450.

[42] P. M. Santos, “Evaluation of laryngeal function after implantation of the vagus nerve stimulation device,” Otolaryngol. - Head Neck Surg., vol. 129, no. 3, pp. 269–273, Nov. 2003, doi: 10.1016/S0194-5998(03)00605-3.

[43] M. Marzec, J. Edwards, O. Sagher, G. Fromes, and B. A. Malow, “Effects of Vagus Nerve Stimulation on Sleep-related Breathing in Epilepsy Patients,” Epilepsia, vol. 44, no. 7, pp. 930–935, Jul. 2003, doi: 10.1046/J.1528-1157.2003.56202.X.

[44] J. Iriarte, E. Urrestarazu, M. Alegre, A. MacÍas, A. Gómez, P. Amaro et al., "Late-onset periodic asystolia during vagus nerve stimulation," Epilepsia, vol. 50, no. 4, pp. 928–932, Apr. 2009, doi: 10.1111/J.1528-1167.2008.01918.X.

[45] H. Stefan, G. Kreiselmeyer, F. Kerling, K.Kurzbuch, C.Rauch, M.Heers et al., "Transcutaneous vagus nerve stimulation (t-VNS) in pharmacoresistant epilepsies: A proof of concept trial," Epilepsia, vol. 53, no. 7, pp. e115– e118, Jul. 2012, doi: 10.1111/J.1528-1167.2012.03492.X.

[46] B. Bonaz, V. Sinniger, and S. Pellissier, "Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation," J. Physiol., vol. 594, no. 20, pp. 5781–5790, Oct. 2016, doi: 10.1113/JP271539.

[47] I. Lerman, R. Hauger, L. Sorkin, J. Proudfoot, B. Davis,A. Huang et al., "Noninvasive Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation Decreases Whole Blood Culture-Derived Cytokines and Chemokines: A Randomized, Blinded, Healthy Control Pilot Trial," Neuromodulation Technol. Neural Interface, vol. 19, no. 3, pp. 283–290, Apr. 2016, doi: 10.1111/NER.12398.

[48] B. Bonaz, V. Sinniger, and S. Pellissier, "Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease," J. Intern. Med., vol. 282, no. 1, pp. 46–63, Jul. 2017, doi: 10.1111/JOIM.12611.

[49] B. Bonaz, "Is-there a place for vagus nerve stimulation in inflammatory bowel diseases?," Bioelectron. Med., vol. 4, no. 1, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1186/s42234-018-0004-9.

[50] S. Reyt, C. Picq, V. Sinniger, D. Clarençon, B. Bonaz, and O. David, "Dynamic Causal Modelling and physiological confounds: A functional MRI study of vagus nerve stimulation," Neuroimage, vol. 52, no. 4, pp. 1456–1464, Oct. 2010, doi: 10.1016/J.NEUROIMAGE.2010.05.021.

[51] J. Meregnani, D. Clarençon, M. Vivier, A. Peinnequin, C. Mouret, V. Sinniger, et al., "Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease," Auton. Neurosci., vol. 160, no. 1–2, pp. 82–89, Feb. 2011, doi: 10.1016/J.AUTNEU.2010.10.007.

[52] P. S. Olofsson and K. J. Tracey, "Bioelectronic medicine: technology targeting molecular mechanisms for therapy," J. Intern. Med., vol. 282, no. 1, p. 3, Jul. 2017, doi: 10.1111/JOIM.12624.

[53] S. Nomura and N. Mizuno, "Central distribution of primary afferent fibers in the Arnold's nerve (the auricular branch of the vagus nerve): A transganglionic HRP study in the cat," Brain Res., vol. 292, no. 2, pp. 199–205, Feb. 1984, doi: 10.1016/0006-8993(84)90756-X.

[54] J. Ellrich, “Transcutaneous vagus nerve stimulation,” Eur. Neurol. Rev., vol. 6, no. 4, pp. 254–256, 2011, doi: 10.17925/ENR.2011.06.04.254.

