

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SOĞUK-HAREKETSİZLİK STRESİNİN FARELERİN
PERİFERAL KANINDAKİ YARDIMCI T HÜCRE YANITINA
ETKİSİ

Dr.Murat DOĞAN

Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2014

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SOĞUK-HAREKETSİZLİK STRESİNİN FARELERİN
PERİFERAL KANINDAKİ YARDIMCI T HÜCRE YANITINA
ETKİSİ**

Dr.Murat DOĞAN

**Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU**

**ANKARA
2014**

ONAY SAYFASI

Anabilim Dalı :Fizyoloji
 Program :Fizyoloji
 Tez Başlığı :Soğuk-Hareketsizlik Stresinin Farelerin Periferal Kanındaki
 Yardımcı T Hücre Yanıtına Etkisi

Öğrenci Adı-Soyadı :Murat Doğan
 Savunma Sınavı Tarihi :15 Mayıs 2014

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Gonca Akbulut
 GÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji AD
 Tez danışmanı: Doç. Dr. Bilge Pehlivanoglu
 HÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji AD
 Üye: Prof. Dr.Ersin Fadilloğlu
 HÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji AD
 Üye: Doç. Dr. Ayşen Erdem
 HÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji AD
 Üye: Doç. Dr. Esin İleri-Gürel
 HÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

(imza)

(imza)

(imza)

(imza)

(imza)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(imza)
 Prof.Dr. Ersin FADILLOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Çalışmanın her evresinde desteğini ve bilimsel katkılarını gördüğüm değerli danışmanım Doç. Dr. Bilge Pehlivanoglu'na, çalışmanın her basamağında bana bilgi ve deneyimlerini aktaran Y.D.Ü. Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi sayın hocam Yard. Doç. Dr. A.Meltem Sevgili'ye, “kısıtlayıcı”yı tasarlama ve yapımına yardımcı olan ve Farmakoloji AD. laboratuvarlarının imkanlarını bana açan H.Ü. Tıp Fakültesi Emekli Öğretim Üyesi sayın hocam Prof. Dr. Rüştü Onur'a, akım sitometrisi deneyleri yapabilmemizi sağlayan ve bunun için Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Yüreğir Eğitim Araştırma Hastanesi Kemik İliği ve Hücresel Tedavi Merkezi'nin laboratuvar imkanlarını sağlayan B.Ü. Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi sayın hocam Doç. Dr. İlknur Kozanoğlu'na, akım sitometrisi deneylerini yapan Uz. Biyolog Oktay Sözer'e,

H.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalındaki doktora eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen önceki Anabilim Dalı başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Neslihan H. Dikmenoğlu Falkmarken'e ve Anabilim Dalı başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Dicle Z. Balkancı'ya,

Tez çalışmam sırasında katkıda bulunan araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve teknisyenlerimize; doktora eğitimime katkıda bulunan Fizyoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyelerine,

Bu günlere gelebilmemde gecesi ve gündüzüyle her türlü maddi, manevi desteklerini karşılıksız sağlamış aileme ve eşimin ailesine,

“Bir Eşi Olmalı İnsanın” şiirinin benim için karşılığı canım eşim Dr. Ayşe Çitil Doğan'a,

Vaktinden önce gelerek çalışmalarımızın planını bozan çok sevdiğim biricik kızım Nazenin'ime,

Teşekkür ederim.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 011 D04 101 003 numaralı destek ve 011 D04 101 004 numaralı tez projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

Doğan M., Soğuk-Hareketsizlik Stresinin Farelerin Periferik Kanındaki Yardımcı T Hücre Yanıtına Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2014 Stresin organizmada stres sisteminin uyarılması ile oluşan özgül olmayan yanıt, bağışıklık sistemini etkileyerek pek çok hastalığın fizyopatolojisinde yer alır. Kazanılmış bağışıklık sistemi yanıtı ve kontrolünde yardımcı T hücrelerinin (Th) görevleri çok önemlidir. Th [Th1, Th2, Th17, düzenleyici T (Treg)] hücrelerinin alt tiplerinin dengesi, sağlık ve hayatta kalış için anahtardır. Akut ve/ya kronik stresin bağışıklık sistemine etkileri farklıdır. Stresin bağışıklık sistemi hücrelerine etkileri üzerinde şimdiye kadar fikir birliğine varılamadığı için; bu çalışmada akut veya kronik strese maruz kalan farelerde periferik kandaki Th lenfositlerinin dağılımı ve işlevlerini incelemeyi amaçladık. Kontrol (K), AS ve KS gruplarına (n=11/grup) rastgele yerleştirilen erişkin erkek Swiss-albino fareler, 2 saat +4°C'de kafes içinde serbest, 2 saat oda sıcaklığında kısıtlayıcıda tutuldu. Soğuk-hareketsizlik stresi AS protokolünde bir, KS protokolünde artarda beş gün uygulandı. Deneyden sonra alınan kan örneklerinde serum kortizol seviyeleri; serum IL-4, INF- γ ve IL-17 sitokin düzeyleri ölçüldü ve akım sitometrisi ile lenfosit alt tipleri yapıldı. Deneyler sonlandıktan sonra tüm gruplardaki hayvanlar benzer zamanlarda eksanguinasyon ve yüksek doz anestezi ile feda edildi. Sonuçlar SPSS 20.0 paket programı ile değerlendirildi. AS ve KS gruplarında lökosit sayısı artmıştı ($p<0,05$). Stres protokolleri Th hücrelerinin yüzdesinde değişiklik yaratmazken, dağılımı değiştirdi. Treg hücreleri AS grubunda artış gösterdi ($p<0,05$). Sitokin profilleri AS ve KS gruplarında farklı bulundu. AS grubunda INF- γ ve IL-17 en yüksek değerlerde ($p<0,05$) ölçülürken, IL-4 için en yüksek değer ($p<0,05$) KS grubunda saptandı. Farelerde soğuk/hareketsizlik stresinin farklı sürelerle uygulanması, bağışıklık sistemi yanıtını değiştirmektedir. Buna göre AS grubunda bağışıklık sistemi yanıtı Th1/Th17 aracılı hücresel yanıt lehine güçlendirirken, KS grubunda Th2 aracılı humoral yanıtı kaymıştır. Treg hücrelerinde gözlenen değişiklikler stresin süresi ile değişmektedir. Bu da efektör ve Treg hücreleri arasındaki dengenin değişmesine neden olmaktadır. Th hücrelerinin modülasyonu bağışıklık sisteminin dis/malfonksiyonu ile gelişen hastalıkların açıklanabilmesi için bir adım olacaktır.

Anahtar kelimeler: Akut stres, kronik stres, bağışıklık sistemi, yardımcı T hücreler, Th-17, düzenleyici T hücreler

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 011 D04 101 003 numaralı destek ve 011 D04 101 004 numaralı tez projesi ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Doğan, M. Effects of Cold-Immobilization Stress on T Helper Cell Response in Peripheral Blood in Mice, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Physiology Program, PhD Thesis, Ankara, 2014

Stress brings out a non-specific response, modulating the immune system so blamed in pathophysiology of various diseases. Helper T (Th) lymphocytes have a central role both in acquired immune system response and in its control. The balance between subtypes of Th cells [Th1, Th2, Th17, regulatory T (Treg) cells] is the key for the survival and health of the organism. Since the effects of acute or chronic stress on immune system are different and the cell types effected in organisms facing AS or KS have ever been fully elucidated, in this study; we aimed to investigate the distributions and functions of Th cell subtypes in peripheral blood in AS or KS exposed mice. Adult male Swiss-albino mice were randomly placed into control (C), AS and KS groups (n=11/group). Cold-immobilization stress, combined protocol of free movement in cage at +4°C for 2 h and restrained at room temperature for 2 h, was applied once for AS and in five consecutive days for KS protocols. Flow-cytometric lymphocyte subtyping and serum cortisol, IL-4, INF- γ and IL-17 cytokine level determinations were carried out in the blood samples. After blood withdrawal the experiments were terminated by exsanguination and anesthesia overdose. Control animals were sacrificed at corresponding times to the stress groups. Results were evaluated by SPSS programme. AS and KS protocols increased the number of leukocytes ($p < 0.05$), didn't alter the total number of Th cells but changed distribution. Treg cells increased in the AS group ($p < 0.05$). Cytokine profiles differed in AS and KS groups. While INF- γ and IL-17 were highest in the AS group ($p < 0.05$), IL-4 was observed at its highest value in the KS group ($p < 0.05$). Cold/immobilization stress altered the IS response in mice under acute or chronic conditions. AS resulted in a shift towards Th1/Th17 mediated cellular response whereas KS caused a Th2 mediated humoral shift in immune system response. The effect on Treg cell percentages are duration dependent, changing the balance between effector Th and Treg cells. Stress induced modulation observed in Th cells may be an explanation for diseases related with dys/malfunction of IS.

Keywords: Acute stress, chronic stress, immune system, T helper cells, Th-17, regulatory T cells

This study was supported by HUBAB with project numbers 011 D04 101 003 and 011 D04 101 004

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
AMAÇ	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bağışıklık Sistemi	3
2.1.1. Doğal Bağışıklık Sistemi	3
2.1.2. Kazanılmış (Edinsel) Bağışıklık Sistemi	3
2.1.3. Bağışıklık Sistemi Organları – Lenfoid Organlar	4
2.1.3.1. Merkezi Lenfoid Organlar	4
2.1.3.2. Periferik Lenfoid Organlar	5
2.1.4. Kazanılmış Bağışıklık Sistemi Hücreleri	6
• Lenfositler	6
• Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer, NK Hücreler)	7
• B Lenfositler	8
• T Lenfositler	8
1. CD8(+) Sitotoksik T (Tc) Lenfositler	13
2. CD4(+) Yardımcı T (Th) Lenfositler	14
○ Th1 Hücreler	15
○ Th2 Hücreler	15
○ Th17 Hücreler	16
○ Düzenleyici T Lenfositler (Treg Hücreler)	17
• Sitokinler	17
• İnterlökin 4 (IL-4)	19

• İnterlökkin 10 (IL–10)	19
• İnterferon γ (IFN– γ) (İmmün ya da Tip II İnterferon)	19
• İnterlökkin 17 (IL–17)	20
2.2 Stres	21
2.2.1. Hayvanlarda Uygulanan Deneysel Stres Modelleri	23
o Anneden Ayırma (Anne Yoksunluğu)	25
o Kalabalık Ortamda Barındırma	25
o İzolasyon	25
o Ayak Tabanından Elektroşok Uygulaması	25
o Formalin Enjeksiyonu	26
o Serum Fizyolojik Enjeksiyonu	26
o İnsülin Enjeksiyonu	26
o İmmobilizasyon	26
o Termal Stres	27
a. Soğuk Ortamda Barındırma ya da Soğuk Suda Yüzdürme	27
b. Sıcak Ortamda Barındırma	28
2.2.2. Stres Cevabı	28
2.2.3. Stresin Nöroendokrin Cevabı	29
2.3. Stres ve Bağışıklık Sistemi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Deney Hayvanı	40
3.2. Deney Protokolü	40
3.2.1. Stres Protokolü	40
3.2.1.1. Akut Stres	40
3.2.1.2. Kronik Stres	40
3.3. Kan Örneklerinin Alınması ve Deneyin Sonlandırılması	41
3.4. Lökosit Sayımı	42
3.5. Akım Sitometrisi ile Hücrelerin Sayımı	42
3.6. Sitokin Tayini	44
3.7. Serum Kortizol Tayini	45
3.8. İstatistiksel Değerlendirme	46
3.9. Etik Kurul İzni	47

4. BULGULAR	48
4.1. Hayvan Ağırlıkları	48
4.2. Serum Kortizol Değerleri	48
4.3. Akım-Sitometrisi Ölçümleri	49
4.3.1. Beyaz Küre Sayıları	49
4.3.2. Total Lenfosit Yüzdeleri	52
4.3.3. T Lenfosit Yüzdeleri	53
4.3.4. CD4(+) T Lenfosit Yüzdeleri	54
4.3.5. CD25(+) T Lenfosit Yüzdeleri	55
4.4. Serum Sitokin Değerleri	56
4.4.1. INF- γ	56
4.4.2. IL-4	56
4.4.3. Th1/Th2 Profili Göstergesi Olarak INF γ /IL-4 Oranı	57
4.4.4. IL-17	58
5. TARTIŞMA	60
• Stres Modeli	60
• Stres Yanıtı	62
• Stres ve Bağışıklık Sistemi	63
6. SONUÇ	74
7. KAYNAKLAR	76
EKLER	
EK1. ETİK KURUL İZNİ	
EK2. KONGRE SÖZLÜ SUNUM ÖZETİ	

KISALTMALAR

aa	Aminoasit
ACTH	Adrenokortikotrofik Hormon
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
APC	Antijen Sunan Hücre
AS	Akut Stres
AVP	Arjinin-Vazopressin
BCR	B-Lenfosit Hücre Reseptörü
CD	Farklılaşma Grupları (Cluster of Differentiation)
CFU	Koloni Oluşturan Ünite
CRH	Kortikotrofin Salgılatıcı Hormon
CXCL	Kemokin Ligandı
DM	Diyabetes Mellitus
DTH	Gecikmiş Tip Hipersensitivite
ECLIA	Elektro Kemilüminesans İmmünolojik Test
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
ELISA	Enzim İlişkili İmmünolojik Test
Fas L	Fas Ligand
Fc	Kristalize Olabilen Fragman
FISH	Floresan İn-Situ Hibridizasyon
FITC	Fluoresan İzotiyosiyanat
FLT3	FMS Benzeri Tirozin Kinaz Reseptörü-3
FOXP3	Forkhead Box Proteini
FS/SS	Forward Scatter/Side Scatter
G-CSF	Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör
GABA	Gama-Amino Bütirik Asit
GITR	Glukokortikoid ile İndüklenen Tümör Nekrotize Edici Faktör İlişkili Reseptör
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
hGR	İnsan Glukokortikoid Reseptörü
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HSD	Hidroksisteroid Dehidrojenaz

ICAM	Hücre İçi Adezyon Molekülü
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
IL-R	İnterlökin Reseptörü
IU	Uluslararası Birim
K	Kontrol
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
KS	Kronik Stres
KVS	Kardiyovasküler Sistem
LC	Lokus Seruleus
LFA	Lenfosit Fonksiyonu ile İlişkili Antijen
M-CSF	Monosit–Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
MALT	Mukoza İlişkili Lenfoid Doku
MHC	Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
ml	Mililitre
MoAb	Monoklonal Antikorlar
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
N-CAM	Nöral Hücre Adezyon Molekülü
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
NPY	Nöropeptid Y
OSS	Otonom Sinir Sistemi
PE	Pikoeritrin
POMC	Pro-Opiyomelanokortin
PSS	Parasempatik Sinir Sistemi
SP	P Maddesi
SSS	Sempatik Sinir Sistemi
Tc	Sitotoksik T Hücreleri
TCR	T Hücresi Reseptörü
Teff	Efektör T Hücreleri
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü

Th	Yardımcı T Hücreler
TLR	Toll Benzeri Reseptör (Toll Like Reseptör)
TNF	Tümör Nekrotize Edici Faktör
Treg	Düzenleyici T Hücreler
μL	Mikrolitre

ŞEKİLLER

2.1. Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık Yanıtının Bileşenleri	4
2.2. Lenfoid organlar	5
2.3. Hematopoetik kök hücreden türeyen hücre grupları	7
2.4. T lenfositlerinin timustaki farklılaşması ve olgunlaşması	10
2.5. CD4(+)Yardımcı T lenfosit alt tipleri	15
2.6. Stres sisteminin stres yanıtını oluşturan merkezi ve çevresel bileşenler	29
2.7. Stres sisteminin merkezi ve çevresel bileşenlerinin fonksiyonel ilişkileri	31
3.1. Deney hayvanının kısıtlayıcıya yerleştirilmesi ve kısıtlayıcı içindeki hayvan görüntüsü.	41
3.2. Akım sitometrisi cihazının şematik gösterimi	44
4.1. Deney gruplarının serum kortizol değerleri	49
4.2. Hücrelerin akım sitometrik görüntülerinin <i>FS/SS</i> diyagramında dağılımları	50
4.3. Deney gruplarının beyaz küre değerleri	51
4.4. Deney gruplarının total lenfosit yüzdeleri	52
4.5. Deney gruplarının T lenfosit yüzdeleri	53
4.6. Deney gruplarının CD4(+) T lenfosit yüzdeleri	54
4.7. Deney gruplarının CD25(+) T lenfosit yüzdeleri	55
4.8. Deney gruplarının IFN- γ değerleri	57
4.9. Deney gruplarının IL-4 değerleri	58
4.10. Deney gruplarının IL-17 değerleri	59

TABLOLAR

2.1. Stres Yanıtının Temel Özellikleri	23
2.2. Stres Yanıtının Merkezi ve Periferik Sonuçları	23
2.3. Akut Streste Davranışsal ve Fiziksel Adaptasyon	34
4.1. Deney gruplarında bulunan hayvanların vücut ağırlıkları	48
4.2. Deney gruplarının kortizol değerleri	48
4.3. Deney gruplarının beyaz küre sayıları	51
4.4. Deney gruplarının total lenfosit yüzdeleri	52
4.5. Deney gruplarının T lenfosit yüzdeleri	53
4.6. Deney gruplarının CD4(+) T lenfosit yüzdeleri	54
4.7. Deney gruplarının CD25(+) T lenfosit yüzdeleri	55
4.8. Deney gruplarının IFN- γ değerleri	56
4.9. Deney gruplarının IL-4 değerleri	57
4.10. Deney gruplarının INF γ /IL-4 Oranı	58
4.11. Deney gruplarının IL-17 değerleri	59

1. GİRİŞ

Stres her canlı için yaşamın kaçınılmaz bir parçasıdır. Stres terimi biyolojide çok geniş anlamda kullanılmakta ve bilim adamları tarafından farklı şekillerde tanımlanmaktadır. Stresin tanımlanmış bir etiyolojisi ve/ya prognozu yoktur. En basit ve geniş şekli ile stres; tehdit altındaki homeostazis olarak tanımlanır; stresör olarak isimlendirilen tehditlerin bozduğu denge durumu, organizmanın fizyolojik ve davranışsal adaptif yanıtları ile tekrar sağlanır.

