



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
SULTAN 2. ABDÜLHAMİD HAN SAĞLIK UYGULAMA VE
ARAşTIRMA MERKEZİ
GENEL CERRAHİ KLİNİĞİ

NON-İNVAZİV TRANSAURİCULAR VAGAL UYARININ
KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
ETKİSİ

Dr. Mahmut Salih Genç

İSTANBUL/2024



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
SULTAN 2. ABDÜLHAMİD HAN SAĞLIK UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ
GENEL CERRAHİ KLİNİĞİ**

**NON-İNVAZİV TRANSAURİKULAR VAGAL UYARININ
KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
ETKİSİ**

Dr. Mahmut Salih Genç

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bülent Güleç
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

İSTANBUL/2024

TEŞEKKÜR

Genel cerrahi uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle gelişimimde önemli bir katkı sağlayan, mesleki birikimlerini her daim paylaşmaktan geri durmayan, zor anlarımızda her zaman yanımda olduğunu hissettiren, alanındaki engin bilgi birikimi ve titiz çalışmalarıyla hepimize ilham kaynağı olan, tüm eğitim sürecim boyunca benim için örnek bir hekim, bilim insanı ve aynı zamanda kıymetli bir mentor olan Sayın Prof. Dr. Bülent Güleç'e;

Bu zorlu süreç boyunca, her konuda desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan, yol gösterici yaklaşımları ve mesleki katkılarından ötürü minnet duyduğum kıymetli hocam Prof. Dr. Ömer Faruk Özkan'a;

Cerrahi eğitim yolculuğumda tanışmaktan onur duyduğum, sabrı ve azmiyle çalışmam için beni her zaman teşvik eden, cerrahi gelişimimde öncülük eden ve her anlamda desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Uğur Kesici'ye;

Asistanlık sürecimde bilgi, deneyim ve rehberlikleriyle beni eğiten; katkılarından ötürü şükran duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Yavuz Kurt, Prof. Dr. İlker Sücüllü, Doç. Dr. Gülçin Ercan, Doç. Dr. Yavuz Poyrazoğlu, Op. Dr. S. Emine Bölük, Op. Dr. Süleyman Atalay, Op. Dr. M. Özgün Yüksek, Op. Dr. Hakan Çakıt, Op. Dr. L. Damla Ercan, Op. Dr. Haron Cemel, Op. Dr. Murat Kalın, Op. Dr. Mustafa Demir, Op. Dr. Taygun Gülşen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Op. Dr. Cemil Adaş, Op. Dr. Hilal Kızıltoprak, Op. Dr. Haluk Karakullukçu başta olmak üzere, tüm değerli hocalarıma ve uzmanlarıma;

Değerli dostluğunu her zaman yanımda hissettiğim Dr. Furkan Mazlum ve bu süreçte çalışma fırsatı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma;

Genel Cerrahi Kliniği çatısı altında servis, ameliyathane, poliklinik ve endoskopi ünitelerinde çalışarak desteklerini esirgemeyen tüm hemşire ve sağlık personeline;

Tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlusu Uzm. Vet. Hek. Cumaali Demirtaş ve laboratuvar çalışanlarına, patoloji kliniğinden Uzm. Dr. Ayşe Gökçen Sade'ye, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Eray Metin Güler ve Kübra Bozali'ye, ayrıca desteklerinden dolayı kardiyoloji kliniğinden Dr. Samet Yavuz ve Dr. Şahhan Kılıç'a;

Bu süreçte yanımda olan, desteğini ve sevgisini her an hissettiren sevgili eşim Kübra'ya ve her daim yanımda olduklarını bildiğim, fedakârlıkları ve sonsuz destekleriyle beni bu noktaya taşıyan aileme en derin şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
GRAFİK LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
1. KARACİĞER ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ	3
1.1. KARACİĞERİN LOB VE SEGMENTLERİ	4
1.2. KARACİĞERİN VASKÜLER YAPISI	6
1.3. KARACİĞERİN HİSTOLOJİK VE FİZYOLOJİK YAPISI.....	8
2. İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI.....	10
2.1. KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI.....	10
2.2. KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA NRF-2 VE OKSİDATİF STRES İLİŞKİSİ	13
3. HEPATİK SİNİR SİSTEMİ.....	16
3.1 HEPATİK SİNİR SİSTEMİNİN EKSTRİNSİK ANATOMİSİ.....	17
3.2 HEPATİK AFFERENT SİNİRLER.....	18
3.3 HEPATİK SİNİRLERİN HORMON VE SİTOKİNLERLE İLİŞKİSİ.....	18
4. VAGUS NÖROANATOMİSİ.....	19

5. VAGUS SİNİR UYARIMI (VSU)	22
5.1. İNVAZİV VSU.....	24
5.2. NON-İNVAZİV VSU.....	26
5.2.1 TRANSAURİCULAR VAGUS SİNİR UYARIMI (TVSU)	26
5.2.1.1. TVSU ETKİ MEKANİZMASI.....	28
5.2.1.2. TVSU UYGULAMA TEKNİĞİ.....	29
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	30
BULGULAR.....	40
TARTIŞMA.....	57
SONUÇLAR.....	64
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	78
EKLER.....	79
EK 1. TEZ KONUSU ONAY FORMU	79
EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU	80
EK 3. VAGUSSTİM CİHAZI CE ONAY FORMU.....	81

KISALTMALAR

- VSAD:** Vagus sinirinin auricular dalı
VDMN: Vagusun dorsal motor nucleusu
HSS: Hepatik sinir sistemi
Gİ: Gastrointestinal
KTA Kalp tepe atımı
MSS: Merkez sinir sistemi
NTS: Nucleus tractus solitarii
TNF: Tümör nekrozis faktör
tVSU: Transauricular vagus sinir uyarımı
VS: Vagus siniri
VSU: Vagus sinir uyarımı
iVSU: İnvaziv Vagus sinir uyarımı
nVSU: Non-invaziv Vagus sinir uyarımı
I/R: İskemi reperfüzyon
İVK: İnförior vena kava
ROS: Reaktif oksijen türleri
Nrf-2: Nükleer faktör eritroid ilişkili faktör 2
HO-1: Heme oksijenaz 1
ARE: Antioksidan yanıt elemanı
KEAP-1: Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1
NF-kB: Nükleer faktör kappa B
A7NACHR: Alfa 7 nikotinik asetilkolin reseptörü
HİR: Hepatik iskemi reperfüzyon
NA: Nükleus ambiguus
DMV: Dorsal motor çekirdek
sTN: Spinal trigeminal nükleus

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Karaciğer lobları

Tablo 2: Karaciğer subsegmentleri

Tablo 3: Hepatosit zonları

Tablo 4: Sıçan Deney Grupları

Tablo 5: Suzuki sınıflandırması

Tablo 6: Araştırma gruplara göre doku biyokimya ölçüm sonuçları

Tablo 7: Araştırma gruplara göre serum biyokimya ölçüm sonuçları

Tablo 8: Araştırma gruplarına göre bazı histolojik parametreler

Tablo 9: İR+tVSU grubunda işlem öncesi ve sonrası nabız düzeyi

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum TOS düzeyi

Grafik 2: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum TAS düzeyi

Grafik 3: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum OSI düzeyi

Grafik 4: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum MDA düzeyi

Grafik 5: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum NRF2 düzeyi

Grafik 6: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum IL-1b düzeyi

Grafik 7: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum IL-6 düzeyi

Grafik 8: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum IL-10 düzeyi

Grafik 9: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum TNF-a düzeyi

Grafik 10: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum HIF-1a düzeyi

Grafik 11: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum MPO düzeyi

Grafik 12: Araştırma gruplara göre serum TT düzeyi

Grafik 13: Araştırma gruplara göre serum NT düzeyi

Grafik 14: Araştırma gruplara göre serum DİS düzeyi

Grafik 15: Araştırma gruplara göre serum NT/TT(%) düzeyi

Grafik 16: Araştırma gruplara göre serum DİS/TT(%) düzeyi

Grafik 17: Araştırma gruplara göre serum DİS/NT(%) düzeyi

Grafik 18: Araştırma gruplarına göre hepatosit sitoplazma vakuolizasyonu ve hepatosit nekrozu varlığı

Grafik 19: İR+tVSU grubunda işlem öncesi ve sonrası nabız düzeyi

şEKİL LİSTESİ

şekil 1: Karaciğer loblarının vasküler plana göre dağılımı

şekil 2: Portal Venöz Drenaj

şekil 3: Sinüzoidal kapiller damar yoluyla merkezi bir vene doğru drene olan portal triadı gösteren hepatik lobül

şekil 4: İskemi/Reperfüzyon hasarı mekanizması

şekil 5: Nrf2-Keap-1 sinyal iletim yolu

şekil 6: Nrf2 hedef genleri tarafından yönlendirilen hücresel fonksiyonların şematik gösterimi

şekil 7: Vagus sinirinin auriküler dalı (VSAD) aracılığıyla parasempatik aktivasyonun iki olası mekanizması.

şekil 8: Anestezi altındaki sıçana tVSU uygulaması

şekil 9: Karaciğer diseksiyonu ve sol portal triad klempleme işlemi

şekil 10: Klip koyma işlemi sonrası iskemiye giden karaciğer lobu

şekil 11: Vagal uyarım esnasında altında ekokardiyografi çekimi

şekil 12: tVSU öncesi ekokardiyografi görüntüsünde R-R mesafesi

şekil 13: tVSU sonrası ekokardiyografi görüntüsünde R-R mesafesi

şekil 14: Kontrol, İ/R ve tVSU gruplarının 10x, 20x ve 40x büyütmede H-E boyalı karaciğer kesitleri

ÖZET

Amaç: Hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı sıklıkla karaciğer rezeksiyonu ve karaciğer transplantasyonu gibi karaciğer cerrahisi prosedürleri sırasında ortaya çıkar. Karaciğer cerrahisindeki hızlı teknolojik gelişmelere rağmen, hepatik I/R hasarı kritik bir sorun olmaya devam etmektedir ve karaciğer fonksiyon bozukluğuna, uzak organ yetmezliğine ve yüksek morbidite ve mortalite oranlarına yol açabilmektedir. Bu olumsuz sonuçlar nedeniyle günümüzde yeni tedavi stratejileri için yapılan çalışmalar artmaktadır. Vagal stimülasyonun birden fazla mekanizma aracılığıyla hepatik hasarı azalttığı bilinmektedir. İnvaziv VSU ‘nun ek cerrahi işlem gerekliliği, yan etkilerinin bildirilmiş olması ve klinik kullanımının genel cerrahi açısından uygun olmayacağı düşünüldüğünden cerrahi işlem gerektirmeyen ve klinik kullanımının daha kolay olduğu transauricular VSU (tVSU) yöntemi kullanımlarına karar verildi.

Bu çalışmada; vagus sinir stimülasyonunun ek cerrahi girişim gerektirmeyen ve klinik pratikte kullanımı olabilen non-invaziv transauricular vagus uyarımı (tVSU)’nın karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkisinin incelenmesi planlandı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma, 16-20 haftalık 21 adet Sprague cinsi erkek sıçan üzerinde yapıldı. Sıçanlar 7’erli olacak şekilde Grup A, Grup B ve Grup C olarak 3 eşit gruba ayrıldı. Grup B sıçanlarına laparotomi, karaciğer iskemi ve reperfüzyon, Grup C sıçanlarına laparotomi, karaciğer iskemi ve reperfüzyonu ve tVSU uygulandı. Grup C sıçanlarına karaciğer iskemi reperfüzyon süresince 3 saat boyunca anestezi altında iken tVSU uygulandı. Grup A ve Grup B sıçanlarına da tVSU cihazının elektrotları bağlandı ancak uyarım yapılmadı. Doku örneklerinin yarısı histopatolojik inceleme, yarısı doku oksidatif stres ve inflamasyon durumları tayini için belirli şartlarda saklanmak üzere uygun tüplere alındı. Her üç gruptan serum biyokimya değerlendirmesi için intrakardiyak kan alınarak sıçanlar ponksiyon ile kurban edildi.

Sonuç: Çalışmamızdaki sonuçlara göre; Vagus uyarımı yapılan deney grubunda inflamatuvar ve oksidatif stres bulgularında istatistiksel olarak anlamlı olumlu sonuçlar

elde ettik. Daha önceki çalışmalarda görülen vagus uyarımı sonrası anlamlı Nrf2 artışı, çalışmamızda tam aksine düşüş olarak gerçekleşti. Çalışmamızda vagus sinir stimülasyonunun NRF-2 düzeylerine olan etkisini, karaciğer I/R modeli için oksidatif stresin kontrolünde potansiyel bir müdahale olarak değerlendirdik. Histolojik olarak iskemik karaciğer dokusunda vagus uyarımı sonrası özellikle nekrotik alanların gerilediğini gördük. Bu bulgular doğrultusunda, invaziv olmayan transauricular VSU'nun hepatik I/R hasarında yeni ve umut vadeden bir tedavi yöntemi olabileceği düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Karaciğer, iskemi, reperfüzyon, vagus, transauricular

EFFECT OF NON-INVASIVE TRANSAURICULAR NERVUS VAGUS STIMULATION ON HEPATIC İSCHEMİA REPERFUSİON INJURY

ABSTRACT

Objective: Hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury commonly arises during liver surgeries such as hepatic resection and liver transplantation. Despite rapid technological advancements in liver surgery, hepatic I/R injury remains a critical issue, leading to hepatic dysfunction, distant organ failure, and high morbidity and mortality rates. Due to these adverse outcomes, research into new therapeutic strategies has increased. Vagal stimulation has been shown to reduce hepatic injury through various mechanisms. However, due to the additional surgical procedure required for invasive VNS, its associated side effects, and the unsuitability for general surgical application, we opted for the use of transauricular VNS (tVNS), a non-invasive technique with easier clinical applicability. This study aimed to investigate the effects of non-invasive transauricular vagus stimulation (tVNS), which does not require additional surgical intervention and can be used in clinical practice, on hepatic I/R injury.

Materials and Methods: This study was conducted on 21 male Sprague-Dawley rats, aged 16-20 weeks. The rats were divided equally into three groups: Group A, Group

B, and Group C, with seven rats each. Rats in Group B underwent laparotomy and liver ischemia-reperfusion, while those in Group C underwent laparotomy, liver ischemia-reperfusion, and tVNS. tVNS was administered to Group C rats under anesthesia for three hours during the liver ischemia-reperfusion phase. Rats in Groups A and B had tVNS device electrodes attached, but no stimulation was applied. Tissue samples were collected, with half preserved for histopathological examination and the other half for oxidative stress and inflammation analysis. Blood samples were drawn from each group for serum biochemistry, and the rats were sacrificed via puncture.

Results: According to our findings, the experimental group receiving vagal stimulation showed statistically significant improvements in inflammatory and oxidative stress markers. In contrast to previous studies, which showed significant increases in Nrf2 following vagus stimulation, our study observed a decrease. We evaluated the effect of vagus nerve stimulation on NRF-2 levels as a potential intervention for oxidative stress control in the hepatic I/R model. Histologically, we observed regression of necrotic areas in ischemic liver tissue following vagus stimulation. These findings suggest that non-invasive transauricular VNS may offer a promising new treatment approach for hepatic I/R injury.

Keywords: Liver, ischemia, reperfusion, vagus, transauricular

GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, arteriyel ya da venöz kan akışının kesilmesi veya azalması sonucu dokuların ve organların oksijenlenmesinin ve kanlanmasının sekteye uğraması olarak ifade edilir. Reperfüzyon ise iske miyle tıkanan damarların yeniden açılmasıyla dokulara kan akışının geri dönmesidir. Ancak, iskemik dokuya tekrar kan akışı sağlandığında, yalnızca iske miye bağlı hasara kıyasla daha ciddi hasarlar meydana gelebilir ve bu süreçte serbest radikallerin etkisi daha belirgin hale gelir (1-4).

Hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, karaciğer travması, transplantasyonu ve cerrahi rezeksiyon gibi klinik durumlardan sonra ortaya çıkabilir. Bu durumlarda kanamanın önlenmesi amacıyla hepatik pedikülün klemp edilmesi (Pringle Manevrası) sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, hepatik arter ve portal venin klemp edilmesiyle iskemi sağlanır, klempin kaldırılmasıyla ise reperfüzyon süreci başlar.

Beyin ile batin organlari arasindaki sinirsel iletinin temel elemani olan vagus siniri (VS), beyin/karaciğer sinir ekseninde sinyaller ileten parasempatik ve sempatik lifler içeren otonom sinir sisteminin önemli bir bileşenidir. İnsan vücudundaki en uzun kraniyal sinir olan vagus siniri, afferent ve efferent lifleri aracılığıyla karaciğer üzerinde fizyopatolojik süreçlerde etkili olan otonomik innervasyonu sağlar (5).

Vagus siniri uyarımı (VSU), dirençli epilepsi, tedaviye dirençli depresyon ve baş ağrılarında onaylanmış bir tedavi yöntemidir. Bu endikasyonların yanı sıra, son yıllarda kardiyovasküler hastalıklar, morbid obezite ve özellikle antiinflamatuvar mekanizmasının keşfiyle birlikte sepsis ve inflamatuvar hastalıkları üzerinde de olumlu etkiler sağladığı bildirilmiştir(6).

Yapılan çalışmalarda subdiyafragmatik vagotominin kısmi hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunu ciddi şekilde bozduğu keşfedildiğinden beri, otonom sinir sisteminin karaciğer rejenerasyonunda önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır (7).

Hepatik afferent ve efferent lifler tarafından algılanıp salgılatılan nörotransmitterler ve sitokinler karaciğer hasarında inflamasyon, apoptoz sürecinin yönetiminde etkili olduğu bildirildi. Hepatik sinir sistemi, sempatik aktivasyon

durumunda, kanama ve yoğun enerji ihtiyacı durumlarında kanın karaciğerden sistemik dolaşıma yönlendirilmesini sağlar (8,9).

Vagus siniri uyarımı, invaziv ve non-invaziv yöntemlerle uygulanabilmektedir. İnvaziv yaklaşımlar servikal vagus stimülasyonu ve abdominal vagus stimülasyonunu içermektedir. Servikal vagus stimülasyonu ile gerçekleştirilen çalışmalarda, kardiyak aritmiler, asistoli, peritrakeal hematoma, yara bölgesinin etrafında lokalize enfeksiyon, ağrı, vokal kord hasarı ve solunum sıkıntısı gibi sorunlar yer almaktadır (10-13).

Bu yan etkiler sebebiyle, cerrahi işlem gerektirmeyen ve kullanım kolaylığı sunan non-invaziv yöntemler ilgi odağı haline gelmiştir. Son yıllarda, vagus sinirinin auriküler dalı (VSAD) ile beyin sapındaki nucleus tractus solitarius (NTS) arasında bir bağlantı keşfedilmiş ve non-invaziv transauricular vagus stimülasyonu üzerine çalışmalar hızlanmıştır (14).

Kulağın transauricular uyarımı ile parasempatik etkinin artırıldığı, sempatik etkinin baskılandığı ve bu sistemik etkilerin sempato-inhibitör bir mekanizma ile sağlandığı düşünülmektedir. Vagal efferent lifler, kardiyovasküler, hepatobilier ve sindirim sistemi dahil birçok sistemin periferik organları ile iletişimde olduğundan, bu uyarımın çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımı araştırılmaktadır (15).

Ulusal ve uluslararası kaynaklar gözden geçirildiğinde, Non-invaziv transauricular vagus sinir uyarımının (tVSU) karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki etkilerini doğrudan inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Son yıllarda, VSU'nun inflamasyon ile giden akut ve kronik birçok hastalıkta olumlu etkileri görülmüş ve araştırılmaya devam etmekte olup, karaciğer cerrahisinde ve hastalıklarında organı olumlu yönde etkileyebileceği de ortaya konmuştur. İnflamasyon ve oksidatif stresin karaciğer iskemi reperfüzyon hasarındaki kritik rolü nedeniyle, bu çalışmada tVSU ile hepatik I/R hasarı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

1. KARACİĞER ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ

Karaciğer diyaframın altında bulunan, normal rengi kahverengi olan ve karın bölgesinin sağ üst kadranının çoğunu kaplayan bir organdır (16).

Yüksek vaskülariteye sahip olan karaciğer, kolayca lasere olabilen, süngerimsi bir yapıya sahiptir. Komşu olduğu organlarla net şekilde sınırları ayrılmıştır. Makroskopik olarak değerlendirildiğinde, superior, inferior ve posterior olmak üzere üç yüze sahip prizma şeklindedir (17).

Karaciğerin büyük bir bölümü intraperitonealdır ve visseral peritonla örtülüdür. Midklaviküler çizgideki beşinci interkostal aralıktan sağ kosta kenarına kadar uzanır. Konumu, abdominal kadranslardan sağ hipokondrium ve epigastrium bölgelerine denk gelmektedir. Yaklaşık kadınlarda 1400 gr ve erkeklerde 1800 gram ağırlığında olup, bu da vücut ağırlığının yaklaşık 1/35 ila 1/40'ını (ortalama vücut ağırlığının %2 ila %3'ünü) oluşturan vücudun en büyük organıdır (18,19).

Karaciğeri çevresindeki dokulara bağlayan konnektif doku yapıları hepatik ligamentlerdir. Bu yapıların çoğu periton kıvrımlarından oluşur. Bunun dışında fetal dokuların oblitere olmasıyla meydana gelen fibröz kordlar; umbilikal ven (ligamentum teres ve round ligament) ve duktus venosus (ligamentum venosum) mevcuttur. Bu ligamentler karaciğeri komşu doku ve organlara (hepatogastrik ve hepatoduodenal ligamentler gibi), karın ön duvarı ve diaframa bağlarlar (17,18). Karaciğerin superior posterior yüzünde diyafram ve inferior vena kavanın bulunduğu çıplak bir alan bulunur. Karaciğerin geri kalan kısımları visseral periton ile örtülüdür. Karaciğerin alt yüzü safra kesesi ve sağ böbrek ile yakından ilişkilidir. Falciform ligamenti; karaciğeri ön yüzü boyunca uzanan, anatomik olarak karaciğeri sol ve sağ olmak üzere ikiye ayıran ligamenttir. Falciform ligament, remnant embriyonik umbilikal ven kalıntısıdır (20,21).

Arteria hepatica, truncus coeliacus'un üç ana dalından birini oluşturur. Vena porta ise vena mesenterica superior ile vena lienalis'in birleşmesi sonucunda meydana gelir (22).

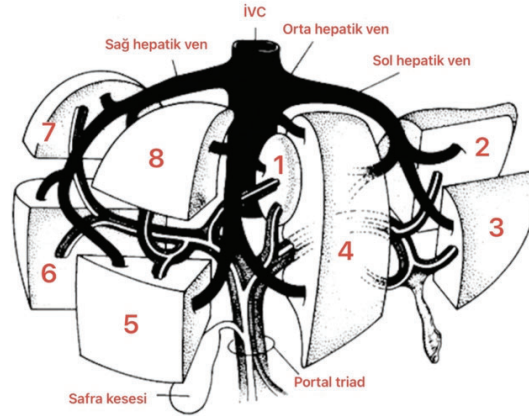
Karaciğer kan akımı dakikada 100–150 ml/kg arasındadır. Organın kan ihtiyacı iki kaynaktan karşılanır. Bunlar; Vena porta (yaklaşık %75-80) ve arteria hepatica (%20-25) ‘dır (18).

Karaciğerin fizyolojik anatomisi, fonksiyonel, segmental, modern veya cerrahi anatomi olarak sınıflandırılır. Bu yaklaşımda, her segmentin kendi afferent kan akımı, venöz ve biliyer drenajı bulunmaktadır. Segmentlerin hepatik arter, portal ven ve biliyer kanalları çeşitli varyasyonlar göstermekle beraber, birbirilerinden ayrıdır (23).

Fizyolojik anatomi, karaciğer cerrahisinin planlanmasını kolaylaştırarak cerrahi başarının artmasına katkı sağlar. Cerrahi işlem sırasında, portal triadın (portal ven, hepatik arter ve hepatik safra kanalı) yaralanma olasılığını büyük ölçüde azaltır, bunun sonucunda mortalite ve morbiditeyi düşürür. En yaygın kabul gören segmentasyon, "Couinaud'ın segmental anatomisi"dir. Bu yaklaşımda, karaciğer sekiz segmente ayrılır. Tüm anatomik sınıflandırmalara rağmen, karaciğer birçok anatomik varyasyon gösteren bir yapıya sahiptir. Günümüzde, görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler sayesinde, Couinaud'ın segmental anatomisi ameliyat öncesinde gerçeğe oldukça yakın bir şekilde belirlenebilmektedir (24).

1.1. KARACİĞER LOB VE SEGMENTLERİ

Karaciğerin fonksiyonel birimleri lobüllerdir ve lobüller birleşerek lobları oluşturur. Karaciğer lobül sistemi sınırları, hilustan karaciğere giren ve parankimi odacıklar şeklinde bölen “Glisson kapsülü” tarafından belirlenir. Segmentler ise içinde birden fazla lobül barındıran, sınırları vasküler ana dallar tarafından belirlenen, cerrahi prosedürler için önemli olan ve karaciğeri topografik olarak bölgelere ayıran ünitelerdir (25).



Şekil 1: Karaciğer loblarının vasküler plana göre dağılımı

1.	Sağ lob	Karaciğerin en büyük lobudur. En önde impressio colica, arka ve solda impressio suprarenalis, aralarında impressio renalis bulunur.
2.	Sol lob	Sağ lobtan volüm olarak daha küçüktür. Bu lobun ortasında impressio gastrica, arka kısımda impressio esophagea bulunur.
3.	Quadrat lob	İnferior yüzde yer alır. Önde karaciğerin inferior hattı, solda ligamentum teres fissürü, arkada porta hepatis, sağda safra kesesinin yerleştiği fossa yer alır.
4.	Caudat lob	Posterior yüzde yer alır. Önde porta hepatis, sağda vena kava inferior (VCI), solda ligamentum venosum fissürü ile sınırlıdır.