[55] S. Dietrich, J. Smith, C. Scherzinger, K. Hofmann-Preiß, T. Freitag, A. Eisenkolb *et al.*, “A novel transcutaneous vagus nerve stimulation leads to brainstem and cerebral activations measured by functional MRI / Funktionelle Magnetresonanztomographie zeigt Aktivierungen des Hirnstamms und weiterer zerebraler Strukturen unter transkutaner Vagusnervstimulation,” vol. 53, no. 3, pp. 104–111, Jun. 2008, doi: 10.1515/BMT.2008.022.

[56] T. Kraus, K. H€ O Osl, O. Kiess, A. Schanze, J. Kornhuber, and C. Forster, “BOLD fMRI deactivation of limbic and temporal brain structures and mood enhancing effect by transcutaneous vagus nerve stimulation,” J Neural Transm, vol. 114, pp. 1485–1493, 2007, doi: 10.1007/s00702-007-0755-z.

[57] T. Kraus, O. Kiess, K. Hösl, P. Terekhin, J. Kornhuber, and C. Forster, “CNS BOLD fMRI Effects of Sham-Controlled Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation in the Left Outer Auditory Canal – A Pilot Study,” Brain Stimul., vol. 6, no. 5, pp. 798–804, Sep. 2013, doi: 10.1016/J.BRS.2013.01.011.

[58] S. S. Baig, M. Kamarova, A. Ali, L. Su, J. Dawson,J. N. Redgrave et al., “Transcutaneous vagus nerve stimulation (tVNS) in stroke: the evidence, challenges and future directions,” Auton. Neurosci. Basic Clin., vol. 237, no. April 2021, 2022, doi: 10.1016/j.autneu.2021.102909.

[59] T. Usichenko, H. Hacker, and M. Lotze, “Transcutaneous auricular vagal nerve stimulation (taVNS) might be a mechanism behind the analgesic effects of auricular acupuncture,” Brain Stimul., vol. 10, no. 6, pp. 1042–1044, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.brs.2017.07.013.

[60] G. N. Asher, D. E. Jonas, R. R. Coeytaux, A. C. Reilly, Y. L. Loh, A. A. Motsinger-Reif et al., “Auriculotherapy for Pain Management: A Systematic Review and Meta - Analysis of Randomized Controlled Trials https: // home.liebertpub.com/ acm, vol. 16, no. 10, pp. 1097 – 1108, Oct. 2010, doi: 10.1089/ACM.2009.0451.

[61] W. He, P. J. Rong, L. Li, H. Ben, B. Zhu, and G. Litscher, “Auricular acupuncture may suppress epileptic seizures via activating the parasympathetic nervous system: A hypothesis based on innovative methods,” Evidence-based Complement. Altern. Med., vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/615476.

[62] E. C. G. Ventureyra, “Transcutaneous vagus nerve stimulation for partial onset seizure therapy,” Child’s Nerv. Syst. 2000 162, vol. 16, no. 2, pp. 101–102, 2000, doi: 10.1007/S003810050021.

[63] A. J. Fallgatter et al., “Far field potentials from the brain stem after transcutaneous vagus nerve stimulation,” J. Neural Transm. 2003 11012, vol. 110, no. 12, pp. 1437–1443, Jan. 2003, doi: 10.1007/S00702-003-0087-6.

[64] J. Kong, J. Fang, J. Park, S. Li, and P. Rong, “Treating Depression with Transcutaneous Auricular Vagus Nerve Stimulation: State of the Art and Future Perspectives,” Front. Psychiatry, vol. 0, no. FEB, p. 20, Feb. 2018, doi: 10.3389/FPSYT.2018.00020.

[65] A. Straube, J. Ellrich, O. Eren, B. Blum, and R. Ruscheweyh, “Treatment of chronic migraine with transcutaneous stimulation of the auricular branch of the vagal nerve (auricular t-VNS): a randomized, monocentric clinical trial,” J. Headache Pain 2015 161, vol. 16, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2015, doi: 10.1186/S10194-015-0543-3.

[66] P. J. Rong, A. H. Liu, J. G. Zhang, Y. P. Wang, A. C. Yang, L. Li et al., “An alternative therapy for drug-resistant epilepsy: Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation,” Chin. Med. J. (Engl)., vol. 127, no. 2, pp. 300–304, 2014, doi: 10.3760/CMA.J.ISSN.0366-6999.20131511.