Tüm yaşam formları stres ile başa çıkmak için mekanizmalar geliştirmiştir. Stres yanıtı olarak genelleyebileceğimiz bu mekanizmaların farklı bileşenleri ve stresin neden olduğu hastalıklar, 1936'da Hans Selye'nin ilk kez stresi tanımlamasından bu yana pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Uygarlıkların gelişmesi insanlar için pek çok kolaylığı beraberinde getirmiştir. Daha önce ölümcül kabul edilen bazı hastalıklar tedavi edilebilir hale gelirken, pek çok yeni hastalık da insanlığı tehdit etmeye başlamıştır. Bunların arasında stresin tetiklediği hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır. Stres ve hastalık ilişkisinde rolü olduğu düşünülen çok sayıdaki fizyolojik ve psikolojik yolda zihin ve vücudun ilişkisi önemli yer tutmaktadır. Bu ilişki de iletişim hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini ve sempatik sinir sistemi (SSS) aracılığı ile kurulur. Stres sisteminde yer alan bu yolların her ikisinin de salgıladıkları hormonlar aracılığı ile doğal ve adaptif bağışıklık sistemi yanıtının büyüklüğünü ve yönünü belirledikleri gösterilmiştir.

Stres ve bağışıklık sistemi arasındaki ilişki ile ilgili bilgilerimiz ilerleyen araştırmalar ile değişmiştir. Stresin bağışıklık sistemini baskıladığı yönündeki genel kabul edilmiş Hans Selye'nin stresin timusta involüsyona neden olduğunu gösterdiği deneylerine dayanmaktadır. Erken dönemde gerçekleştirilen insan çalışmaları da kronik strese maruz kalan bireylerde düşük doğal öldürücü hücre (NK) sitotoksitesisi, lenfosit proliferasyonunun baskılanması gibi bulgularla bu düşüncüyü desteklemiştir. Kronik stresin sorumlu tutulduğu azalmış bağışıklık sistemi işlevleri, artmış bulaşıcı hastalık insidansı ve neoplastik hastalıklar ile de ilişkilendirilmiştir. Her ne kadar genel bağışıklık sistemi baskılanması modeli uzun süre bilim adamlarınca kabul edilmiş ve etkili olmuşsa da; homeostazisin tehdit altında olduğu koşullarda bağışıklık sistemi fonksiyonlarındaki azalma canlılığın evrimsel adaptif yanıtına

uygun değildir. Dhabhar ve McEwen'ın çalışmaları aslında stres yanıtının bir baskılanmadan çok bağışıklık sistemi hücrelerinin kompartmanlar arasındaki dağılımında değişikliklere neden olduğunu göstermiştir.

Fareler üzerinde yapılan bir dizi deney akut stresin T hücrelerinin seçici bir şekilde deri içine dağılması ve bağışıklık yanıtının artırılması için çalıştığını ortaya koymuştur. Bunun aksine kronik strese, T hücrelerinin deriden uzaklaşması ile deri testine verilen bağışıklık yanıtının azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular temelinde akut ve kronik stresin farklı bağışıklık yanıtlarını oluşturduğu bifazik bir modeli önermektedir. Toplanan bilgiler ve ilerleyen araştırmalar göstermiştir ki aslında kazanılmış bağışıklık yanıtının efektör hücresi olan lenfositlerin yardımcı T hücre (Th) alt grubu tüm bağışıklık yanıtında ve bu yanıtın stresle modülasyonu ve özellikle otoimmün hastalıklarda çok önemli bir yere sahiptir. Bu bilgiler ışığında ve bildiğimiz kadarı ile literatürde şu ana kadar incelenmediği için çalışmamızın amacımızı buna göre belirledik.

HİPOTEZ

Akut ve kronik soğuk-hareketsizlik stres protokolü yardımcı T hücre yanıtında değişikliğe neden olur.

AMAÇ

1. Akut veya kronik stresin bağışıklık yanıtında kritik önemi olan Th hücre dağılımına etkisini saptamak.
2. Akut veya kronik stresin Th hücrelerinin alt gruplarına [Th1/Th2/Th17 ve düzenleyici T (Treg) hücreleri] etkisini incelemek.
3. Özellikle otoimmün hastalıklarda önem kazanan efektör T (Teff) hücreleri/Treg hücreleri oranını akut veya kronik stres koşullarında değerlendirmek

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağışıklık Sistemi :

Bağışıklık sistemi; vücudun kendisinden patolojik olarak kaynaklanan ve/ya çeşitli yollardan vücuda girmiş olan yabancı antijenleri tanıyarak bunlara yanıt oluşturan doku, hücre ve moleküllerden meydana gelen savunma mekanizmasıdır. Canlının bu sistem ile antijen ve patojenleri tanınması ve bunlara karşı reaksiyon oluşturmaları bağışıklık yanıtı olarak adlandırılmaktadır. Bağışıklık, patojenlere karşı canlının gösterdiği direnci ifade eder. Bağışıklık sisteminin öncelikli görevi karşılaştığı antijen ve/ya patojenlerin kendisine yabancı olup olmadığını algılamaktır. Bu algılama süreci sonrası görevi de bu tehditi organizmadan uzaklaştırmaktır (1, 2).

Bağışıklık sistemi, doğal ve kazanılmış olarak ikiye ayrılır. Bu sistemler karşılıklı etkileşim içindedirler.

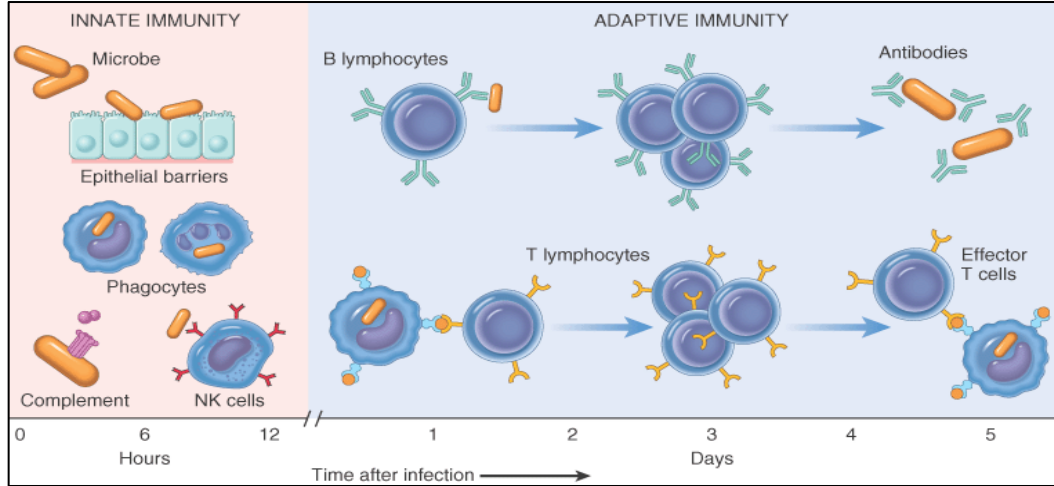
2.1.1. Doğal Bağışıklık Sistemi

Doğal bağışıklık sistemi, edinilmiş bir bilgiye dayanılmaksızın bir antijenle ilk karşılaşma ile işlevi başlayan koruyucu mekanizmalardan oluşur. Kazanılmış bağışıklığın oluşması ve farklılaşmasında da rolü vardır.

Doğal bağışıklık sistemi; epitel bariyerleri, fagositoz yapabilen hücreler (nötrofiller, monosit/ makrofajlar, NK hücreleri), kompleman sistemi, doğal bağışıklık sitokinleri ve doğal bağışıklığın diğer plazma proteinleri (akut faz proteinleri) tarafından oluşturulur. Normal vücut florası ile birlikte bazı fizyolojik yanıtlar (mide ve idrar pH'sının asidik oluşu, lakrimasyon vb.) da bunlar arasında sayılır (1,2). Doğal bağışıklık sistemi hızlı yanıt oluşturur, özgül değildir ve hafızası yoktur (Şekil 2.1).

2.1.2. Kazanılmış (Edinsel) Bağışıklık Sistemi

Kazanılmış bağışıklık sistemi, antijene özgü bağışıklık yanıtından sorumludur. Efektör hücreleri olan B ve T lenfositleri ile kazanılmış bağışıklık yanıtı oluşur. Lenfositlerin antijenlerle tekrar karşılaştıklarında hatırlamalarını sağlayan özgün yanıtı ve hafıza yetenekleri kazanılmış bağışıklık yanıtının temelidir. Doğal bağışıklık yanıtının özgül olmaması ve sınırlı olması özellikle yüksek mutasyon



Şekil 2.1 : Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık Yanıtının Bileşenleri (4)

hızına sahip patojen ve hücre içinde çoğalan virüslerin bağışıklık sisteminden tanınmadan kaçması ile sonuçlanabilir (3).

Kazanılmış bağışıklık T hücre reseptörleri (TCR) ve antikorlar aracılığıyla yürütülen antijen tanıma işlevi ile doğal bağışıklığın eksik kaldığı mutasyona bağlı antijenik değişkenlik ya da hücre içi çoğalma mekanizmalarına da yanıt oluşturabilir.

Kazanılmış bağışıklık yanıtı hücresel ve humoral olmak üzere iki tiptir. Kazanılmış bağışıklık yanıtı yabancı antijenin tanınması, bu antijene yönelik yanıtta özgü lenfositlerin çoğalması ve işlev görecektir. Aktif hale gelmiş hücrelerin tanımlanmış özgül antijeni etkisiz hale getirmesi, efektör fazı oluşturur. Bu fazda yabancı antijen yoğunluğunun azalması oluşturulan bağışıklık yanıtının şiddetini azaltır ve yanıtı sınırlandırır. Aktif hücrelerin çoğu etkilerini gösterdikten sonra apoptozis ile ölür, bazı hücreler ise hafıza hücrelerine dönüşür (1, 5, 6) (Şekil 2.1).

2.1.3. Bağışıklık Sistemi Organları - Lenfoid Organlar

Bağışıklık sistemi nde görev alan hücrelerin gelişimleri merkezi (primer) ve çevresel-periferel (sekonder) lenfoid organlarda gerçekleşir (Şekil 2.2).

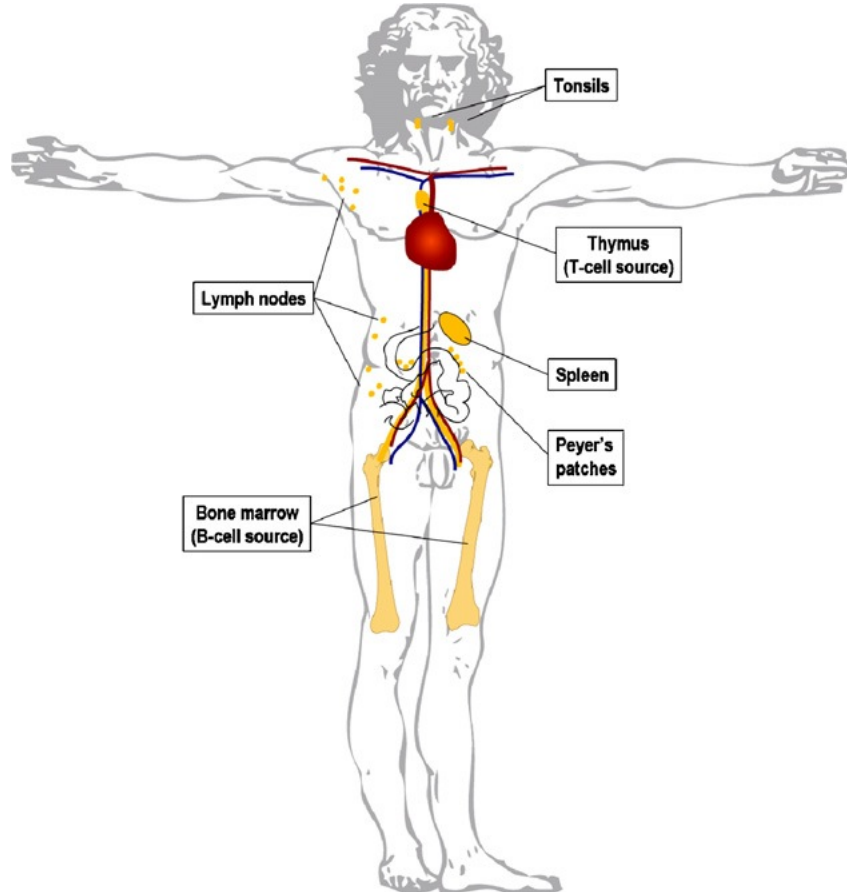
2.1.3.1. Merkezi Lenfoid Organlar

Merkezi lenfoid organlar, kemik iliği ve timus gibi lenfositlerin herhangi bir antijene maruz kalmadan gelişip olgunlaştıkları ve bağışıklık yanıtı oluşturabilme

yetisi kazandıkları organlardır.

Kemik İliği: Retiküler lifler ve hücrelerden meydana gelen gevşek bir stromanın içinde yerleşmiş yağ ve farklı olgunlaşma dönemlerine ait kan hücrelerinin bulunduğu kemik iliği; T lenfositleri, makrofaj öncülleri içermesinin yanı sıra B lenfositlerinin gelişiminin asıl merkezi olma özelliğine de sahiptir.

Timus: Kemik iliğinden göç eden T lenfosit öncüllerinin olgun T lenfositlerine dönüştükleri merkezi bir organdır (1, 5, 7-9).



Şekil 2.2. Lenfoid organlar (9)

2.1.3.2. Periferal Lenfoid Organlar

Dalak, lenf düğümleri, tonsiller ve diğer lenfoid dokular gibi bazı bağışıklık hücrelerinin olgunlaşma ve farklılaşmasını tamamladığı, lenfositlerin antijenik uyarıya maruz kalması ile oluşan bağışıklık yanıtının başladığı organlardır.

Dalak: Lenfositleri içeren kırmızı pulpa ile makrofajlar ve eritrositleri yapısında bulunduran beyaz pulpadan oluşur. Kanın filtre edilmesi ve kandaki antijenlerin yakalanmasından sorumludur.

Lenf Düğümleri: Lenf düğümleri kapsül ve trabekülalar ile ağırlıklı olarak B lenfositleri içeren korteks, T lenfosit ve makrofajları içeren parakorteks ve plazma hücrelerini içeren medulla olmak üzere 3 bölümden oluşur. Kortekste ayrıca B lenfositlerinin kümeleşmesiyle oluşan birincil ve ikincil lenf folikülleri bulunur.