Tablo 1: karaciğer lobları

Gold Smith ve Woodborne, fonksiyonel karaciğer sınıflandırmasını üç ana hepatic venin dağılımına göre yapmışlardır. Bu sınıflandırmaya göre, karaciğer sağ, sol ve kaudat lob olmak üzere üç loba ayrılmıştır. Sağ hepatic ven, sağ lobun anterior ve posterior segmentlerini birbirinden ayırır. Orta hepatic ven ise sağ lobu sol lobdan ayırmaktadır. Sol lobun medial ve lateral segmentleri arasında ise sol hepatic ven ve falciform ligament yer almaktadır (22).

Karaciğerin cerrahi anatomisi vasküler plana göre ifade edilmektedir. Couinaud ve Bismuth, portal ve hepatik venlerin dallanmasını temel alarak karaciğeri segmentlere ve alt segmentlere ayırmışlardır.

Diğer subsegmentler, üç ayrı dikey düzlem ile sınıflandırılır. Segment I dışındaki tüm bu segmentler, sağ ve sol ana portal dalların düzeyinden geçen bir yatay düzlem ile daha sonra superior ve inferior subsegmentlere ayrılır. Bunun sonucunda, karaciğerin üç dikey ve bir yatay düzlem tarafından oluşturulan sekiz subsegmenti ve bir segmenti (Segment I) tanımlanmış olur (Tablo 2) (22).

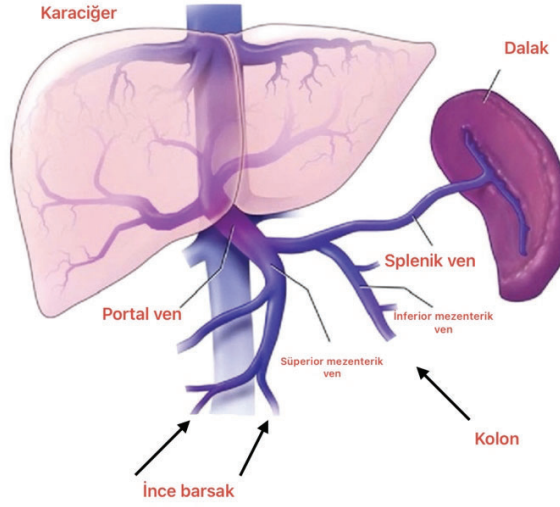
	KARACİĞER SUBSEGMENTLERİ
1	Kaudat lob
2	Sol lateral superior subsegment
3	Sol lateral inferior subsegment
4a	Sol medial superior subsegment
4b	Sol medial inferior subsegment
5	Sağ anterior inferior subsegment
6	Sağ posterior inferior subsegment
7	Sağ posterior superior subsegment
8	Sağ anterior superior subsegment

Tablo 2: Karaciğer subsegmentleri

1.2. KARACİĞERİN VASKÜLER YAPISI

Karaciğer, splanknik dolaşımın merkezinde yer alır ve bu sistemle ayrılmaz bir şekilde ilişkilidir. Splanknik kan akımında meydana gelen bir değişiklik, hepatik kan akımını doğrudan etkiler. Karaciğer, hepatik arter ve portal ven aracılığıyla kardiyak debinin yaklaşık %25'ini alır (her 1 gram karaciğer dokusu için yaklaşık 1 ml kan hacmi) (26). Portal ven ve hepatik arter, karaciğere kan akışını sağlayan iki ana damar yapısıdır. Karaciğere gelen kanın %75-80'ini portal ven, %20-25'ini ise hepatik arter sağlar. Hepatik arterdeki kanın oksijen saturasyonu normal bir insanda %96-98 seviyesindedir. Ancak debisinin portal vene göre daha düşük olması nedeniyle karaciğerin oksijenlenmesindeki katkısı daha azdır. Bu sebeple, karaciğerin oksijenlenmesinin %60-70'lik kısmı portal ven tarafından, %30-40'lık kısmı ise hepatik arter tarafından karşılanır (26). Common hepatik arter çölyak truncustan ayrılıp superior gastroduodenal ve sol gastrik arter dallarını oluşturur ve hepatik propria arter adını alır. Hepatik propria arter ise karaciğere girmeden önce sağ ve sol hepatik arter dallarını oluşturur (27).

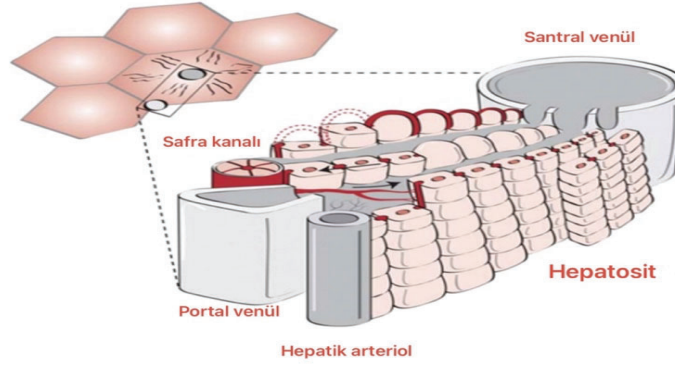
Karaciğerin venöz drenajı, inferior vena kava (İVK) aracılığıyla üç ana hepatik ven ile sağlanmaktadır. Sağ hepatik ven, sağ lobun anterolateral ve anteromedial sektörlerini ayıran bir olukta yer alır. Bu ven, sağ karaciğerin büyük bir kısmını drene eder ve yaklaşık bir santimetre ekstrahepatik seyrettikten sonra İVK'nin sağ tarafına açılır. Orta hepatik ven, sağ ve sol lobları ayırırken esas olarak IV numaralı segmenti drene eder. Sol hepatik ven ise ağırlıklı olarak II ve III numaralı segmentleri drene etmektedir. Orta ve sol hepatik venler intrahepatik olarak birleşir ve tek bir damar halinde İVK'ye sol taraftan girerler. Kaudat lobun venöz drenajı bu sistemden bağımsız olup doğrudan İVK'ye gerçekleşir (27).



Şekil 2: Portal Venöz Drenaj

1.3. KARACİĞER HİSTOLOJİK VE FİZYOLOJİK YAPISI

Karaciğer, parankimal ve parankimal olmayan olarak sınıflandırılabilen özel hücre tiplerinden oluşur. Karaciğer parankimi hücresel düzeyde altıgen şeklindeki lobüller halinde organize olmuştur. Her lobülün çevresinde, hepatik arter, portal ven ve safra kanalının dallarının bir araya gelerek oluşturduğu bir portal triad bulunur. Lobüller, portal triadın merkezi bir vene doğru boşaldığı sinüzoidal kılcal damarlara sahiptir. Her bir sinüzoidal vasküler yapı özel fenestreli endotel hücreleriyle kaplıdır. Bu sayede bitişik olduğu hepatositlerle rahatlıkla iletişim kurabilir. Karaciğerin kütlesine hâkim yapıyı oluşturan hepatositler, ayrı sinüzoidal kılcal damarları çevreleyen hücre kordonları halinde organize olmuşlardır (28).



Şekil 3: Sinüzoidal kapiller damar yoluyla merkezi bir vene doğru drene olan portal triadı gösteren hepatik lobül (29).

Karaciğer fonksiyonel ve fizyolojik yapısı: Karaciğer metabolik süreçlerin düzenlenmesi, detoksifikasyon, besin maddelerinin depolanması ve immün yanıtın modülasyonu gibi hayati fonksiyonları yerine getiren karmaşık ve çok yönlü bir organdır (30). Bu organ, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında merkezi bir rol oynar; glikojen depolayarak ve glikoneogenez yoluyla kan glukoz düzeylerini düzenlerken, lipid metabolizmasında yağ asitlerinin sentezi ve oksidasyonu, lipoproteinlerin üretimi ve kolesterol metabolizması gibi kritik süreçleri yönetir (31). Protein metabolizmasında ise amino asitlerin deaminasyonu, üre sentezi ve plazma proteinlerinin sentezi gibi temel işlevleri üstlenir (30).

Detoksifikasyon fonksiyonları kapsamında karaciğer, vücuda giren veya metabolizma sonucu oluşan toksik maddelerin biyotransformasyonunu gerçekleştirir; bu süreçte sitokrom P450 enzim sistemi önemli bir rol oynayarak ilaçların, alkolün ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasını sağlar (31). Ayrıca, karaciğer safra üretimi ve sekresyonu ile sindirim sistemine katkıda bulunur; safra asitleri ve tuzları, yağların emülsifikasyonu ve emilimi için gereklidir, bilirubin metabolizması da burada gerçekleşir ve hemoglobin yıkım ürünü olan bilirubin konjuge edilerek vücuttan uzaklaştırılır (30).

Depolama fonksiyonları açısından karaciğer, glikojen, demir, bakır, B12 vitamini ve yağda çözünen vitaminler gibi besin maddelerinin depolanmasında önemli bir rol oynar; bu depolama kapasitesi, besin maddelerinin sürekli bir şekilde vücuda sağlanmasını ve eksiklik durumlarının önlenmesini mümkün kılar (32). İmmün

fonksiyonlar bakımından karaciğer, Kupffer hücreleri olarak bilinen rezident makrofajlar aracılığıyla sistemik immün yanıtın modülasyonunda etkindir; bu hücreler, patojenlerin ve yabancı maddelerin fagositozu ile enfeksiyonlara karşı savunmada kritik bir rol üstlenir (30). Hormonların metabolizması ve inaktivasyonu da karaciğerin önemli fonksiyonları arasındadır; steroid hormonlar, insülin ve glukagon gibi hormonlar karaciğerde metabolize edilerek aktivite düzeyleri düzenlenir ve ayrıca karaciğer, büyüme faktörleri ve benzeri moleküllerin sentezinde de rol oynar (31).

Karaciğerin bu çok yönlü biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları, vücudun genel sağlığının ve homeostazının korunmasında vazgeçilmezdir; karaciğer hastalıkları veya fonksiyon bozuklukları, metabolik dengenin bozulmasına, toksik maddelerin birikimine ve immün yanıtta aksamalara yol açarak ciddi klinik tabloların ortaya çıkmasına neden olabilir (32). Bu nedenle, karaciğer fonksiyonlarının anlaşılması ve korunması, tıp alanında önemli bir araştırma ve klinik uygulama alanıdır.

Karaciğer zonları: Karaciğer lobül yapısını oluşturan hepatositler, glukoz metabolizması, safra sentezi, detoksifikasyon ve protein sentezi gibi çeşitli işlevlere sahiptir. Bu hepatositler, ağırlıklı olarak üstlendikleri fonksiyonlara göre lobülün farklı bölgelerinde yer alır (33).

Bu özelliklerine dayanarak, hepatositler periferden merkeze doğru üç ayrı zona ayrılır;

1.	Zon-1	Periferik zon olarak adlandırılır ve Glisson kapsülünün hemen altında başlar. Bu bölgedeki hepatositler, karaciğerin fonksiyonel ünitesinin ilk karşılaştığı hücrelerdir ve toksinler, oksijen, glukoz, lipidler ve proteinlere en yüksek düzeyde maruz kalırlar. Bu sebeple, enzimatik aktiviteleri oldukça yüksektir ve glikojen depolarının büyük bir kısmı bu zonda bulunur.
2.	Zon-3	Periferik zon ile santral zon arasında yer alır ve "geçiş zonu" ifade edilir.
3.	Zon-3	Santral zon olarak adlandırılır ve santral ven etrafındaki hepatositlerden oluşur.

Tablo 3: Hepatosit zonları

2. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

2.1 KARACİĞER İSKEMİ REPEFÜZYON HASARI

Karaciğer iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, hepatik travma, şok, karaciğer nakli ve cerrahi rezeksiyonu gibi sıkça karşılaşılan yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden klinik durumlar arasındadır. Bu durumlarda, karaciğer dokusunun kanlanması kesilmesi veya azalması sonucu oksijen ve besin maddelerinin yetersizliğiyle doku hasarı meydana gelir. Yakın ve uzak organ disfonksiyonu, transplantasyon cerrahisi yapılan hastada greftin fonksiyon bozukluğu ve ölümüne neden olabilir. I/R hasarı, hem iskemi sürecinin yol açtığı doğrudan doku hasarı hem de reperfüzyon sırasında oluşan inflamatuvar yanıt ve serbest radikal üretimi nedeniyle ek zararlar oluşturur (4).

On dokuzuncu yüzyıl ortalarında yaşamış olan iskoç cerrah Dr. James Hogarth Pringle, abdominal cerrahi sırasında ve karaciğer travması ile ilişkili kanamada, kanama riskini minimize etmek, karaciğer fonksiyonlarını korumak ve hemostazı sağlamak amacıyla cerrahi bir teknik geliştirmiştir. Bu teknik günümüzde de yaygın olarak kullanılmakta ve “Pringle manevrası” olarak bilinmektedir. Pringle Manevrası, hepatik arter ve portal venin geçici olarak bağlanmasıyla karaciğerde geçici bir iskemi durumu yaratır. Bu yöntem, özellikle karaciğer cerrahisinde aktif kanama kontrolü sağlamak için etkilidir (34).

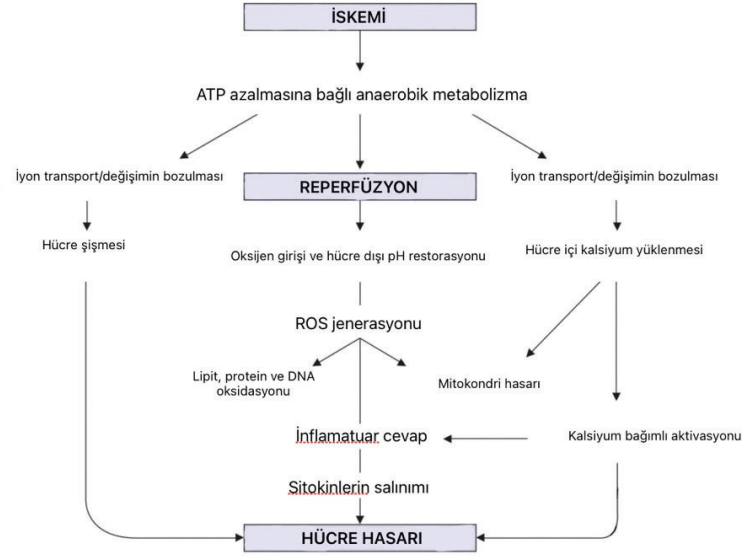
Klempleme süresi boyunca, kan akışı kesilir ve böylece ameliyat alanında kanama riski azalır. Ameliyatın ilerleyen aşamalarında klempin kaldırılmasıyla birlikte reperfüzyon süreci başlatılır; bu da oksijen ve besin maddelerinin tekrar karaciğer dokusuna ulaşmasını sağlar. Ancak, reperfüzyon sırasında ortaya çıkan oksidatif stres ve inflamasyon, karaciğer hücrelerinde ek hasarlara yol açabilir. Bu nedenle, Pringle Manevrası uygulanırken iskemi süresinin sınırlı tutulması ve reperfüzyonun kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesi büyük önem taşır. Ayrıca, antioksidan tedaviler ve inflamasyon inhibitörleri gibi stratejilerle I/R hasarının etkileri azaltılmaya çalışılmaktadır (3).

Karaciğer I/R hasarı iki ana kategoriye ayrılmaktadır: soğuk-depolama reperfüzyon hasarı ve sıcak I/R hasarı. Bu iki tip, farklı klinik senaryolarda farklı patofizyolojik mekanizmalarla ilişkilidir. Soğuk-depolama reperfüzyon hasarı, organın

transplantasyondan önce soğuk ortamda korunması sırasında meydana gelebilir. Soğuk depolama, organın oksijen ve besin maddelerinden yoksun kaldığı bir süreçtir ve bu durum hücresel enerji üretiminin azalmasına, iyon dengesizliğine ve hücre zarında hasara yol açar. Depolama süresinin uzaması, doku hasarının artmasına ve reperfüzyon sırasında daha ciddi inflamatuvar yanıtların tetiklenmesine neden olabilir. Soğuk depolama sırasında ortaya çıkan mekanizmalar arasında mitokondrial disfonksiyon, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi ve inflamatuvar sitokinlerin salınımı bulunmaktadır (2).

Sıcak I/R hasarı ise genellikle karaciğer cerrahisi sırasında, özellikle karaciğer transplantasyonu esnasında görülür. Bu süreçte, kan kaybını ve ameliyat sırasında meydana gelebilecek komplikasyonları azaltmak amacıyla karaciğerdeki farklı damarların kan dolaşımının geçici olarak durdurulması gerekmektedir. Bu uygulama, karaciğerde geçici bir iskemi oluşturur ve damarların yeniden açılmasıyla reperfüzyon gerçekleşir (1). Sıcak I/R hasarı, iki evreye ayrılmaktadır:

1. Erken Evre: Reperfüzyon sonrası yaklaşık iki saatlik dönemi kapsar. Temel mekanizma kupffer hücrelerinin aktivasyonudur. Kompleman ve CD-4 T lenfosit aktivasyonu kupffer hücrelerinin aktivasyonunu sağlayan faktörlerdir. Bu evrede, ROS'lar ve inflamatuvar mediatörlerin (örneğin, TNF- α , IL-6, IL-1) üretimi artar. ROS, hücre membranlarını lipid peroksidasyonu yoluyla hasara uğratar, proteinleri ve DNA'yı okside eder, bu da hücresel fonksiyon bozukluklarına yol açar (35,36).



Şekil 4: İskemi/Reperfüzyon hasarı mekanizması

2. Geç Evre: Reperfüzyondan 6 ila 48 saat sonraki dönemi kapsar. Bu evrede, nötrofil lökositlerin birikimi ve aktive olması ile inflamatuvar bir yanıt gelişir. Nötrofiller, doku hasarını daha da artıran enzimler ve ROS üretirler. Ayrıca, mikrovasküler hasar ve doku ödemi oluşur, bu da karaciğer fonksiyonlarının ciddi şekilde bozulmasına neden olur (1,2).

Reperfüzyon sonrası özellikle ilk 3-6 saat içinde serbest radikallerin üretimi, T-lenfosit ve Kupffer hücre aktivasyonu; sinüzoidal konjesyon, hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterize hepatoselüler hasar ve sonuçta nekroz ve apoptozis ile hücreyi ölüme götürür (36-38). İ/R hasarında karaciğer yanıtında TNF- α merkezi mediatör olarak görev alır. TNF- α üretimi, damar endotelinden adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükler ve kemokinlerin üretimi ve salınımını uyarır ve ardından nötrofiller aktive edilir. Aktive olan nötrofiller, ROS ve proteazlar reperfüzyon hasarının geç evresi boyunca indüklenen oksidatif strese sorumlu tutulurlar (39,40). İskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, özellikle karaciğerin mikrovasküler damarlarındaki endotel hücrelerini yoğun olarak etkilemektedir. I/R süreci sırasında üretilen reaktif

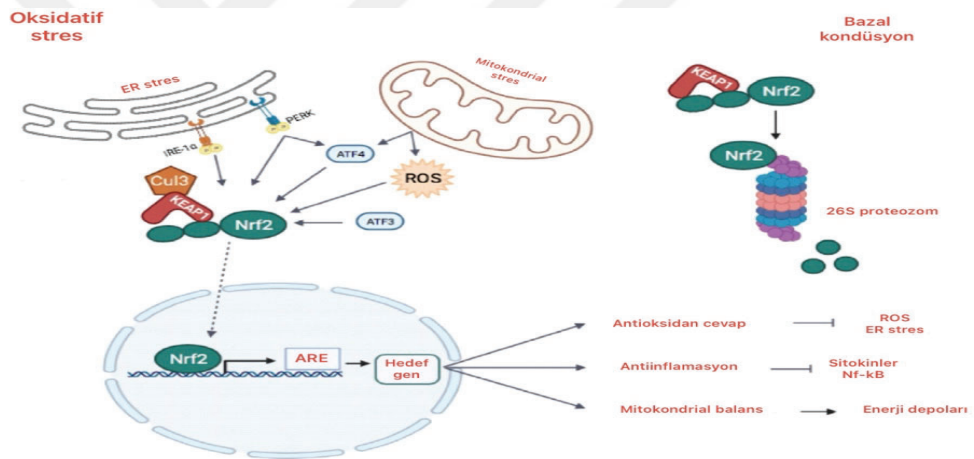
oksijen türleri (ROS), endotel hücrelerinin şişmesine ve kapiller geçirgenliğin artmasına yol açar. Bu değişiklikler, damar duvarlarının bütünlüğünü zayıflatarak, sıvı ve inflamatuvar moleküllerin dokuya daha kolay geçişini sağlar (41). Reperfüzyon esnasında, normale dönmekte olan kan akımı, ortamda bol miktarda bulunan inflamatuvar substratların iskemi bölgesine ulaşmasına neden olur. Bu substratlar arasında sitokinler, kemokinler ve diğer inflamatuvar mediatörler bulunur. İskemik alana ulaşan bu inflamatuvar faktörler, nötrofiller ve diğer inflamatuvar hücrelerin bölgeye göçünü ve aktivasyonunu teşvik eder. Nötrofiller, burada serbest radikallerin ve enzimlerin üretimini artırarak doku hasarını derinleştirir (41).

Ayrıca, I/R hasarı sırasında mikrovasküler dolaşımın bozulması, doku ödeme ve mikrovasküler tıkanıklığa yol açarak karaciğer fonksiyonlarının daha da bozulmasına neden olur. Bu süreçler, karaciğer hücrelerinin apoptozunu ve nekrozunu tetikleyerek organın genel işlevselliğini olumsuz (42). Karaciğer I/R hasarı sonrasında akciğer yetersizliğinin temel nedeni olarak, karaciğerden salınan inflamatuvar sitokinler düşünülmektedir. Özellikle TNF- α , hem karaciğerde hem de akciğer dokusunda hasara yol açabilen önemli bir sitokindir. Bu bulgular, karaciğer I/R hasarının sistemik inflamatuvar yanıtlar aracılığıyla diğer organlarda da önemli hasarlara neden olabileceğini ortaya koymaktadır (43).

2.2. KARACİĞER İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA NRF-2 VE OKSİDATİF STRES İLİŞKİSİ

Bir transkripsiyon faktörü olarak nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), organlardaki oksidatif stresin düzenlenmesinde ve hücre içi sinyalleşmede görev alır. Fizyolojik koşullar altında Nrf2 esas olarak sitoplazmada Keap-1 (Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1)'e bağlı halde lokalizedir ve Keap-1, Nrf2'nin ubiquitinasyonunu/proteolizini kolaylaştırır. Çeşitli uyarılarla aktive edildiğinde, Nrf2 çekirdeğe transfer olur ve hem oksijenaz-1 (HO-1) dahil olmak üzere ilgili sitoprotektif enzimleri regüle eder (44). Bir antioksidan enzim olan heme oksijenaz (HO-1), ARE

(antioksidan yanıt elemanı) genleriyle ilişkili ilk antioksidan enzimlerden biri, hem grubunun biliverdine reaksiyonunu katalize eden ve güçlü antioksidan bilirubine indirgenen indüklenebilir bir enzimdir. Hem'in yıkımında hız sınırlayıcı bir enzimdir ve karaciğer oksidatif stresine neden olan çeşitli uyarıcılar tarafından yüksek oranda uyarılabilir (45). HO-1 transkripsiyonu, Nrf2'nin önemli rol oynadığı karmaşık bir mekanizma tarafından düzenlenmektedir (46). Dinlenme halindeki hücrelerde, Nrf2, Keap-1 ile inaktif bir kompleks halinde sitoplazmada tutulduğu gibi hücreler elektrofille veya reaktif oksijen türlerine, endojen ve ekzojen aktivatörlere maruz kaldığında Nrf2 kompleksten serbest kalır ve sitoplazmadan çekirdeğe geçer. Nrf2 çekirdeğe ulaştıktan sonra, küçük Maf proteinleri ile heterodimerler oluşturur ve HO-1 ve NQO1 gibi genlerin promotörlerindeki antioksidan yanıt elemanına bağlanır (47,48).