[67] P. Hyvarinen, S. Yrttiaho, J. Lehtimaki, R. J. Ilmoniemi, A. Makitie, J. Ylikoski et al., “Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation Modulates Tinnitus-Related Beta-and Gamma-Band Activity,” Ear Hear., vol. 36, no. 3, pp. e76–e85, Jul. 2015, doi: 10.1097/AUD.0000000000000123.

[68] A. Mertens, R. Raedt, S. Gadeyne, E. Carrette, P. Boon, and K. Vonck, “Recent advances in devices for vagus nerve stimulation,” https://doi.org/10.1080/17434440.2018.1507732, vol. 15, no. 8, pp. 527–539, Aug. 2018, doi: 10.1080/17434440.2018.1507732.

[69] N. J. Spencer and H. Hu, “Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility,” Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2020 176, vol. 17, no. 6, pp. 338–351, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41575-020-0271-2.

[70] M. D. Gershon and H. Nakamura, “Functional Anatomy of the Enteric Nervous System,” Hirschsprung’s Dis. Allied Disord., pp. 31–76, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-15647-3_3.

[71] B. Niesler, S. Kuerten, I. E. Demir, and K.-H. Schäfer, “Disorders of the enteric nervous system — a holistic view,” Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2021 186, vol. 18, no. 6, pp. 393–410, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41575-020-00385-2.

[72] J. B. Furness, B. P. Callaghan, L. R. Rivera, and H.-J. Cho, “The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control,” Adv. Exp. Med. Biol., vol. 817, pp. 39–71, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_3.

[73] P. Forsythe, J. Bienenstock, and W. A. Kunze, “Vagal Pathways for Microbiome-Brain-Gut Axis Communication,” Adv. Exp. Med. Biol., vol. 817, pp. 115–133, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_5.

[74] J. B.Furness, “Frontmatter,” in The Enteric Nervous System. Blackwell Publishing, 2006, pp. i–xiii. Retrieved from https://pdfs.semanticscholar.org/91d6/8122b89631fe61bc416c9d633f7b7ef39f2b.pdf

[75] J. B. Furness, “Types of neurons in the enteric nervous system,” J. Auton. Nerv. Syst., vol. 81, no. 1–3, pp. 87–96, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0165-1838(00)00127-2.

[76] Quizlet Inc., “Constipation/Diarrhea”, Erişim adresi: https://quizlet.com/267687750/25-constipationdiarrhea-flash-cards/.(Erişim tarihi: 30. 03. 2022)

[77] E. R. Graf, X. Zhang, S. X. Jin, M. W. Linhoff, and A. M. Craig, “Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins,” Cell, vol. 119, no. 7, pp. 1013–1026, Dec. 2004, doi: 10.1016/J.CELL.2004.11.035.

[78] Y. Tian, T. Li, M. Sun, D. Wan, Q. Li, P. Li, et al., “Neurexin Regulates Visual Function via Mediating Retinoid Transport to Promote Rhodopsin Maturation,” Neuron, vol. 77, no. 2, pp. 311–322, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.NEURON.2012.11.012.

[79] C. Reissner, M. Klose, R. Fairless, and M. Missler, “Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components,” Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 105, no. 39, pp. 15124–15129, Sep. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0801639105.

[80] I. A. Sindi, R. K. Tannenberg, and P. R. Dodd, “A role for the neurexineneuroligin complex in Alzheimer’s disease,” Neurobiology of Aging, Volume 35, Issue 4, Pages 746-756, April 2014, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.032.

[81] K. Ichtchenko, Y. Hata, T. Nguyen, B. UIIrich, M. Messier, C. Moomaw, et al., “Neuroligin 1: A splice site-specific ligand for β-neurexins,” Cell, vol. 81, no. 3, pp. 435–443, May 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)903968.

[82] C. Dean and T. Dresbach, “Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function,” Trends Neurosci., vol. 29, no. 1, pp. 21–29, Jan. 2006, doi: 10.1016/J.TINS.2005.11.003.