Mukoza İlişkili Lenfoid Doku (MALT): Sindirim, solunum ve ürogenital sistemlerin muköz membranlarında yer alarak bağışıklık yanıtının oluşmasında rol oynayan organize lenfoid dokular, tonsiller ve peyer plakları gibi yapılardan oluşur (1, 5, 7-9).

2.1.4. Kazanılmış Bağışıklık Sistemi Hücreleri

Kazanılmış bağışıklık yanıtı antijene özgüdür ve vücudun *kendinden-olmayan* antijenleri antijen sunumu ile tanımasını gerektirir. Özgül antijene uygun bağışıklık yanıtını oluşturur ve bellek hücreleri aracılığı ile vücutta kalır. Aynı patojen ile tekrar karşılaşıldığında bellek hücreleri sayesinde daha hızlı ve güçlü bir cevap oluşturularak yok edilir (9). Kazanılmış bağışıklık yanıtında görev alan farklı lökosit alt grupları vardır (Şekil 2.3). Görevleri birbirinden farklı olan bu hücre toplulukları, salgıladıkları sitokinler aracılığı ile birbirlerini etkileyerek bağışıklık sistemi trafiğinde önemli rol oynarlar.

Lenfositler

Lenfositler, farklı antijenik yapıları tanıma ve birbirinden ayırabilme yetisine sahip tek hücre topluluğudur. Antijene özgü bağışıklık yanıtının oluşmasını sağlar.

Lökositlerin ayırt edilmesi morfolojik olarak farklı histolojik boyama teknikleri ya da yüzeylerinde bulunan glikoprotein yapıdaki farklılaşma antijenleri ile yapılabilir. Lenfositlerin morfolojik ve boyanma özellikleri çok benzer olduğu için hücrenin fenotipinin belirlenmesi “Farklılaşma grupları” (Cluster of Differentiation-CD) olarak adlandırılan bu işaretleyiciler kullanılarak yapılır. CD proteinleri hücreleri işaretleyip ayırt edilmelerini sağlamanın yanı sıra işlevsel özelliğe de sahiptir. 350’den fazla tanımlanmış CD proteini vardır ve bunlar bir sayı

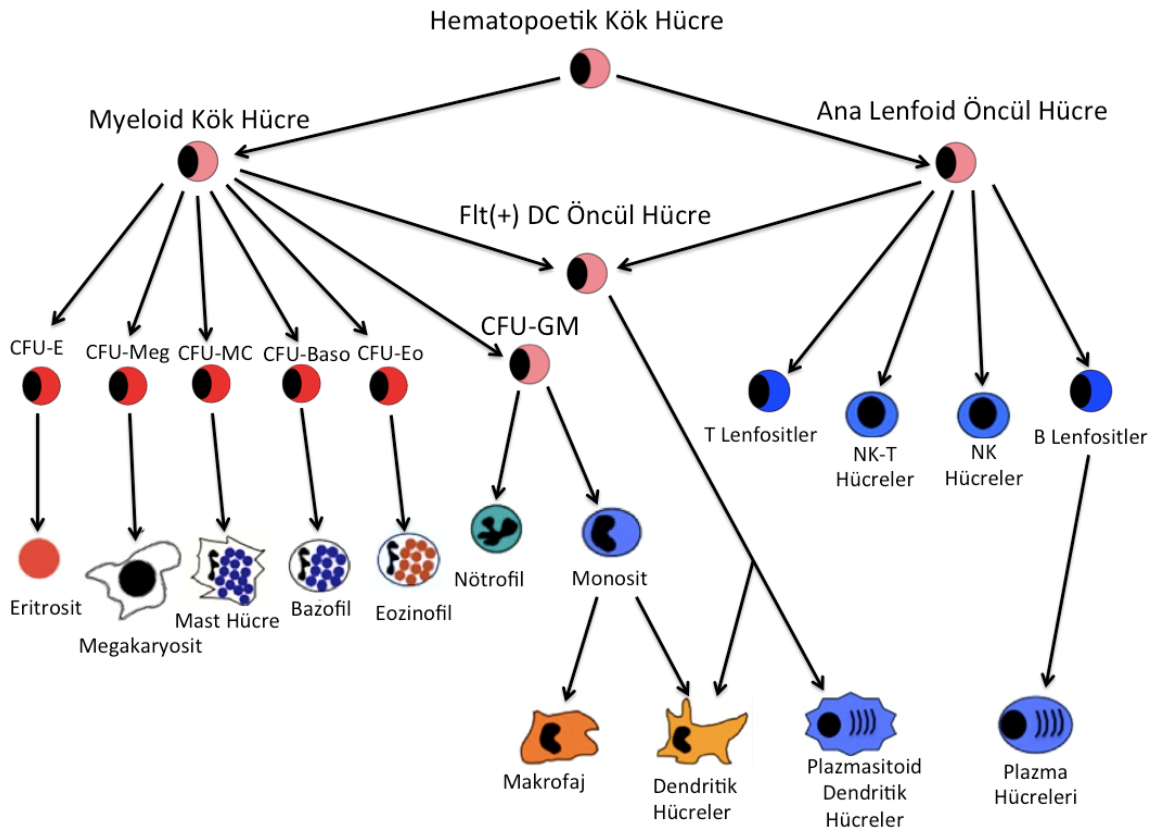
kodu ile adlandırılır (10-12).

Buna göre lenfositler üç temel alt grupta incelenebilir; NK hücreler, B lenfositler ve T lenfositler.

Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer, NK Hücreler)

Doğal bağışıklık yanıtının önemli hücrelerinden olan NK hücreleri virüsle enfekte hücrelerin yok edilmesinde ilk yanıtı oluşturur. Ayrıca tümör hücreleri, parazit, mantar, bakteri gibi mikrobiyal enfeksiyonların kontrolünde rol oynar.

NK hücreleri periferel kandaki lenfoid hücrelerin % 10-15'ini oluşturur. Adezyon ve fagositoz özelliklerinin olmaması ile makrofajlardan ayrılırlar. Etkilerini göstermek için doku uygunluk kompleksine (MHC-Major histocompatibility complex) bağımlı değildir (12-14).



Şekil 2.3. Hematopoetik kök hücreden türeyen hücre grupları. FLT3: FMS-benzeri tirozin kinaz reseptörü-3, DC: Dendritik Hücreler, CFU: Koloni oluşturan üniteler, GM:Granülosit-Monosit, Eo: Eozinofil, Baso: Bazofil, MC: Mast Hücresi, Meg: Megakaryosit, E: Eritrosit, NK: Doğal Öldürücü Hücreler. Chaplin'den değiştirilerek (12).

Kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfosit morfolojisindeki hücrelerdir. Yüzey antijenleri bakımından heterojenite gösterirler. Ancak hiçbirisi TCR ve Ig taşımaz, çoğunluğu CD16 [IgG için kristalize olabilen fragman (Fc) reseptörü-FcγIII] ve CD56 (Nöral hücre adezyon molekülü, N-CAM izoformu) moleküllerini taşır (12-14).

Antikor veya antijenik stimulasyona gerek duymaksızın hücreiçi mikroorganizmalarla enfekte olmuş konak hücrelerini spontan litik aktivite göstererek öldürürler. Makrofajlar tarafından IL-12 aracılığıyla uyarılırlar. Uyarılan NK hücreleri ise salgıladıkları sitokinler ile makrofajları uyarır. Böylece aktiviteleri kuvvetlenen makrofajlar tarafından fagosite edilen mikroorganizmaların daha güçlü biçimde yok edilmeleri sağlanır. Öldürme işlevini sitotoksik T hücrelerine (Tc) benzer şekilde fakat önceden uyarılma gerekmeksizin hızlı bir şekilde gerçekleştirir. Perforin ve granzim gibi çeşitli enzimleri içeren büyük granüller sitoplazmalarında her zaman hazır bulunur. Tc hücrelerinde ise granüller, aktivasyon gerçekleşikten sonra belirmeye başlar. CD16 aracılığı ile antikora bağımlı hücrel sitotoksiste gösterirler (12, 13, 15).

B Lenfositler

Multipotent öncül hücrelerden kemik iliğinde oluşur ve erken dönem olgunlaşmalarını burada tamamlarlar. Periferik kandaki lökositlerin %15 kadarını oluşturan B lenfositleri, antikor üretebilen tek hücre grubudur. Antikorlar, B lenfositlerinin hücre yüzeyinde membrana bağlı olarak bulunan antijen reseptörleridir, olgunlaşmaları sırasında her B hücresi tek ve özgül bir antikor B hücre reseptörü (BCR) olarak eksprese eder. Böylece her lenfosit tek bir antijeni (monospesifik) tanır. Yabancı antijenlerin B lenfositlerle karşılaşması bu hücrelerin aktive olmasını, plazma hücrelerine farklılaşmasını ve antikor salgılamasını sağlar (10). Bu özellikleri ile kazanılmış bağışıklık yanıtının humoral bileşeninden sorumludurlar (16).

T Lenfositler

Diğer lenfositler gibi kemik iliğinde veya fetal dönemde karaciğerde gelişmeye başlayan T lenfositleri olgunlaşmalarını timusta tamamlar (17).

Gestasyonun dördüncü haftasında üst mediastinal bölgede epitelden oluşan solid bir yapı olan fetal timus üçüncü ayda işlev kazanır (6, 9, 12).

Aşağıda ayrıntıları ile açıklanan timustaki temel gelişim aşamaları ve aktive olma mekanizmaları tüm T lenfositleri için ortak olmasına karşın bu hücrelerin efektör işlevleri arasında çok büyük farklılıklar vardır. T hücrelerinin patojenlerin ortadan kaldırılmasında doğrudan rolleri vardır. Ayrıca yardımcı hücre işlevi ile doğrudan hücresel temas ya da sitokinler aracılığı ile B ve T hücre yanıtlarını ve doğal bağışıklık sisteminin efektör hücrelerini etkilerler. Son olarak T lenfositleri bağışıklık yanıtının zamanında sonlanmasını sağlayarak düzenleyici rol oynarlar (17).

Gebeliğin 7. haftasından itibaren fetusta karaciğer ve vitellüs kesesinde görülmeye başlayan T lenfositleri, pro-timositler ve adanmış kök hücreden (pro-T, committed stem cell) gelişir (Şekil 2.3). Kemik iliği kaynaklı kök hücreleri, gelişmek ve fonksiyon kazanmak için özellikle timusun korteks bölümüne göç ederler. Öncül hücreler timustaki matürasyon sürecinden geçmeden özellikli yüzey işaretleyicilerini eksprese etmez. Timustaki T lenfositleri timosit adını alır, buradaki farklılaşma sürecinde korteksten medullaya doğru ilerleyen hücreler CD2, CD3, CD4, CD8 ve TCR eksprese etmeye başlarlar (6, 9, 12, 18) (Şekil 2.4).

Timositler CD4 ve CD8 işaretleyicilerinin hücre yüzeyinde bulunmasına göre 4 ana gruba ayrılır: CD4(-) CD8(-), CD4(+) CD8(+), CD4(+), CD8(+) T lenfosit. Kemik iliğinden timusun korteksine göç eden pro-T hücrelerinde, herhangi bir yüzey işaretleyicisi eksprese (TCR ve CD) edilmez [CD2(-) CD3(-) CD4(-) CD8(-)].

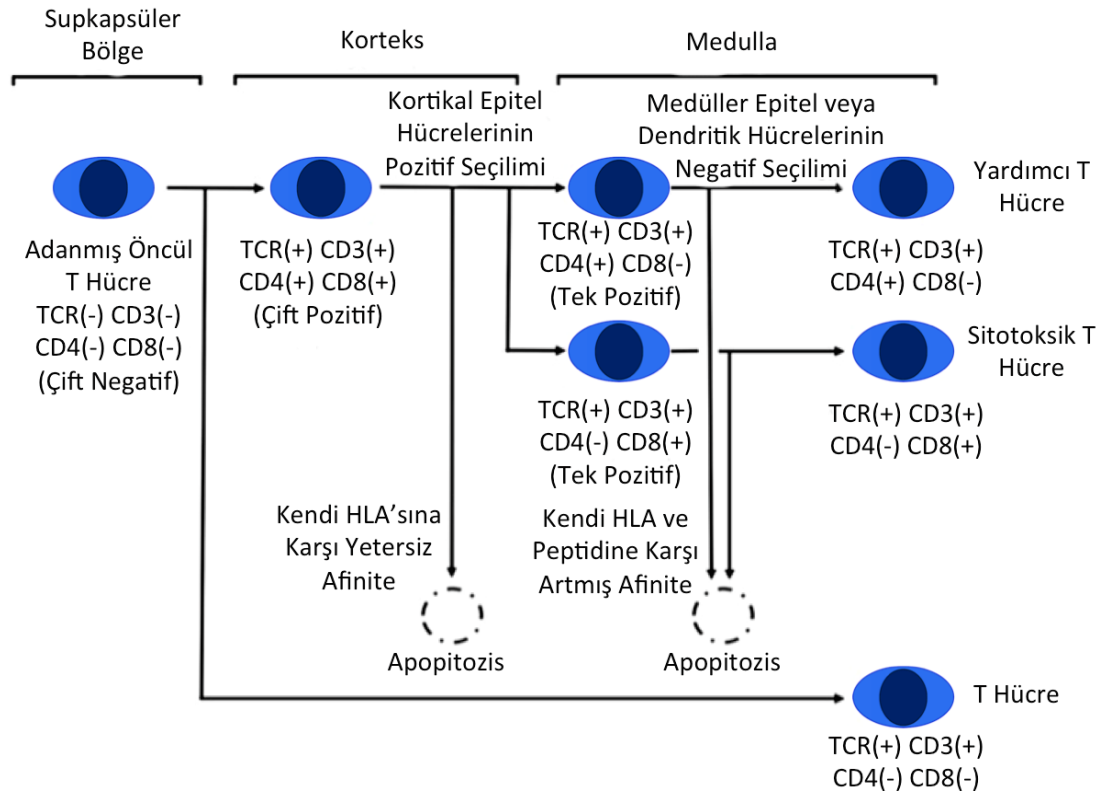
Timositlerin korteksten medullaya göçü sırasındaki farklılaşmaları, önce T lenfositleri için karakteristik yüzey işaretleyicisi olan CD2 ve sonra CD3 ekspresyonu ile başlar. Böylece CD2(+) CD3(+) CD4(-) CD8(-) (çift negatif) hücreler oluşur. Hücre reseptör genlerinin aktive olmasıyla TCR eksprese edilir.

Her T hücresi tek bir antijene özgül bir TCR'ye sahiptir. Bu çok sayıda TCR'nin kodlanması ile oluşan geniş T hücre repertuarı ile sağlanır. Heterodimer yapıdaki TCR'lerinin farklılaşma sürecinde β zincir sentezinin tamamlanmış olması önce α zincirinin yapımını sonra da CD4(+) CD8(+) (çift pozitif) hücrelerin oluşumunu sağlar. Timositlerden ve/ya diğer hücrelerden salgılanan sitokinlerin bu hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında etkili oldukları bilinmektedir. Büyük, aktif bölünen, gelişimini tamamlamamış blast özelliğinde hücreler olan CD4(+) CD8(+)

timositleri, timustaki olgun popülasyonu oluştururlar. Bu hücreler bölünerek, düşük düzeyde TCR $\alpha\beta$ eksprese eden kortikal, küçük, bölünmeyen hücreleri oluştururlar. CD4(+) CD8(+) timositlerde TCR'nın sentezi pozitif seçilimin erken gelişim fazında artar (6, 18-20).

Timositler timustaki farklılaşma sürecinde olgunlaştıkça TCR ekspresyonu artar ve yüzeylerindeki CD4 veya CD8 proteinlerinden birisi kaybolur. Bu basamağın sonunda medüllada bulunan tüm timositler CD2 ve CD3 işaretleyicilerini ortak olarak taşıyır [CD2(+) CD3(+)]; ancak hücreler ya CD4(+) ya da CD8(+)'tir (Şekil 2.4).