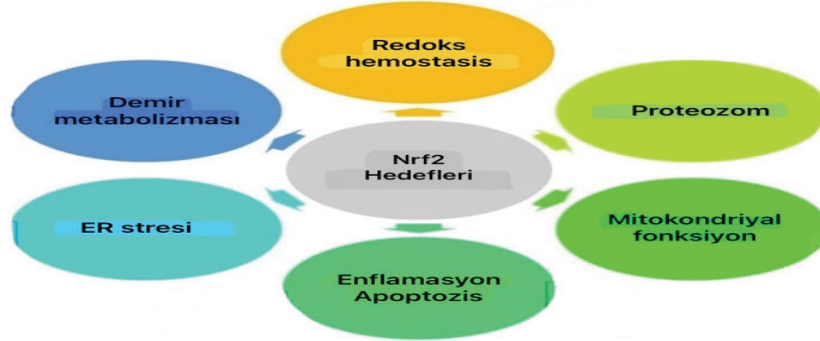


Şekil 5: Nrf2-Keap-1 sinyal iletim yolu

Alfa 7 nikotinik asetilkolin reseptörü ($\alpha 7$ nAChR), sinir sistemi ve kolinerjik olmayan bağışıklık sistemlerinde yaygın olarak dağılmıştır. Kolinerjik vericinin inflamatuvar yanıtın düzenlenmesine katılması gereklidir ve kolinerjik anti-inflamatuvar yolun anahtar unsurudur (49). Farklı asetilkolin reseptör agonistlerinin $\alpha 7$ nAChR'yi aktive ederek karaciğer I/R hasarını azalttığı gösterilmiştir (50). Ayrıca, $\alpha 7$ nAChR aktivasyonunun Nrf2/HO-1 yolunu güçlendirdiği gösterilmiştir (51,52). Birçok araştırma, Nrf2/HO-1 yolunun hepatik I/R hasarını hafifletmede yakından rol oynadığını göstermektedir. Nrf2 eksikliğinin, karaciğer iskemi-reperfüzyon (HIR)

hasarını şiddetlendirdiği ve hepatositlere özgü Nrf2'nin aşırı aktivasyonunun sıcak HIR'ye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda Nrf2'nin tükendiği I/R modellerinde karaciğerde inflamasyonun, oksidatif stresin ve hücre apoptozunun şiddetlendiği bildirilip aktivasyonunda ise hepatik hasarı baskıladığı bildirilmiştir (53). Nrf2 eksikliğinin ya da tükendiği durumların toksin kaynaklı karaciğer hasarını arttırdığını ve Nrf2'nin karaciğer hasarında hepatoprotektif faktör olarak yer aldığı makalelerde bildirilmiştir (53-55). Çok sayıda çalışma, ROS'un karaciğer I/R hasarında önemli rolü olduğuna dair güçlü kanıtlar ortaya koymuştur. Bu sebeple, ROS üretiminin inhibisyonu ve ROS'un temizlenmesi tedavi şekli olarak düşünülmektedir (35) (56). Çok sayıda çalışma, Nrf2 eksik ya da defektli farelerin kimyasallar, metiyonin-kolin eksikliği olan diyet, sepsis ya da sitokinler yoluyla oluşturulan hepatik hasarlara karşı anlamlı derecede duyarlı olduğunu ortaya koymuş ve bunun sonucunda Nrf2'nin karaciğeri birden fazla sitoprotektif yolla koruduğunu göstermişlerdir (57) (55). Nrf2, apoptozun önlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, antioksidan (tert-bütillhidrokinon)'a maruz bırakılan fare hepatoma ve insan hepatoblastoma hücrelerinde, Nrf2'nin anti-apoptotik protein olan Bcl-2'yi yukarı regüle ettiğini ve bu sayede Bax, sitokrom c salınımı ve kaspazların aktivasyonu gibi apoptotik süreçleri engellediğini ortaya koymuştur. Bu mekanizmanın, hücre sağ kalımının artmasına katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (58).

Sonuç olarak Nrf2, hücresel işlevlerin birçok yönünü, gen ekspresyonunun düzenlenmesi veya transkripsiyon faktörleri arasındaki çapraz konuşmalar (crosstalk) yoluyla etkilediği gösterilmiştir (59).



Şekil 6: Nrf2 hedef genleri tarafından yönlendirilen hücresel fonksiyonların şematik gösterimi

3. HEPATİK SİNİR SİSTEMİ

Karaciğerin sinir sistemi, birçok sürece dahil olan hem afferent hem de efferent nöronları içerir. Afferent kol, lipidlerin, glikozun ve metabolitlerin (yemek ve içecek alımından sonra) algılanmasını içerir ve uygun fizyolojik değişiklikleri başlatmak için sinir sistemini uyarır. Efferent kol ise metabolik düzenleme, fibrozisin modülasyonu, safra fonksiyonu ve diğer birçok sürecin kontrolü için esastır. Deneysel modeller, karaciğerin otonom sinir sistemi tarafından innerve edildiğini anlamamızda ve bu süreçlerde yer alan hücre tiplerini ortaya koymamızda yardımcı olmuştur. Bu bağlamda, karaciğer hem bir algılayıcı (sensör) hem de sinirsel sinyaller ve ablasyon (ortadan kaldırma) ile etkilenen bir efektör olarak işlev görür (8).

Otonom sinir sistemi, karaciğerdeki birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde önemli rol oynayan periferik sinir sisteminin bir parçasıdır. Otonom sinir sistemi, beyin/karaciğer sinir ekseninde sinyaller ileten sempatik ve parasempatik kollara ayrılır. Hem vagus sinirinin hem de splanknik sinirlerin dalları, portal alan aracılığıyla karaciğeri innerve eder ve portal ven ile safra kanallarıyla yakın ilişki içindedir (60) (5).

Vagus siniri motor ve duysal liflerden oluşurken, splanknik sinirler hem visseral efferent ve afferent liflerden hem de duysal liflerden oluşur. Sistematik n3ral ablasyon, karaciğerin hem fizyolojik hem de patolojik s3reğlerdeki hepatik otonomik innervasyonunun 3nemini vurgulamıştır. Ayrıca, son bulgular, karaciğerin sinirsel d3zenlenmesinde yer alan alt tipleri, resept3rleri ve aracılık eden molek3lleri belirleyerek otonom sinir sisteminin rol3n3 daha ayrıntılı bir şekilde tanımlamıştır. şu anda, diyabet mellitus tip 2, obezite ve diğer patolojiler 3zerindeki etkisi nedeniyle hepatik sinir sisteminin anatomik ve işlevsel 3zelliklerinin daha iyi anlaşılmasına y3nelik b3y3k bir ilgi bulunmaktadır (8).

3.1 Hepatik Sinir Sisteminin Ekstrinsik Anatomisi

Karaciğer, portal ven, hepatik arter, safra kanalları ve karaciğer hilusu ile ilişkili olan hem afferent hem de efferent otonom sinirler tarafından innerve edilir. Sempatik innervasyon postganglioniktir ve omuriliğin intermediolateral kolonundan (T7-T12) preganglionik lifler alan 33lyak ve 3st mezenterik ganglionlardan kaynaklanır (61). 3n pleksus, ortak hepatik arter 3evresinde yer alırken, arka pleksus portal ven 3evresinde yer alır. Bu pleksuslar, bu yapılara eşlik eden portal yapılarla birlikte karaciğer hilusuna girer ve hem sempatik hem de parasempatik k3kenli afferent ve efferent lifleri taşır (8).

Parasempatik sinirler vagus sinirinden dallanıp, karaciğeri doğrudan beyin sapının dorsal motor 3ekirdeğinden kaynaklanan preganglionik lifler olarak innerve ettiği veya hepatik hilusta ve hilus boşluklarında bulunan ganglionlarda sinaps yaptığđ d3ř3n3lmektedir (62) (63). 3n pleksus, 33lyak pleksusun sol kısmından ve vagusun sağ abdominal dalından kaynaklanan hepatik arteri 3evreleyen bir sinir aęđ oluşturur. Arka pleksus, 33lyak pleksusun sağ kısmından kaynaklanır ve portal venin etrafında yer alır ve ara sıra hepatik vene eşlik eden innervasyonlar vardır (62).

3.2. Hepatik Afferent Sinirler

Gastrointestinal (GI) yol boyunca besinlerin sindiriminden sonra emilen maddelerle yakın ilişki içinde olan karaciğer, damar sistemini çevreleyen afferent sinirlerle, hipo-ozmolar sinyalleri algılar ve dorsal kök ganglionu aracılığıyla basınç refleksini, ayrıca sempatik aktiviteyi tetikler. Diğer reflekslerde olduğu gibi, bu sürecin de beyinden bağımsız olarak işlediği düşünülmektedir (64). Karaciğer ozmoresepsiyonun yanı sıra glikoz ve yağ asidi düzeylerinin algılanması için ideal bir sensör görevi görür. GI yolunda emilim gerçekleştikten sonra, makro besinler portal ven aracılığıyla karaciğere ulaşır. Karaciğerde iyonları ve besinleri algılayan ve beyne sinyaller gönderen çok sayıda kemoreseptör bulunur (8). Örneğin, hepatik afferent sinirler hipernatremiye yanıt olarak tetiklenir ve dorsal kök ganglionundaki sempatik lifler üzerinde etki göstererek böbreğe giden sempatik sinir aktivitesini refleks olarak azaltır (65). Hepatik afferent sistem hakkındaki mekanik bilgiler, sinirsel aktivitenin izlenmesi ve hayvan modellerinde nöropeptitler ile kognat reseptörlere ait genlerin devre dışı bırakılması yoluyla elde edilmiştir. Bu bilgiler, obezite ve diyabet gibi hastalıkların klinik yönetimi için umut verici tedavilerin geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu bağlamda, karaciğer afferent liflerinin metabolizmayı nasıl düzenlediğini, glikoz, lipidler ve GI hormonlarının algılanması ile başlayarak anlamak önem arz etmektedir (8).

3.3 Hepatik Sinirlerin Hormon ve Sitokinlerle İlişkisi

Karaciğerde, afferent duyuşal nöronlar inkretinler adı verilen besin kaynaklı ve emilim sonrası salgılanan hormonları algılar. Önemli bir inkretin olan glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1), hem beyinde hem de gastrointestinal (GI) organlarda salgılanır (66). Karaciğer afferent lifleri ayrıca GI sistem tarafından salgılanan bir dizi hormon için reseptörler bulundurur. Kolesistokin (CCK), gıda alımına yanıt olarak duodenumdaki I hücrelerinden salınır ve karaciğer ve safra kanalları gibi GI sistem yapılarını uyarır (67).

CCK reseptörleri, afferent sinirleri uyaran portal vende yer alır (68). Bununla birlikte, nucleus tractus solitarius (NTS) veya area postrema'nın denervasyonu, CCK'nın

tokluk etkilerini bozmaz, bu da olası bir otonomik refleks veya beyne alternatif bir yolun varlığını düşündürür (68). Hepatik vagal afferent lifler tarafından algılanan diğer GI hormonları arasında somatostatin ve leptin de bulunmaktadır (69). İnterlökinler (IL), kanser ve fibrozis gibi hastalık süreçlerinde rol oynayan inflamatuvar hücreler tarafından salgılanan sitokinlerdir. Hormonlara ek olarak, IL'ler hepatik afferent sinirler tarafından da algılanabilir. IL-1 β 'nin hepatik vagal aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (9). Şu anda, IL-1 β 'nin hepatik sinir sistemi aracılığıyla bağışıklık sisteminden beyne kimyasal bir haberci olarak görev yaptığı düşünülmektedir, ancak kesin rolü henüz tam olarak netleşmemiştir (9). IL-1 α 'nın, karaciğer hücrelerinde değişikliklere neden olduğu ve hepatik afferent lifler aracılığıyla sinyal ilettiği öne sürülmüştür (70,71). Efferent nörotransmitterler ve nöropeptitlerden asetilkolin veya vazoaktif intestinal peptid gibi parasempatik nörotransmitterlerin etkisi sinüzoidlerin gevşemesine, adrenalın veya P maddesi gibi sempatik nörotransmitterlerin salınımı ise sinüzoidlerin kasılmasına yol açar. Sempatik aktivasyon, kanamanın olduğu durumlarda veya fiziksel aktivite sırasında, kanın karaciğerden sistemik dolaşıma yönlendirildiği süreçte gözlemlenir (72) (8).

Ek olarak, Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, subdiyafragmatik vagotominin kısmi hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunu ciddi şekilde bozduğu keşfedildiğinden beri, otonom sinir sisteminin karaciğer rejenerasyonunda önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır (7). Diğer çalışmalar, karaciğer rejenerasyonunun parasempatik sistem tarafından aktive edildiğini gösteren bulgular ortaya koymuştur (73,74).

4.VAGUS NÖROANATOMİSİ

Vagus siniri, beyni boyun, toraks, abdomen ve pelvik organlara bağlayan önemli bir sinirdir. Vagus siniri, 10. kranial sinirdir ve çok sayıda işlevi yerine getiren otonom sinir sisteminin önemli bir bileşenidir. Liflerinin büyük çoğunluğu parasempatik aktiviteye hizmet ederken, somatik, viseral, duyusal ve brankiyal motor lifleri de içerir. Bu lifler, beyin sapında bulunan medulla oblongata'daki dorsal motor çekirdeği ve nucleus ambiguus'tan köken alır ve terminal dalları, kolonun splenik alanına kadar ulaşır (75).

Vagus siniri, invaziv (servikal) ve invaziv olmayan transkutanöz yöntemlerle, kulak içindeki cymba concha bölgesine yerleştirilen bir elektrot ya da servikal anterolateral boyun cildi üzerine yerleştirilen bir stimülasyon cihazı aracılığıyla uyarılabilir. Vagus sinir uyarımı (VSU), dirençli epilepsi, depresyon ve küme baş ağrılarının tedavisinde uygulanmaktadır (75-77).

Vagus siniri, hem efferent hem de afferent liflerden oluşur. Liflerin büyük çoğunluğu (%80) afferent olup, çeşitli organlardan beyin ve omuriliğe içsel algısal bilgileri iletir. Geri kalan lifler ise parasempatik efferent lifler olup, VN'nin innerve ettiği organların aktivitelerini düzenler. Parasempatik efferentler, dorsal motor çekirdeğinden ve nucleus ambiguus'tan köken alır (78).

Vagus siniri liflerinin %20'si ise efferent liflerden oluşur. Bu efferent lifler, nucleus ambiguus (NA) ve dorsal motor çekirdeğinden (DMN) köken alır ve baş, boyun, göğüs ve karın bölgelerinde bulunan birçok organ üzerinde parasempatik etki yaratmak amacıyla bu bölgelerden geçer. Vagal afferent lifler ise, bu organlardan genel ve duyuşsal bilgileri nucleus tractus solitarius'un (NTS) çekirdeğine taşır. Ayrıca, dış kulağın bir bölümünü innerve eden somatik duyuşsal lifler, spinal trigeminal nucleus'a (sTN) iletilir. Bu nedenle, NST, sTN vagus siniri aracılığıyla beyne taşınan visseral ve somatik duyuşların işlenmesinde ana alıcı görevi görür (79).

Vagus siniri sağ ve sol olmak üzere ikiye ayrılır. Sağ vagus siniri (VS) sinoatriyal düğümü, sol VS ise atriyoventriküler düğümü innerve eder (80). Vagus siniri, posterior kraniyal fossada yer alan jugular foramenlerden çıkar ve boyun boyunca aşağıya doğru uzanır. Bu sinir, boyun bölgesinde internal jugular ven, internal karotid arter ve common karotid arter ile seyrederek. Bu yapılar, "karotis kılıfı" olarak bilinen bir fibröz doku kılıfı içinde yer alır. Vagus siniri, karotis kılıfının arka kısmında, lateralinde internal jugular ven ve medialinde karotid arter olacak şekilde konumlanmıştır. Boyun bölgesinde vagus siniri, farengeal, superior laringeal, karotid, kardiyak ve rekürren laringeal dallarını verir. Sağ ve sol vagus sinirleri, boyunda karotid kılıfının içinde ilerler ve frenik sinirlerin medialinden geçerek toraks bölgesine girerler. Sol vagus siniri, sol rekürren laringeal dalı verir ve trakeoözofageal oluktan geçerek kardiyak ve pulmoner pleksuslara katılır. Daha sonra, özofagusun ön tarafında özofageal pleksusu oluşturarak torakstan çıkar. Sağ vagus

siniri, sağ rekürren laringeal dalını verir ve trakeoözofageal oluktan geçip kardiyak ve pulmoner pleksuslara katılır. Ardından, özofagusun arka tarafında posterior özofageal pleksusu oluşturarak torakstan çıkar (81).

Servikal vagustan çıkan dallar, bronşların, akciğerlerin, kalbin ve özofagusun innervasyonunu sağlar (82). Subdiyafragmatik vagus, dalları aracılığıyla farklı organları innerve eder. Vagal efferent motor nöronların, DMV (dorsal motor çekirdek) içinde yer alan ve gastrointestinal yolu innerve eden dalları önemlidir. Subdiyafragmatik vagusun 5 dalı olan anterior gastrik, posterior gastrik , hepatik , çölyak ve aksesuar çölyak dallar bunlara örnek verilebilir (83). Mideyi innerve eden gastrik dallar hem dorsal hem de ventral mideye ulaşır. Çölyak dalları, proksimal ve inen kolonu innerve ederken, hepatik dal karaciğeri innerve eder. Hepatik dalın bir uzantısı olan gastroduodenal dal, duodenum ve pankreası innerve eder. Visseral afferentler, periferik otonom sinir sistemi ile merkezi sinir sistemi arasındaki ilk entegrasyon noktası olan beyin sapındaki nucleus tractus solitarius (NTS) bölgesinde birleşir. Visseral afferent lifler, vagusun dorsal motor çekirdeğinden (DMV) çıkar ve periferde otonomik kontrolün sağlanmasında kritik bir rol oynar. Bu bölgelerden gelen efferent lifler, kardiyorespiratuar ve gastrointestinal otonomik tonun yanı sıra diğer otonomik fonksiyonların düzenlenmesinden sorumludur. Gastrointestinal sistem, kendi özerk sinir sistemine sahip olmasına rağmen, merkezi sinir sistemi (MSS) tarafından kontrol edilen düzenleyici sinyaller alır. Bu düzenleme, özellikle beyin sapında bulunan çekirdeklerden çıkan parasempatik ve sempatik sinir ağları aracılığıyla gerçekleşir. Sempatik sinir sistemi, gastrointestinal kaslar üzerinde büyük ölçüde inhibitör bir etki gösterir ve mukozal sekresyonu baskılar. Ayrıca, nöral aracılı vazokonstriksiyon yoluyla gastrointestinal kan akışını düzenler. Parasempatik sinir sistemi ise gastrointestinal sistem üzerinde hem uyarıcı hem de inhibitör etkiler gösterir (84). Preganglionik parasempatik nöronlar, dorsal motor çekirdek (DMN) nöronları olup kolinerjik özellik taşır. Bu nöronlar, postganglionik nöronlardaki nikotinik reseptörleri aktive etmek için asetilkolin salgırlar (85).

Asetilkolin dışındaki nörotransmitterler, preganglionik nöronlarda da tanımlanmıştır; bunlar arasında katekolaminler ve nitrik oksit (NO) yer alır. Vagal nörotransmisyon, nikotinik asetilkolin reseptör antagonistleri tarafından engellenebilir.

Ayrıca, kolinerjik olmayan nörotransmitterler, kolinerjik vagal iletimde modölatör bir rol oynar (86). Hepatik ve gastrointestinal sistemi innerve eden sempatik nöronlar, torakal ve lomber omurilikten kaynaklanır ve birincil nörotransmitter olarak norepinefrin (NE) kullanır. Bu nöronlar, enterik nöronlarla bağlantı halinde olup, enterik nöronların aktivitesini modüle ederler. Sistemin tüm vasküler yatağı, vasküler tonusun düzenlenmesinde ve kan basıncının kontrolünde önemli bir modölatör görevi görür (87).

5.VAGAL SİNİR UYARIMI (VSU)

Vagus sinir uyarımı (VSU), vagus sinirini uyarmak için kullanılan bir nöromodülasyon yöntemi olarak bilinir. İlk kez 19. yüzyılın sonlarında bir müdahale olarak önerilmesine rağmen, 1980'lerin sonunda dirençli epilepsi için umut verici bir tedavi olarak tekrar keşfedilmiştir. Bu süreçten itibaren, VSU'nun epilepsi, morbid obezite ve dirençli depresyon gibi rahatsızlıkların tedavisindeki rolü üzerine yapılan çalışmalar artmış ve FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından onay almıştır. VSU'nun invaziv yöntemleri maliyetli olduğu için yaygın kullanımı sınırlı kalmış, ancak son yıllarda kulakta uyarılan transauricular invaziv olmayan VSU (tVSU) yönteminin keşfi ile bu konudaki araştırmalar hızlanmıştır (6).

VSU, dünyada en yaygın olarak vagus sinirinin etrafına yerleştirilen ve göğüste implante edilen elektrot manşetleri ile elektriksel uyarım yapan bir beyin stimülasyonu şekli olarak uygulanmaktadır (88).

Özet olarak, VSU, vagus sinirine elektrik akımının iletilmesiyle gerçekleştirilen bir işlemdir ve bu yöntem 125 yıldır literatürde yerini korumaktadır. 19. yüzyılın sonlarında serebral kan akışını ve epilepsideki rolünü araştıran nörolog Dr. James Corning, epilepsinin düzensiz serebral kan akışı ile ilişkili olduğunu düşünmüş ve karotis kılıfını her iki yandan sıkıştırarak elektriksel olarak uyarımı hedeflemiştir. Bu yöntem akut nöbetlerde başarılı olamasa da profilaktik olarak erken dönemde başarı sağlamıştır. Ancak, 1923'te Dr. Corning'in ölümünden sonra bu teknik önemini yitirmiştir (89,90).

1997 yılında 310 hasta üzerinde yapılan kontrollü bir çalışmada (91), vagus siniri uyarımının (VSU) dirençli epilepsi tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış ve bu sonuçlar

doğrultusunda FDA, 1997'de VSU cihazı için onay vermiştir. Benzer şekilde, 2005 yılında dirençli depresyon tedavisinde ve 2015'te morbid obezite tedavisinde VSU'nun kullanımına onay verilmiştir (6).

Vagus siniri uyarımı, genel olarak vagus sinirinin elektriksel, kimyasal veya mekanik yollarla uyarılmasını tanımlayan bir nöromodülasyon tekniğidir. 19. yüzyılın sonlarında, servikal bölgeye yapılan manuel kompresyon yoluyla vagus sinirinin uyarılmasının nöbetleri baskıladığı gözlemlenmiştir (92). 1930'lu ve 1940'lı yıllarda ise vagus siniri uyarımı üzerine yapılan elektriksel stimülasyon çalışmaları başlamış ve kedi ve maymunlar üzerinde yapılan araştırmalarda vagus uyarımının beyin elektriksel aktivitesini etkilediği gösterilmiştir. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda, köpek modellerinde vagus siniri uyarımının nöbetler üzerinde antikonvülsan etkiler yarattığı tespit edilmiştir (93). 1997 yılında, dirençli epilepsi tedavisi için implantasyona dayalı bir vagus siniri uyarım cihazı FDA tarafından onaylanmıştır (94). Bu onayla birlikte, VSU klinik uygulamalarda yaygınlaşmış ve 2005 yılında dirençli depresyon için de FDA onayı alınmıştır. VSU'nun klinik kullanımı genişlerken, bipolar bozukluk, dirençli anksiyete bozuklukları, Alzheimer hastalığı, dirençli baş ağrıları ve obezite gibi çeşitli endikasyonlar için araştırmalar sürmekte, ancak bu endikasyonlar için henüz FDA onayı bulunmamaktadır (95).

Kore'de ise 1999 yılında VSU onaylanmış ve 2005 yılında sigorta kapsamına alınmıştır (96). 2018 yılına kadar, dünya genelinde 100.000'den fazla hastaya VSU cihazı implante edilmiş olup, cerrahi açıdan zorlu bir yöntem olmamasından dolayı yaygın olarak tercih edilmektedir (97).

5.1 İNVAZİV VSU

Vagus siniri, beyin sapındaki medulla oblongata bölgesinden köken alır ve servikal foramen yoluyla toraks, abdomen ve kolona kadar uzanır. Bu yol boyunca, merkezi sinir çekirdekleri aracılığıyla periferik organlarla sıkı bir şekilde bağlantı halindedir (82) (98) (99). Servikal ve nodal vagal ganglionlar, servikal foramen bölgesinde konumlanmıştır. Nodal ganglionlar, özellikle vagus sinirine ait afferent liflerin hücre gövdelerini barındırır

(100) Vagus sinirinin vücut yüzeyine dağılmış olan tek afferent dalı, kulak dalıdır ve bu dal, dış ve iç kulak kanalını ve kulak kepçesinin etrafındaki cildi innerve eder (101) (75). Cerrahi implantasyon gerektiren cihazlar için iki farklı klinik VSU yöntemi bulunmaktadır: invaziv Vagus Sinir Uyarımı (iVSU) ve non-invaziv Vagus Sinir Uyarımı(nVSU). Son yıllarda, dört farklı VSU modalitesi tanımlanmıştır: servikal olarak implante edilen VSU, transkutanöz servikal VSU, transkutanöz auriküler VSU ve perkutanöz auriküler VSU (102). iVSU, sol servikal vagus sinirine bağlanan elektrotlarla çalışan bir sistemdir. Bu elektrotlar, akım üreten bir cihaza teller aracılığıyla bağlanır ve bu cihaz, göğüs bölgesine yerleştirilen kalp pili benzeri bir aygıt şeklindedir (103) .

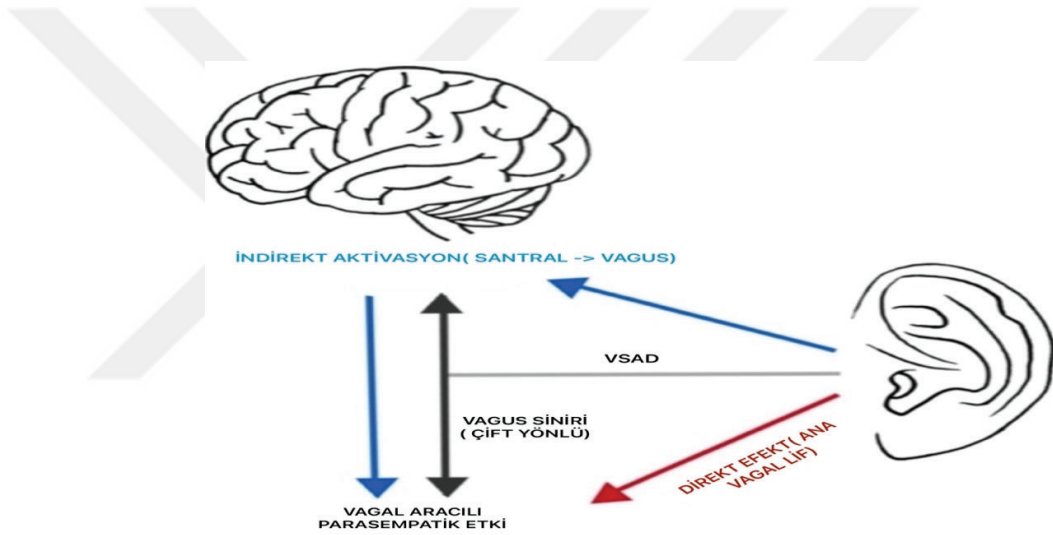
nVSU için, dış kulakta veya boyunda cilt üzerinden uyarım sağlayan bir harici cihaz kullanılır (104,105). Uzun dönem klinik çalışmalar sonucunda, iVSU, 1997 yılında FDA tarafından inatçı parsiyel epilepsi tedavisi için, 2005 yılında ise dirençli depresyon tedavisi için onay almıştır (94) ve 2005 yılında dirençli mono ve bifazik depresyonun tedavisi için onaylanmıştır (106). Avrupa’da ise iVSU, hem epilepsi hem de ilaca dirençli depresyon için tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır (107).