[83] A. C. Reichelt, R. J. Rodgers, and S. J. Clapcote, “The role of neurexins in schizophrenia and autistic spectrum disorder,” Neuropharmacology, vol. 62, no. 3, pp. 1519–1526, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.NEUROPHARM.2011.01.024.

[84] T. Bourgeron, “A synaptic trek to autism,” Curr. Opin. Neurobiol., vol. 19, no. 2, pp. 231–234, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.CONB.2009.06.003.

[85] J. C. Hoffmann, N. N. Pawlowski, A. A. Kühl, W. Höhne, and M. Zeitz, “Animal Models of Inflammatory Bowel Disease: An Overview,” Pathobiology, vol. 70, no. 3, pp. 121–130, 2002, doi: 10.1159/000068143.

[86] M. Fiona Powrie, “T Cells in Inflammatory Bowel Disease: Protective and Pathogenic Roles,” Immunity, vol. 3, pp. 171–174, 1995.

[87] W. Strober, I. J. Fuss, and R. S. Blumberg, “The Immunology of Mucosal Models of Inflammation1,” https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816, vol. 20, pp. 495–549, Nov. 2003, doi: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.20.100301.064816.

[88] Vagustim, ' Vagus Nerve Stimulation Device for Animal Research', Erişim adresi: https://vagustim.io/vagus-nerve-stimulation-animal-research-2/., Erişim tarihi: 10. 03. 2022.

[89] Y. H. Wang, J. Dong, J. X. Zhang, J. Zhai, and B. Ge, “Effects of mimic of manganese superoxide dismutase on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats,” Arch. Pharm. Res., vol. 39, no. 9, pp. 1296–1306, 2016, doi: 10.1007/s12272-016-0811-z.

[90] J. Gálvez, G. Coelho, M. E. Crespo, T. Cruz, M. E. Rodríguez-Cabezas, A. Concha et al., “Ginsenoside metabolite compound K promotes recovery of dextran sulfate sodium-induced colitis and inhibits inflammatory responses by suppressing NF-κB activation,” Aliment. Pharmacol. Ther., vol. 15, no. 12, pp. 2027–2039, 2001, doi: 10.1046/j.1365-2036.2001.01133.x.

[91] J. L. Salzmann, F. Peltier-Koch, F. Bloch, J. P. Petite, and J. P. Camilleri, “Morphometric study of colonic biopsies: a new method of estimating inflammatory diseases,” Lab. Invest., vol. 60, no. 6, p. 847—851, Jun. 1989, [Online]. Available: http://europepmc.org/abstract/MED/2733385.

[92] C. M. Hogaboam, K. Jacobson, S. M. Collins, and M. G. Blennerhassett, “The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis,” Am. J. Physiol., vol. 268, no. 4 Pt 1, 1995, doi: 10.1152/AJPGI.1995.268.4.G673.

[93] S. Sanovic, D. P. Lamb, and M. G. Blennerhassett, “Damage to the enteric nervous system in experimental colitis,” Am. J. Pathol., vol. 155, no. 4, pp. 1051–1057, 1999, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65207-8.

[94] M. D. Gershon, A. Chalazonitis, and T. P. Rothman, “From neural crest to bowel: Development of the enteric nervous system,” J. Neurobiol., vol. 24, no. 2, pp. 199–214, Feb. 1993, doi: 10.1002/NEU.480240207.

[95] L. Tu, P. Gharibani, J. Yin, and J. D. Z. Chen, “Sacral nerve stimulation ameliorates colonic barrier functions in a rodent model of colitis,” Neurogastroenterol. Motil., vol. 32, no. 10, Oct. 2020, doi: 10.1111/NMO.13916.

[96] T. S. Pasricha, H. Zhang, N. Zhang, and J. D. Z. Chen, “Sacral nerve stimulation prompts vagally-mediated amelioration of rodent colitis,” Physiol. Rep., vol. 8, no. 1, p. e14294, Jan. 2020, doi: 10.14814/PHY2.14294.

[97] B. Bonaz, V. Sinniger, and S. Pellissier, “Therapeutic Potential of Vagus Nerve Stimulation for Inflammatory Bowel Diseases,” Front. Neurosci., vol. 15, p. 300, Mar. 2021, doi: 10.3389/FNINS.2021.650971/BIBTEX.