Tek pozitif hücreler adı verilen bu hücreler timusta post kapiller venüllere geçerek genel dolaşıma katılır. Doğumdan sonraki 6. aya kadar T lenfosit sayısı kanda gittikçe artar ve 1-2 yaş aralığında azalarak erişkin düzeyine iner. Hem T lenfositlerin hem de toplam lenfositlerin sayısı yenidoğanda, çocuk veya erişkindekine göre fazladır.



Şekil 2.4 : T lenfositlerinin timustaki farklılaşması ve olgunlaşması. Huston'dan değiştirilerek (21).

CD4(+) veya CD8(+)'liği Teff lenfositlerinin özgülüğünü belirler. CD4(+) T lenfositleri Th hücreler olarak isimlendirilirken CD8(+) hücreler Tc hücreler olarak tanımlanır. CD4/CD8 oranı fetal hayatta 3,5 ve doğumda 2,5 iken 4 yaş civarında erişkin düzeyi olan 2'ye düşer (6, 10, 18).

Timustaki CD4(+) CD8(-) T lenfositleri, CD25 bulundurmalarına göre iki alt gruba daha ayrılır. Hücrelerin çoğunluğunu oluşturan CD4(+) CD25(-) hücreler periferel bağışıklık sisteminde Th hücrelerin efektör alt grupları olarak görev alırken; daha az sayıdaki CD4(+) CD25(+) hücreler Treg hücrelerini oluştururlar (6, 18, 19, 22).

Timositlerin timusta olgunlaşması 3 gün alır. Tüm timositlerin yaklaşık %1'i dolaşıma katılırken kalanı apoptoza uğrar. Apoptoza uğrayan timositlerin %75'i CD4(+) CD8(+) çift pozitif, %13'ü de CD4(-) CD8(-) çift negatif hücrelerdir. Apoptotik hücrelerin çoğunluğu CD4(+) CD8(+) lenfositlerin yüksek yoğunlukta bulunduğu kortiko-medüller bağlantı bölgesinde, daha az bir bölümü de kortekste yerleşmiştir.

TCR özgülüğü, rastgele gen düzenlemeleri ile ortaya çıkmaktadır. İntratinik self peptid-MHC Sınıf II moleküllerinin etkileşimi, CD4(+) CD8(+) T lenfositlerini etkileyerek T lenfosit çeşitliliğini oluşturur. Hücrelerin kendi MHC moleküllerine afinite göstermesi timositlerin canlılığı için gereklidir. Timositlerden sadece kendi MHC yapısına afinite gösterenler yaşarken diğerleri apoptoza uğrar. MHC moleküllerinin yardımı ile yapısında CD3, CD4, CD8 ve TCR gibi kendilerine özgü işaretleyicileri bulunan ve periferel dolaşımda görev alan antijen sunucu hücrelerin (APC) sundukları antijenlerin yabancı olarak algılanmaması sağlanmış olur (self-tolerans). Hücrelerin seçilmesi, çoğalması ve/ya apoptoza uğraması üzerine yapılan araştırmalar henüz bütün mekanizmaları açıklayabilmiş değildir ve bu farklılaşmada yer alan başka mekanizmaların varlığı da düşünülmektedir (6, 18, 19).

İnsan T lenfositlerinde, CD2, CD3, CD4 ve CD8 gibi yüzey işaretleyicilerinin yanı sıra çok sayıda sitokin ve interlekin (IL) reseptörleri [IL-1R, IL-2R, IL-6R, İnterferon (IFN)- γ R, Tümör nekrotize edici faktör (TNF)-R] ve lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1 (LFA-1), hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi adezyon molekülleri de eksprese edilir. Bu yüzey molekülleri ilgili T lenfositlerinin antijen tanınması, uyarılması ve efektör işlevleri için gereklidir. Ayrıca T lenfositlerinin

gelişiminde, aktive olmasında, dönüşüm geçirmesinde IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, IL-27, IFN- γ gibi bir çok farklı sitokin rolü bulunmaktadır (10, 18).

Timositlerin olgunlaştıktan sonra dolaşıma nasıl geçtikleri ve hangi alt gruplara farklılaşarak nasıl görev yapacaklarına dair hala karanlık noktalar bulunmaktadır. Dolaşıma geçtikten sonra olgun T lenfositler dalak, lenf nodülleri, peyer plakları gibi ikincil lenfoid dokulara geçer. Ayrıca serbest dolaşan T lenfositler dolaşımdaki lenfositlerin %60-80 kadarını oluştururlar. Bu hücrelerin 2/3'ü CD4(+), 1/3'ü CD8(+)'tir (6, 10, 18, 19).

Olgun T lenfositleri timustaki öncül havuzuna bağlı olmaksızın dolaşımda hücre bölünmesiyle çoğalır ve periferik T lenfosit sayısı sabit tutulur. T lenfositlerin çeşitlenmesi her ne kadar timusta şekilleniyor olsa da olgun T lenfosit özellikleri ve fonksiyonları, periferdeki havuzun gelişmesi ile sağlanır (18). T lenfositlerinin yüzey özelliklerinden, işlevleri ile yakından ilgili olan bazıları aşağıda açıklanmıştır.

T Hücresi Reseptörü

T lenfositler antijenik peptidleri TCR ile tanır. TCR, yapısal olarak hiç bir zaman salgılanmaması ve işlevsel olarak antijeni, MHC ile yaptığı kompleks sonrası tanınmasıyla immünoglobülinlerden ayrılmaktadır. TCR 2 adet polipeptid zincirinin disülfid bağı ile bağlanarak heterodimer yapı oluşturması ile şekillenmiştir. İki tip TCR tespit edilmiştir; TCR-1: γ ve δ zincirlerinden, TCR-2: α ve β zincirlerinden oluşur. T lenfositlerin %95'i TCR-2 %5'i TCR-1 bulundurur (23). TCR'nin sitoplazmik kuyruğunun aşırı derecede kısa olması hücre-antijen etkileşimi sonrası bu yolla sinyal oluşumunun olası olmadığını düşündürmektedir. TCR, CD3 ve zeta (ζ) zincirlerinin birleşmesi ile TCR kompleksini oluşturarak fonksiyonel hale gelir; böylece sinyal oluşumu ve iletimi sağlanır (6, 19, 24, 25).

T lenfositleri, özgün yüzey işaretleyicisi CD3 ve iki önemli alt grubu oluşturan CD4 ve CD8 yüzey işaretleyicileri ile tanınırlar.

CD3

T lenfositlerinin membran yüzeyinde yer alan CD3; gama (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ) ve eta (η) polipeptid zincirleriyle kompleks oluşturarak TCR'in

hücre içindeki kısa kalan bölümünü oluştururlar. TCR'ın heterodimer alt birimleriyle yan yana bulunarak görev görür. T lenfosit aktivasyonunda, TCR'nin hücre yüzeyine sunumunda, TCR'nin bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynadığı gibi hücre içine sinyal iletiminden sorumlu molekül olarak da görev görür (6, 18, 19).

CD4

Glikoprotein yapıda olup 55 kDa ağırlığında tek bir polipeptid zincirinden oluşmuştur. CD4(+) Th lenfositlerine özgü işaretleyici olup MHC Sınıf-II molekülüne bağlanabildiği için lenfositlerin TCR ile birlikte APC ile bağlantısında görev alır. Ayrıca sinyal iletiminde rol oynar. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), Th hücrelerinin yüzeyindeki CD4 molekülüne bağlanarak enfeksiyonunu gerçekleştirir (6, 19, 26).

CD8

Tc lenfositlerin yüzey işaretleyicisidir. CD8 kendine özgü α ve β zincirinden oluşmaktadır. T lenfositlerin de iki farklı tipte CD8 molekülü bulunabilir: α zincir homodimeri, α ve β zincirleri heterodimeri. Görevi MHC Sınıf I molekülüne tutunmak ve sinyal iletimini kolaylaştırmaktır (6, 19, 26).

CD25

55 kDa ağırlığında bir membran glikoproteinidir. IL-2 reseptörünün α zinciridir. β ve γ zincirleri ile nonkovalen bağlanarak reseptör yapısını oluşturur. Aktif T lenfositler, Treg hücreleri, aktif B lenfositler ve aktif makrofajların yapısında da bulunmaktadır (27).

1. CD8(+) Sitotoksik T Lenfositler

Periferal kan T lenfositlerin % 20-40'ını oluşturan Tc lenfositler CD8 işaretleyicileri taşır. Bağışıklık sisteminde virüs, parazit ve hücre içi bakteriler ile enfekte olmuş hücre, tümör hücrelerine, organizmaya yabancı kabul edilen doku ve organ transplant hücrelerine, yabancı hücreler ve dış etkenlerden etkilenmiş hücrelere doğrudan saldırırlar. Bu hücrelerde immünoglobülinler için Fc reseptörü bulunmaz. Bu nedenle de antikor-bağımlı hümmoral sitotoksisite göstermezler. MHC

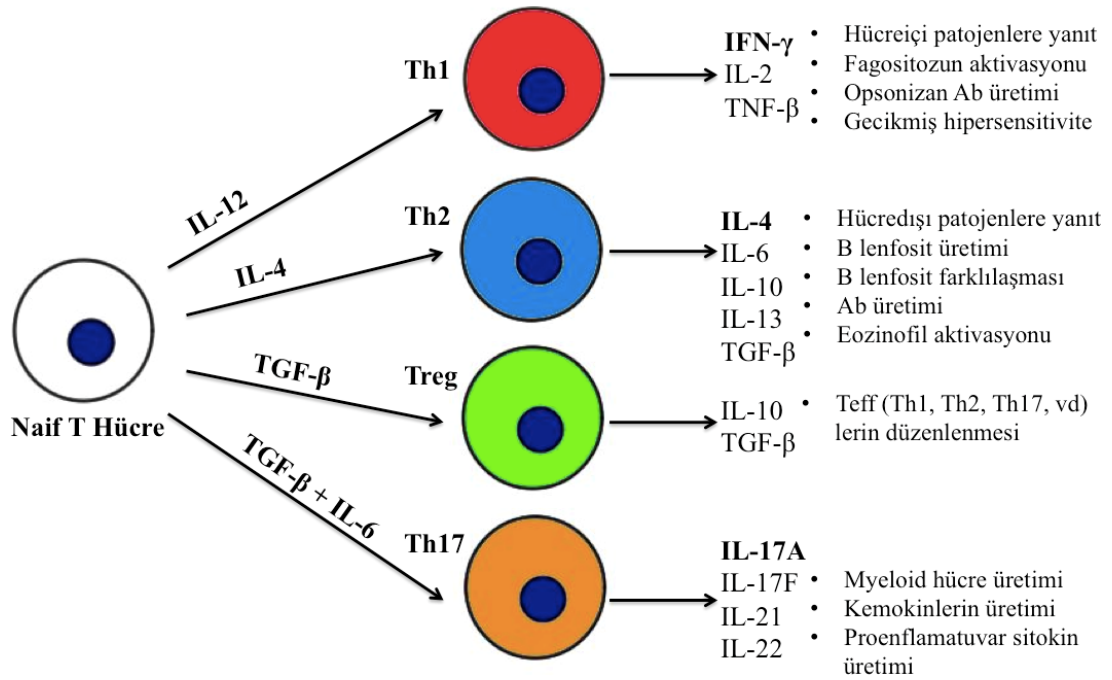
Sınıf I ile sunulan antijeni tanıyarak aktive olur ve sitotoksik fonksiyon gösterirler. Farklılaşmasına neden olan antijeni taşıyan hedef hücrenin zar bütünlüğünü bozarak öldürür. Bu işlem sırasında komşu hücelere ve kendine zarar vermeyerek çok sayıda hedef hücreyi öldürebilirler (6, 18, 19, 28).

Tc hücreler sunulan antijeni tanıdıklarında; LFA-1, ICAM-1 gibi adezyon molekülleri aracılığı ile hedef hücreyle sıkı bağlantılar oluşturur ve temas ettiği bölgeye ekzositozla granüllerini boşaltır. Granül içeriklerinden perforin, aktivite kazanmaları için gerekli olan ortamdaki Ca^{++} ile polimerize olarak hedef hücrenin zarında delikler açar. Bu deliklerden veya endositozla hedef hücreye giren granzimler sitoplazmadaki kaspaz enzimlerini aktive eder, böylece hücre ölümü ile sonuçlanan apoptotik süreç başlar. Granzimleri aktive eden ikinci yolak Ca^{++} 'dan bağımsızdır. Bu yolla aktive Tc hücrelerinde bulunan Fas ligand (Fas L), hedef hücredeki uyarıcı Fas (CD95) reseptörlerine bağlanarak granzimleri aktive eder, apoptozis başlar (6, 18, 19, 28).

2. CD4(+) Yardımcı T Lenfositler

Kandaki lenfositlerin %35-60 kadarı adanmış bir kök hücreden köken alan CD4(+) Th lenfositlerdir. Yaklaşık olarak 20 yıl önce Robert Coffman ve Tim Mossman'ın her Th lenfositinin tüm sitokinleri üretme yeteneği olmadığını ve her hücrenin kendi repertuarı olduğunu yayınlaması ile Th lenfositleri iki alt gruba (Th1 ve Th2) ayrılmıştır (29). Ancak Treg hücrelerinin Th1 ve Th2 dengesindeki rolünün belirlenmesi ve 2005 yılında özellikle otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilen Th17 hücrelerinin tanımlanmasıyla grup sayısı artmıştır (30, 31). Farklılaşma, bu hücreleri bir gruba yönlendiren sinyal ve sitokin mekanizmaları ile gerçekleştirilir. Böylece hücreler IFN- γ salgılayan Th1, IL-4 salgılayan Th2, IL-17 salgılayan Th17 ve TGF- β salgılayan Treg hücreleri fenotipine farklılaşırlar (18, 19, 32, 33) (Şekil 2.5).

Th hücreler, MHC Sınıf II molekülleri ile sunulan peptidleri tanıyarak antikor üreten B ve Tc lenfositlerinin aktivitelerini artırır. Th hücrelerin sayıca azalması ve/ya yeterince aktivite gösterememesi bu hücrelerin antijene cevabının zayıf olmasına yol açar. Ayrıca çeşitli lenfokinleri salgılayarak T lenfositlerinin, monosit-makrofajların ve diğer bazı hücrelerin sayıca ve etkinlikçe artmalarını sağlarlar. Bu nitelikleri ile Th lenfositleri, bağışıklık sisteminin orkestra şefi hücreleridir (18).



Şekil 2.5: CD4(+) Yardımcı T lenfosit alt tipleri ve salgıladıkları sitokinlerin bazıları. Maniati ve Mesquita'dan değiştirilerek (30, 31).

Th1 Hücreler

Bu hücreler naif Th hücrelerinden IL-12 uyarılması ile oluşur ve sitolitik aktivite göstererek hücre sel bağışıklık yanıtında etkin ve kilit rol oynarlar. Bunu salgıladıkları IFN- γ , IL-2 ve TNF- β ile gerçekleştirirler. Bu sitokinler ağırlıklı olarak makrofaj, Tc ve B lenfositlerinin aktive olmasını sağlar. B lenfositlerinin IgG1 ve IgG3 antikorlarını sentezlemesini sağlar. IFN- γ aracılığı ile opsonizasyon, kompleman bağlayıcı antikor üretiminde artış ve makrofaj aktivasyonu ile antijenlerin ortadan kaldırılması sağlanır (6, 20, 29).

Th2 Hücreler

Th2 lenfositlerinin gelişimi IL-4 ile kontrol edilir. Th2 lenfositler humoral bağışıklık yanıtında, allerjik enflamasyon oluşması ve parazitlere karşı bağışıklık yanıtında önemli rol oynar. Akut ve kronik enflamasyonu ve geç tipte hücre sel aşırı duyarlılığı inhibe eder. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 gibi sitokinleri üretir. Antijenik uyarım sonucu çoğalan ve farklılaşan Th2 lenfositlerinden sentezlenen IL-4, B lenfositlerini etkileyerek IgM ve IgG sentezini uyarır. Ig değişiminden (IgM, IgG sentez switching) sorumludur. Böylece total IgG sentezi de artar. IL-5 ile

eozinofilleri aktive eder ve IgE sentezini oluşturur. IgE, mast hücre aktivasyonuna neden olur ve helmintleri kaplayarak eozinofiller tarafından parçalanmasını sağlar.