İnvaziv Vagus Sinir Uyarımı (iVSU)'nın invaziv yapısı ve tedavi sürecindeki çok sayıda karmaşıklık göz önünde bulundurulduğunda, araştırmacılar tamamen invaziv olmayan bir uyarım yöntemi üzerinde kapsamlı bir şekilde çalışmışlardır. nVSU, iVSU ile benzer etkinliği, kullanım kolaylığı, erişilebilirliği ve düşük yan etki profili nedeniyle klinik ve translasyonel tıpta güncel bir araştırma konusu haline gelmiştir (10). nVSU 1997 yılında klinik kullanıma girmiştir ve iVSU ile karşılaştırıldığında benzer klinik sonuçlar ve fizyolojik etkiler sağlamıştır; hatta bazı durumlarda iVSU'ya kıyasla üstün etkinlik ve fizyolojik etkiler göstermiştir (108) . Transkutanöz servikal Vagus Sinir Uyarımı, FDA tarafından migren (109) ve küme baş ağrısının (110) tedavisi için de onaylanmıştır.

Bir dizi kontrollü klinik çalışma, iVSU ve nVSU'nun kombinasyonunun felç geçirmiş hastalarda üst ekstremitelerde motor ve algısal yeteneklerin iyileştirilmesinde etkili olduğunu göstermiş ve bu kombinasyonun felç rehabilitasyonu için yeni yaklaşımlar sunduğunu ortaya koymuştur (111-113). Ancak yapılan çalışmalarda iVSU tedavisinin komplikasyonları da bildirilmiştir. Bu komplikasyonlar arasında kardiyak aritmiler,

asistoli, peritrakeal hematoma, yara bölgesinin etrafında lokalize enfeksiyonu, ağrı, vokal kord hasarı ve solunum sıkıntısı gibi postoperatif sorunlar yer almaktadır (10-13).

Ek olarak, trombolitik tedavi ve/veya mekanik için gereken zaman kısıtlamaları, inme geçiren hastaların akut fazında vagus siniri uyarıcılarının implantasyonunu pratik olmayan bir seçenek haline getirmektedir (114). Üst ekstremitte rehabilitasyonu açısından, nVSU'nun iVSU kadar etkili olduğu kanıtlanmıştır (115,116). Trombektomi ve afazi ve ekstremitte zayıflığı gibi diğer fonksiyonel bozuklukların tedavisinde de kullanılabilir. Ayrıca, nVSU'nun uygulanması, iVSU'nun potansiyel risklerini azaltabilir (117) (108) .



Şekil 7: Vagus sinirinin auriküler dalı (VSAD) aracılığıyla parasempatik aktivasyonun iki olası mekanizması (75).

(Mavi oklar, merkezi sinir sistemi aracılığıyla vagal afferentlerin aktivasyonu ve ana vagal demetin uyarımını temsil eder. Kırmızı ok, vagal efferentlerin doğrudan aktivasyonu ve ana vagal demetin uyarımını temsil eder.)

5.2 NON-İNVAZİV VSU

Son yıllarda, non-invaziv VSU, yeni bir tedavi yaklaşımı olarak ortaya çıkmıştır. Bu teknik, cerrahi implantasyon gerektirmemekte ve uyarı, transkutanöz yolla gerçekleştirilmektedir. Yöntem, kulak içine yerleştirilen bir elektrot, taşınabilir bir stimülatör ve sinyalleri yöneten dijital bir arayüzü içermektedir (10) Cerrahi müdahale gerektirmemesi ve enfeksiyon riskini azaltması, bu yöntemi diğer tekniklere göre avantajlı hale getirmektedir (118). Epilepsi nöbetleri üzerindeki etkisi, yapılan klinik çalışmalarla gösterilmeye başlanmıştır (119). nVSU'nun, bazı olumsuz etkilerinin bildirilmiş olduğu raporlar bulunmaktadır; özellikle orofaringeal ağrı ve boyun ağrısı gibi yan etkiler kaydedilmiştir (110).

nVSU'nun invaziv yöntemlerle karşılaştırılabilir etkinlik göstermesi, yan etkilerinin daha az olması ve cerrahi müdahaleden uzak bir yaklaşım sunması, bu tekniğin popülaritesini artırmıştır. Transkutanöz yöntemlerden biri olan tVSU'da, duyuşsal algılama eşiğinin üstünde ancak ağrı eşiğinin altında bir uyarı uygulandığında, servikal uyarımın beyin aktivasyonu üzerindeki etkisi açısından fark olmadığı rapor edilmiştir (120-122).

5.2.1 TRANSAURİKULAR VAGUS SİNİR UYARIMI (tVSU)

Transkutanöz yöntemle uyarım, vagus sinirinin afferentlerinin dış kulak (vagusun auriküler dalı) veya boyun (vagus sinirinin servikal dalı) bölgelerinde uyarılmasına dayanmakta ve implantasyon gereksinimini ortadan kaldırmaktadır. Vagus sinirinin auriküler dalının elektriksel stimülasyonu, servikal VNS'ye göre daha yeni bir yöntem olup, bu konuda literatürde henüz yeterli veri bulunmamaktadır (75). Transauricular vagus siniri uyarımının (tVSU) yapılabilmesi için en uygun anatomik bölgenin tespit edilmesine yönelik birçok anatomik ve fonksiyonel MR görüntüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, cymba choncae ve tragusun en uygun bölgeler olduğunu ve mevcut cihazların büyük çoğunluğunun bu bölgeye odaklandığını ortaya koymuştur (108) (115) (123).

Kulağın cymba conchae ve cavum conchae bölgeleri, temel olarak vagus sinirinin auriküler dalı tarafından innerve edilir. Transkutanöz VSU yöntemleri, bu dalın uyarılabilir alanını hedef almaktadır. Duyusal algı eşiğinin üzerinde, ancak ağrı eşiğinin altında bir seviyede uyarıldığında, servikal uyarım ile beyin aktivasyonu arasında fark olmadığı rapor edilmiştir (120-122).

Dış kulak , üç farklı duyuşal sinir tarafından beslenmektedir: aurikulotemporal sinir, büyük auriküler sinir ve vagus sinirinin auriküler dalı (124). Vagus sinirinin auriküler dalı (VSAD, Arnold siniri) insanlarda detaylı bir şekilde araştırılmış olup, temporal kemikte farklı yollar izlediğı tespit edilmiştir. VSAD'nin kulağın cymba conchae'sında sonlandığı gözlemlenmiştir (125). Auriküler vagus siniri uyarımının dayandığı temel prensip, dış kulağın somatosensoriyel innervasyonunu sağlayan ve Arnold siniri olarak da bilinen vagus sinirinin auriküler dalının kutanöz innervasyon alanıdır (126).

Vagus sinirinin auriküler dalı aktive edildiğinde, bu sinirin afferent liflerinin sonlandığı ve iç organlardan gelen duyuşal bilgilerin işlendiğı merkez olan Nucleus Tractus Solitarius (NTS) ile bir bağlantı kurulmaktadır (127). Vagus sinirinin efferent lifleri ise birçok organ sistemini yönettiğı için, auriküler dalın uyarılmasının bu sistemlerle ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğı öne sürölmektedir. İlk olarak sıçan modellerinde, auriküler daldan NTS'ye afferent projeksiyonların varlığı bildirilmiştir (14). Auriküler dalın otonom sinir sistemi ile merkezi sinir sistemi arasındaki ilişkisinin, aurikülo-vagal afferent yol (AVAY) olarak tanımlandığı belirtilmiştir. Kulaktan yapılan non-invaziv uyarımın, parasempatik aktiviteyi artırdığı, sempatik aktiviteyi baskıladığı ve bu etkilerin sempatik inhibisyon mekanizmaları yoluyla ortaya çıktığı düşünölmektedir (15). Dış kulak yolunun transkutanöz olarak uyarılmasıyla deney ve sham grubu arasında beyin aktivitesi karşılaştırıldığında, belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir; bu yöntemin umut verici sonuçlar verdiğı saptanmıştır (122). Yapılan çalışmalarda, parasempatik afferent liflerin aktive edilmesiyle vagus sinirinin auriküler dalına bağılı olarak tragusun elektriksel stimölasyonunun kalp hızını düşürdüğü gösterilmiştir (128,129).

İnvaziv vagus siniri uyarım yöntemleri ile karşılaştırıldığında, benzer sonuçlar ve tutarlılıklar bildirilmiştir. Deneyşel çalışmalarda, invaziv ve non-invaziv yöntemler

arasında antikonvulsif etkiler açısından bir fark olmadığı rapor edilmiştir (130). Non-invaziv vagus siniri uyarımı, invaziv yöntemlerle karşılaştırılabilir olması, daha az yan etkiye sahip olması ve cerrahi müdahale gerektirmemesi nedeniyle daha fazla ilgi görmüştür. 2010 yılında epilepsi ve depresyon tedavisi için, 2012 yılında ise ağrı tedavisi için Avrupa’da bir transkutanöz cihaz onaylanmış ve kullanım izni almıştır (131).

5.2.1.1 tVSU ETKİ MEKANİZMASI

Günümüzde transkutanöz vagus siniri uyarımının deneysel modellerde kullanımı, genellikle antiinflamatuvar mekanizmalar üzerine odaklanmaktadır. Bu durum iki temel mekanizma ile açıklanmaktadır. Vagus sinirinin afferent yolunun aktive olduğu mekanizmada, inflamasyon başladığında, interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi sitokinler bu yolu harekete geçirir. Bu sinyaller Nucleus Tractus Solitarius’a (NTS) iletilir, ardından hipotalamusa projekte edilerek kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salınımını tetikler. CRH, hipofizde adrenokortikotropik hormonun (ACTH) salınımını uyarır ve bunun sonucunda adrenal bezlerden kortikosteroid salınımı artar. Serum kortikosteroid düzeyinin yükselmesiyle sitokinler baskılanır ve inflamasyon süreci engellenir (132). Birçok inflamatuvar hastalığın patogenezi, bu kaskadın bozulmasıyla ortaya çıkar ve tVSU'nun antiinflamatuvar etkisi, hastalıkların tedavisinde kullanılmasına imkân tanır. Ayrıca, transauricular vagus sinir stimülasyonunun vagus sinirinin efferent kolinerjik antiinflamatuvar yolunu da aktive ederek inflamasyonu modüle ettiği kanıtlanmıştır (133,134). Vagus sinirinin efferent lifleri asetilkolin salgısını artırır ve bu nörotransmitter, makrofajlar tarafından eksprese edilen alfa-7 nikotinik asetilkolin reseptörüne ($\alpha 7nAChR$) bağlanır. Bu etkileşim sonucunda, makrofajlardan TNF ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimi baskılanır (132). Çeşitli çalışmalarda TNF seviyelerindeki farklılıklar, VSU'nun inflamatuvar süreçlerdeki etkili mekanizması ile ilişkilendirilmektedir (132) (135).

5.2.1.2 tVSU UYGULAMA TEKNIĞİ

Transauricular vagus siniri uyarımında uygulamaya göre parametreler belirlenmeli, güvenli aralık oluşturulmalı ve bu doğrultuda planlanma yapılmalıdır (136). Uyarımın tek kulaktan mı yoksa her iki kulaktan mı yapılması gerektiği konusunda bazı görüş ayrılıkları mevcuttur. Vagus sinirinin efferent liflerinin sağ tarafta kalbi innerve ettiğine dair inanış nedeniyle bazı çalışmalar sağ kulaktan uyarımı desteklese de sol kulakta da benzer etkilerin elde edildiği ve ciddi yan etkilere rastlanmadığı gösterilmiştir (137). İki taraflı auriküler dalın uyarılması, beyin sapında artan duyuşal girdilerle uyarımın etkinliğini artırmaktadır (138). Anatomik olarak, cyma conchae bölgesi, %100 oranında vagus sinirinin auriküler dalının hakimiyetinde olduğundan en uygun uyarım alanı olarak kabul edilir. Kulak anatomisine bakıldığında, antiheliks %73, cavum conchae %45 ve tragus %45 oranında auriküler dal tarafından innerve edilmektedir (125). Elektrot yerleştirilirken, auriküler dal dışındaki sinirlerin uyarılmasını önlemek için dikkatli olunmalıdır.

Elektriksel stimölasyon belirli parametrelere dayandırılmalıdır ve mevcut çalışmalar, en uygun frekans aralığının 20 Hz ile 25 Hz (0,5-120 Hz) arasında olduğunu bildirmektedir (108).

Her ne kadar uyarım frekansı ile ilgili çalışmalar sınırlı olsa da yakın tarihli bir araştırma, sıçan modellerinde en etkili frekansın 20 Hz olduğunu ortaya koymuştur (139). Darbe genişliği genellikle 1 ms veya 0,25 ms (0,01-1 ms) olarak uygulanmaktadır (108). En uygun dalga boyunun 500 µs olduğu bildirilmiştir (140). Uyarımın yoğunluğu, deneğin tolere edebilmesine göre ayarlanmalıdır, ancak birçok çalışmada yoğunluğa ilişkin detaylı veri eksikliği bulunmaktadır.

Çeşitli çalışmalar, transauricular vagus uyarımının parametrelerini ele alsa da günümüzde bu parametrelerin net bir standardı oluşmamıştır. Pratikte, uyarım parametrelerinin nasıl kombine edileceğine dair yeterli bilgi bulunmamaktadır. Birçok çalışma, yöntemeye yönelik uyarım parametrelerini belirlemeye çalışmaktadır (141).

GEREÇ VE YÖNTEMLER (MATERYAL METOD)

Planlanan çalışmanın yapılabilmesi için gerekli etik kurul izni, Sağlık Bilimleri Üniversitesi (SBÜ) Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 19.07.2024 tarihinde onaylanmıştır. SBÜ Bilimsel Araştırma Projesi Birimi (BAP) tarafından 15.10.2024 tarihinde kabul görmüş ve 2024/102 proje numarası ile desteklenmesine karar verilmiştir. Bu çalışma; SBÜ Hamidiye Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

DENEY GRUPLARININ BARINMA ŞARTLARI

Bu çalışma, ortalama ağırlığı 300 ± 20 gram, 16-20 haftalık toplam 21 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan üzerinde yapıldı. Çalışma boyunca tüm sıçanlar normal oda ısısı ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) ve nemine (%40--60) sahip, 12 saat aydınlık- 12 saat karanlık ortamda her kafeste "1" sıçan olmak üzere, metal kafeslerde tutulup, standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Kafes bakımı günlük kontrollerle düzenli olarak yapıldı. Çalışma sırasında tüm sıçanlar 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' göre insani muameleyle tabi tutuldu.

DENEY GRUPLARI

Sıçanlar; randomize olarak her biri 7 sıçandan oluşan 3 ana gruba ayrılmıştır.

Tablo 4: Sıçan Deney Grupları

Deney Grupları	Sıçan Sayısı	İşlem
Grup A (Kontrol)	7	Laparotomi / tVSU (Transauricular Vagus Siniri Uyarımı)-
Grup B (İ/R)	7	Laparotomi + / I/R (1 saat iskemi, 3 saat reperfüzyon) / tVSU-
Grup C (İR+tVSU)	7	Laparotomi + / I/R (1 saat iskemi, 3 saat reperfüzyon) + tVSU+ 1mA, 500µs, 20Hz, 5V, 3 saat boyunca

CERRAHİ İŞLEM

Sıçanlar üzerinde yapılan tüm cerrahi girişimler anestezi altında uygulandı. Anestezi indüksiyonunda, Ketamin Hidroklorür (Ketalar® vial, 50 mg/ml, Eczacıbaşı. Istanbul, Turkey) 80 mg/kg intraperitoneal (ip) ve Ksilazin Hidroklorür (Rompun® vial, 23,32 mg/ml, Bayer. Istanbul, Turkey) 10 mg/kg intraperitoneal (ip) kullanıldı.

Anestezi altında tüm sıçanlara kuyruk veninden 26 G angiocut ile damar yolu açıldı. Laparatomiden 30 dakika önce profilaktik olarak 30 mg/kg/mL sefazolin sodyum uygulandı. Tüm sıçanların karın bölgeleri ve göğüs bölgesi (Ekokardiyografi çekimi için) tıraş edilip ameliyathane koşullarında povidon iyot ile cerrahi saha dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra tüm grup (Grup A, Grup B ve Grup C) sıçanlara 3 cm uzunluğunda tam kat karın orta hat insizyonu yapıldı.

Grup A sıçanlarında laparotomi sonrasında hepatik iskemi ve tVSU uygulaması yapılmadan histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için örnekler alındı. Deney grubu hayvanları işlem sonrası kardiyak ponksiyon ile sakrifiye edildi. 1 adet Grup A deney grubu sıçanı anestezi indüksiyonu sonrası ex oldu.

Grup B ve Grup C sıçanlara laparotomi sonrası karaciğer sol portal triad invaziv olmayan vasküler klemp ile kapatıldı. Grup B ve C sıçanlarında, karaciğer ortaya çıkarıldı ve sol lateral ve median lobları besleyen sol portal triad (hepatik arter, portal ven, safra kanalı) yapıları vasküler klips ile kapatıldı. Parsiyel hepatik iskemi (%70) sağlamak amacıyla bu yöntem kullanıldı. Akut segmental hepatik iskemi modeli uygulanmış oldu. Bu parsiyel hepatik iskemi metodu ile sağ ve kaudat loblara portal dekompresyon sağlanabildi ve mezenterik venöz konjesyonun önüne geçilmiş oldu.

Grup B sıçanlarına 3 saat sonra relaparotomi yapıldı ve 1 saatlik reperfüzyon sonrası histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için örnekler alındı. İşlem sonrası hayvanlar kardiyak ponksiyon ile sakrifiye edildi.

Grup C sıçanlarında 3 saatlik iskemi süresince eş zamanlı olarak tVSU ile uyarım yapıldı. 3 saat bittikten sonra tVSU durduruldu ve relaparotomi yapılarak vasküler klemp

ıkarıldı. 1 saatlik reperfüzyon süresi sonrasında histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için örnekler alındı. İşlem sonrası hayvanlar kardiyak ponksiyon ile kurifiye edildi.

TRANSAURİCULAR VAGUS SİNİRİ UYARIMI (tVSU)

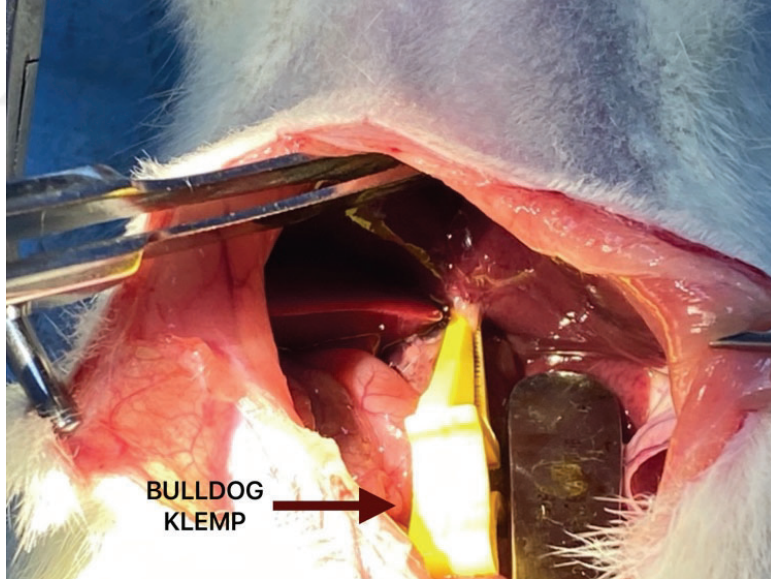
Transauricular vagus siniri uyarımı (tVSU), hayvan çalışmaları için tasarlanmış olan Vagustim® cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu cihaz, mobil uygulama aracılığıyla Bluetooth teknolojisi ile kontrol edilen ve CE (Conformité Européenne) onaylı bir transauricular vagal uyarım cihazıdır (Bkz. EK 3). Uyarım işlemi sırasında, cihazın elektrotları sıçanların her iki kulağındaki tragus bölgesine yerleştirilerek uyarım sağlanmıştır.

Grup C sıçanlarına hepatik iskemi yapıldıktan ve insizyon kapatıldıktan sonra anestezi altında iken 3 saat boyunca 30 saniye açık 30 saniye kapalı olacak şekilde 1 mA, atım süresi 500 µs, frekansı 20 Hz, gerilimi 5 V uyarım parametreleri ayarlanarak uyarım yapılmıştır. Grup C sıçanlarına uyarım öncesi ve uyarım sonrası uyarımın doğruluğunu test etmek amacıyla ekokardiyografi çekimi yapılmıştır (108) (142-144).

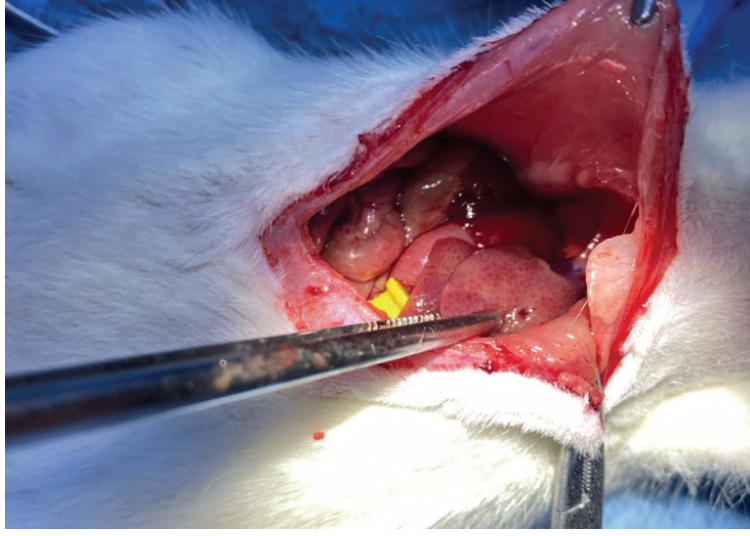
Grup A ve B sıçanlarına laparotomi sonrası 3 saat boyunca cihazın elektrotları bağlandı ancak stimülasyon verilmedi. Üç grup arasında uyarım haricindeki metodolojik benzerlik sağlanmış oldu. Tüm grup sıçanlarına uyarı verilsin ya da verilmesin önerilen dozlarda anestezi uygulanarak işlemler yapılmıştır.



Şekil 8: Anestezi altındaki sıçana tVSU uygulaması



Şekil 9: Karaciğer diseksiyonu ve sol portal triad klempleme işlemi



Şekil 10: Klip koyma işlemi sonrası iskemiye giden karaciğer lobu

RE-LAPAROTOMİ ve ÖRNEKLEME

Postoperatif 4.saatte (3 saat iskemi + 1 saat reperfüzyon) tüm sıçanlara batın orta hat tam kat insizyon ile re-laparotomi işlemi yapıldı. Sol ve medial karaciğer lobları rezeke edilerek doku örneğinin yarısı histopatolojik inceleme ve diğer yarısı doku biyokimyasal ölçümleri için belirli şartlarda saklandı. Histopatolojik inceleme için; doku örnekleri hazırlanıncaya dek formaldehit içinde, biyokimyasal inceleme için -80 °C ependorf tüplerde saklandı. Tüm sıçanların doku örnekleri alındıktan sonra biyokimyasal değerlendirme için intrakardiyak kan alınıp ponksiyon ile sakrifiye edildi.

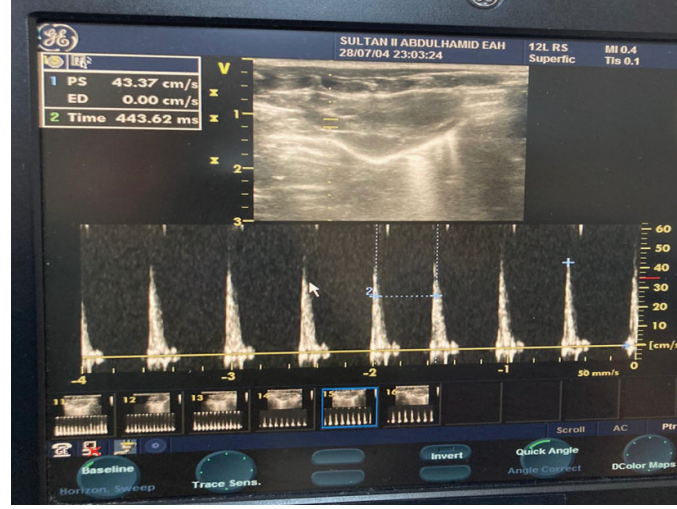
EKOKARDİYOGRAFİ ÇEKİMİ

Tüm hayvanlar genel anestezi altındayken ekokardiyografi çekimi gerçekleştirildi. SBÜ Hamidiye Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda sıçanlar anesteziye alındı ve ekokardiyografi öncesinde prob ile temas edecek olan göğüs bölgesi tüylerden temizlendi. Anestezi altındaki hayvanlar, General Electric Vivid 55 cihazı ve 12S probu kullanılarak görüntülendi. Kalp incelemesi sol yan pozisyonunda Doppler yöntemi ile yapıldı. Ölçümler, operasyon sonrası ve Vagus sinir stimülasyonu sonrası iki

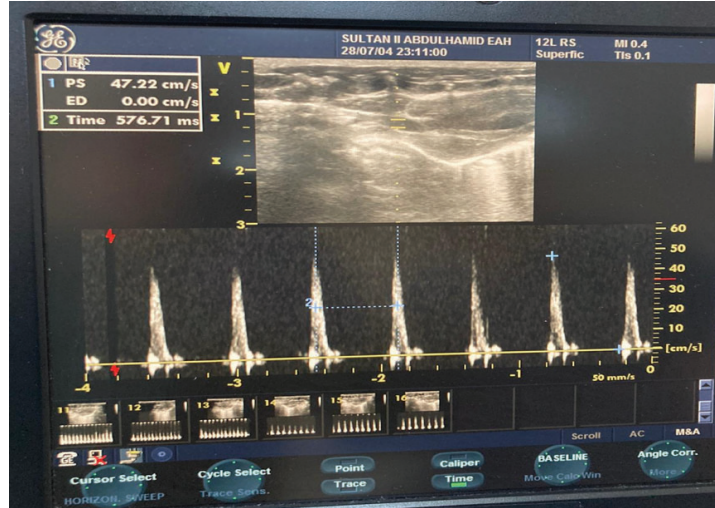
kez gerçekleştirilerek R-R aralığı ve kalp atım hızları incelendi. Kalp tepe atım hızı (KTA), kalbin dakikadaki atım sayısı ya da milisaniye cinsinden R-R aralığı ile ifade edilir. KTA ile R-R aralığı arasında ters orantılı bir ilişki bulunur ($KTA \times RR \text{ aralığı} = 60000$). Bu parametrelerdeki değişiklikler büyük ölçüde otonom sinir sistemi tarafından yönetilir. Sempatovagal dengenin durumu, bu ölçümlerin prognostik önemini belirler. Vagal sinir aktivitesinin R-R aralığı ile pozitif bir korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (145-146).