[98] J. E. Ghia, P. Blennerhassett, R. T. El-Sharkawy, and S. M. Collins, “The protective effect of the vagus nerve in a murine model of chronic relapsing colitis,” Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol., vol. 293, no. 4, pp. 711–718, Oct. 2007, doi: 10.1152/AJPGI.00240.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH301007488500006.JPEG.

[99] H. Jin, J. Guo, J. Liu, B. Lyu, R. D. Foreman, J. Yin et al., “Anti-inflammatory effects and mechanisms of vagal nerve stimulation combined with electroacupuncture in a rodent model of TNBS-induced colitis,” Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., vol. 313, no. 3, pp. G192–G202, Sep. 2017, doi: 10.1152/AJPGI.00254.2016.

[100] Q. Zhang,J. Wang, A.Li, H. Liu, W. Zhang, X. Cui et al., “Expression of neurexin and neuroligin in the enteric nervous system and their down-regulated expression levels in Hirschsprung disease,” Mol. Biol. Rep., vol. 40, no. 4, pp. 2969–2975, Apr. 2013, doi: 10.1007/S11033-012-2368-3.

[101] A. J. L. Leembruggen, G. K. Balasuriya, J. Zhang, S. Schokman, K. Swiderski, J. C. Bornstein, et al., “Colonic dilation and altered ex vivo gastrointestinal motility in the neuroligin-3 knockout mouse,” Autism Res., vol. 13, no. 5, pp. 691–701, May 2020, doi: 10.1002/AUR.2109.

[102] T. A. Heanue and V. Pachnis, “Enteric nervous system development and Hirschsprung’s disease: advances in genetic and stem cell studies,” Nat. Rev. Neurosci., vol. 8, no. 6, pp. 466–479, 2007, doi: 10.1038/nrn2137.

[103] J. Wang, Y. Mou, Q. Zhang, F. Zhang, and H. Yang, “Expression and Significance of Neuroligins in Myenteric Cells of Cajal in Hirschsprung’s Disease,” PLoS One, vol. 8, no. 6, p. 67205, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0067205.

8. ÖZET

DENEYSEL KOLİT MODELİNDE TRANSAURICULAR VAGAL STİMÜLASYONUN ENTERİK SİNİR SİSTEMİ SİNAPS OLUŞUMU VE BAĞIRSAK MORFOMETRİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Bu çalışmada deneysel kolit oluşturulan ratlarda tVSS'nin enterik sinir sistemi (ESS)'nde sinaps oluşumu ve bağırsak morfometrisi üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

En uzun kraniyal sinir olan nervus vagus (VS), medulla oblongata'dan başlar ve colon transversum' un 1/3 distaline kadar devam eder. Otonomik, kardiyovasküler, solunum, gastrointestinal, immün ve endokrin sistemlerle ilgilidir. Dış kulak, nervus vagus'un vücutta periferik dalını gönderdiği tek yerdir. Kulak kepçesinin arka yüzü, dış kulak yolunun arka bölümü ve kulak zarının buraya komşu olan bölümünden duyu alır. Enterik Sinir Sistemi, gastrointestinal sistemde "bağırsakların beynini" oluşturan ve merkezi sinir sisteminden bağımsız olarak işlev gören nöronların bir araya gelmesiyle oluşmuş bir sistemdir. Enterik Sinir Sistemi, mukozal bariyer arasına ve kas katmanları içine entegre edilmiştir. Sadece gastrointestinal motiliteyi değil, aynı zamanda sekresyon, besin emilimi, bağışıklığın düzenlenmesi ve savunma gibi çok çeşitli gastrointestinal fonksiyonları da düzenlemektedir. Beyin, nöronları iletişim halindeki geniş hücre ağlarına bağlayan sinapslarda sinyaller ileterek bilgiyi işler. Bu ağlarda sinapslar sadece sinyalleri iletmekle kalmaz, aynı zamanda onları dönüştürür ve iyileştirir. Nöroksin'ler ve nöroligin'ler, sinapslardaki presinaptik ve postsinaptik nöronları birbirine bağlayan, sinaps boyunca sinyalleşmeye aracılık eden ve sinaptik işlevleri belirleyerek sinir ağlarının özelliklerini şekillendiren sinaptik hücre yapışma moleküleridir.