Th2 lenfositlerinden salgılanan IL-4 ve TGF- β ; makrofaj aktivasyonunu inhibe ederek Th1 aracılığıyla yürütülen hücresel bağışıklığı baskılar (6, 20, 29). Hümmoral bağışıklık yanıtında görev alan IL-4, IL-10 ile birlikte mast hücreleri ve eozinofillerin büyümelerini ve aktive olmalarını, B hücrelerinin antikor salgılayan B hücrelerine dönüşümelerini sağlar; makrofaj aktivasyonunu, T hücre proliferasyonunu ve proenflamatuvar sitokin salgılanmasını inhibe eder (34-36).

Tanımlandıkları 1986 yılından bu yana Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki ilişki Yin-Yang paradigması gibi ele alınmış ve bağışıklık yanıtı primer olarak Th1 veya Th2 aracılı olarak sınıflandırılmıştır. Ancak yakın zamandaki çalışmalar Th hücrelerinin diğer alt tiplerinin de varlığını ortaya çıkartmıştır (37) (Şekil 2.5).

Th17 Hücreler

2005 yılında tanımlanan Th 17 hücreleri, naif Th hücrelerinden farede TGF- β ve IL-6, insanda ise TGF- β ve enflamatuvar sitokinler aracılığı ile farklılaşır. Bunlar IL-1 β , IL-6, IL-21, ve/ya IL-23 olabilir. IL-23, Th17 hücrelerinin büyüme, hayatta kalış ve işlevleri için gereklidir. Th17 lenfositleri etkilerini proenflamatuvar sitokin IL-17 salgılayarak gösterirler. IL-17, doğal immünitede efektör rol alan IL-6, akut faz proteinleri, G-CSF ve prostaglandin E2'nin salgılanmasını indükler ve nötrofil mobilizasyonunu sağlar. Th17 lenfositleri romatoid artrit, deneysel otoimmün ensefalomyelit vb. otoimmün hastalıkların gelişiminde, bazı allerjen spesifik yanıtların patogeneğinde, ayrıca enfeksiyona karşı konakçı yanıtında nötrofil ve makrofajları enfeksiyon bölgesine çekerek ve antimikrobiyal peptidlerin ekspresyonunu artırarak görev yaparlar (38, 39).

Th17 hücrelerinin otoimmün enflamasyondaki rolü pekçok hayvan modelinde gösterilmiştir. Örneğin deneysel otoimmün artrit modelinde kemik ve kıkırdak hasarından sorumludur (40) ve IL-17A'nın hastalığın başlangıcından önce bloke edilmesi hastalığın şiddetini azaltmaktadır (41). Benzer şekilde IL-17A eksikliği olan farelerde kollajen ile indüklenen artrit (42) ve deneysel otoimmün ensefalomyelit modellerinde hastalığın başlangıcında gecikme ve şiddetinde azalma gözlenmiştir (43). Bunlara ek olarak enflamatuvar doku hasarında, epitelyal ve mukozal

bariyerlerin antimikrobiyal aktivitesinde rolü olduğu düşünülmektedir (33, 44). Th17 hücreleri özellikle hücre dışı patojenlere karşı aktive olan konakçı bağışıklık yanıtında önemlidir (45).

Düzenleyici T Lenfositler

Bağışıklık yanıtının kontrolü ve immün homeostazisin korunmasında yadsınamaz rolü olan Treg hücreler CD4(+) CD25(+) T lenfositlerdir. Ayrıca hücre içi Forkhead Box Proteini-3'ü (FOXP3) en güçlü olarak eksprese eden Th lenfosit alt grubudur. Periferik kandaki CD4(+) T lenfositlerin % 5-25'ini oluştururlar. İşlevsel olarak hücre aracılı baskılamadan sorumlu olan bu hücre grubuyla ilgili son yıllardaki araştırmalar bilgilerimizde önemli ilerlemeler kaydedilmesini sağlamıştır (32, 46-49).

Treg hücreleri iki hücre grubundan oluşur: timusta gelişimini tamamlayan doğal Treg (nTreg) hücreler, naif Th hücresinden çevresel dokularda gelişen indüklenebilen Treg (iTreg) hücreler. nTreg hücreleri canlının kendi dokularına toleransından (self tolerans), iTreg hücreleri de adaptif bağışıklık yanıtının regülasyonundan sorumludurlar (32, 46, 47). CD4(+) Th hücrelerin tüm alt gruplarını baskılama yeteneğine sahip olan Treg hücreleri (50), Th1, Th2 ve Th17 hücrelerinin işlevlerini düzenler (51, 52). TGF- β ve IL-10 sentezleyerek efektör Th1 hücreleri üzerinde inhibisyona neden olurlar. T lenfositlerinin IL-2 üretimini ve proliferasyonunu baskırlar (46, 47, 53). Ayrıca CD8(+) T lenfositleri, dendritik ve B hücrelerinin çoğalmasını ve işlevlerini baskıladığı da gösterilmiştir (51, 52).

Sitokinler

Sitokinler doğal ve kazanılmış bağışıklığın aktivasyon ve efektör fazında bağışıklık sisteminde özellikle makrofajlar ve Th lenfositleri veya diğer sistem hücrelerince üretilen ve salgılanan polipeptid yapıda; hücreler arası ilişkileri, bağışıklık yanıtını ve enflamasyonu düzenleyici sinyal proteinleridir. Tanımlanmış sitokin sayısı 100'den fazladır (54-58).

Sitokinler genellikle uyarılmış hücreler tarafından salgırlar. Aynı sitokin farklı hücreler tarafından üretilir. Sitokinler birbirlerinin yapımını ve salıverilmesini arttırabilir veya azaltabilir. Sitokin yapımı ve salıverilmesini kısa

sürelî, kendini sınırlayan bir olaydır. Sitokinlerin yarı ömürleri kısadır. Öncül moleküller olarak depolanmazlar ve sentezleri yeni gen transkripsiyonu ile başlatılır. Etkilerini hedef hücrelerdeki özgül transmembran reseptörlere bağlanarak gösterirler (49, 54-57).

Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin fonksiyonlarını etkilerler. İki sitokin birbirine antagonistik veya sinerjistik etki gösterebilir. Bir sitokin birçok farklı hücre tipine etki edebilir (pleiotropi). Yani aynı sitokin birden fazla etkisi olabilir (55-58).

Sitokinler genellikle otokrin ve parakrin etkileşimler ile lokal etki oluştururlar ancak endokrin olarak salgılanıp sistemik etki de gösterebilir (54, 56, 57).

Sitokinler farklı şekillerde sınıflandırılabilir;

1. İşlevlerine göre:

- Hematopoezi uyaranlar: IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, GM-CSF, M-CSF, G-CSF.
- Doğal bağışıklıkta görevli olanlar: TNF, IL-1, IL-6, Tip I interferonlar.
- Bağışıklık aracılı enflamasyonu düzenleyenler: IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ
- Lenfosit aktivasyonu, proliferasyon ve differansiasyonunu düzenleyenler: IL-2, IL-4, TGF- β

2. Proenflamatuvar veya antienflamatuvar oluşlarına göre:

- Proenflamatuvar; IL-1, IL-6, TNF- α vd.
- Antienflamatuvar; IL-4, IL-10, IL-13 vd

3. Sentez edildikleri hücrelere göre:

(Burada sadece Th hücrelerinden salgılanan sitokinler gösterilmiştir)

- Th1 lenfositler: TNF- β , IFN- γ , IL-2 ve IL-12
- Th2 lenfositler: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13
- Th17 hücreler: IL-17 salgılayarak etkilerini gösterirler
- Treg hücreler: TGF- β , IL-10 (33, 49, 53-55, 57).

Geniş sitokin kütüphanesinin üyelerinin arasından Th hücre yanıtını değerlendirmek için kullandığımız moleküllerin özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

Naif CD4(+) Th lenfositlerinin alt tiplerine farklılaşmasını ve işlevlerini sitokinler belirler (59). Th1 yanıtı hücresel bağışıklık yanıtı olarak da tanımlanabilir ve IL-2, IFN- γ ve IL-12 salgısı ile karakterizedir. Öte yandan IL-4 ve IL-10 salgısı ile tanınan Th2 yanıtı kazanılmış bağışıklık yanıtını humoral cevaba kaydırır (60). Bunlara ek olarak Th17 hücreleri IL-17 başta olmak üzere salgıladıkları sitokinler ile

vücudun savunma sistemini güçlendirmelerinin yanısıra otoimmün hastalıkların patogeneğinde de yer almaktadırlar (61).

İnterlökin 4 (IL-4)

20 kDa ağırlığında olup 5. kromozom tarafından kodlanan IL-4, özellikle Th2 yanıtında rol alan aktif CD4(+) T lenfositleri ve mast hücreleri tarafından sentezlenir (49, 55, 57, 62). Th1 lenfositlerinin uyarılmasını ve işlevlerini baskılar, Th2 lenfositlerinin uyarılmasını, gelişimini, eozinofil ve mast hücrelerinin çoğalmasını ve etkinliğini artırır. Makrofajların aktivasyonunu inhibe ederken MHC Sınıf II moleküllerinin bu hücrelerce ekspresyonunu artırır. IFN- γ 'nın birçok makrofaj aktive edici etkisini bloke eder. Böylece hücrel bağışıklık yanıtını baskılar (55, 57, 63, 64). Temel fizyolojik etkisi allerjik olayları düzenlemektir. B lenfositlerin proliferasyon, aktivasyon ve differansiasyonunu artırarak IgG1 ve IgE antikorlarını üretebilmelerini sağlar (54, 56, 63, 64).

İnterlökin 10 (IL-10)

18 kDa'luk bir sitokin olan IL-10 asıl olarak Th2 lenfositleri, bazı aktive B ve Th1 lenfositleri ve aktive makrofajlar tarafından da üretilir (55, 56, 65).

IL-10 konağın bağışıklık yanıtının inhibitörü, enflamasyonun asıl sınırlayıcısıdır (down-regülasyon). Makrofajların ve Th1 lenfositlerinin sitokin üretimini ve aktifleşmesini engeller. Makrofajların T lenfosit aktivasyonundaki işlevlerini MHC Sınıf II moleküllerinin ve bazı diğer uyarıcıların ekspresyonunu azatarak engeller. Sonuçta T lenfosit aracılı bağışıklık yanıtını inhibe eder (49, 55, 57, 65).

IL-10'un B lenfositler üzerinde proliferatif etkisi vardır. Ebstein-Barr virüsü, viral IL-10 analogu üreterek hücrel bağışıklık sistemini baskırlar. B lenfositlerinin proliferasyonunu uyarak Burkitt Lenfoma gelişmesine neden olabilir (55, 57).

İnterferon γ (IFN- γ) (İmmün ya da Tip II İnterferon)

İnterferonlar aminoasit dizilimlerine göre sınıflandırılır. Buna göre antiviral etkinliği yüksek olan Tip I interferon grubu (IFN α , IFN β , IFN ω) ve antiviral etkinliği düşük olan Tip II interferon grubu [IFN- γ (immün interferon)]

tanımlanmıştır (55, 58).

IFN- γ , 21-24 kDa'luk homodimer bir glikoproteindir. Özellikle CD8(+) T lenfositleri ile Th1 lenfositleri ve NK hücreleri tarafından üretilir. Doğal ve adaptif bağışıklıkta kritik öneme sahiptir. IFN- γ üretimi IL-2 ve IL-12 ile artarken, IL-4 ve IL-10 ile baskılanır. Makrofajların etkinliğini ve mikrobisidal etkilerini arttıran temel aktivatördür. IFN- γ ile uyarılan makrofajlarda IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α gibi sitokinlerin ve NO'nun yapımı ve salıverilmesi uyarılır. Nötrofiller ve damar endotel hücreleri aktive olur. NK hücrelerinin sitolitik aktivasyonu ve CD4(+) T lenfositlerin Th1 yönünde farklılaşması artar. Th2 lenfositlerinin yapımı azalır. IL-4 üretimi baskılanır. MHC Sınıf I ve II moleküllerinin ekspresyonu artar (55, 57, 58).

İnterlökin 17 (IL-17)

IL-17, 150 aa'lık 15 kDa ağırlığında bir proteindir ve disülfid bağlarıyla bağlı homodimer yapısıyla 30-35 kDa ağırlığında bir glikoprotein olarak salgılanır (66). IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), IL-17F olarak isimlendirilen altı adet altıtipi tanımlanmıştır. IL-17E Th17 hücrelerinden değil Th2 hücrelerden sentezlenir (38, 42, 43). IL-17A ve IL-17F, NK hücreleri, nötrofiller ve eozinofiller gibi farklı hücre gruplarınca da sentezlenir. Bu nedenle IL-17A ve IL-17F, hem doğal ve hem de adaptif bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen ve köprü işlevi gören efektör sitokinlerdir (67). Bu moleküller proenflamatuvar özelliklere sahip olup geniş bir hücre grubunu etkileyerek sitokin (TNF, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, G-CSF), kemokin (CXCL1, CXCL8, CXCL10) ve metalloproteinazların salgılanmasını indükler (68, 69).

IL-17 ayrıca nötrofil proliferasyonu, maturasyonu ve kemotaksisinde görev alır. IL-17 reseptörü olmayan farelerde nötrofil sayısının düşüşü ile konağın bakteriyel akciğer enfeksiyonlarına daha duyarlı hale gelmesi rapor edilmiştir. Aynı zamanda lökositler tarafından IL-17'nin aşırı salgılanmasının akciğerlerde kemokin salgılanmasını ve doku inflamasyonuna neden olduğu bulunmuştur. IL-17, T hücrelerini de uyararak dendritik hücrelerin maturasyonunu arttırır. Serum ve hedef organda IL-17 düzeyinin romatoid artrit, multiple skleroz, sistemik lupus eritematoz ve astım gibi hastalıklarda arttığı bulunmuştur. Romatoid artritte proenflamatuvar sitokin, kemokin, matriks proteazların salgılanmasını indüklemesi ile IL-17, kemik ve

kıkırdak doku yıkımına direkt etkili bulunmuştur. IL-17 *knock out* ve IL-17 reseptör (IL-17R) antagonisti verilen farelerin kimyasal verilerek oluşturulan artrite dirençli olduğu gözlenmiştir. Benzer çalışmalar otoimmün ensefalomyelit için de yapılmıştır (68, 70-73).

2.2.Stres

Varoluşun temel gerçeği bireyin hayatını devam ettirebilmesidir. Hayatta kalım ise karşılaşılan iç ve/ya dış tehditleri, etkenleri, uyarıları gerekli şekilde algılamayı ve uygun bir yanıt oluşturabilmeyi gerektirir. Stres, basitçe bireyin iç veya dış dünyada karşılaştığı herhangi bir durum olarak ifade edilebilir (74, 75). Stresi anlamak için öncelikle ‘homeostazis’ kavramı açıklanmalıdır.

Homeostazis terimi her ne kadar ilk kez Walter Bradford Cannon tarafından kullanılmış olsa da ondan yıllar önce Claude Bernard’ın ‘Milieu interieur’ terimiyle açıkladığı özgür ve bağımsız bir yaşam için iç ortamının dinamik değişmezlik durumu olarak tanımlanır. “*Canlılar ihtiyaçlarını karşılamak için gereksinim duydukları bir çevre içinde nispeten bağımsız yaşarlar. Bu bağımsızlık, dokuların dış etkilere uzaklaştırıldığı bir iç çevre içinde olmaları ile açıklanmaktadır.*”

1. Walter Bradford Cannon 1915 yılında “*Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Researches into the Function of Emotional Excitement*” adlı eserinde bir hayvanın tehditlere karşı cevabını ‘Savaş veya Kaç’ yanıtı ile tanımlamıştır. Daha sonra 1932’de *The Wisdom of the Body* adlı kitabında homeostazisin genel özelliklerini açıklamıştır. Buna göre: vücudumuz gibi dış etkenlere açık bir sistemin sabitliğini, değişmezliğini sağlamak için bazı mekanizmalar gerekir. Ör.; glukoz konsantrasyonu, vücut sıcaklığı, asit-baz dengesi gibi kararsız durumlar böyle mekanizmalarla sabit tutulmaktadır.
2. Sabit durum koşullarında, değişim yönündeki herhangi bir eğilim otomatik faktörler ile değişime direnmek yönünde cevap gerektirir. Ör.: kan şekerinde artma susuzluk yanıtına neden olur böylece birey sıvı alarak kan glukozunu seyrelterek durum değişikliğine direnir.
3. Ayar sistemi homeostatik durum için aynı anda ve başarılı bir şekilde çalışan bir dizi mekanizma tarafından belirlenir. Ör.; kan şekeri insülin, glukagon ve diğer hormonlar tarafından karaciğerden salgılanmasını ya da dokulara alımı ile

kontrol edilir.