Şekil 11: Vagal uyarım esnasında altında ekokardiyografi çekimi



Şekil 12: tVSU öncesi ekokardiyografi görüntüsünde R-R mesafesi



Şekil 13: tVSU sonrası ekokardiyografi görüntüsünde R-R mesafesi

HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Sol lob ve median (iskemiye maruz kalan) karaciğer loblarından alınan doku örnekleri rutin takip sonrası parafin bloklara gömüldü. Dokular mikrotom yardımıyla 4 mikron kalınlığında doku kesitleri hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyandı. Sonrasında ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme Sağlık Bilimler Üniversitesi Sultan 2.Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniğinde

bir uzman patolog tarafından yapıldı. Histolojik hasarı değerlendirmek için, sinüzoidal konjesyonun derecesine, hepatosit sitoplazmasının vakuolizasyonuna ve hepatosit nekrozuna göre 0'dan 4'e kadar derecelendirmek için Suzuki sınıflandırması kullanıldı (147). Nekrotik alanın yüzdesi, karaciğer numunesi başına en az 5 alanda değerlendirildi.

Tablo 5: Suzuki sınıflandırması

<i>Skor</i>	<i>Konjesyon</i>	<i>Vakuolizasyon</i>	<i>Nekroz</i>
0	<i>Yok</i>	<i>Yok</i>	<i>Yok</i>
1	<i>Çok az</i>	<i>Çok az</i>	<i>Tek hücre nekrozu</i>
2	<i>Hafif</i>	<i>Hafif</i>	<i>%30<</i>
3	<i>Orta derece</i>	<i>Orta derece</i>	<i>%30-60</i>
4	<i>Ağır</i>	<i>Ağır</i>	<i>%60></i>

BIYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlardan alınan karaciğer dokuları biyokimyasal değerlendirme için analiz edilinceye kadar -80 °C'de saklandı. İntrakardiyak kan örnekleri ise jelli pıhtı aktivatörlü biyokimya tüplerine alındı. Alınan örnekler 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edilip (Beckman Coulter Allegra® X-30, IN, ABD) elde edilen serum örnekleri alikotlanarak analizler yapılana kadar -80°C'de saklandı.

Doku Homojenizasyonu ve Total Protein Tayini

Karaciğer doku örnekleri 1:9 (w/v) 0,1 mol/L fosfat tamponlu salin (pH 7,4) solüsyonu içerisinde seramik bilyelerle homojenizatör cihazında 10 dakika homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra örnekler +4°C'de 10 dakika boyunca 10000 × g'de santrifüj (Beckman Coulter Allegra® X-30, IN, ABD) edilerek süpernatantlarına ayrıldı.

Ayrılan süpernatantlardaki total protein tayini BCA (ThermoFisher, 23225) yöntemine dayalı ticari kit kullanılarak 562 nm dalga boyunda spektrofotometri (BioTek, Synergy™ HTX Flaş Çok Modlu Okuyucu) ile ölçülerek örneklerdeki düzeyler, standart eğri ile karşılaştırılarak belirlendi.

Oksidatif Stres ve Antioksidan Parametrelerin Analizi

Total antioksidan seviye (TAS), total oksidan seviye (TOS), total tiyol (TT) ve natif tiyol (NT) seviyeleri ticari olarak satın alınan kitler (Rel Assay) ile farklı fotometrik yöntemlerle ölçüldü. Serum ve dokulardaki oksidatif stres indeksi TOS seviyelerinin TAS seviyelerine oranı alınarak hesaplandı. Serumlardaki disülfid (DIS), TT, NT ve grupları arasındaki farkın yarısı düzeylerini hesaplamak için kullanıldı. DIS, TT ve NT seviyeleri belirlendikten sonra; DIS/NT, DIS/TT ve NT/TT yüzdelik oranları (%) hesaplandı.

Sıçanların serum ve doku örneklerindeki myeloperoksidaz (MPO, Elabscience E-BC-K074-M), nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2, Elabscience E-EL-R1052) ve Malondialdehit (MDA, Elabscience E-BC-K025-S) düzeyleri enzime bağlı immünosorbent assay (ELISA) kiti ile üreticinin talimatlarına göre uygulandı. Mikroplaka kuyulara 100 µL serum/doku örneklerinden eklenip 90 dakika 37°C’de inkübe edildi. Ardından kuyular aspire edildi ve sonrasında 100 µL antikor eklenip 60 dakika boyunca 37°C’de inkübasyona tekrar bırakıldı. İnkübasyondan sonra, her bir kuyuya 350 µL yıkama solüsyonu eklendi ve bu prosedür 3 kez tekrarlandı. Ardından yıkanmış her bir kuyuya 100 µL horseradish peroksidaz (HRP) konjugat eklendi. Bu karışım 37°C etüvde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, her bir kuyuya tekrar yıkama prosedürü 3 kez uygulandı. Boş kuyulara 90 µL substrat reaktif eklenip karanlık bir ortamda üstü kapalı bir şekilde 37°C etüvde 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından reaksiyonu durdurmak için her kuyuya 50 µL stop solüsyonu eklendi ve örnekler 450 nm dalga boyunda spektrofotometri (BioTek, Synergy™ HTX Flaş Çok Modlu Okuyucu) ile ölçüldü. Örneklerdeki düzeyler, MPO/Nrf2/MDA standart eğrisi ile karşılaştırılarak belirlendi. Doku örneklerinde ölçülen MPO, Nrf2 ve MDA düzeylerinin sonuçları ise doku total protein miktarıyla normalize edilerek mg protein olarak verildi.

Enflamasyon ve Hipoksi Parametrelerin Analizi

Toplanan serum ve karaciğer örneklerindeki enflamasyon biyobelirteçlerden interlökin-1 beta (IL-1 β , Elabscience E-EL-R0012), interlökin-6 (IL-6, Elabscience E-EL-R0015), interlökin-10 (IL-10, Elabscience E-EL-R0016), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α , Elabscience E-EL-R0019) ve hipoksi indüklenebilir faktör 1 alfa (HIF-1 α , Elabscience E-EL-R0513) düzeyleri ELISA kiti ile üreticinin talimatlarına göre uygulandı. Mikroplaka kuyulara 100 μ L serum/doku örneklerinden eklendi ve 37°C etüvde 90 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, kuyular boşaltıldı ve boş kuyulara 10 μ L Sıçan IL-1 β /IL-6/IL-10/TNF- α /HIF-1 α antikoru eklendi ve 37°C etüvde 1 saat inkübe edildi. Sonrasında her bir kuyu 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından her kuyuya 100 μ L HRP-konjugat eklendi ve bu karışım 30 dakika 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyular tekrar 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından, 90 μ L substrat reaktifi eklenip karanlık bir ortamda üstü kapalı bir şekilde 15 dakika 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı. Ardından her kuyuya 50 μ L stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve örnekler 450 nm dalga boyunda spektrofotometri (BioTek, Synergy™ HTX Flaş Çok Modlu Okuyucu) ile ölçüldü. Örneklerdeki düzeyler, IL-1 β /IL-6/IL-10/TNF- α /HIF-1 α standart eğrisi ile karşılaştırılarak belirlendi. Doku örneklerinde ölçülen IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α ve HIF-1 α düzeylerinin sonuçları doku total protein miktarıyla normalize edilerek mg protein olarak verildi.

Araştırmanın Evren ve Örneklemi

Araştırmada, ratlarda transauricular vagus uyarımının hepatik iskemi reperfüzyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla araştırmaya dahil edilecek örneklem büyüklüğünü belirlemede yararlanılacak etki büyüklüğünün hesaplanmasında Cohen tarafından geliştirilen hesaplama (d-değeri) yöntemi kullanıldı (148). Etki büyüklüğü indeksi olan d değerini belirlemek için Zhang, Q ve arkadaşlarının tarafından 2019 yılında bildirilen, vagus sinir stimülasyonunun hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmaya ait bulgular kullanıldı (149). Bu çalışmada, vagus uyarımının I/R dokularındaki nekrotik alanı ve hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığı

bildirilmiştir. Bu bulgudan hareketle araştırmada kullanılacak etki büyüklüğü, $d=0,831$ olarak hesaplandı. Bu bağlamda üç grup arasındaki nicel farklılık (ANOVA testi) için $d=0,831$, %95 güven düzeyinde ($1-\alpha$), %80 test gücü ($1-\beta$) ile G-power (versiyon 3.1) paket programı kullanılarak her grupta 6 tane olmak üzere toplam 18 adet ratın örneklem grubu olarak alınması öngörüldü. Ancak olası hayvan kayıpları göz önünde bulundurularak her grup için 7 hayvan planlandı.

Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) sürüm 27 programı (IBM Corp., Armonk, NY, USA) kullanıldı. Sürekli her bir değişkenden elde edilen puanların normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için çarpıklık (skewness) ve basıklık (kurtosis) katsayıları hesaplandı. Ayrıca normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile de sınıandı. Kategorik değişkenler frekans (n, %); sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Sürekli değişkenlerde gruplar arasındaki karşılaştırmalar Tek yönlü ANOVA (varyans) ve Kruskal Wallis H testleri ile yapıldı. ANOVA ve Kruskal Wallis testinde, anlamlı farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Tukey post-hoc testi ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Tekrarlı ölçümlerim karşılaştırılmasında Bağımlı örneklem t testinden yararlanıldı. Gruplar arasındaki nitel karşılaştırmalarda ise Ki-kare testleri (Pearson ki-kare testi ve Fisher kesin ki-kare testi) kullanıldı. Sonuçlar; %95 güven aralığında anlamlılık ise $p<0.05$ (iki yönlü) altında değerlendirildi.

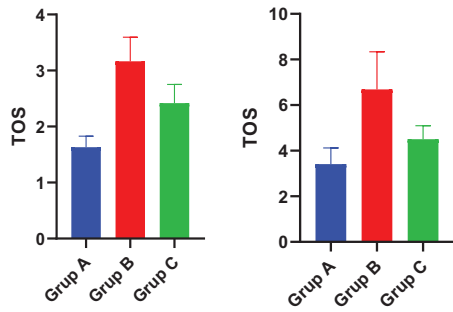
BULGULAR

Araştırma gruplara göre dokudan bakılan biyokimya ölçüm sonuçları Tablo 6’da ve serumdan bakılan biyokimya ölçüm sonuçları Tablo 7’de sunuldu.

Total Oksidan Seviye (TOS)

Araştırma grupları A, B ve C TOS doku düzeyi sırasıyla $1,63 \pm 0,20$; $3,17 \pm 0,43$ ve $2,42 \pm 0,33$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku TOS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=32,887$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A TOS düzeyi grup B ve C’den daha düşükken; C grubu TOS düzeyi B’den daha düşüktü.

Araştırma grupları A, B ve C serum TOS düzeyi sırasıyla $3,41 \pm 0,71$; $6,68 \pm 1,65$ ve $4,50 \pm 0,60$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum TOS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=14,785$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B’den kaynaklandığı belirlendi. Grup B TOS düzeyi grup A ve C’den daha yüksekti.



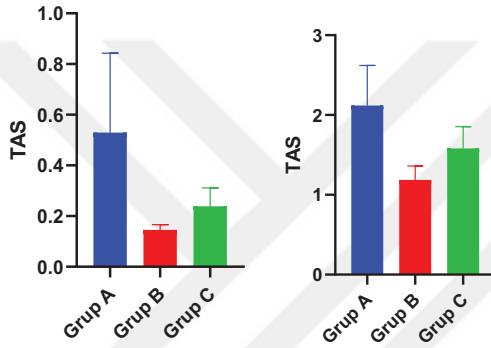
Şekil 1: Araştırma gruplarına göre sırasıyla doku ve serum TOS düzeyi

Total Antioksidan Seviye (TAS)

Araştırma grupları A, B ve C doku TAS düzeyi sırasıyla $0,53 \pm 0,31$; $0,15 \pm 0,02$ ve $0,24 \pm 0,07$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku TAS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=8,300$; $p=0,003$).

Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup A'dan kaynaklandığı belirlendi. Grup A TAS düzeyi grup B ve C'den daha düşüktü.

Araştırma grupları A, B ve C serum TAS düzeyi sırasıyla $2,12 \pm 0,50$; $1,19 \pm 0,18$ ve $1,58 \pm 0,27$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum TAS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=12,562$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A TAS düzeyi grup B ve C'den daha yüksekken; C grubu TAS düzeyi B'den daha yüksekti.

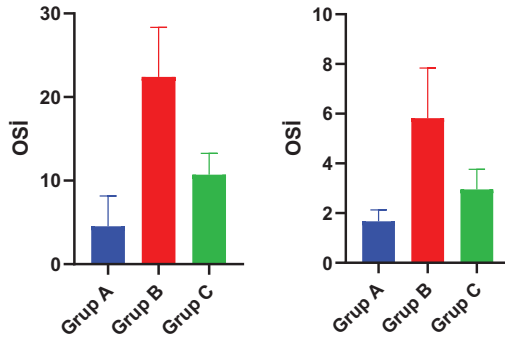


Şekil 2: Araştırma gruplarına göre sırasıyla doku ve serum TAS düzeyi

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Araştırma grupları A, B ve C doku OSİ düzeyi sırasıyla $4,55 \pm 3,62$; $22,41 \pm 5,91$ ve $10,70 \pm 2,56$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku OSİ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=29,354$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A OSİ düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu OSİ düzeyi B'den daha düşüktü.

Araştırma grupları A, B ve C serum OSİ düzeyi sırasıyla $1,67 \pm 0,46$; $5,82 \pm 2,02$ ve $2,95 \pm 0,81$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum OSİ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=17,145$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B'den kaynaklandığı belirlendi. Grup B OSİ düzeyi grup A ve C'den daha yüksekti.

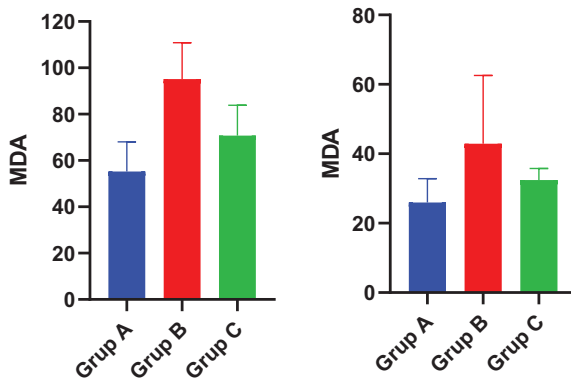


Şekil 3: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum OSI düzeyi

Malondialdehit (MDA)

Araştırma grupları A, B ve C doku MDA düzeyi sırasıyla $55,29 \pm 12,77$; $95,11 \pm 15,79$ ve $70,77 \pm 13,04$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=13,472$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B'den kaynaklandığı belirlendi. Grup B MDA düzeyi grup A ve C'den daha yüksekti.

Araştırma grupları A, B ve C serum MDA düzeyi sırasıyla $25,99 \pm 6,87$; $42,93 \pm 19,67$ ve $32,44 \pm 3,33$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=7,354$; $p=0,025$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B ile A arasında olduğu belirlenirken; B grubu MDA düzeyi daha yüksekti.

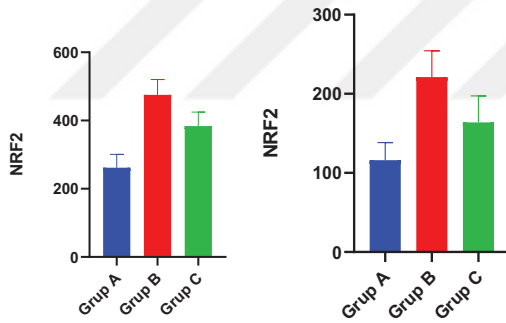


Şekil 4: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum MDA düzeyi

Nükleer Faktör 2 ile İlişkili Faktör 2 (NRF2)

Araştırma grupları A, B ve C doku NRF2 düzeyi sırasıyla $261,85 \pm 39,03$; $475,03 \pm 45,31$ ve $383,82 \pm 40,86$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku NRF2 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=41,726$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A NRF2 düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu NRF2 düzeyi B'den daha düşüktü.

Araştırma grupları A, B ve C serum NRF2 düzeyi sırasıyla $116,04 \pm 22,45$; $221,01 \pm 33,30$ ve $163,78 \pm 33,48$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum NRF2 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=19,219$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A NRF2 düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu NRF2 düzeyi B'den daha düşüktü.

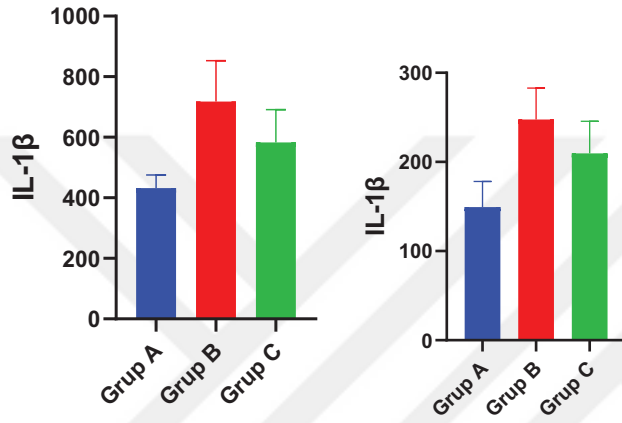


Şekil 5: Araştırma gruplarına göre sırasıyla doku ve serum NRF2 düzeyi

İnterlökin 1 β (IL-1 β)

Araştırma grupları A, B ve C doku IL-1 β düzeyi sırasıyla $431,93 \pm 43,49$; $718,27 \pm 134,98$ ve $582,90 \pm 108,64$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku IL-1 β düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=11,879$; $p=0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A IL-1 β düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu IL-1 β düzeyi B'den daha düşüktü.

Araştırma grupları A, B ve C serum IL-1 β düzeyi sırasıyla 149,38 $\pm$ 28,85; 247,65 $\pm$ 35,11 ve 209,55 $\pm$ 36,09 olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum IL-1 β düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı (F=13,793; p<0,001). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A IL-1 β düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu IL-1 β düzeyi B'den daha düşüktü.

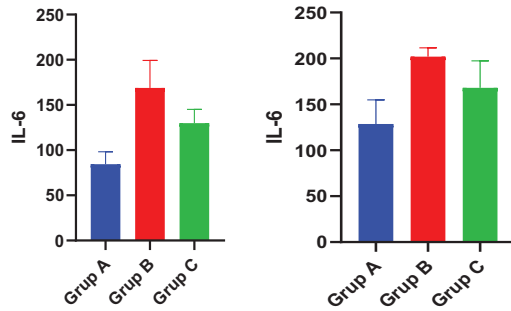


Şekil 6: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum IL-1 β düzeyi

İnterlökin 6 (IL-6)

Araştırma grupları A, B ve C doku IL-6 düzeyi sırasıyla 84,51 $\pm$ 13,70; 168,84 $\pm$ 30,45 ve 129,99 $\pm$ 15,17 olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku IL-6 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı (F=24,773; p<0,001). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A IL-6 düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu IL-6 düzeyi B'den daha düşüktü.

Araştırma grupları A, B ve C serum IL-6 düzeyi sırasıyla 128,67 $\pm$ 26,19; 201,97 $\pm$ 9,59 ve 167,98 $\pm$ 29,37 olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum IL-6 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı (F=16,112; p<0,001). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A IL-6 düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu IL-6 düzeyi B'den daha düşüktü.

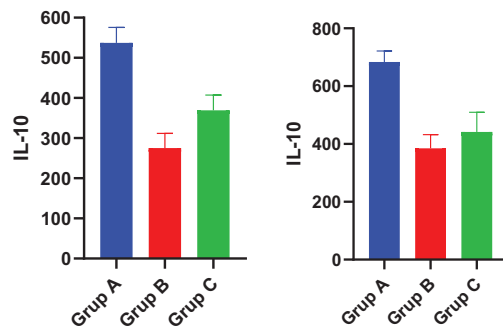


Şekil 7: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum IL-6 düzeyi

İnterlökin 10 (IL-10)

Araştırma grupları A, B ve C doku IL-10 düzeyi sırasıyla $537,21 \pm 38,34$; $275,13 \pm 36,49$ ve $369,49 \pm 37,66$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku IL-10 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=80,246$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A IL-10 düzeyi grup B ve C'den daha yüksekken; C grubu IL-10 düzeyi B'den daha yüksekti.

Araştırma grupları A, B ve C serum IL-10 düzeyi sırasıyla $683,46 \pm 38,04$; $385,22 \pm 47,22$ ve $441,38 \pm 68,32$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum IL-10 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=55,519$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup A'dan kaynaklandığı belirlendi. Grup A IL-10 düzeyi grup B ve C'den daha yüksekti.

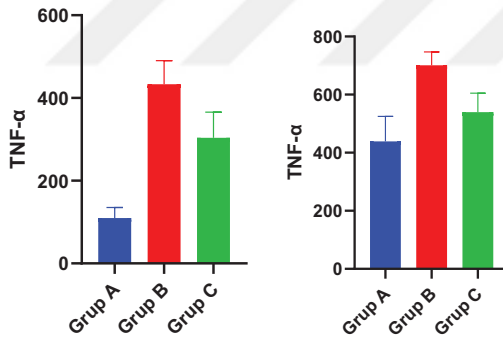


Şekil 8: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum IL-10 düzeyi

Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)

Araştırma grupları A, B ve C doku TNF- α düzeyi sırasıyla $109,95 \pm 25,14$; $433,17 \pm 56,96$ ve $303,55 \pm 62,34$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku TNF- α düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=62,765$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A TNF- α düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu TNF- α düzeyi B'den daha düşüktü.

Araştırma grupları A, B ve C serum TNF- α düzeyi sırasıyla $438,87 \pm 86,26$; $700,70 \pm 46,43$ ve $539,65 \pm 65,67$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum TNF- α düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=25,589$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A TNF- α düzeyi grup B ve C'den daha düşükken; C grubu TNF- α düzeyi B'den daha düşüktü.

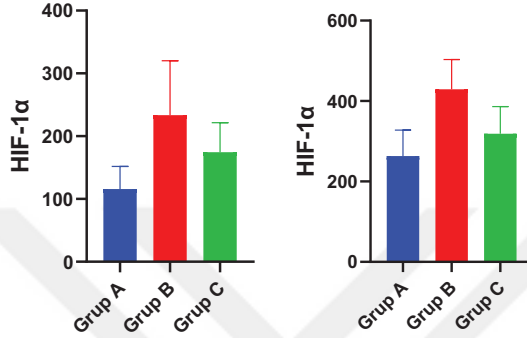


Şekil 9: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum TNF- α düzeyi

Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1 Alfa (HIF-1 α)

Araştırma grupları A, B ve C doku HIF-1 α düzeyi sırasıyla $115,98 \pm 35,72$; $233,50 \pm 86,75$ ve $174,44 \pm 47,04$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku HIF-1 α düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=5,866$; $p=0,012$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B ile A arasında olduğu belirlenirken; B grubu HIF-1 α düzeyi daha yüksekti.

Araştırma grupları A, B ve C serum HIF-1 α düzeyi sırasıyla 263,24 $\pm$ 64,50; 429,48 $\pm$ 73,79 ve 318,64 $\pm$ 67,70 olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum HIF-1 α düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı (F=9,928; p=0,001). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B'den kaynaklandığı belirlendi. Grup B HIF-1 α düzeyi grup A ve C'den daha yüksekti.

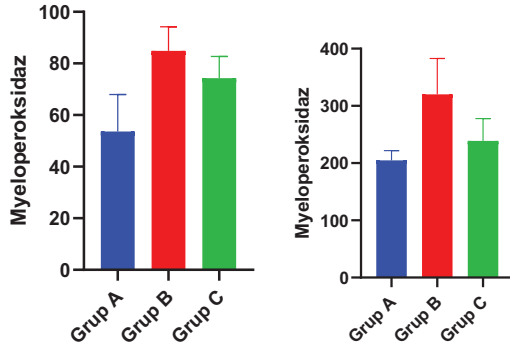


Şekil 10: Araştırma gruplara göre sırasıyla doku ve serum HIF-1 α düzeyi

Myeloperoksidaz (MPO)

Araştırma grupları A, B ve C doku MPO düzeyi sırasıyla 53,60 $\pm$ 14,34; 84,84 $\pm$ 9,39 ve 74,26 $\pm$ 8,42 olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre doku MPO düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı (F=13,800; p<0,001). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup A'dan kaynaklandığı belirlendi. Grup A MPO düzeyi grup B ve C'den daha düşüktü.