Yaptığımız çalışmada; kolit trinitrobenzen sülfonik asidin (TNBS) kolon içine damlatılmasıyla indüklenmiştir. Kontrol gruplarına kolon içine salin enjekte edilmiştir. Hayvanlara art arda on gün boyunca günde 2 kez 30 dakika süreyle tVSS yapılmıştır. Kolondaki iltihaplanma makroskopik, mikroskobik histolojik,

histopatolojik, Nöroligin-I ve Nöroksin-IIα pozitif hücre sayımları, nöroligin-I ve Nöroksin-IIα immunreaktivite analizleri ile değerlendirilmiştir.

Vagus sinir stimülasyonu'nun antiinflamatuar özellikleri, çeşitli deneysel inflamasyon modellerinde rapor edilmiştir, ancak deneysel kolit modelinde tVSS ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Dış kulağın yüzeysel duyusal innervasyonunu sağlayan n. vagus'un auricular dalının elektriksel olarak uyarılması kavramı, servikal VSS ile karşılaştırıldığında nispeten yenidir. İşleyişini ve işlevselliğini çevreleyen göreceli bir literatür eksikliği vardır. Bu ihtiyaç doğrultusunda deneysel kolit oluşturulan ratlarda tVSS ile çalışmamızı gerçekleştirdik. Bu noktada bizim çalışmamız özgün değer olarak, kullandığımız stimülasyon parametreleri doğrultusunda, alınan makroskopik bulgular ve anlamlı presinaptik-postinaptik protein immunreaktivite yoğunluklarını gösteren IHC sonuçları ile tVSS'nin n. vagus aracılığı ile ESS üzerindeki etkilerinin gösterildiği literatürdeki ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nervus vagus, transauricular vagal sinir stimülasyonu, Nöroligin-I, Nöroksin-IIα, kolit, TNBS, rat

9. SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF TRANSAURICULAR VAGAL STIMULATION ON ENTERIC NERVOUS SYSTEM SYNAPSE FORMATION AND INTESTINAL MORPOMETRY IN EXPERIMENTAL COLITIS MODEL

Our aim in this study is to examine the effects of transauricular vagus nerve stimulation (tVNS) on synapse formation and intestinal morphometry in the enteric nervous system of experimental colitis in rats.

The longest cranial nerve, the vagus nerve (VS), starts from the medulla oblongata and continues up to the distal 1/3 of the colon transversum. It pertains to the autonomic, cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, immune, and endocrine systems. The external ear is the only place in the body where the vagus nerve sends its peripheral branch. It receives sensation from the posterior surface of the auricle, the posterior part of the external auditory canal and the adjacent part of the eardrum. The enteric nervous system (ENS) is a system formed by the combination of neurons that form the “brain of the intestines” in the gastrointestinal tract and that function independently of the central nervous system. ENS is integrated between the mucosal barrier and within the muscle layers. It regulates not only gastrointestinal motility, but also a wide variety of gastrointestinal functions such as secretion, nutrient absorption, immune regulation and defense. The brain processes information by transmitting signals at synapses that connect neurons to large networks of communicating cells. In these networks, synapses not only transmit signals, but also transform and improve them. Neuroxins (NRXNs) and neuroligins (NLGNs) are synaptic cell adhesion molecules that connect presynaptic and postsynaptic neurons at synapses, mediate signaling across the synapse, and shape the properties of neural networks by determining synaptic functions.