4. Homeostazis, bir organizasyon sonucudur ve şans eseri meydana gelmez.

Stres terimi Latince’de *sıkıştırmak* anlamına gelen *stringere* teriminden türetilmiştir. 1920-1930’larda bu terim zihinsel gerginlik ve hastalığa yol açabilen zararlı çevresel ajanlar için kullanılmaya başlanmıştır. Stres teriminin bugünkü anlamına ulaşmasında homeostazis merkezi bir öneme sahiptir. Biyolojik sistemlerde fizyolojik ve biyokimyasal süreçler denge sağlamak için çalışır. Bu denge çevresel faktörler, iç veya dış uyaranlar ile sürekli bozulur. Bir organizmanın homeostazis durumunun değişmesi durumu stres olarak tanımlanabilir. Bu gibi durumlarda, organizmanın savaş ya da kaç tepkisi vücudun enerji depolarını çalıştırır ve tehditin üstesinden gelmeye odaklanır. Bu durum ilk olarak Hans Selye tarafından tanımlanmıştır (76). İlk defa kullanılmaya başlandıktan sonra Selye stresi vücudun dış etmenlerin üstesinden gelmek için oluşturduğu non-spesifik yanıt olarak tanımlamıştır.

Günümüzün ileri gelen nörobilimcilerinden Jaap Koolhaas stresi “*organizmanın doğal düzenleme kapasitesini aşan çevresel talepler*” olarak tanımlamaktadır (77). Daha kapsamlı bir ifade ile stres; homeostazisin gerçekten tehdit edildiği ya da öyle algılandığı durum olarak tanımlanabilir ve bu durum organizmanın karmaşık davranışsal, biyolojik ve psikolojik uyum yanıtı ile homeostazisin tekrar sağlanması ile son bulur (78).

Stres yanıtının temel özellikleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir. Günümüzde değişen yaşam alışkanlıklarıyla birlikte stres de bir çok insan için kaçınılmayan bir durum haline gelmiştir. Stres insan vücudunda hemen tüm sistemleri etkiler (Tablo 2.2). Kişisel farklılıklara ve/ya strese neden olan koşullara bağlı olarak hastalıklara zemin hazırlayabilir ya da şiddetini değiştirebilir.

Bu nedenlerle yoğun stresten kaçınmak ve stresin zararlı etkilerini azaltmaya çalışmak önemlidir. Öte yandan stres her zaman kendisine yüklenen olumsuz anlamı taşımayabilir. Belli bir düzeydeki stres yararlıdır. Olumlu stres diye adlandırabileceğimiz bu düzeydeki stres kişiye enerji verir. Denetlenebilen ve yönetilebilen stres kişinin içindeki potansiyelin açığa çıkmasına yardımcı olur. Kişinin dikkatini ve performansını artırır.

Tablo 2.1. Stres Yanıtının Temel Özellikleri (78)

• Hemostazisin tehdiye uğradığı veya böyle algılandığı durumlarda stres oluşur. • Stres yanıtı hem MSS hem de periferel organlardan oluşan stres sistemi aracılığıyla oluşur • Stres sisteminin asıl efektörleri olan kortizol ve katekolaminler birbirine sıkıca bağıdır. • Stres sisteminin malfonksiyonu davranışsal ve somatik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. • Stres insanlarda psikososyal ve fiziksel patolojik koşullara önemli derecede katkıda bulunur.
--

Tablo 2.2. Stres Yanıtının Merkezi ve Periferel Sonuçları (79, 80).

Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'ndeki Etkileri
• Uyarılmanın, uyanıklığın, bilişin, dikkatin ve saldırganlığın kolaylaştırılması • Vejetatif işlevlerin baskılanması (üreme, beslenme ve büyüme gibi) • Karşı-düzenleyici geri besleme döngüsünün aktivasyonu
Periferel Etkiler
• Oksijenizasyonun artması • Beyin, kalp ve iskelet kaslarında kan dolaşımının artması • Kardiyovasküler tonusun ve solunumun güçlenmesi • Metabolik ürünlerin ve yabancı maddelerin detoksifikasyonunun artışı • Metabolik etkiler (katabolizma, üreme ve büyümenin inhibisyonu) • Karşı-düzenleyici geri besleme döngüsünün aktivasyonu • Bağışıklık sisteminin modülasyonu

2.2.1. Hayvanlarda Uygulanan Deneysel Stres Modelleri

Stres ve sistemlere etkisi; stres kaynaklı hastalıkların sebep/sonuç ilişkisini ortaya koyma, kronik hastalıkların seyrinde stresin rolü olup olmadığını test etme, stres ve strese yanıt veren organizmanın vücut içi dinamiklerinin nasıl bozulduğunu

saptama ve stres kaynaklı hastalıkları tedavi edebilme amacıyla, bir çok araştırmanın odağı olmaktadır. Stres çalışmaları insanlar ve hayvanlar üzerinde gerçekleştirilebilir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar, farklı doğal stres koşullarına maruz kalan (savaş, sevilen kişilerin ve yakınların kaybı, kronik hastalıklar vb.) bireylerde veya deneysel koşullar (aritmetik testler, sınav stresi, Stroop testi, toplum önünde konuşma vb.) yaratılarak gerçekleştirilmektedir. Stres deneylerinde insan deneylerinden elde edilen verilerin yeri ve değeri tartışılmazken; stresi ve/ya kişisel koşulları tam olarak standardize etmek mümkün olmadığı için bazı problemleri de taşımaktadır.

Hayvan çalışmaları ise özellikle bireysel ve stresörle ilgili varyasyonların ortadan kaldırılması ve akut ve kronik stres protokollerinin daha rahat uygulanabilmesi nedeniyle vazgeçilmez öneme sahiptir. Hayvanlarda kullanılan deneysel stres modelleri de çok çeşitlidir (81-102). Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmeye çalışılmıştır. Bunlar:

- Anneden ayırma (anne yoksunluğu)
- Kalabalık ortamda barındırma
- İzolasyon (tecrit etme)
- Koşmaya (Rota-Rod) ya da yüzmeye (water maze) zorlama
- Ayak tabanından elektrik şoku uygulanması
- Formalin enjeksiyonu ile ağrı oluşturma
- Serum fizyolojik enjeksiyonu
- İnsülin enjeksiyonu ile hipoglisemi oluşturma
- Hemoraji
- Eter inhalasyonu
- İmmobilizasyon (hareketin kısıtlanması)
- Termal Stres
 - Soğuk ortamda barındırma ya da soğuk suda yüzdürme
 - Sıcak ortamda barındırma

Deney hayvanlarında oluşturulan stres modellerini uygulanan stresörün türüne göre psikolojik, sosyal, kimyasal veya fiziksel olarakta sınıflandırabiliriz.

Anneden Ayırma (Anne Yoksunluğu)

Anne yoksunluğu modeli psikososyal stres modellerinden biridir. Yaşamın erken dönemlerinde karşılaşılan anne yoksunluğu stresi deney hayvanlarında 1-21. günler arasında her gün 3 saat olmak üzere veya anneden emzirme döneminde iken bir kez 24 saat boyunca ayırma şeklinde uygulanır. Bu stres uygulamasının üstünlüğü ergenlik ve erişkin dönemde, etkilerin gözlemlenebilmesi, bu süreçteki davranış ve nörobiyolojik göstergelerinin izlenebilmesidir. Sıçanlarda doğum sonrası 4-14. günlerde hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen etkinliği karakteristik olarak en düşük düzeydedir. Bu evre, 'strese düşük yanıt dönemi' olarak adlandırılır. Bu dönemde, öncesinde ya da sonrasında stres uygulanması farklı yanıtlara yol açar (87).

Kalabalık Ortamda Barındırma

Kalabalık ortamda barındırma psikososyal bir stres modelidir. Bu stres modelinde rodentler cinsiyet farkı göstermektedir. Dişilerin stres yanıtı erkeklere göre daha yavaş gelişmektedir ve daha düşük düzeydedir. Ayrıca dişilerin kalabalık ortama daha hızlı uyum sağladığı gözlenmiştir (81). Sosyolojik çalışmalar insanlarda da benzer sonuçların varlığını doğrulamaktadır (88).

İzolasyon

İzolasyon deney hayvanlarında sosyal stres oluşturmak için uygulanan bir yöntemdir. Bunun için deney hayvanı tek başına bir kafeste diğer deney hayvanlarıyla aynı koşullara sahip ama tamamen başka bir odada barındırılmalıdır. Bu modelde amaç, her türlü sosyal etkileşimin önlenmesidir (89, 90).

İzolasyon, hem insanlar hem de diğer canlıları psikolojik olarak etkilemekte, organik ve psikolojik düzensizliklere yol açmaktadır. Çevreden etkilenme insanlarda kişiden kişiye ve cinsiyet etkisiyle değişebilirken diğer canlıların tepkileri türler ve cinsler arasında da farklılıklar gösterebilir (89).

Ayak Tabanından Elektroşok Uygulaması

Deney hayvanlarından özellikle sıçan ve farelerde uygulanan bu fiziksel stres modelinde; ayak tabanına, hayvanın yerleştirildiği elektrik iletebilen bir metal ızgara üzerinden farklı protokollere göre farklı voltajlarda elektroşok uygulanır. Elektroşok

uygulanacak platform, deney hayvanının düzeneğe kaçamayacağı, dışarıdan gözlenmesine izin verecek fakat hayvanı kendi ortamında hissetmesini sağlayacak standartta olmalıdır (91, 92).

Sıçanlarda farklı sürelerde uygulanan elektroşokun stres mekanizmasını aktive ederek plazma adreno-kortikotrofik hormon (ACTH) ve kortikosteron düzeylerini arttırdığı, hayvanların vücut ağırlığında azalmaya yol açtığı (91) ve motor aktivitede değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (83).

Formalin Enjeksiyonu

Genelde % 1'lik veya % 4'lük formalin çözeltilerinin derialtına enjekte edilmesi ile oluşturulan fiziksel bir stres modelidir. Formalinin derialtına enjeksiyonu ciddi doku hasarına ve ağrıya neden olmaktadır. % 4' lük formalin kortikosteron düzeylerini hareketsizlik stresi kadar artırırken, % 1'lik formalin daha düşük düzeylerde kortikosteron artışına neden olmaktadır. Her iki uygulamada ACTH düzeylerini arttırmış, hipotalamusta yapılan ölçümlerde paraventriküler çekirdekte norepinefrin düzeylerinin normale göre arttığı olarak bulunmuştur (93).

Serum Fizyolojik Enjeksiyonu

Hayvan deneylerinde ilaçların çözücü kontrolü olarak kontrol grubuna verilen serum fizyolojik ağırlı bir enjeksiyon oluşturmakta ve stres mekanizmasını aktive edebilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu deneklerde enjeksiyon sonrasında enjeksiyon stresi ile ilişkilendirilen, plazmada hafif artmış kortikosteron düzeyi saptanmıştır (94).

İnsülin Enjeksiyonu

Hipoglisemi modeli oluşturmak için basamaklı olarak artan dozlarda damar içi insülin uygulaması (0,1, 1 ve 3 IU/kg), sıçanlarda plazmada ACTH ve kortikosteron düzeylerinde doza bağlı bir artışa yol açmıştır (93).

İmmobilizasyon (Hareketsizlik)

Hareketsizlik, tek başına uygulanabildiği gibi diğer stres modelleriyle kombine edilerek uygulanabilen fiziksel ve sosyal bir stres modelidir. Uygulama

biçimi yönünden kolay olduğu ve stres sistemini hızla aktive ettiği için en sık uygulanan stres modellerinden biridir (82, 95). Bu modelde deney hayvanı rahatlıkla hareket edemeyeceği, su ve besinden kısıtlı olacağı belli bir süre kısıtlayıcı denilen alette tutulmalıdır. Protokolün uygulanması sırasında deney hayvanının ihtiyacı kadar havayı alabilmesi için kısıtlayıcı üzerinde deliklerin olması ayrıca önemlidir (Şekil 3.1).

Bowman ve ark. farklı protokoller uygulayarak oluşturduğu çalışmalarında, 21 veya 28 gün boyunca 6 saat hareketsizlik stresine maruz kalan sıçanlarda ölçülen birinci, yedinci, ondördüncü ve yirmibirinci günlerdeki plazma kortikosteron düzeyini, kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Yükselen plazma kortikosteron düzeyi stres protokolü bitiminden 15 gün sonra normal kontrol düzeylerine dönmüştür (82).

Pacak ve ark. sıçanlarda farklı stres modelleri uygulayarak yaptığı çalışma da hareketsizlik stresinin hipotalamusta yapılan ölçümlerde paraventriküler çekirdekte NE düzeylerini, plazmada da ACTH ve kortikosteron düzeylerini en fazla arttıran stres modeli olduğunu ortaya koymuştur (93, 96).

Termal Stres

Termal stres soğuk veya sıcak şeklinde uygulamaktadır.

a. Soğuk Ortamda Barındırma ya da Soğuk Suda Yüzdürme

Deneğin soğuk ortamda kafeste tutulması veya soğuk suda yüzdürülmesi ile uygulanan bu stres modelinde, uygulama hayvanlara tek tek yapılabildiği gibi bir arada tutularak da uygulanabilir. Bu modelde uygulama farklılıkları ile stres etkisi değişkendir. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de kafeste yalnız bırakma veya soğuk suda yüzdürme, deneklerin bir arada olmalarına göre daha güçlü bir stres oluşturma yöntemidir (97, 98).

Yapılan bir çalışmada BALB/c farelerde 1 kere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de kafeste 4 saat boyunca uygulanan akut soğuk stres plazma kortikosteron, epinefrin ve norepinefrin düzeyini kontrole oranla anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir (99).

Erişkin sıçanlar kısa süreli (5 dakika) soğuk suda yüzmeye zorlandıkları akut stres ve bunun ardışık 4 gün günde 2 kere uygulanması ile oluşturulan kronik stres modellerinde kortikotrofin salgılatıcı hormon (CRH) ekstrapitotalamik kaynağı olan ovaryumda immünoreaktif CRH düzeylerinin arttığı bulunmuştur (97,100).

b. Sıcak Ortamda Barındırma

Soğuk stresi gibi sıcak stresi de fiziksel stres modelleri arasında yer almaktadır. Bu model için hayvanlar özellikle sıcak ortamda (30⁰ C üstü) tutulmakta ya da bu deneyler yaz aylarında yapılmaktadır.

Bir stresör olarak sıcaklık farklı yolları kullanarak proopiomelanokortin (POMC) ile onun türevlerini (CRH ve ACTH-adrenal-steroid eksenini) etkiler (101).

Dış ortam sıcaklığında artışın yanısıra vücut sıcaklığı artışı da strese neden olmaktadır. Vücut sıcaklık artışı eskiden beri özellikle patojenik uyarılara karşı bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (102).

2.2.2. Stres Cevabı

Yaşam, organizmanın dinamik denge halini -homeostazis- iç ya da dış çevreden kaynaklanan tehditlerin, stresörlerin etkisi ile devam ettirmektir. Pek çok stresörün etkisine karşı organizma, dengeyi sağlamaya yönelik adaptif bir yanıt oluşturur. Bu yanıtın başarısız olması durumunda; sistemler üzerine zararlı etkiler ortaya çıkarabilir. Bu durum “dishomeostazis” ya da “kakostazis” olarak adlandırılır (78-80, 103).