Araştırma grupları A, B ve C serum MPO düzeyi sırasıyla 204,69 $\pm$ 16,98; 320,00 $\pm$ 62,99 ve 238,67 $\pm$ 39,20 olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre serum MPO düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı (F=11,481; p=0,001). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B'den kaynaklandığı belirlendi. Grup B MPO düzeyi grup A ve C'den daha yüksekti.



Şekil 11: Araştırma gruplarına göre sırasıyla doku ve serum MPO düzeyi

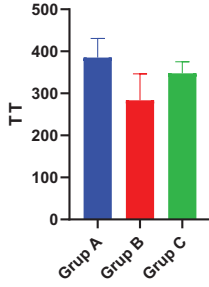
Tablo 6: Araştırma gruplarına göre doku biyokimya ölçüm sonuçları

	Grup A (n=6)	Grup B (n=7)	Grup C (n=7)	Anlamlılık		
Doku-Biyokimya	Ort.±Ss	Ort.±Ss	Ort.±Ss	F	P değeri	Fark [‡]
TOS	1,63±0,20	3,17±0,43	2,42±0,33	32,887	<0,001*	b>c>a
TAS	0,53±0,31	0,15±0,02	0,24±0,07	8,300	0,003**	a>b,c
OSİ	4,55±3,62	22,41±5,91	10,70±2,56	29,354	<0,001*	b>c>a
MDA	55,29±12,77	95,11±15,79	70,77±13,04	13,472	<0,001*	b>a,c
NRF2	261,85±39,03	475,03±45,31	383,82±40,86	41,726	<0,001*	b>c>a
IL-1β	431,93±43,49	718,27±134,98	582,90±108,64	11,879	0,001**	b>c>a
İL-6	84,51±13,70	168,84±30,45	129,99±15,17	24,773	<0,001*	b>c>a
İL-10	537,21±38,34	275,13±36,49	369,49±37,66	80,246	<0,001*	a>c>b
TNF-α	109,95±25,14	433,17±56,96	303,55±62,34	62,765	<0,001*	b>c>a
HIF-1α	115,98±35,72	233,50±86,75	174,44±47,04	5,866	0,012***	b>a
MPO	53,60±14,34	84,84±9,39	74,26±8,42	13,800	<0,001*	a<b,c

*p<0,001; **p<0,01; ***p<0,05; F: Tek yönlü ANOVA testi; ‡LSD post hoc testi; Ss: Standart sapma.
Grup A: Kontrol, Grup B: İ/R, Grup C: İR+tVSU

Total Tiyol (TT)

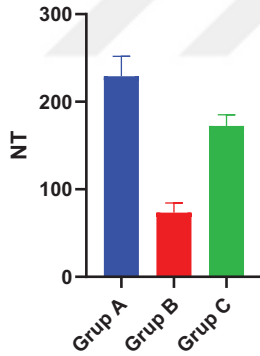
Araştırma grupları A, B ve C serum TT düzeyi sırasıyla 385,23±45,54; 283,65±62,92 ve 347,59±27,74 olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre TT düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı (F=7,605; p=0,004). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B'den kaynaklandığı belirlendi. Grup B TT düzeyi grup A ve C'den daha düşüktü.



Şekil 12: Araştırma gruplara göre serum TT düzeyi

Natif Tiyo (NT)

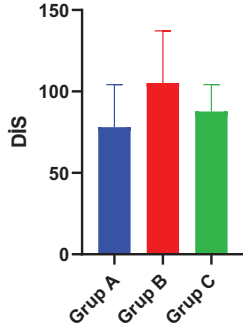
Araştırma grupları A, B ve C serum NT düzeyi sırasıyla $229,07 \pm 22,73$; $73,26 \pm 11,04$ ve $172,28 \pm 12,73$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre NT düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=162,122$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A NT düzeyi grup B ve C'den daha yüksekken; C grubu NT düzeyi B'den daha yüksekti.



Şekil 13: Araştırma gruplara göre serum NT düzeyi

Disülfid (DİS)

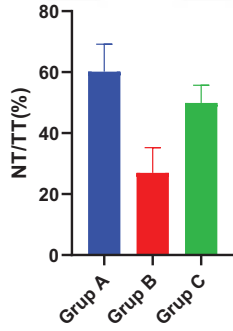
Araştırma grupları A, B ve C serum DİS düzeyi sırasıyla $78,08 \pm 26,16$; $105,19 \pm 31,95$ ve $87,65 \pm 16,50$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre DİS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).



Şekil 14: Araştırma gruplara göre serum DİS düzeyi

NT/TT (%)

Araştırma grupları A, B ve C serum NT/TT (%) düzeyi sırasıyla $60,14 \pm 9,03$; $26,99 \pm 8,21$ ve $49,89 \pm 5,80$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre NT/TT (%) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=31,963$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında anlamlı olduğu belirlendi. Grup A NT/TT düzeyi grup B ve C'den daha yüksekken; C grubu NT/TT düzeyi B'den daha yüksekti.

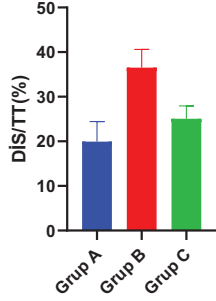


Şekil 15: Araştırma gruplara göre serum NT/TT (%) düzeyi

DİS/TT (%)

Araştırma grupları A, B ve C serum DİS/TT (%) düzeyi sırasıyla $19,93 \pm 4,51$; $36,51 \pm 4,11$ ve $25,06 \pm 2,90$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre DİS/TT (%) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=31,963$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın bütün alt grup karşılaştırmalarında

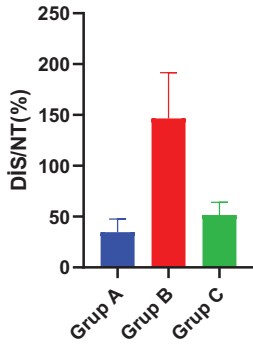
anlamalı olduğu belirlendi. Grup A DİS/TT düzeyi grup B ve C’den daha düşükken; C grubu DİS/TT düzeyi B’den daha düşüktü.



Şekil 16: Araştırma gruplara göre serum DİS/TT(%) düzeyi

DİS/NT (%)

Araştırma grupları A, B ve C serum DİS/NT (%) düzeyi sırasıyla $34,75 \pm 12,95$; $146,63 \pm 45,02$ ve $51,47 \pm 12,63$ olarak hesaplandı. Araştırma gruplarına göre DİS/NT (%) düzeyinde istatistiksel olarak anlamalı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($F=29,869$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B’den kaynaklandığı belirlendi. Grup B DİS/NT (%) düzeyi grup A ve C’den daha yüksekti.



Şekil 17: Araştırma gruplara göre serum DİS/NT(%) düzeyi

Tablo 7: Araştırma gruplara göre serum biyokimya ölçüm sonuçları

	Grup A (n=6)	Grup B (n=7)	Grup C (n=7)	Anlamlılık		
Serum-Biyokimya	Ort.±Ss	Ort.±Ss	Ort.±Ss	F/KWχ^2	P değeri	Fark[±]
TOS	3,41±0,71	6,68±1,65	4,50±0,60	14,785^d	<0,001[*]	<i>b>a,c</i>
TAS	2,12±0,50	1,19±0,18	1,58±0,27	12,562^d	<0,001[*]	<i>a>c>b</i>
OSİ	1,67±0,46	5,82±2,02	2,95±0,81	17,145^d	<0,001[*]	<i>b>a,c</i>
MDA	25,99±6,87	42,93±19,67	32,44±3,33	7,354^e	0,025^{***}	<i>b>a</i>
NRF2	116,04±22,45	221,01±33,30	163,78±33,48	19,219^d	<0,001[*]	<i>b>c>a</i>
IL-1 β	149,38±28,85	247,65±35,11	209,55±36,09	13,793^d	<0,001[*]	<i>b>c>a</i>
İL-6	128,67±26,19	201,97±9,59	167,98±29,37	16,112^d	<0,001[*]	<i>b>c>a</i>
İL-10	683,46±38,04	385,22±47,22	441,38±68,32	55,519^d	<0,001[*]	<i>a>b,c</i>
TNF- α	438,87±86,26	700,70±46,43	539,65±65,67	25,589^d	<0,001[*]	<i>b>c>a</i>
HIF-1 α	263,24±64,50	429,48±73,79	318,64±67,70	9,928^d	0,001^{**}	<i>b>a,c</i>
MPO	204,69±16,98	320,00±62,99	238,67±39,20	11,481^d	0,001^{**}	<i>b>a,c</i>
TT	385,23±45,54	283,65±62,92	347,59±27,74	7,605^d	0,004^{**}	<i>b<a,c</i>
NT	229,07±22,73	73,26±11,04	172,28±12,73	162,122^d	<0,001[*]	<i>a>c>b</i>
DİS	78,08±26,16	105,19±31,95	87,65±16,50	1,893	0,181	
NT/TT(%)	60,14±9,03	26,99±8,21	49,89±5,80	31,963^d	<0,001[*]	<i>a>c>b</i>
DİS/TT(%)	19,93±4,51	36,51±4,11	25,06±2,90	31,963^d	<0,001[*]	<i>b>c>a</i>
DİS/NT(%)	34,75±12,95	146,63±45,02	51,47±12,63	29,869^d	<0,001[*]	<i>b>a,c</i>

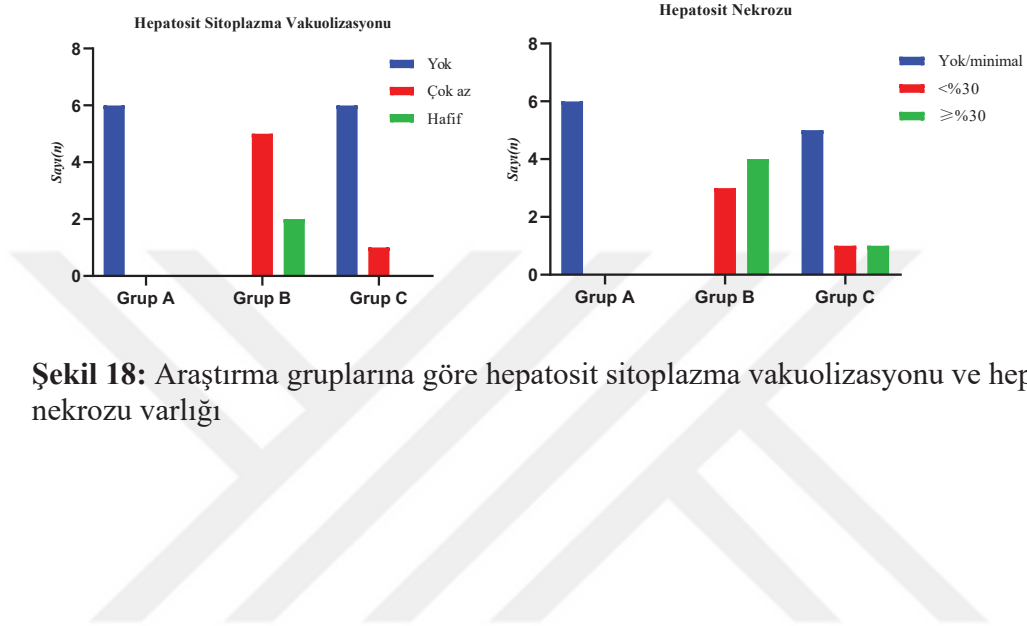
*p<0,001; **p<0,01; ***p<0,05; **F(d)**: Tek yönlü ANOVA testi, **KW χ^2 (e)**: Kruskal Wallis H testi, $\neq$ LSD post hoc testi; **Ss**: Standart sapma; Grup A: Kontrol, Grup B: İ/R, Grup C: İR+tVSU

Araştırma gruplarına göre bazı histolojik parametrelerin dağılımı Tablo 8’de sunuldu.

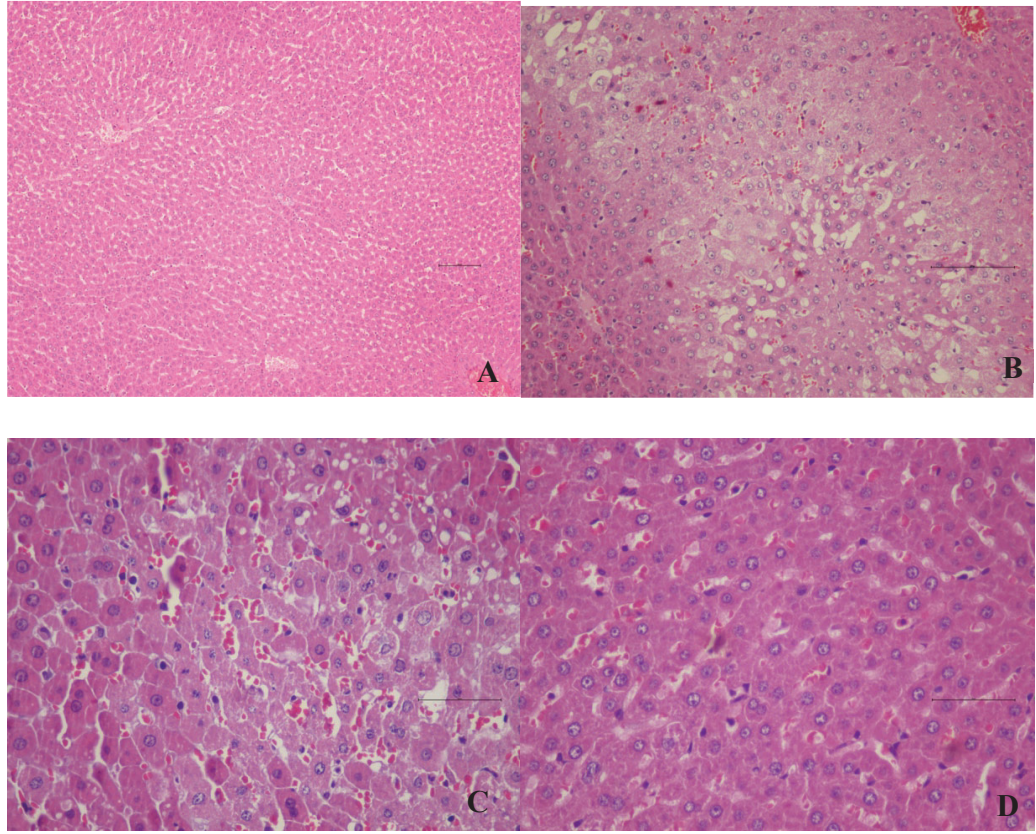
Araştırma gruplarına göre sinüzoidal konjesyon varlığında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($\chi^2=21,297$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup A’dan kaynaklandığı saptandı. Grup A’da sinüzoidal konjesyon saptanmadı. Grup B ile C arasında konjesyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık yoktu ($p>0,05$).

Araştırma gruplarına göre hepatosit sitoplazmasının vakuolizasyonu varlığında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($\chi^2=15,479$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B’den kaynaklandığı saptandı. Grup B’de vakuolizasyon düzeyi daha fazlaydı.

Araştırma gruplarına göre hepatosit nekroz varlığında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olduğu saptandı ($\chi^2=19,748$; $p<0,001$). Yapılan alt grup analizlerinde bu farkın grup B’den kaynaklandığı saptandı. Grup B’de %30 ve üzeri nekroz varlığı daha fazlaydı.



Şekil 18: Araştırma gruplarına göre hepatosit sitoplazma vakuolizasyonu ve hepatosit nekrozu varlığı



Şekil 14: Kontrol, İ/R ve tVSU gruplarının 10x, 20x ve 40x büyütmede H-E boyalı karaciğer kesitleri, (A: Kontrol grubuna ait H-E boyalı karaciğer kesiti (10x), B: İ/R grubuna ait H-E boyalı karaciğer kesiti (20x), C: İ/R grubuna ait H-E boyalı karaciğer kesiti (40x), D: tVSU grubuna ait H-E boyalı karaciğer kesiti (40x).)

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İ/R grubundaki sıçanlarda karaciğer hücrelerinde konjesyon, vakuolizasyon ve nekrozda artış görülmektedir. İ/R grubu ile tVSU grubu karşılaştırıldığında azalmış konjesyon ve vakuolizasyon, nekrotik hücrelerin yüzdesinde düşüş (tek hücre nekrozu) görülmektedir.

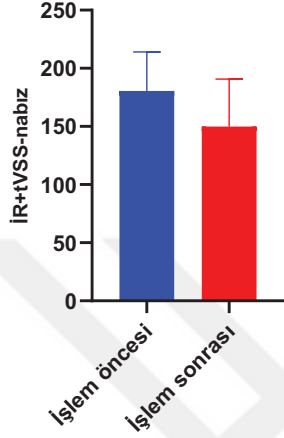
Tablo 8: Araştırma gruplarına göre bazı histolojik parametreler

	Grup A	Grup B	Grup C		
	(n=6)	(n=7)	(n=7)		
Histoloji	n(%)	n(%)	n(%)	χ^2	P değeri
Sinüzoidal Konjesyon				21,297	<0,001*
Yok	6(100,0)	0(0,0)	0(0,0)	$a \rightarrow b$	0,001**
Çok az	0(0,0)	1(14,3)	4(57,1)	$a \rightarrow c$	<0,001*
Hafif	0(0,0)	2(28,6)	3(42,9)	$b \rightarrow c$	0,126
Orta	0(0,0)	2(28,6)	0(0,0)		
Ağır	0(0,0)	2(28,6)	0(0,0)		
Hepatosit Sitoplazmasının					
Vakuolizasyonu				15,479	<0,001*
Yok	6(100,0)	0(0,0)	6(85,7)	$a \rightarrow b$	<0,001*
Çok az	0(0,0)	5(71,4)	1(14,3)	$a \rightarrow c$	0,999
Hafif	0(0,0)	2(28,6)	0(0,0)	$b \rightarrow c$	0,008**
Hepatosit Nekrozu				20,033	<0,001*
Yok	6(100,0)	0(0,0)	1(14,3)	$a \rightarrow b$	<0,001*
Minimal	0(0,0)	0(0,0)	4(57,1)	$a \rightarrow c$	0,013***
<%30	0(0,0)	3(42,9)	1(14,3)	$b \rightarrow c$	0,079
%30-60	0(0,0)	2(28,6)	1(14,3)		
>%60	0(0,0)	2(28,6)	0(0,0)		
Hepatosit Nekrozu				19,748	<0,001*
Yok/minimal	6(100,0)	0(0,0)	5(71,4)	$a \rightarrow b$	<0,001*
<%30	0(0,0)	3(42,9)	1(14,3)	$a \rightarrow c$	0,999
$\geq$ %30	0(0,0)	4(57,1)	1(14,3)	$b \rightarrow c$	0,038***

*p<0,001; **p<0,01; ***p<0,05; χ^2 : Fisher kesin ki-kare testi, Grup A: Kontrol, Grup B: İ/R, Grup C: İR+tVSU.

İR+tVSU grubunda işlem öncesi ve sonrası nabız düzeyi Tablo 9’da sunuldu.

İR+tVSU grubunda işlem öncesi ve sonrası ortalama nabız düzeyi sırasıyla $180,57 \pm 33,39$ ve $149,86 \pm 40,77$ olarak hesaplandı. İR+tVSU grubunda, işlem öncesi göre işlem sonrası nabız düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yaklaşık -30,71(%95 GA: -38,01; -23,42) birimlik bir düşüş olduğu saptandı ($t=10,301$; $p<0,001$).



Şekil 19: İR+tVSU grubunda işlem öncesi ve sonrası nabız düzeyi

Tablo 9: İR+tVSU grubunda işlem öncesi ve sonrası nabız düzeyi

Nabız	Grup C (n=7)
	Ort.±Ss
İşlem öncesi	180,57±33,39
İşlem sonrası	149,86±40,77
Fark (%95 GA)	-30,71(-38,01; -23,42)
<i>t</i>	10,301
<i>P-değeri</i>	<0,001*

* $p<0,05$; *t*: Bağımlı örneklem t-testi, *Ss*: Standart sapma, *GA*: Güven aralığı

TARTIŞMA

Karaciğer iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, hepatik travma, şok, karaciğer nakli ve cerrahi rezeksiyon gibi yüksek mortalite ve morbidite riskine sahip klinik durumlarda sıkça görülür. Bu koşullarda, karaciğer dokusuna giden kan akışının kesilmesi veya azalması sonucu oksijen ve besin maddesi eksikliği ortaya çıkarak doku hasarına yol açar. Yakın ve uzak organlarda disfonksiyon gelişebilir, transplantasyon cerrahisi uygulanan hastalarda greft işlev bozukluğu veya ölümle sonuçlanabilir. I/R hasarı, hem iskemi sürecinde oluşan doğrudan doku hasarına hem de reperfüzyon sırasında gelişen inflamatuvar yanıt ve serbest radikal üretimiyle ek zararlara neden olur. (4)(150-152).

Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin inflamasyon, nekroz ve apoptoz gibi hücresel hasara yol açan bir dizi olayı tetiklediği düşünülmektedir. Çeşitli çalışmalar, iskemik dokularda reperfüzyonun, hücre hasarını daha da artırabilen reaktif oksijen radikallerinin üretimini teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Ancak, reperfüzyonun farklı aşamalarında gözlenen hücre ölümü ve yapısal değişikliklerin tam olarak nasıl gerçekleştiği henüz net bir şekilde anlaşılmamıştır (153). Bu süreçlerin aydınlatılması ve sürecin daha az zarar ile atlatılması için birçok çalışma yapılmaktadır. Yıllar içinde yapılan bilimsel çalışmalar ve deneylerle vagus sinirinin etki mekanizması aydınlatılmaya çalışıldı (154).

Vagus siniri, karaciğer dahil olmak üzere birçok organın parasempatik innervasyonunu sağlamaktadır. Vagus siniri beyin ile boyun, toraks, abdomen ve pelvik organların bağlantısını sağlamakta ve fizyopatolojik süreçlerinde yer almaktadır (155). Vagal lifler hepatik nöronlar ile iletişim halindedir. Vagus siniri, afferent ve efferent lifleri aracılığıyla karaciğerin metabolik, fizyolojik ve patolojik süreçleri üzerinde etkili olmaktadır (8). Bu sebeple, vagus siniri uyarımının karaciğer üzerindeki olumlu etkileri daha önceden yapılan çalışmalarda görülmüş olup çalışmamıza ilham vermiştir. Vagus sinirinin birçok uyarım metodu bilinmekle beraber çalışmamızda non-invaziv transauricular yöntem olan; dış kulak tragus üzerinden yerleştirilen bir prob düzeneği ile uyarım gerçekleştirildi (75).

Birçok çalışma transauricular vagus stimülasyonunun parametrelerini önemsemesine rağmen günümüz şartlarında net bir kanıya varılabilmiş değildir. Pratik uygulamada, uyarım parametrelerinin kombinasyonu hakkında ortak fikir elde edilememiştir ve hali hazırda elimizdeki bilgiler yeterli değildir. Çok sayıda çalışmanın tasarlanma sürecinde metoda yönelik uyarım parametreleri belirlenmiştir. Biz kendi çalışmamızda Vagustim cihazını kullanarak 1 mA, atım süresi 500 µs, frekansı 20 Hz, gerilimi 5 V parametreleri ayarlanarak uyarımımızı gerçekleştirdik. Daha önceden yapılmış sıçan ve fare deneylerinde 6 saatlik vagus uyarımının aksine bizim çalışmamızda Yalnızca Grup C sıçanlarında 3 saat boyunca 30 sn açık 30 sn kapalı olacak şekilde uyarım gerçekleştirilebildi (108) (142) (149).

Uyarımın doğruluğunu direkt olarak gösterebilmek ve işlem esnasında teyit edebilmek için çalışmamızda sıçanlara vagus siniri uyarım öncesi ve sonrası ekokardiyografi çekimi yapılmıştır. Ölçümlerde R-R aralığı ve kalp atım hızlarına bakılmıştır (145,146).

Kalp atım hızlarındaki düşüş istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve anlamlı bulunmuş olup vagus uyarımının doğruluğunu kanıtlar niteliktedir.

Vagus sinirinin etkileri ve uyarım yöntemleri üzerine yıllarca çalışmalar ve tartışmalar yapılmıştır. Halen bu konu üzerine tartışmalar ve araştırmalar devam etmektedir. Vagus sinir stimülasyonu; dirençli epilepsi, dirençli depresyon ve baş ağrısı için onay almış bir tedavi yöntemidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalıklar, morbid obezite ve antinflamatuar mekanizmasının bulunmasının ardından inflammatuar süreçlerle seyreden bağırsak hastalıkları, sepsis, postoperatif ileus modelleri üzerinde olumlu sonuçlar bildirilmiştir (6) (154). Güncel bilimsel veriler göz önünde bulundurulduğunda, vagus siniri uyarımının birçok organın iskemi reperfüzyon hasarı üzerine olumlu etkileri gözlemlenmiştir. Çalışmamızda da incelemeyi hedeflediğimiz gibi daha önceden yapılmış birçok çalışma, Hepatik iskemi reperfüzyon hasarında vagus siniri uyarımının karaciğer ve uzak organlarda koruyucu etkilerini göstermiştir (149) (156).

Ancak literatürde karaciğer iskemi reperfüzyonu üzerinde vagus siniri uyarımının etkilerini inceleyen non-invaziv bir metod olmadığı için çalışmamız bu konuda bir ilki gerçekleştirmeyi planlamaktadır.