In our study; colitis was induced by instillation of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) into the colon. The control groups were injected with saline into the colon. Animals underwent tVSS for 30 minutes, 2 times a day for ten consecutive days. Inflammation in the colon was evaluated by macroscopic, microscopic

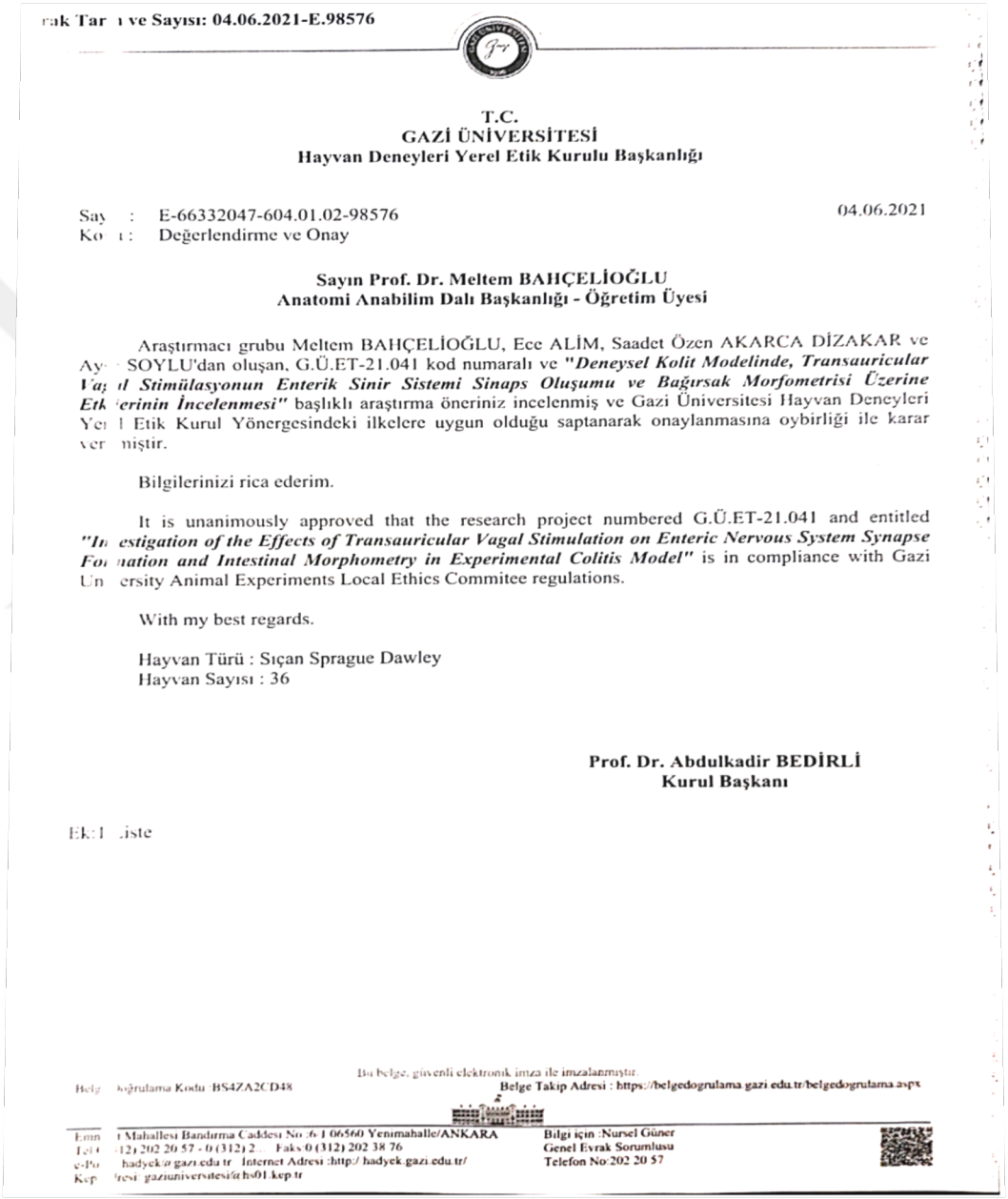
histological, histopathological, Neuroligin-I and Neuroxin-II α positive cell counts, neuroligin-I and Neuroxin-IIα immunoreactivity assays.

The anti-inflammatory properties of VNS have been reported in various experimental models of inflammation, but there has been no study of tVNS in the experimental colitis model. The concept of electrically stimulating the auricular branch of the vagus nerve, which provides the superficial sensory innervation of the external ear, is relatively new compared to cervical VNS. There is a relative lack of literature surrounding its functioning and functionality. In line with this need, we carried out our study with tVNS in rats. There is a relative lack of literature surrounding its functioning and functionality. At this point, our study is the first study in the literature to show the effects of tVNS on ESS via the vagus nerve, with macroscopic findings and IHC results showing significant presynaptic-postynaptic protein immunoreactivity intensities, in line with the stimulation parameters we used, as an original value.