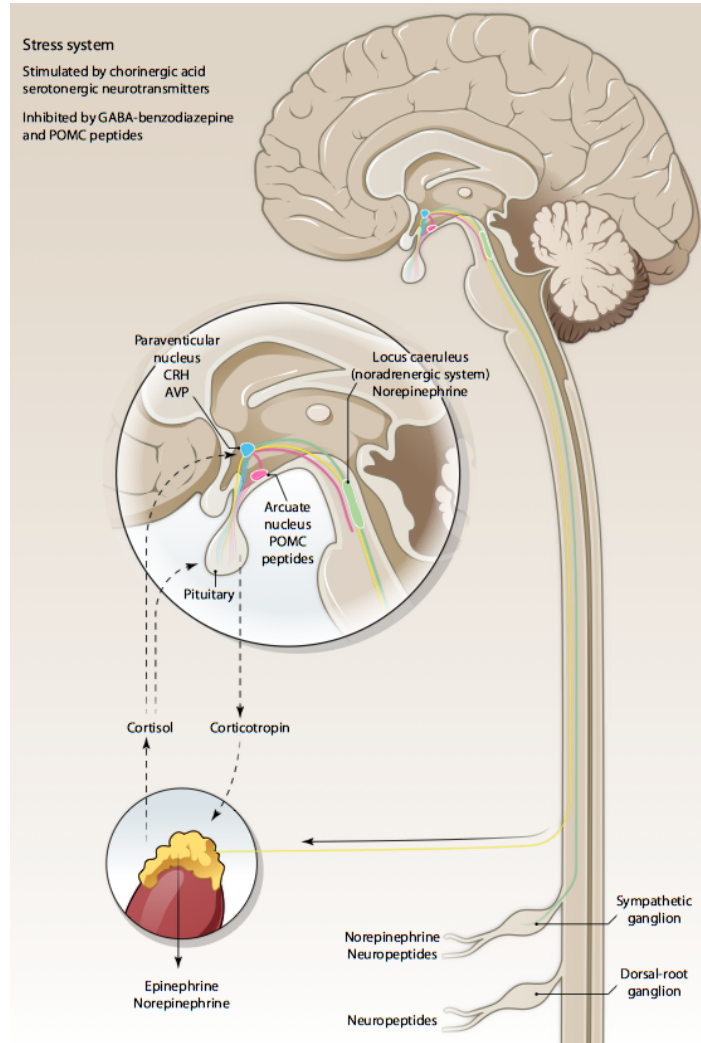
Homeostazisi bozan her türlü stresli uyaran, stresörle karşılaşma sıklığı ve süresi, stres yanıtı ve adaptif süreçte değişikliğe neden olabilir. Stres akut; kısa süreli, tek sefer karşılaşılan, uyum sağlanabilen veya kronik, uzun süreli ve/ya tekrarlayan, uyum sağlanamayan stres olarak sınıflandırılabilir (82, 104).

Strese neden olan stresörler dış çevreden gelen etkilere bağlı olabilecekleri gibi, vücudun kendi iç ortamından da kaynaklanabilirler. Ayrıca stresörlerin birincil yüklenmeyi yaptıkları sisteme göre oluşan stres farklı isimlendirilir. Bu değişikliğe göre sınıflandırıldığında, fiziksel ve mental (psikolojik) stres ve stresörden bahsedilir.

Zararlı uyarıların tümünün bedensel ve/ya ruhsal sağlığı olumsuz etkilediği bilinmektedir. Kronik stresin akut strese göre insan sağlığını daha çok ve olumsuz etkilediği de bazı çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (78, 82, 83).

Stres yanıtında etkileşen iki temel sistem otonom sinir sistemi (OSS) ve hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenidir. Bunlardan OSS sempatik post-gangliyonik sinir uçlarından salınan norepinefrin ve böbrek üstü bezi medullasından salınan

epinefrin/norepinefrin, hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini ise böbrek üstü bezi korteksinden salınan kortizol aracılığı ile homeostazisi beklenmedik yeni duruma göre düzenlemek üzere organizmada gerekli değişiklikleri başlatırlar. Bu sistemlerdeki kısa süreli etkileşimler, uyum sağlanabilen stres yanıtını oluştururlar. Strese uyum yanıtı, sinir sistemi ile endokrin sistem arasındaki bütünsel etkileşimin önde gelen örneklerinden birini oluşturur (79, 83).



Şekil 2.6. Stres sisteminin stres yanıtını oluşturan merkezi ve çevresel bileşenler. GABA, gama-aminobutirik asit; POMC, proopiomelanokortin; CRH, kortikotrofin salgılatıcı hormon; AVP, arjinin-vazopressin (80).

2.2.3. Stresin Nöroendokrin Cevabı:

Glukokortikoid ve katekolaminler karbonhidrat ve lipit metabolizmasının, kardiyovasküler sistem (KVS) tonusunun, kas fonksiyonunun, immünokompetans ve

davranışların asıl düzenleyicileridir. Adrenal glukokortikoidler, hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin son ürünleridir (79, 83) (Şekil 2.6).

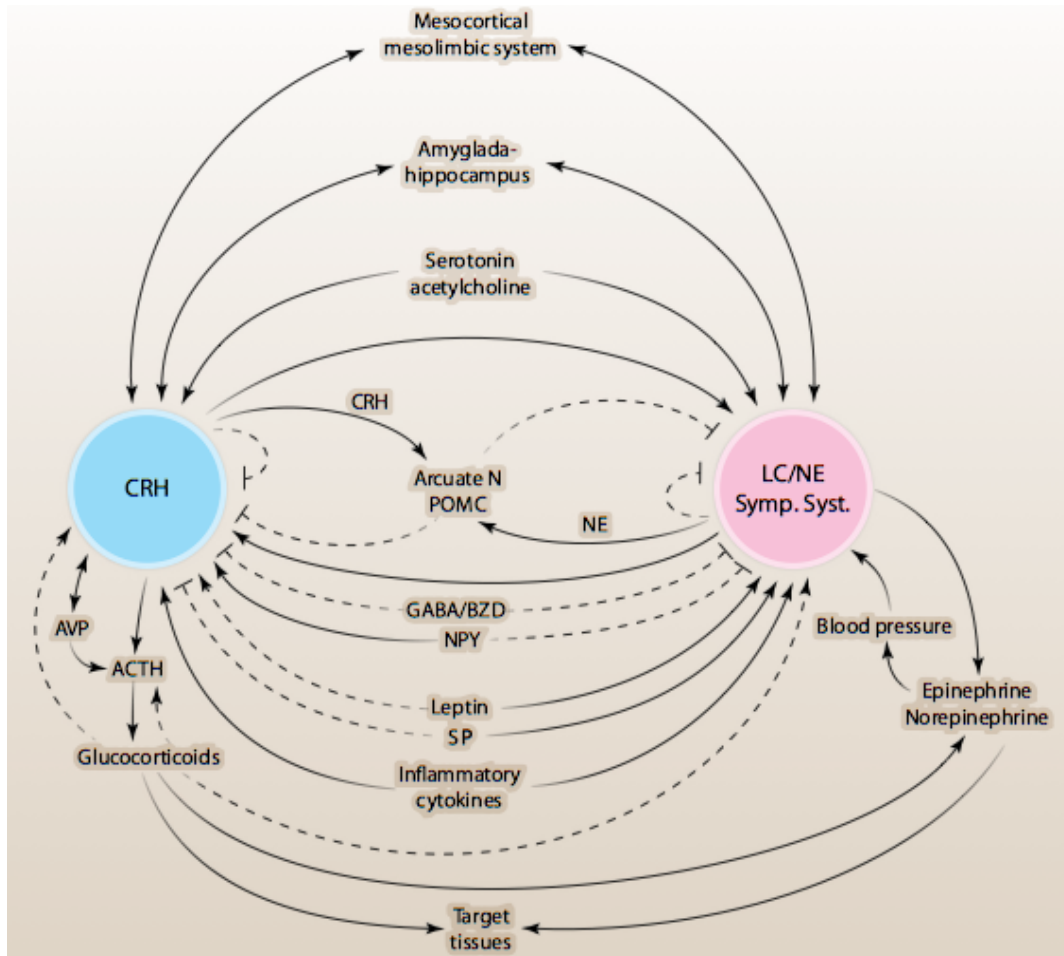
Stres yanıtı stres sistemi tarafından oluşturulmuştur ve merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferel bileşenleri bulunur (78-80, 103). Stres sisteminin santral ögeleri hipotalamus ve beyin sapında yer almaktadır. Bu sistem; hipotalamusun CRH salgılayan parvosellüler çekirdeği, paraventriküler çekirdek arjinin-vazopressin nöronları, LC ve medullanın paragigantosellüler ve parabrakial çekirdeklerinin CRH nöronları ve pons ve medullada bulunan NE salgılayan nöron gruplarından oluşmaktadır. Stres sisteminin periferel bileşenleri; hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin periferel dalları ve sempatik-adrenomedüller sistemin efferent bileşenlerinden oluşmaktadır (78-80, 83, 103) (Şekil 2.6 ve 2.7). Stres sisteminin uyarılması sistemik dolaşımda glukokortikoid ve katekolaminlerin düzeyinin yükselmesine neden olur. Bu artış bazal ve stres koşullarında homeostazisin korunmasını sağlar (105-107).

Stres sisteminin otonomik bileşeni, çok çeşitli vücut işlevlerini kontrol eden hızlı yanıtta sorumludur. KVS, solunum, mide-bağırsak, boşaltım, endokrin, bağışıklık ve diğer vücut sistemleri SSS ve parasempatik sinir sistemi (PSS) ya da her ikisi ile birlikte düzenlenmektedir. PSS, SSS'nin işlevlerini kendi aktivitesindeki azalma ile güçlendirirken, artış ile frenlemektedir (78, 79, 103).

Psikolojik ya da mental strese salgılanan epinefrin ve norepinefrin miktarları Frankenhauser ve ark. tarafından pek çok çalışmada araştırılmıştır. Sonuçlar, E salgısının stres yanıtında yer aldığını ve idrar katekolamin atılımının da strese yanıtın hassas bir göstergesi olduğunu göstermiştir (108). Stres sisteminin aktive olmasını sağlayan merkezi nörokimyasal devre ve stres sisteminin birçok komponentinin kendi aralarındaki kompleks ilişkisi Şekil 2.7.'te gösterilmiştir.

Stres cevabının oluşmasını sağlayan başlangıç noktası CRH salgılanmasıdır. CRH 41 aa'lık peptid yapıda bir hormon olup hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin asıl hipotalamik düzenleyicisidir (109). Ön hipofiz hormonlarından ACTH sentezinin regülasyonunda birincil role sahip olmasına ek olarak; CRH, MSS'inde bir nörotransmitter olarak görev alır ve stresle ilişkili psikiyatrik bozuklukların tedavisindeki yenilikler üzerine yapılan çalışmaların hedeflerinden birisidir. *In vivo* birçok davranışsal çalışma CRH sisteminin anksiyete, depresyon, madde bağımlılığı

veya periferik olarak irritabl barsak sendromu gibi rahatsızlıklarla direkt ilişkili olduğunu göstermiştir (110). CRH'ya ek olarak nörosteroidler de stres cevabını etkilemektedir. Nörosteroidler, MSS'inde hipokampus ve kortekste bulunan perifer dokularda üretilen bir molekül grubudur. Bu moleküllerin düzenleyici etkileri milisaniye veya saniye gibi hızlı sürelerde meydana gelir.



Şekil 2.7. Stres sisteminin merkezi ve çevresel bileşenlerinin fonksiyonel ilişkileri, — aktivasyonu, - - - - - inhibisyonu temsil etmektedir.

BZD, benzodiyazepin; NPY, nöropeptid Y; SP, P maddesi; CRH, Kortikotrofin salgılatıcı hormon; AVP, Arjinin Vazopressin; LC/NE, Lokus seruleus/norepinefrin; POMC, proopiymelanokortin. (115).

Pregnenolon (3α , 5α -tetrahidrodeoksikortikosteron) ve bunun sülfat esteri olan pregnenolon sülfat, pregnanolon (3α , 5β -tetrahidroprogesteron) ve bunun epimeri olan allopregnanolon (3α , 5α -tetrahidroprogesteron), dehidroepiandrosteron

(DHEA) ve sülfat esteri DHEA-sülfat, androsteron ve 3 α androstenadiol gibi steroidlerin; klasik genomik yol dışında, hücre yüzeyinde bulunan reseptörler yolu ile etki gösteren nörosteroidler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca progesteron, östradiol ve testosteron gibi klasik steroidler de nöroaktiftir; çünkü bunlar da serotonin reseptörlerinde, ligand kapılı iyon kanallarında ya da farklı glutamat reseptörlerinde işlevsel antagonist olarak davranabilirler (111-113). Strese bağlı panik atak, major ve postpartum depresyon, şizofreni gibi hastalıklar MSS’inde nörosteroidlerin konsantrasyonundaki düzensizliklerle ilişkilendirilmiştir. Bazı psikoaktif ilaçlarla tedavi de bu molekülerde dengesizliğe yol açabilir. Ayrıca nörosteroidojenik ajanların benzodiyazepin benzeri yan etki göstermemesi anksiyete ve depresyon tedavisinde ümit verici görünmektedir (111, 112, 114). İleri çalışmalar stres ilişkili durumların tedavisinde nörosteroid analoglarının kullanımı için gerekli bilgi birikimini sağlayabilir.

Hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini bir sirkadiyen döngü içinde günlük osilasyonlar gösterir. Hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin sirkadiyen aktivitesi, vücuttaki sirkadiyen ritmin ana yöneticisi olan hipotalamik suprakiazmatik çekirdek tarafından belirlenir. MSS ile periferel doku ve organların koordinasyonu, transkripsiyon faktörlerinden *Clock* ve *Bmal1*’in aktivasyonu ve inaktivasyonu ile sağlanır. Son yıllarda yapılan çalışmalar transkripsiyon faktörlerinden *Clock*’un insan glukokortikoid reseptörünün (hGR) liganda bağlanan alanıyla fiziksel olarak etkileştiğini göstermektedir. *Clock*, glukokortikoidin hGR’ye bağlanmasını azaltır ve glukokortikoid ile indüklenen gen ekspresyonunu etkiler (116).

Sirkadiyen ritm ve hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini birbirleri üzerine birçok seviyede etkileşim göstererek homeostazisi koordine eder (Şekil 2.7). Normal fizyolojik koşullarda; sabah saatlerinde en yüksek düzeyde ölçülen kan kortizol kontrasyonu ile birlikte kortizole karşı hedef doku direnci en yüksek seviyededir; kortizol düzeyinin düşük olduğu dönemde ise dokuların kortizole direnci en düşük değerine ulaşır. Bununla birlikte stres koşulları altında bu ilişki geçerli değildir. Kortizol sekresyonu ile hedef doku arasındaki bu ilişkinin bozulmasının kronik stres altındaki bireylerde santral obezite ve metabolik sendrom gelişimi vb. patolojik durumlardan sorumlu olabileceği, ayrıca farklı saat dilimlerinde seyahat ederek devamlı “jetlag”e maruz kalan veya gece vardiyasında çalışan kişilerin artmış

kardiyometabolik riskinin yine bu mekanizma ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (117-118).

Glukokortikoid metabolizması ve stres etkileşiminin bireyin bilişsel aktivitesi üzerine de etkisi bulunmaktadır. Kronik glukokortikoid yüksekliği kişide hafızanın gerilemesine ve duygusal durumunun bozulmasına neden olmaktadır. Kortizol konsantrasyonları yaşlılarda gençlere oranla daha yüksektir. Yapılan bir çalışmada, katılımcıların yaşa bağlı hafıza değişiklikleri, kan glukokortikoid düzeyleri ile direkt ilişkili bulunmuştur (118-121).

11-beta hidroksi-steroid dehidrojenazın (11β -HSD) glukokortikoidleri hızlı bir şekilde etkisiz hale getiren tip 2 formu, baskın olarak fetuste ve plasentada bulunur. Maternal stres, inflamasyon veya beslenme yetersizliğinin neden olduğu fetoplasental 11β -HSD tip 2'nin inhibisyonu, tam veya kısmi yokluğu, fetusta birçok organın ve özellikle beynin fonksiyonunu programlayan glukokortikoid etkisinin artmasına sebep olur. Sonuç olarak bu stresli annelerin yavruları hayatları boyunca duygusal ve bilişsel bozukluklar gösterir (122). Erişkin beyinde, bazı beyin sapı çekirdeklerindeki 11β -HSD tip-2 aktivitesinin yanı sıra 11β -HSD tip-1 de etkindir ve glukokortikoidin aktif formlarını katalizleyerek hücre içi glukokortikoid etkisini artırır. 11β -HSD tip-1'in inhibisyonunun hipokampal hücreleri nörotoksik etkiden koruduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir. Bir çalışmada 11β -HSD tip-1'in yaşlı sıçan hipokampusünde arttığı ve bunun yaşa bağlı olarak bilişsel gerilemeye neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca bir başka çalışmada, 11β -HSD tip-1 *knock-out* farelerin yaşla birlikte glukokortikoide bağlı bilişsel bozukluklara dirençli olduğu ortaya konmuştur. 11β -HSD tip-1 inhibitörü karbenoloksonun yaşlı bireylerde bilişsel performansı arttırmasının bu tarz hastalıkların tedavisi için bu ilaçların kullanılabileceğine dair yeni bir umut kapısı açacağı düşünülmektedir (120, 121).