Zhang ve ark. yaptığı hayvan deneyinde ise, Hepatik iskemi reperfüzyon hasarında servikal invaziv vagus siniri uyarımının etkisi ve sonuçları incelenmiş. Sol portal triad klemplenerek %70'lik hepatik iskemi modeli oluşturulmuş. VSU'nun I/R dokularındaki nekrotik alanları ve apoptozu belirgin azalttığını, dokulardaki inflamasyonu ve oksidatif stresi baskıladığını göstermişlerdir. Vagus sinir uyarımının Nrf-2/HO-1 seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını ve bu yolağın koruyucu etkisi olabileceği yorumunu yapmışlardır. Çalışmamıza birçok açıdan benzeyen bu deneyde hepatik segmental iskemi modeli oluşturulup invaziv olarak servikal vagus uyarımı yapılmış. tVSU ile uyarımı yaptığımız çalışmamızda Zhang ve arkadaşlarının histopatolojik ve biyokimyasal olarak ulaşmış oldukları vagus uyarımının antiinflamatuvar, antiapoptik ve antioksidan etkilerini kanıtlayana ve destekleyen sonuçlar elde etmiş olduk (149) (156).

Yakın zamanda yayınlanan deneyde, non-invaziv transüriculer vagus siniri uyarımının(tVSU) akut gut'lu farelerde etkisi değerlendirilmiştir (157). Gut'lu fare modeli ayak eklemlerine monosodyum ürat (MSU) enjekte edilerek oluşturulmuş. tVSU'nun doku içinde nötrofil infiltrasyonunu ve kemoatraksiyonunu azalttığını gözlemlenmiş. tVSU'nun, nötrofil aktivitesini baskılayarak önemli anti-inflamatuvar özellikler gösterdiğini ve bununla yalnızca gut için değil, hem akut hem de kronik inflamasyon ile seyreden birçok hastalıkta geleneksel farmakolojik yöntemlerin ötesinde yeni bir terapötik yaklaşım sunduğunu yorumlamışlardır.

Yapılmış ve yapılmakta olan çalışmalardan edindiğimiz bilgiler ışığında, sıçanlar üzerinde yaptığımız çalışmamızda, sol portal triad klemplemesi yaparak oluşturduğumuz hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde, non-invaziv bir metod olan transauricular vagus siniri uyarımı (tVSU)'nın karaciğerde hipoksi ve iskeminin direkt ve indirekt etkileri sonucu gelişen inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoz üzerine etkinliğinin araştırılmasını amaçladık.

Bizim çalışmamızda, sıçanlarda parsiyel hepatik iskemi (%70) modelini oluşturmak için, sol lateral ve median lobları besleyen sol portal triad (hepatik arter, portal

ven, safra kanalı) yapıları vasküler klips ile kapatıldı. 60 dakika süreyle klempe edildikten sonra mikrovasküler klempe kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon sağlandı. Oluşturulan karaciğer I/R sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen patolojik değişiklikler histopatolojik olarak değerlendirildi.

Karaciğer I/R hasarında, karaciğerin fonksiyonlarını, patofizyoloji süreci ve hasarı değerlendirebilmek için birçok tetkik yapılabilmektedir. Bunlardan sık kullanılan ve bizim çalışmamızda da kullandığımız yöntemler biyokimyasal olarak oksidatif stresi ve antioksidan durumu tayin etmek için, TAS, TOS, NT, TT, DİS, MPO, Nrf-2 ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması, inflamasyon durumunu tayin etmek için IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a ve HIF-1a düzeylerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması kullanılmaktadır (149)(158,159). Çalışmamızda bu tetkikleri değerlendirip istatistiksel olarak karşılaştırılmış sonuçları elde ettik.

Histopatolojik olarak değerlendirmede ise Suzuki ve ark.'nın oluşturduğu sınıflamayı kullandık (147). Bu sınıflamaya göre sinuzoidal konjesyon, sitoplazmik vakuolizasyon ve hepatosellüler nekroz parametreleri karaciğer fonksiyonu ve hasarın değerlendirilmesinde yol gösterici oldu.

Suzuki sınıflamasına göre yapılan değerlendirmede kontrol grubunda beklendiği gibi sinuzoidal konjesyon ve sitoplazmada vakuolizasyon görülmedi. I/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı konjesyon ve sitoplazmik vakuolizasyon artışı gözlemlendi. Vagus uyarımı sonrası ise özellikle orta ve ağır sinüzoidal konjesyonların hafiflediği ve gerilediği, vakuolizasyonların ise aynı şekilde anlamlı derecede gerilediği ve ortadan kalktığı görüldü.

Hepatosit nekrozunda ise I/R grubunda görülen %30 ve üzeri nekrotik alanların, vagus uyarımı sonrası istatistiksel olarak anlamlı derecede gerilediği görüldü.

Bu sonuçlara paralel olarak Suzuki skorları değerlendirildiğinde, kontrol grubu ve I/R grubu karşılaştırıldığında Suzuki skorunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmektedir. I/R grubu ile tVSU grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlılık saptanmasada skorda aşikâr gerileme görülmektedir.

Çalışmamızda, plazma ve doku TOS, OSI ve MDA değerleri karşılaştırıldığında; I/R grubunda, kontrol ve tVSU grubuna oranla değerlerin daha yüksek olduğu görüldü.

Plazma ve dokuda bakılan TAS değerlerinde ise kontrol grubuna kıyasla her iki çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu görülmüştü.

Plazmada bakılan MPO değerlerinde I/R grubunda diğer iki gruptan anlamlı yükseklik görülse de dokuda MPO'nun hem I/R hem de tVSU grubunda kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görülmüştü. Burada Vagal uyarım sonrası plazmada anlamlı MPO düşüşü görülse de dokudaki düşüş istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmedi.

Yine serumda bakılan DİS, NT, TT değerleri karşılaştırıldığında, disülfid değerlerinde iskemi sonrası artış ve vagal uyarım sonrası düşüş görülse de istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Fakat I/R grubunda istatistiksel olarak hem natif hem de total tiyol seviyesinde düşüş görüldü. Vagal uyarımın ardından NT ve TT seviyelerinde anlamlı artış uyarımın antioksidan etkisini gözler önüne seriyor.

Çalışmamızda, bir diğer oksidatif stresin anlamlı göstergelerinden birisi olan Nrf-2 değerleri hem plazma hem dokuda incelendiğinde; I/R grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yükseliş görüldü. Ancak Deng ve ark. ve Zhang ve ark. 'çalışmalarında iskemi/reperfüzyon grubunda vagal stimülasyon sonrası görülen Nrf-2 artışı bizim çalışmamızda görülmeydi. Aksine I/R ardından uygulanan non-invaziv vagus uyarımında istatistiksel olarak anlamlı olmayan Nrf-2 düşüşü görüldü. Nrf-2'de önceki çalışmalarda görülen artışın görülmemesi vagus siniri uyarım süresinin farklı olması gibi materyal metot farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nrf-2'nin bu sonuçları bizden önce yapılan örnek çalışmalardan farklı olarak görülmüştür.

Bu ortaya çıkan değerlerin, özellikle İskemi/reperfüzyon grubundaki artışın, oksidatif stresin doğal bir reaksiyonu olarak antioksidan sistemlerin aktive olmasının bir sonucu olduğu düşünüldü. Daha sonra non-invaziv vagus siniri uyarımı sonrası antioksidan parametrelerde artışın görülmesi ve istatistiksel olarak desteklenmesi çalışmamızın etkinliğini ortaya koyuyor.

Hepatik sinir sistemiyle yakın ilişkisi olduğu çalışmalar sonucunda aydınlatılmış olan IL-1b, IL-6, IL-10 ve TNF-a'nın özellikle bağışıklıkta, inflamasyon sürecinde, fibrozis oluşumunda, kanser sürecinde aktif rol aldıkları biliniyor. Vagus siniri hasarlarında ve vagotomilerde karaciğer rejenerasyon ve iyileşme sürecinin ciddi şekilde

bozulduğu bilindiği için karaciğer ve vagus siniri arasında işlevsel anlamda çok yakın bir ilişki olduğu ifade edilmektedir (9)(73,74).

Biz de çalışmamızda özellikle inflamasyon, hipoksi ve iskemi sürecinin vagus sinirinin non-invaziv olarak uyarımından ne derece etkilendiğini değerlendirebilmek amacıyla tetkik ettik. Yapılan serum ve doku IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a ve HIF-1a ölçümleri sonucunda IL-1b,IL-6,TNF-a ve HIF-1a değerleri I/R sonrası verilen vagus uyarımı ardından anlamlı derecede düşüş göstermişti. IL-10 ise I/R sonrası sinir uyarımıyla anlamlı derecede artmıştı. Her iki mevcut durum Vagus sinirine yaptığımız non-invaziv uyarımın karaciğer üzerinde inflamasyon sürecini olumlu yönde etkilediğini söyleme imkânı veriyor.

Mevcut sonuçlar Zhang ve arkadaşlarının karaciğer üzerinde vagus sinir uyarımını antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini gösterdikleri çalışmalarını, Deng ve arkadaşlarının hepatik I/R hasarı sonrası vagal uyarım sonrası uzak organdaki etkilerini, Lai ve arkadaşlarının Renal I/R hasarı sonrası akut karaciğer hasarında vagus uyarımının inflamasyon ve antioksidan açıdan olumlu etkilerini, Shin J. Ve arkadaşlarının akut gut inflamasyonu modelinde tVSU ile inflamasyonu baskıladıklarını gösterdikleri yazılarını destekler nitelikte sonuçlar aldığımızı ifade edebiliriz (149)(156-158).

Farklı iskemi/reperfüzyon (I/R) organlarındaki fizyopatolojik süreçlerin benzerliği göz önüne alındığında, Vagus siniri uyarımının (VSU) karaciğer I/R hasarında da koruyucu bir rol oynayabileceğini öne sürüyoruz. Birçok çalışma, otonom sinir sisteminin I/R hasarı dahil çeşitli karaciğer yaralanmalarındaki önemini ortaya koymuştur. Sempatik sinir sisteminin karaciğerde oksidatif stresi artırdığı bilinmektedir; örneğin, Lin ve arkadaşları, karbon tetraklorür enjeksiyonu ile indüklenen hepatik oksidatif stresin, sempatik sinirleri alınmış farelerde hafiflediğini bildirmiştir (160).

Ayrıca, Oben ve arkadaşları, kimyasal sempatektomi ajanı olarak kullanılan 6-hidroksidopaminin, antioksidan eksik diyetle beslenen farelerde karaciğer hasarını önemli ölçüde iyileştirdiğini bulmuştur (161). Sempatik sinir sisteminin doğal antagonisti olan vagus siniri, karaciğer I/R hasarını azaltmada hayati bir role sahip olarak gösterilmiştir. Ni ve ekibi, hepatik vagotomi ve $\alpha 7nAChR$ eksikliğinin, farelerde I/R ile indüklenen apoptozu kötüleştirdiğini rapor etmiştir (162). Ayrıca, çeşitli asetilkolin reseptör

agonistleri ile yapılan ön tedavinin, farelerde karaciğer I/R hasarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (163,164). Bu bulgular, vagus sinir sisteminin $\alpha 7$ nAChR'yi aktive ederek karaciğeri koruyabileceğini düşündürmektedir. Mevcut çalışma, doğrudan non-invaziv bir yöntem olan tVSU'nun karaciğer I/R hasarına karşı etkili bir koruma sağladığını ve önceki çalışmalara paralel olduğunu göstermekte ve desteklemektedir.

Hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında altta yatan çok çeşitli mekanizmalar arasında artmış inflamatuvar tepkiler merkezi bir rol oynamaktadır (165). Vagus siniri uyarımına (VSU) aracılık eden kolinerjik anti-inflamatuvar yolak karaciğerde iyi bir şekilde incelenmiştir. Vagus sinir uçları tarafından salınan asetilkolin, Kupffer hücrelerindeki $\alpha 7$ nAChR'ye bağlanarak inflamatuvar sitokinlerin üretimini önleyebilir. Çeşitli çalışmalar, $\alpha 7$ nAChR agonistleri ile tedavinin I/R karaciğerinde NF- κ B aktivasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini bildirmiştir (163). Mevcut çalışmamızda, I/R dokularında tVSU ile inflamatuvar faktör seviyeleri ve NF- κ B sinyalleme azaltılmış, kolinerjik anti-inflamatuvar yolun potansiyel bir mekanizma olabileceğini düşündürmüştür.

I/R hasarında NRF-2 aktivitesinin artması, oksidatif stresle ilişkili adaptif bir yanıt olarak literatürde sıkça bildirilmiştir. Karaciğer I/R hasarı sırasında ROS seviyelerindeki artış, NRF-2'nin nükleusa taşınmasını tetikleyerek antioksidan enzimlerin transkripsiyonunu başlatır ve hücrel savunmayı artırır. Bu artış, hücrel oksidatif strese karşı koruyucu bir yanıt olarak işlev görmektedir (53)(165,166). Vagus sinir stimülasyonu, özellikle transauricular vagus sinir stimülasyonu (tVSU), inflamasyon ve oksidatif stres düzeylerini düşürebilme potansiyeline sahiptir.

Moleküler mekanizmaları araştırmak için, çalışmamızda I/R dokularında ve serumda Nrf2 ekspresyon seviyeleri ölçüldü. Daha önce yapılmış çalışmalarda, Nrf2/HO-1 yolunun hepatik I/R hasarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiş, Nrf2'nin tükenmesinin inflamasyonu, oksidatif stresi ve hücre apoptozunu şiddetlendirdiğini, Nrf2 aktivasyonunun ise hepatik hasarı önemli ölçüde baskıladığını bildirmiştir. Ayrıca, $\alpha 7$ nAChR aktivasyonu ile Nrf2 yolunun indüklenebileceği çok sayıda araştırma ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile $\alpha 7$ nAChR aktivasyonunun Nrf2'ye bağlı bir mekanizma üzerinden koruyucu etki gösterdiğini söylemek mümkün (52)(53) (165). Ancak bizim

çalışmamızda önceki çalışmalara uyumlu olmayan değerler elde ettik. Çalışmamızda tVSU'nun I/R karaciğerinde Nrf2 sinyallemesini anlamlı şekilde azalttığı sonucunu aldık.

Bu sonucun daha önceden yapılmış çalışmalardaki sonuçların aksine, tVSU'nun inflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılayarak ROS seviyelerini azalttığını, dolayısıyla NRF-2'nin aşırı aktivasyonuna olan ihtiyacı azalttığını düşünüyoruz (167,168). Vagus stimülasyonunun bu etkileri, inflamasyon ve oksidatif stresin azaltılmasında terapötik bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, vagus sinir stimülasyonu yapılan grupta Nrf-2 seviyelerindeki azalmanın, oksidatif stresin azalması ile ilişkili olduğunu ve Nrf-2'nin savunma yanıtına olan ihtiyacın azaldığını düşündürmektedir.

Bu sonuçlar, yukarıdaki verilerle uyumlu olup, çalışmamızdaki bulgularla paralellik göstermektedir. Ancak I/R modeli oluşturulup vagus siniri uyarımının 6 saat olarak planlandığı deney gruplarıyla karşılaştırıldığında, çalışmamızda vagus uyarımının 3 saat olarak planlanmış olmasının mevcut farkın nedeni olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, vagus sinir stimülasyonunun Nrf-2 düzeylerine olan etkisi, karaciğer I/R modeli için oksidatif stresin kontrolünde potansiyel bir müdahale olarak değerlendirilebilir.

Non-invaziv transauricular Vagal uyarımın karaciğer iskemi/reperfüzyon hasar sürecine etkisini inceleyen ilk çalışma olmasından dolayı bu sonuçların ilerideki çalışmalara ışık tutacağı görüşündeyiz.

SONUÇ

Hepatik I/R hasarı, karaciğer cerrahilerinde yaygın olarak karşılaşılan ve yüksek mortalite riski taşıyan ciddi bir durumdur. Bu çalışmada, transauricular vagus Siniri Uyarım (tVSU)'ın hepatik I/R hasarına karşı koruyucu etkileri ortaya konmuştur. Özellikle dirençli epilepsi ve depresyon tedavisinde kullanılan VSU, geleneksel yöntemlerde cihaz implantasyonu gerektirdiği için uygulama alanı sınırlı kalmıştır. Ancak, çalışmamızda invaziv olmayan transauricular VSU'nun benzer koruyucu etkiler sağlayabildiğini göstermiş bulunmaktayız. Bu bulgular doğrultusunda, invaziv olmayan transauricular VSU'nun hepatik I/R hasarında yeni ve umut vadeden bir tedavi yöntemi olabileceği düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Abu-Amara, M., et al., Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl*, 2010. 16(9): p. 1016- 32.
2. Zhai, Y., et al., Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation-- from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. 10(2): p. 79-89.
3. Liu Y, Ma J, Zhang Y, et al. Role of Antioxidants in Mitigating Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Free Radic Biol Med*. 2021;169:328-337. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.012>
4. Zhao Q, Pang M, Tian D, et al. Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury: Mechanisms of Damage and Prevention Strategies. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:8894517. <https://doi.org/10.1155/2020/8894517>.
5. McCrea ED. The Abdominal Distribution of the Vagus. *J Anat*. 1924 Oct;59(Pt 1):18-40. PMID: 17104037; PMCID: PMC1249850.
6. Badran BW, Austelle CW. The Future Is Noninvasive: A Brief Review of the Evolution and Clinical Utility of Vagus Nerve Stimulation. *Focus (Am Psychiatr Publ)*. 2022 Jan;20(1):3-7. doi: 10.1176/appi.focus.20210023. PMID: 35746934; PMCID: PMC9063597.
7. Kato H, Shimazu T. Effect of autonomic denervation on DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. *Eur J Biochem*. 1983 Aug 15;134(3):473-8. doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07591.x. PMID: 6349992.
8. Jensen KJ, Alpini G, Glaser S. Hepatic nervous system and neurobiology of the liver. *Compr Physiol*. 2013 Apr;3(2):655-65. doi: 10.1002/cphy.c120018. PMID: 23720325; PMCID: PMC3733049.
9. Nijima A. Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of the guinea pig. *Science*. 1969 Dec 19;166(3912):1519-20. doi: 10.1126/science.166.3912.1519. PMID: 17655046.
10. Ben-Menachem E, Revesz D, Simon BJ, Silberstein S. Surgically implanted and non-invasive vagus nerve stimulation: a review of efficacy, safety and tolerability. *Eur J Neurol*. 22:1260–1268. 2015.
11. Ma J, Qiao P, Li Q, Wang Y, Zhang L, Yan LJ, Cai Z (2019) Vagus nerve stimulation as a promising adjunctive treatment for ischemic stroke. *Neurochem Int* 131:104539.
12. Zhao XP, Zhao Y, Qin XY, Wan LY, Fan XX (2019) Non-invasive vagus nerve stimulation protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and promotes microglial m2 polarization via interleukin-17A inhibition. *J Mol Neurosci* 67:217–226.
13. Li J, Zhang Q, Li S, Niu L, Ma J, Wen L, (2020b) alpha7nAChR mediates transcutaneous auricular vagus nerve stimulation-induced neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by enhancing

axonal plasticity. *Neurosci Lett* 730:135031.

14. He W, Jing XH, Zhu B, et al. The auriculo-vagal afferent pathway and its role in seizure suppression in rats. *BMC Neurosci* 2013, 14: 85. doi: 10.1186/1471-2202-14-85.
15. Deuchars SA, Lall VK, Clancy J, et al. Mechanisms underpinning sympathetic nervous activity and its modulation using transcutaneous vagus nerve stimulation. *Exp Physiol* 2018, 103: 326–331. doi: 10.1113/EP086433.
16. Hiatt JR, Gabbay J, Busuttil RW. Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. *Ann Surg* 1994;220: 50—52. Hiatt JR, Gabbay J, Busuttil RW. Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. *Ann Surg* 1994;220: 50—52.
17. Phillip S, Gelman S. Hepatic Physiology and Pathophysiology. In: Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA (eds), *Miller's Anesthesia* (7th ed). Churchill Livingstone, Philadelphia 2010, pp.411-40.
18. Skandalakis JE, Skandalakis LJ, Skandalakis PN, Mirilas P. Hepatic surgical anatomy *Surg Clin North America* 2004;84:413–435.
19. Schwartz S, Shires T, Spencer FC, Daly MJ, Fischer JE, Galloway AC. *Principles of Surgery Seventh Edition* McGraw-Hill, A Division of the McGraw.Hill Companies Bölüm 28;1417-1455.
20. Nota CL, Hagendoorn J, Fong Y. ASO Author Reflections: The Role of Robotic Surgery in Liver Resection. *Ann Surg Oncol*. 2019 Feb;26(2):591-592.
21. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*. 2010 Aug;90(4):643-53.
22. Goldsmith NA, Woodburne RT. Surgical anatomy pertaining to liver resection. *Surg Gynecol Obstet* 1957;105:310-8.
23. Rutkauskas S, Gedrimas V, Pundzius J, Barauskas G, Basevičius I A. Clinical and anatomical basis for the classification of the structural parts of liver. *Medicina (Kaunas)* 2006;42:98-106.
24. Heriot AG, Karanjia ND. A review of techniques for liver resection. *Ann R Coll Surg Engl*. 2002;84:371–80.
25. Sayek I, Batman F, Aydın M. *Temel Cerrahi* 2004, 3. Baskı, Ankara Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Bölüm129;1293-1301.
26. Schwartz SI. Liver. In: Timothy S, Steven AC (eds). *Schwartz's Principles of Surgery*. McGraw–Hill, Philadelphia 2004, pp.1139-87.
27. D'Angelica M, Fong Y. The liver. Ed. Townsend CM Jr, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. *Sabiston Textbook of Surgery*. 17. edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004; 1513-69.
28. Malarkey ve ark., 2005-Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. 2005. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 33:27–34.
29. McIntyre, Neil. *Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice*. John Wiley & Sons, 2008.
30. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151.

31. Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087–26124.
32. Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, 70(1), 151–171.
33. The 17th edition of Townsend: Sabiston Textbook of Surgery represents an historical landmark. W.B. Saunders comp. 1526-1529.
34. Pringle, J.H. (1908). The Prevention of Haemorrhage During Surgery of the Liver. *British Journal of Surgery*, 3(12), 825-826. DOI: 10.1002/bjs.1800301227.
35. Jaeschke H, Farhood A. (1991). Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol*. 260:G355-G362.
36. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. (2003). Hepatic ischemia/reperfusion injury-a fresh look. *Exp Mol Pathol*. 74:86-93.
37. Farmer DG, Amersi F, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplant Rev* 2000;14:106-26.
38. Kim YI. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:195-9.
39. Jaeschke H. (2000). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 15:718-724.
40. Matsuda T, Yamaguchi Y, Matsumura F, Akizuki E, Okabe K, Liang J, Ohshiro H, Ichiguchi O, Yamada S, Mori K, Ogawa M. (1998). Immunosuppressants decrease neutrophil chemoattractant and attenuate ischemia/reperfusion injury of the liver in rats. *J Trauma*.
41. Xu, Z.C., et al., Grape seed proanthocyanidin protects liver against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress. *World J Gastroenterol*, 2015. 21(24): p. 7468-77.
42. M.J., et al., The impact of hepatic steatosis on hepatic ischemia- reperfusion injury in experimental studies: a systematic review. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 192029.
43. Rocker, G.M., Ischaemia/reperfusion, inflammatory responses and acute lung injury. *Thorax*, 1997. 52(10): p. 841-2.
44. M. Rojo de la Vega, E. Chapman, and D. D. Zhang, “NRF2 and the hallmarks of cancer,” *Cancer Cell*, vol. 34, no. 1, pp. 21–43, 2018.
45. Dennery PA. Signaling function of heme oxygenase proteins. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Apr 10;20(11):1743-53. doi: 10.1089/ars.2013.5674. Epub 2014 Feb 28. PMID: 24180238; PMCID: PMC3961771.
46. Alam J, Cook JL. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr Pharm Des*. 2003;9(30):2499-511. doi: 10.2174/1381612033453730. PMID: 14529549.

47. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004; 114: 1248–1259.
48. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI et al. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* 2001; 61: 3299–3307.
49. Wu YJ, Wang L, Ji CF, Gu SF, Yin Q, Zuo J. The Role of $\alpha 7$ nAChR-Mediated Cholinergic Anti-inflammatory Pathway in Immune Cells. *Inflammation*. 2021 Jun;44(3):821-834. doi: 10.1007/s10753-020-01396-6. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33405021.
50. F. Li, Z. Chen, Q. Pan et al., “The protective effect of PNU-282987, a selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist, on the hepatic ischemia-reperfusion injury is associated with the inhibition of high-mobility group box 1 protein expression and NF- κ B activation in mice,” *Shock*, vol. 39, no. 2, pp. 197–203, 2013.
51. H. O. Kalkman and D. Feuerbach, “Modulatory effects of $\alpha 7$ nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, no. 13, pp. 2511–2530, 2016.
52. J. Egea, I. Buendia, E. Parada, E. Navarro, R. Leon, and M. G. Lopez, “Anti-inflammatory role of microglial $\alpha 7$ nAChRs and its role in neuroprotection,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 97, no. 4, pp. 463–472, 2015.
53. K. Kudoh, H. Uchinami, M. Yoshioka, E. Seki, and Y. Yamamoto, “Nrf2 activation protects the liver from ischemia/reperfusion injury in mice,” *Annals of Surgery*, vol. 260, no. 1, pp. 118–127, 2014.
54. Morito N, Yoh K, Itoh K, et al. Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels. *Oncogene*. 2003;22(58):9275–9281.
55. Zhang YK, Yeager RL, Tanaka Y, et al. Enhanced expression of Nrf2 in mice attenuates the fatty liver produced by a methionine- and choline-deficient diet. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;245(3):326–334.
56. Zwacka RM, Zhou W, Zhang Y, et al. Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation. *Nat Med*. 1998;4(6):698–704.
57. Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest*. 2006;116(4):984–995.
58. Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem*. 2012 Mar 23;287(13):9873–9886. doi: 10.1074/jbc.M111.312694. Epub 2012 Jan 24. PMID: 22275372; PMCID: PMC3323009.
59. G Bardallo R, Panisello-Roselló A, Sanchez-Nuno S, Alva N, Roselló-Catafau J, Carbonell T. Nrf2

- and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury. *FEBS J.* 2022 Sep;289(18):5463-5479. doi: 10.1111/febs.16336. Epub 2022 Jan 19. PMID: 34967991.
60. Edgeworth FH. On a Large-fibred Sensory Supply of the Thoracic and Abdominal Viscera. *J Physiol.* 1892 May;13(3-4):260-71. doi: 10.1113/jphysiol.1892.sp000407. PMID: 16992018; PMC1514448.
 61. Yi CX, la Fleur SE, Fliers E, Kalsbeek A. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr;1802(4):416-31. doi:10.1016/j.bbadis.2010.01.006. Epub 2010 Jan 11. PMID: 20060897.
 62. McCuskey RS. Anatomy of efferent hepatic nerves. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Sep;280(1):821-6. doi: 10.1002/ar.a.20087. PMID: 15382019.
 63. Yi CX, la Fleur SE, Fliers E, Kalsbeek A. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr;1802(4):416-31. doi:10.1016/j.bbadis.2010.01.006. Epub 2010 Jan 11. PMID: 20060897.
 64. May M, Gueler F, Barg-Hock H et al; Liver afferents contribute to water drinking-induced sympathetic activation in human subjects: a clinical trial. *PLoS One.* 2011;6(10):e25898. doi: 10.1371/journal.pone.0025898. PMID: 22016786; PMCID: PMC3189227.
 65. Morita H, Abe C. Negative feedforward control of body fluid homeostasis by hepatorenal reflex. *Hypertens Res.* 2011 Aug;34(8):895-905. doi: 10.1038/hr.2011.88. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21716295.
 66. Orskov C, Bersani M, Johnsen AH, Højrup P, Holst JJ. Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *J Biol Chem.* 1989 Aug 5;264(22):12826-9. PMID: 2753890.
 67. Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R, Simansky KJ. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science.* 1981 Aug 28;213(4511):1036-7. doi: 10.1126/science.7268408. PMID: 7268408.
 68. Horn CC, Friedman MI. Separation of hepatic and gastrointestinal signals from the common "hepatic" branch of the vagus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Jul;287(1):R120-6. doi: 10.1152/ajpregu.00673.2003. Epub 2004 Mar 4. PMID: 15001436.
 69. Nakabayashi H. Neural monitoring system for circulating somatostatin in the hepatoportal area. *Nutrition.* 1997 Mar;13(3):225-9. doi: 10.1016/s0899-9007(96)00438-8. PMID: 9131684.
 70. Moldawer LL, Andersson C, Gelin J, Lundholm KG. Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant-derived cytokines. *Am J Physiol.* 1988 Mar;254(3 Pt 1):G450-6. doi: 10.1152/ajpgi.1988.254.3.G450. PMID: 2450475.
 71. Yamauchi T, Iwai M, Kobayashi N, Shimazu T. Noradrenaline and ATP decrease the secretion of triglyceride and apoprotein B from perfused rat liver. *Pflugers Arch.* 1998 Feb;435(3):368-74. doi: 10.1007/s004240050525. PMID: 9426292.

72. Warne JP, Foster MT, Horneman HF, Pecoraro NC, Ginsberg AB, Akana SF, Dallman MF. Afferent signalling through the common hepatic branch of the vagus inhibits voluntary food intake and modifies plasma metabolite levels in rats. *J Physiol.* 2007 Sep 1;583(Pt 2):455-67. doi: 10.1113/jphysiol.2007.135996. Epub 2007 Jun 21. PMID: 17584842; PMCID: PMC2277022. .
73. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000 Jan 28;275(4):2247-50. doi: 10.1074/jbc.275.4.2247. PMID: 10644669.
74. Tanaka K, Ohkawa S, Nishino T, Nijima A, Inoue S. Role of the hepatic branch of the vagus nerve in liver regeneration in rats. *Am J Physiol.* 1987 Oct;253(4 Pt 1):G439-44. doi: 10.1152/ajpgi.1987.253.4.G439. PMID: 3310660.
75. Butt MF, Albusoda A, Farmer AD, Aziz Q. The anatomical basis for transcutaneous auricular vagus nerve stimulation. *J Anat.* 2020 Apr;236(4):588-611. doi: 10.1111/joa.13122. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31742681; PMCID: PMC7083568.
76. Yuan, H., & Silberstein, S. D. (2016). Vagus nerve and vagus nerve stimulation, a comprehensive review: part II. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 56(2), 259-266.
77. Baquiran M, Bordoni B. Anatomy, Head and Neck: Anterior Vagus Nerve. 2023 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 31613476.
78. Thompson, N., Mastitskaya, S., and Holder, D. Avoiding off-target effects in electrical stimulation of the cervical vagus nerve: Neuroanatomical tracing techniques to study fascicular anatomy of the vagus nerve. *J. Neurosci. Methods* 325:108325. doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.108325.
79. Mercante, B., Ginatempo, F., Manca, A., Melis, F., Enrico, P., & Deriu, F. (2018). Anatomico-physiologic basis for auricular stimulation. *Medical acupuncture*, 30(3), 141-150.
80. Thompson, N., Ravagli, E., Mastitskaya, S., Iacoviello, F., Aristovich, K., Perkins, J., et al. (2020). MicroCT optimisation for imaging fascicular anatomy in peripheral nerves. *J. Neurosci. Methods* 338:108652. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108652.
81. Darby, S. A. (2014). Neuroanatomy of the autonomic nervous system. In *Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and ANS* (pp. 413-507). Elsevier New York.
82. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci.* 2000 Dec 20;85(1-3):1-17. doi: 10.1016/S1566-0702(00)00215-0. PMID: 11189015.
83. Norgren R, Smith GP. Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat. *J Comp Neurol.* 1988;273:207–223.
84. Browning KN, Travagli RA. Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Compr Physiol.* 2014 Oct;4(4):1339-68. doi: 10.1002/cphy.c130055. PMID: 25428846; PMCID: PMC4858318.
85. Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9:633–645.

86. Guo J, Browning KN, Rogers RC, Travagli RA. Catecholaminergic neurons in rat dorsal motor nucleus of vagus project selectively to gastric corpus. *Am J Physiol.* 2001;280:G361–G367.
87. Granger DN, Richardson PD, Kviety PR, Mortillaro NA. Intestinal blood flow. *Gastroenterology.* 1980;78:837–863.
88. George MS , Nahas Z , Bohning DE , et al. : Vagus nerve stimulation: a new form of therapeutic brain stimulation . *CNS Spectr* 2000. ; 5 : 43 – 52.
89. Corning JL : Considerations on the pathology and therapeutics of epilepsy . *J Nerv Ment Dis* 1883. ; 10 : 243 – 248.
90. Corning JL . Electrization of the sympathetic and pneumogastric nerves, with simultaneous bilateral compression of the carotids . *New York Med J* 1884. ; 39 : 212 – 215.
91. Ben-Menachem E , Mañon-Espaillet R , Ristanovic R , et al. : Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 1. A controlled study of effect on seizures . *Epilepsia* 1994. ; 35 : 616 – 626.
92. Lanska DJ. Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s. *Neurology.* 2002;58:452–9.
93. Zabara J. Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. *Epilepsia.* 1992;33(6):1005–12.
94. Morris III, G. L., Gloss, D., (2013). 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*, 81(16), 1453-1459.
95. Howland RH, Shutt LS, Berman SR, et al. The emerging use of technology for the treatment of depression and other neuropsychiatric disorders. *Ann Clin Psychiatry.* 2011;23:48–62.
96. Choi SJ, Hong SC, Seo DW, Joo EY, Cho JR, Hwang KJ, et al. Long-term outcome of vagus nerve stimulation for refractory epilepsy: a longitudinal 4 year follow-up study in Korea. *J Epilepsy Res.* 3:16–20. 2013.
97. Yang, J., & Phi, J. H. (2019). The present and future of vagus nerve stimulation. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 62(3), 344-352.
98. Wiles CC, Wrigley B, Greene JR. Re-examination of the medullary rootlets of the accessory and vagus nerves. *Clin Anat.* 2007 Jan;20(1):19-22. doi: 10.1002/ca.20260. PMID: 16317753.
99. Claudino Dos Santos JC, Oliveira LF, Noleto FM, Gusmão CTP, Brito GAC, Viana GSB. Brito GAC, Viana GSB. Gut-microbiome-brain axis: the crosstalk between the vagus nerve, alpha-synuclein and the brain in Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 2023 Dec;18(12):2611-2614. doi: 10.4103/1673-5374.373673. PMID: 37449597; PMCID: PMC10358673.
100. Ruffoli R, Giorgi FS, Pizzanelli C, Murri L, Paparelli A, Fornai F. The chemical neuroanatomy of vagus nerve stimulation. *J Chem Neuroanat.* 2011; 42: 288-296.
101. Kiyokawa J, Yamaguchi K, Okada R,. Origin, course and distribution of the nerves to the

- posterosuperior wall of the external acoustic meatus. *Anat Sci Int*. 2014 Sep;89(4):238-45. doi: 10.1007/s12565-014-0231-4. Epub 2014 Mar 7. PMID: 24604237.
102. Farmer AD, Strzelczyk A, International Consensus Based Review and Recommendations for Minimum Reporting Standards in Research on Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation (Version 2020). *Front Hum Neurosci*. 2021 Mar 23;14:568051. doi: 10.3389/fnhum.2020.568051. PMID: 33854421; PMCID: PMC8040977.
 103. Pigato G, Rosson S.; Vagus Nerve Stimulation in Treatment-Resistant Depression: A Case Series of Long-Term Follow-up. *J ECT*. 2023 Mar 1;39(1):23-27. doi: 10.1097/YCT.0000000000000869. Epub 2022 Jul 7. PMID: 35815853.
 104. Gaul C, Diener HC.; PREVA Study Group. Non-invasive vagus nerve stimulation for PREvention and Acute treatment of chronic cluster headache (PREVA): A randomised controlled study. *Cephalalgia*. 2016 May;36(6):534-46. doi: 10.1177/0333102415607070. Epub 2015 Sep 21. PMID: 26391457; PMCID: PMC4853813.
 105. Genheimer H, Andreatta M; Reinstatement of contextual conditioned anxiety in virtual reality and the effects of transcutaneous vagus nerve stimulation in humans. *Sci Rep*. 2017 Dec 20;7(1):17886. doi: 10.1038/s41598-017-18183-3. PMID: 29263408; PMCID: PMC5738426.
 106. Young AH, Juruena MF, De Zwaef R, Demyttenaere K. Vagus nerve stimulation as adjunctive therapy in patients with difficult-to-treat depression (RESTORE-LIFE): study protocol design and rationale of a real-world post-market study. *BMC Psychiatry*. 2020 Sep 29;20(1):471. doi: 10.1186/s12888-020-02869-6. PMID: 32993573; PMCID: PMC7526425.
 107. DeGiorgio CM, Krah SE. Neurostimulation for drug-resistant epilepsy. *Continuum (Minneapolis)*. 2013 Jun;19(3 Epilepsy):743-55. doi: 10.1212/01.CON.0000431397.61970.2b. PMID: 23739108; PMCID: PMC4234052.
 108. Redgrave J, Day D, Leung H, et al. (2018) Safety and tolerability of transcutaneous vagus nerve stimulation in humans; a systematic review. *Brain Stimul* 11, 1225–1238.
 109. Martelletti P, Schwedt TJ; My Migraine Voice survey: a global study of disease burden among individuals with migraine for whom preventive treatments have failed. *J Headache Pain*. 2018 Nov 27;19(1):115. doi: 10.1186/s10194-018-0946-z. PMID: 30482181; PMCID: PMC6755592.
 110. Gaul C, Diener HC, Silver N, Magis D, Reuter U, Andersson A, et al. Non-invasive vagus nerve stimulation for PREvention and acute treatment of chronic cluster headache (PREVA): a randomised controlled study. *Cephalalgia*. 36:534–546. 2016.
 111. Khodaparast N, Hays SA, Sloan AM, Hulsey DR, Ruiz A, Pantoja M, Rennaker RL 2nd, Kilgard MP. Vagus nerve stimulation during rehabilitative training improves forelimb strength following ischemic stroke. *Neurobiol Dis*. 2013 Dec;60:80-8. doi: 10.1016/j.nbd.2013.08.002. Epub 2013 Aug 15. PMID: 23954448.
 112. Capone F, Miccinilli S, Pellegrino G,. Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation Combined with

- Robotic Rehabilitation Improves Upper Limb Function after Stroke. *Neural Plast.* 2017;2017:7876507. doi: 10.1155/2017/7876507. Epub 2017 Dec 10. PMID: 29375915; PMCID: PMC5742496.
113. Dawson J, Liu CY, Francisco GE. Vagus nerve stimulation paired with rehabilitation for upper limb motor function after ischaemic stroke (VNS-REHAB): a randomised, blinded, pivotal, device trial. *Lancet.* 2021 Apr 24;397(10284):1545-1553. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00475-X. PMID: 33894832 PMCID: PMC8862193.
 114. Berge E, Whiteley W, Audebert H, De Marchis GM, Fonseca AC, Padiglioni C, de la Ossa NP, Strbian D, Tsivgoulis G, Turc G (2021) European Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Eur Stroke J* 6:I–LXII.
 115. Yakunina N, Kim SS, Nam EC (2018) BOLD fMRI effects of transcutaneous vagus nerve stimulation in patients with chronic tinnitus. *PLoS One* 13:e0207281.2018 .
 116. Zhang Y, Huang Y, Li H, Yan Z, Zhang Y, Liu X, Hou X, Chen W, Tu Y, Hodges S, Chen H, Liu B, Kong J (2021) Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS) for migraine: an fMRI study. *Reg Anesth Pain Med* 46:145–150.
 117. Mokin M, Ansari SA, McTaggart RA, Bulsara KR, Goyal M, Chen M, Fraser JF., Society of NeuroInterventional S (2019) Indications for thrombectomy in acute ischemic stroke from emergent large vessel occlusion (ELVO): report of the SNIS Standards and Guidelines Committee. *J Neurointerv Surg* 11:215–220.
 118. Tatum WO 4th, Moore DB, Stecker MM, Baltuch GH, French JA, Ferreira JA, et al. Ventricular asystole during vagus nerve stimulation for epilepsy in humans. *Neurology.* 52:1267–1269. 1999.
 119. He W, Jing X, Wang X, Rong P, Li L, Shi H, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation as a complementary therapy for pediatric epilepsy: a pilot trial. *Epilepsy Behav.* 28:343–346. 2013.
 120. Dietrich S, Smith J, Scherzinger C, et al. A novel transcutaneous vagus nerve stimulation leads to brainstem and cerebral activations measured by functional MRI. *Biomed Tech (Berlin).* 2008;53:104–11. doi: 10.1515/BMT.2008.022.
 121. Kraus T, Hosl K, Kiess O, et al. BOLD fMRI deactivation of limbic and temporal brain structures and mood enhancing effect by transcutaneous vagus nerve stimulation. *J Neural Transm.* 2007;114:1485–93. doi: 10.1007/s00702-007-0755.
 122. Kraus T, Kiess O, Hosl K, et al. CNS BOLD fMRI effects of sham-controlled transcutaneous electrical nerve stimulation in the left outer auditory canal: a pilot study. *Brain Stimul.* 2013;6:798–804. . doi: 10.1016/j.brs.2013.01.011.
 123. Wang Z, Fang J, Liu J, et al. (2018) Frequency-dependent functional connectivity of the nucleus accumbens during continuous transcutaneous vagus nerve stimulation in major depressive disorder. *J Psychiatr Res* 102, 123–131.

124. Ellrich J. Transcutaneous vagus nerve stimulation. *Eur Neurol Rev.* 2011; 6: 254-256.
125. Peuker ET, Filler TJ. 2002. The nerve supply of the human auricle. *Clin Anat* 15: 35–37.
126. Lekakis GK (2003) Philipp Friedrich Arnold, Ludvig Levin Jacobson and their contribution to head and neck anatomy. *J Laryngol Otol* 117, 28–31.
127. S.C. Schachter, C.B. Saper, Vagus nerve stimulation, *Epilepsia* 1998, 39: 677–686. doi: 10.1111/j.1528-1157.1998.tb01151.
128. Clancy JA, Mary DA, Witte KK, et al. (2014) Non-invasive vagus nerve stimulation in healthy humans reduces sympathetic nerve activity. *Brain Stimul* 7, 871–877.
129. Badran BW, Mithoefer OJ, Summer CE, et al. (2018c) Short trains of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS) have parameter-specific effects on heart rate. *Brain Stimul* 11, 699–708.
130. Dedeurwaerdere S, Gilby K, Vonck K, Delbeke J, Boon P, McIntyre D. 2006. Vagus nerve stimulation does not affect spatial memory in fast rats, but has both anti-convulsive and pro-convulsive effects on amygdala-kindled seizures. *Neuroscience* 140: 1443–1451.
131. Howland RH. Vagus nerve stimulation. *Curr Behav Neurosci Rep* 2014, 1: 64–73. <https://doi.org/10.1007/s40473-014-0010-5>.
132. Cheng J, Shen H, Chowdhury R, Abdi T, et al. Potential of Electrical Neuromodulation for Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2020;26(8):1119-30. doi: 10.1093/ibd/izz289.
133. Rawat JK, Roy S, Singh M, Guatam S, et al. Transcutaneous vagus nerve stimulation regulates the cholinergic anti-inflammatory pathway to counteract 1, 2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in albino wistar rats. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:353. doi: 10.3389/fphar.2019.00353.
134. Kong J, Fang J, Park J, Li S, Rong P. Treating depression with transcutaneous auricular vagus nerve stimulation: state of the art and future perspectives. *Frontiers in psychiatry*. 2018;9:20. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00020>.
135. Gök Dağdır, H., Bukan, N., Çalıkuşu, et al (2023). Transauricular Vagal Nerve Stimulation Effects On Pro- And Anti-Inflammatory Cytokines In An Experimental Model Of Autistic Mice. *Ibro 11th World Congres Of Neuroescience* (pp.570). Granada, Spain.
136. Safi, S., Ellrich, J., & Neuhuber, W. (2016). Myelinated axons in the auricular branch of the human vagus nerve. *The Anatomical Record*, 299(9), 1184-1191.
137. Badran BW, Yu AB, Adair D, Mappin G, DeVries WH, Jenkins DD, et al. Laboratory administration of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS): Technique, targeting, and considerations. *J Vis Exp* 2019, 143: <https://doi.org/10.3791/58984>.
138. Kaniusas E, Kampusch S, Tittgemeyer M, Panetsos F, Gines RF, Papa M, et al. Current directions in the auricular vagus nerve stimulation I - A physiological perspective. *Front Neurosci* 2019, 13:

854.

139. Li S, Wang Y, Gao G, Guo X. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation at 20 Hz improves depression-like behaviors and down-regulates the hyperactivity of HPA axis in chronic unpredictable mild stress model rats. *Front Neurosci* 2020, 14: 680.
140. Badran BW, Dowdle LT, Mithoefer OJ, LaBate NT, et al. Neurophysiologic effects of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS) via electrical stimulation of the tragus: A concurrent taVNS/fMRI study and review. *Brain Stimul* 2018, 11: 492–500.
141. Wang, Y., Li, S. Y., Wang, D., Wu, M. Z., He, J. K., Zhang, J. L., ... & Rong, P. J. (2021). Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation: from concept to application. *Neuroscience Bulletin*, 37, 853-862.
142. Yagi M, Morishita K, Ueno A, et al. Electrical stimulation of the vagus nerve improves intestinal blood flow after trauma and hemorrhagic shock. *Surgery*. 2020 Mar;167(3):638-645. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31759624. doi: 10.1016/j.surg.2019.09.024.
143. Hong GS, Zillekens A, Schneiker B, et al. Non-invasive transcutaneous auricular vagus nerve stimulation prevents postoperative ileus and endotoxemia in mice. *Neurogastroenterol Motil*. 2019 Mar;31(3):e13501. doi: 10.1111/nmo.13501. PMID: 30406957.
144. Meregnani J, Clarençon D, Vivier M, et al. Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Auton Neurosci*. 2011 Feb 24;160(1-2):82-9. doi: 10.1016/j.autneu.2010.10.007. Epub 2010 Nov 11. PMID: 21071287.
145. Katona PG, Poitras JW, Barnett GO, Terry BS. Cardiac vagal efferent activity and heart period in the carotid sinus reflex. *Am J Physiol*. 1970;218(4):1030-1037. doi:10.1152/ajplegacy.1970.218.4.1030.
146. Kollai M, Jokkel G, Bonyhay I, et al. Relation between tonic sympathetic and vagal control of human sinus node function. *J Auton Nerv Syst*. 1994;46(3):273-280. doi:10.1016/0165-1838(94)90044-2.
147. S. Suzuki, L. H. Toledo-Pereyra, F. J. Rodriguez, and D. Cejalvo, "Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine," *Transplantation*, vol. 55, no. 6, pp. 1265–1272, 1993.
148. Cohen J. The analysis of variance. In *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (second ed.). Lawrence Erlbaum Associates. 1988, 274-87.
149. Zhang, Q., Lai, Y., Deng, J., Wang, M., Wang, Z., Wang, M., ... & Jiang, H. (2019). Vagus nerve stimulation attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via the Nrf2/HO-1 pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
150. Yokoo T, Tanaka K, Sato M, et al. Recent Progress in Liver Transplantation: Clinical and Experimental Aspects of Ischemia-Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21):5324. <https://doi.org/10.3390/ijms20215324>.

151. Pantazi E, Bejaoui M, Folch-Puy E. (2016). Advances in treatment strategies for ischemia reperfusion injury. *Expert Opin Pharmacother*. 17(2):169-79.
152. Jang JH, Kang KJ, Kang Y, Lee IS, Graf R, Clavien PA. (2008). Ischemic preconditioning and intermittent clamping confer protection against ischemic injury in the cirrhotic mouse liver. *Liver Transpl*. 14:980-8.
153. Hossein Ali Arab, Farhang Sasani, Mohammad Hossein Rafiee, Ahmad Fatemi, Abbas Javaheri. Histological and biochemical alterations in early-stage lobar ischemia-reperfusion in rat liver. *World J Gastroenterol* 2009 April 28; 15(16): 1951-1957.
154. Johnson RL, Wilson CG. A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention. *J Inflamm Res*. 2018 May 16;11:203-213. doi: 10.2147/JIR.S163248. PMID: 29844694; PMCID: PMC5961632.
155. Thompson, N., Mastitskaya, S., and Holder, D. (2019). Avoiding off-target effects in electrical stimulation of the cervical vagus nerve: Neuroanatomical tracing techniques to study fascicular anatomy of the vagus nerve. *J. Neurosci. Methods* 325:108325. doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.108325.
156. Deng, S., Zhang, Y., Xin, Y. et al. Vagus nerve stimulation attenuates acute kidney injury induced by hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Sci Rep* 12, 21662 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26231>.
157. Shin JH, Lee CM, Song JJ. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation mitigates gouty inflammation by reducing neutrophil infiltration in BALB/c mice. *Sci Rep*. 2024 Oct 27;14(1):25630. doi: 10.1038/s41598-024-77272-2. PMID: 39463429; PMCID: PMC11514149.
158. Lai Y, Deng J, Wang M.. Vagus nerve stimulation protects against acute liver injury induced by renal ischemia reperfusion via antioxidant stress and anti-inflammation. *Biomed Pharmacother*. 2019 Sep;117:109062. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109062. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31177065.
159. Wang M, Deng J, Lai H .. Vagus Nerve Stimulation Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury through Inhibiting NF- κ B Activation and iNOS Protein Expression. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Feb 20;2020:7106525. doi: 10.1155/2020/7106525. PMID: 32148655; PMCID: PMC7053466.
160. J.C.Lin, Y.J.Peng, S.Y.Wanget al., "Sympathetic nervous system control of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in liver through α -adrenergic signaling," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 3190617, 11 pages, 2016.
161. J. A. Oben, T. Roskams, S. Yang et al., "Sympathetic nervous system inhibition increases hepatic progenitors and reduces liver injury," *Hepatology*, vol. 38, no. 3, pp. 664– 673, 2003.
162. M.Ni, H.Fu, F.Huanget al., "Vagus nerve attenuates hepatocyte apoptosis upon ischemia-reperfusion via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor on Kupffer cells in mice," *Anesthesiology*, vol. 125, no. 5, pp. 1005–1016, 2016. .

163. J. Park, J. W. Kang, and S. M. Lee, "Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway by nicotine attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1 induction," *European Journal of Pharmacology*, vol. 707, no. 1-3, pp. 61–70, 2013.
164. E. T. Crockett, J. J. Galligan, B. D. Uhal, J. Harkema, R. Roth, and K. Pandya, "Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists," *BMC Clinical Pathology*, vol. 6, no. 1, 2006.
165. K. Nakamura, M. Zhang, S. Kageyama et al., "Macrophage heme oxygenase-1-SIRT1-p53 axis regulates sterile inflammation in liver ischemia-reperfusion injury," *Journal of Hepatology*, vol. 67, no. 6, pp. 1232–1242, 2017.
166. B. Ke, X. D. Shen, Y. Zhang et al., "KEAP1-NRF2 complex in ischemia-induced hepatocellular damage of mouse liver transplants," *Journal of Hepatology*, vol. 59, no. 6, pp. 1200–1207, 2013.
167. Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1147:61-9. doi: 10.1196/annals.1427.036. PMID: 19076431; PMCID: PMC2605641.
168. Koopman FA, Chavan SS, Miljko S, Grazio S, Sokolovic S, Schuurman PR, Mehta AD, Levine YA, Faltys M, Zitnik R, Tracey KJ, Tak PP. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 19;113(29):8284-9. doi: 10.1073/pnas.1605635113. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27382171; PMCID: PMC4961187.