Keywords: Vagus nerve, transauricular vagal nerve stimulation, Neuroligin-I, Neuroxin-IIα, colitis, TNBS, rat

10. EKLER

EK-1.



rak Tar ı ve Sayısı: 04.06.2021-E.98576

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Say : E-66332047-604.01.02-98576 04.06.2021
Ko ı : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU
Anatomi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Meltem BAHÇELİOĞLU, Ece ALİM, Saadet Özen AKARCA DİZAKAR ve Ay SOYLU'dan oluşan, G.Ü.ET-21.041 kod numaralı ve ***"Deneysel Kolit Modelinde, Transauricular Vag ıl Stimülasyonun Enterik Sinir Sistemi Sinaps Oluşumu ve Bağırsak Morfometrisi Üzerine Etk erinin İncelenmesi"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yer l Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar ver niştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.041 and entitled ***"In estigation of the Effects of Transauricular Vagal Stimulation on Enteric Nervous System Synapse Fo nation and Intestinal Morphometry in Experimental Colitis Model"*** is in compliance with Gazi Un ersity Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Sıçan Sprague Dawley
Hayvan Sayısı : 36

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek: l .iste

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belg oğrulama Kodu :BS4ZA2CD48 Belge Takip Adresi : https://belgedogrulama.gazi.edu.tr/belgedogrulama.aspx

Emn ı Mahallesi Bandırma Caddesi No:6 1 06560 Yenimahalle/ANKARA Bilgi için :Nursel Güner
Tel :12) 202 20 57 - 0 (312) 2 Faks 0 (312) 202 38 76 Genel Evrak Sorumlusu
e-Po hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http:/ hadyek.gazi.edu.tr/ Telefon No:202 20 57
Kep resi: gaziuniversitesi/eths01.kep.tr

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 21/05/2021	TOPLANTI SAYISI : 04
ADI-SOYADI	**İMZA**
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Prof.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

Evrak Tarih ve Sayısı: 30.12.2021-E.249706

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-249706 30.12.2021
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU
Anatomi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 04.06.2021 tarih ve E.98576 sayılı yazımız ile onay alan, araştırmacı grubu Meltem BAHÇELİOĞLU, Ece ALİM, Saadet Özen AKARCA DİZAKAR ve Ayşe SOYLU'dan oluşan G.Ü.ET-21.041 kod numaralı ve ***"Deneysel Kolit Modelinde, Transauricular Vagal Stümülasyonun Enterik Sinir Sistemi Sinaps Oluşumu ve Bağırsak Morfometrisi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi"*** başlıklı araştırma önerisi ile ilgili alınan 30.07.2021 tarihli dilekçe konusu Kurulumuzun **27.08.2021** tarih ve **06** sayılı toplantısında incelenmiş olup,

Çalışmanızda iki hayvan grubunda yaşanan kayıplardan ötürü istatistiksel değerlendirmelerin sağlıklı yapılabilmesi için 6 adet Spraque-Dawley Sıçanın eklenmesi ile hayvan deneyleri aşamasının gerçekleştirilmesine katılmak üzere araştırmacı grubuna Kerem ATALAR ve Özgenur KOÇAK'ın da dahil edilmesi ile ilgili talebin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BSRCRR1RF2 Belge Takip Adresi : https://belgedogrulama.gazi.edu.tr/belgedogrulama.aspx

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr
Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrak Tarih ve Sayısı: 30.12.2021-E.249706

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 27/08/2021	TOPLANTI SAYISI : 06
ADI-SOYADI	**İMZA**
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Prof.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Ayşe
Soyadı. : SOYLU
Doğum Yeri : DENİZLİ
Eğitim:
Tıpta Uzmanlık : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı (2019-devam ediyor)
Tıpta Uzmanlık : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı (2006-2008)
Lisans : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (1997-2004)
Lise : Denizli Lisesi (1994-1997)
Yabancı Dil : İngilizce
Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: TAKAD