Bir başka enzim sistemi olan P450 oksidoredüktaz enziminin eksikliği de kortizol biyosentezini dolayısıyla stres cevabını bozacak etkilere neden olabilir (123).

Stres sistemi bilişsel, duygusal, nörosensoriyel ve periferik somatik sinyalleri olarak entegre eder. Stres sisteminin aktive olmasıyla stres sendromu olarak tanımlanan, bir grup davranışsal ve fiziksel değişimler gerçekleşir (Tablo 2.3) (80). Bu değişimler normalde zamanla sınırlı, uyum sağlanabilen ve bireyin hayatta kalmasını sağlayıcı değişimlerdir (78-80, 103). Genelde stres yanıtı kısa ve zamanla

sınırlıdır; büyümeyi ve üremeyi önleyen, katabolik ve bağışıklık sistemine etkileri yararlı olup herhangi bir yan etkiye yol açmaz. Bununla birlikte stres sisteminin kronik aktivasyonu CRH, kortizol ve katekolaminlerin değişmiş ve uzun süreli salgılanma etkisiyle ciddi sendromlara yol açabilir (80).

Organizmanın strese karşı hızla bir endokrin yanıt başlatması çok önemli ve gereklidir. Adrenalektomize hayvanlar stres altında gerekli KVS tonusu ve kan şekeri düzeylerini koruyamazlar. Öte yandan uygunsuz veya artmış hipotalamus-hipofiz-adrenal aktivitesi de organizmanın sağlığı için bir tehdittir.

Artmış glukokortikoidlere uzun süre maruz kalmak, anabolizmanın baskılanmasına, kas atrofisine, insüline azalmış hassasiyet ve steroide bağlı gelişen diyabetes mellitusa (DM), hipertansiyona, hiperlipidemiye, arteriyal hastalıklara, hiperkolesterolemiye, amenore ve impotansa, bağışıklık sisteminin baskılanmasına, büyüme ve doku yenilenmesinin bozulmasına, nöronal hasar ve bilişsel fonksiyonların bozulmasına neden olur. Yani, strese karşı etkili bir yanıt, tehdit karşısında hızla başlamalı ve bu durum ortadan kalktığında da hızla devreden çıkmalıdır (124).

Tablo.2.3. Akut Streste Davranışsal ve Fiziksel Adaptasyon (80)

Davranışsal Adaptasyon:	Fiziksel Adaptasyon:
Davranışın Adaptif Yönlendirmesi	Enerjinin Adaptif Yönlendirmesi
Artmış Uyarılma ve Uyanıklık	Oksijen ve besinler, MSS ve stres altındaki vücut parçalarına yönlendirilir.
Artmış Algılama ve Odaklanma	Değişmiş Kardiyovasküler Tonus
Dikkat	Artan Kan Basıncı ve Kalp Hızı
Öfori	Artmış Solunum Hızı
Artmış Analjezi	Artmış Glukoneojenez ve Lipoliz
Artmış Vücut Sıcaklığı	Toksik Ürünlerin Detoksifikasyonu
Beslenme ve Açlık Duygusunun Baskılanması	Büyüme ve Üremenin İnhibisyonu
Üreme Ekseninin Baskılanması	Besinle Uyarılan Kolon Hareketlerinin İnhibisyonu
	İnflamatuvar ve Bağışıklık Yanıtını İçermesi

Stresörlere yanıt olarak otonom ve nöroendokrin sistemlerin aktivasyonu, metabolik kaynakların “kaç veya savaş” reaksiyonu için kullanılmaya hazır hale gelmesini sağlar. Stresörlere cevap olarak gelişen yanıt, bir noktaya kadar yararlıdır, ancak artmış yanıtın da bedeli vardır.

2.3. Stres ve Bağışıklık Sistemi:

Stres tanımı bir uyaranın (stresör) beyinde başlattığı reaksiyonun (stres algısı) vücudun kaç ya da savaş sistemlerini aktive etmesi (biyolojik stres yanıtı) ile sonuçlanan olaylar bütünüdür (125-126). Bir stresörün beyinle birlikte vücudu etkilemesinin tek yolu organizmada biyolojik değişikliklere neden olmasıdır, bu da stres hormonları ve fizyolojik stres yanıtının önemini bir kez daha vurgular.

Stres bağışıklık sisteminin de aralarında olduğu pek çok fizyolojik işlevin önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (127). Bu genel kabul ediş, stresin süresi, bireysel stres algısı ve stresör gibi aşağıda daha ayrıntılı açıklanan faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Ancak özellikle akut ve kronik stresin organizmaya etkileri arasında önemli farklar vardır. Genel olarak akut stres bağışıklık yanıtını artıran bir etki gösterirken, kronik stres bağışıklık yanıtını Th2 aracılı hümmoral yanıtı kaydırır ve/ya bağışıklık yanıtını baskılayıcı etkisi vardır. Bağışıklık sistemi organizmayı yabancı patojenlerin işgaline ve neoplastik değişikliklere karşı korumak üzere yapılandırılmıştır. Hızlı, etkili ve kontrollü bir bağışıklık yanıtı sağlık için en önemli bileşendir. Antijenik özellik taşıyan molekülün vücuda girmesi ve/ya oluşması durumunda kazanılmış bağışıklık sisteminin normal mekanizması TCR-antijen-MHC ilişkisini, T hücresi ile APC arasındaki bağlantıda kostimülatör moleküllerin görevlerini, sitokin üretimi, salgısı ve işlevlerini içerir. Bu ilişkinin her aşamasında stres hormonlarının etkili olabileceği gösterilmiştir (128).

Bağışıklık ve stres sistemleri arasında pek çok düzeyde görev yapan iyi kontrol edilen bir döngü vardır. İmmünolojik farklılaşmalar sitokinler aracılığıyla hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini uyarır ve oluşan kortikosteroidler sitokinlerin yapımını kontrol altında tutar (129).

Deneyssel ve klinik çalışmalar, laboratuvarında uygulanan ya da doğal olarak karşılaşılan stresörlerin bağışıklık sistemi üzerinde önemli etkileri olduğunu açıkça göstermiştir. Ancak, gözlenen etkiler, bağışıklık yanıtının tipine, stresörün fiziksel ve

psikolojik özelliklerine ve stresin zamanlamasına bağlı olarak değişiklik gösterir. Stresin nasıl algılandığı ve stresörün psikolojik özellikleri yani, bireyin stresörü kontrol edebilme yeteneği, ortaya çıkışının tahmin edilebilirliği fiziksel özelliklerinden daha önemlidir. Mormede ve Dantzer tarafından da belirtildiği gibi kaçınılmaz şoklar, hücresel bağışıklık yanıtını ve NK hücre aktivitesini azaltmaktadır. Yenilmiş, alet kontrollü ve kaçınma deneylerinde başarılı olan hayvanların hepsinde humoral bağışıklık sisteminin baskılandığını gösterilmiştir (130).

Stresörün bağışıklık üzerine etkisini belirleyen bir başka faktör de tahmin edilebilirliktir. Beklenmeyen elektroşok, sıçanlarda mitojenlere karşı lenfoproliferatif yanıtı azaltırken, tahmin edilebilen şokların böyle bir etkisi olmamıştır (130).

Canlı vücutta bağışıklık sistemi, heterojen ve dağılmış hücrelerden oluşur. Stres doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi hücrelerini farklı şekillerde etkiler. Bağışıklık sistemi değişkenlerinden dolaşımdaki NK hücrelerinin sayısının akut stres ile arttığı bulgular arasında en tutarlı olanıdır. Fiziksel egzersiz NK hücre sayısı ve işlevlerinde geçici artışa neden olmuştur. Sınav stresi veya sevilen birinin kaybı gibi duygusal stresler NK aktivitesinde azalmaya neden olurken, deneysel mental yüklenmenin bu hücrelerin sayı ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Norepinefrin ve epinefrin *in vitro* NK sitotoksitesini baskımlarken, epinefrin uygulamasını takiben *in vivo* NK aktivitesi ve hücre sayısı artmıştır (131).

Stresin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinden birisi, bu hücrelerin vücutta yeniden dağılımını sağlamaktır (132, 133). Bağışıklık sistemi hücreleri gecikmiş tip hipersensitivite (DTH) örneğinde olduğu gibi tehdidin geldiği bölgeye yönelir. Akut stres koşullarında gözlenen bu etki stresin tekrarlandığı ya da uzun döneme yayıldığı durumlarda (kronik stres) azalır (124). Rinner ve ark. hareketsizlik stresinin dolaşımda ve dalakda farklı yanıtlar oluşturduğunu göstermişlerdir. Bağışıklık sistemi hücreleri ve özellikle lenfositler çok sayıda hormon reseptörüne sahiptirler (132). Bu nedenle stresle oluşan bağışıklık sistemi değişikliklerinin stres hormonları; adrenal steroidler ve katekolaminler aracılığı ile kontrol edildiği düşünülmektedir (127, 134-137).

12 dakikalık mental aritmetik bir ödev dolaşımdaki CD8(+) Tsüpressör/Tc hücrelerini ve NK hücrelerini sayıca arttırmış ve yalnızca genç deneklerde NK

aktivitesinde artışın görüldüğü hızlı bağışıklık yanıtlarına yol açmıştır (138). İki saatlik hareketsizlik stresine maruz bırakılan sıçanlarda T, B, NK hücreleri ve monositlerde stres öncesi bazal değerlere göre %40-75 azalma görülmüştür (128).

Kielcolt-Glaser ve Kennedy, yapmış olduğu çalışmalarda; evliliklerinde sorun yaşayan yetişkinlerde, Alzheimer hastalarının yakınlarında ve akademik sınav öncesi tıp öğrencilerinde kronik stres koşullarının NK aktivitesinde, lenfoproliferatif yanıtta ve hücrel bağışıklık yanıtında azalmaya neden olduğunu gözlemiştir (139, 140).

Stresle indüklenen lökosit dağılımı ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına karşın, bu durumun işlevsel ve klinik izdüşümleri henüz açığa kavuşmamıştır (128, 131, 134, 140-144).

Etkili bir bağışıklık yanıtının oluşabilmesi, B ve T lenfositleri arasında yakın bir koordinasyonun olmasına bağlıdır. Bu ilişkide görev yapan Th lenfositlerinin yanıtı genellikle Th1 hücreleri ile başlar ve Th2 olarak devam eder. Glukokortikoidler bu yanıt değişikliği mekanizmasının bir parçası olarak ortaya çıkmaktadır.

Adaptif bağışıklık yanıtının asıl yürütücüleri T lenfositleridir. Naif, sessiz öncüllerden sitokin salgılayan hücrelere dönüşürler. Bağışıklık sistemini aktive eden durumlarda T hücre klonları farklılaşıp çoğalır (145). Bağışıklık sisteminin homeostazisi sitokinler, farklı kostimulatör moleküllerin ekspresyonu ve düzenleyici hücre aktivitesi arasındaki karmaşık ağ yapısına bağlıdır. Bağışıklık yanıtı asıl olarak Th1 hücrelerinin ürettikleri sitokinler (IL-2, IFN- γ ve TNF- α) ile Th2 hücrelerinin ürettikleri sitokinlerin (IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13) dengesi ile ilgilidir (146). Bağışıklık yanıtının süresi ve büyüklüğü birincil olarak Treg hücrelerinden etkilenmektedir. Treg hücreleri çevresel dokularda hücre-hücre teması ve/ya IL-10 ve TGF- β gibi düzenleyici sitokinlerin salgılanması ile ilişkilidir. Sağlıklı bireylerde bu hücre ve sitokin ağlarının uyumlu işlevleri, organizmanın savunma sistemini güçlendirirken, kendi dokularına veya zararsız antijenlere karşı otoimmün ve alerjik reaksiyonları engeller.

Geleneksel stres literatüründe, glukokortikoidlerin immünsüpresif etkileri stresin bağışıklık sistemi üzerindeki rolünü açıklayan ana mekanizmadır. Ancak beyin ve bağışıklık sistemi alanında biriken bilgiler, bu görüşü önemli ölçüde değiştirmiştir. Kemik iliği ve timus, dalak, lenf nodları gibi lenfoid organlar OSS'den

yoğun bir sinir lifi ağı alırlar. Bağışıklık sistemi hücrelerinin çoğaldığı, olgunlaştığı, farklılaştığı mikro çevre OSS'nin etkisi altındadır. Glukokortikoidler, hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen aktivasyonu sonucu salıverilen stres yanıtının aracılardan ve güçlü anti-enflamatuvar ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkileri nedeniyle otoimmün ve enflamatuvar hastalıkların tedavisinde önemli yer tutarlar. Endojen glukokortikoidlerin fizyolojik görevi bağışıklık yanıtını sonlandırarak homeostazisi korumaktır. Glukokortikoidler doğal bağışıklık yanıtının öncelenmesinde, Th1/Th2 dengesinde görev yapar. Stres yanıtına eşdeğer plazma kortizol düzeyi, Th1/Th2 dengesinde kaymaya neden olur (145, 146).

Stresle tetiklenen bağışıklık sistemi işlevlerinin bozulduğu durumların arasında otoimmün hastalıklarda yer almaktadır. Bağışıklık yanıtı pek çok noktadaki kontrol mekanizmaları sayesinde otoimmün hastalıkların önüne geçebilmektedir. IL-17 üreten Th17 hücrelerinin insan ve fare otoimmün hastalıklarında efektör olduğu gösterilmiştir (38, 40-44). Th17 hücrelerinin yanıtı enfeksiyonlara karşı vücudun savunma sisteminde yer alırken öte yandan otoimmün hastalıkların gelişimi ve/ya alevlenmesinde rol oynayan iki tarafı keskin bir bıçaktır (147). Stres cevabının direkt olarak Th17 hücre sayısı ya da aktivitesi üzerine etkisini inceleyen çalışmalar henüz sınırlı sayıdadır. Depresyon modeli olarak uzun süreli kombine streslerin kullanıldığı bir çalışmada 7 günlük stres uygulamasının Th17 popülasyonunda fark yaratmadığı 14 gün ve daha fazla süren stres protokolünün Th17 sayı ve aktivitesinde azalma ile birlikte olduğu saptanmıştır (147, 148). Benzer şekilde stres yanıtının ve artmış glukokortikoid düzeyinin Th17 cevabını azalttığı kronik enflamatuvar durumlar da gösterilmiştir (149-150).

T hücre gelişiminde timustaki eğitim ve burada meydana gelen negatif seleksiyon tüm otoreaktif T hücrelerinin yok edilmesini garanti edememektedir (151). Bu durum bağışıklık sisteminin doğal gelişimi içinde oluşan ve kendi dokularımıza tolerans ve immün homeostazisin korunmasında önemli rol oynayan Treg hücreleri tarafından düzenlenir.

Akut stresin CD4(+) FOXP3(+) Treg hücrelerde azalmaya neden olarak adaptif bağışıklık yanıtının baskılanmasına neden olduğu rapor edilmiştir. β -adrenerjik ve glukokortikoid- α reseptörlerinin Treg hücrelerinde ekspresyonunun fazla olması bu moleküllerin stresle ilişkili Treg hücre değişikliklerinden sorumlu

olabileceğini düşündürmektedir. Kronik stres durumlarında bu senaryo otoimmün hastalıklarda olduğu gibi enflamatuvar yanıtın alevlenmesine neden olabilir (151).

Stresin bağışıklık sistemini baskıladığı ve hastalıklara duyarlılığı artırdığı bilinmektedir. Ancak bu durum, yani stresle indüklenen bağışıklık sistemi baskılanması evrimsel adaptif bir süreç değildir. Aslında organizmanın aktif bir immün cevaba gereksinim duyduğu bir zamanda, ör; stresörün etkisiyle yaralanabileceği veya enfekte olabileceği stres durumlarında bağışıklık sisteminin baskılanması çelişkili görünmektedir. Bir başka paradoks stresin bağışıklık sistemini baskılayıp, kanser, enfeksiyon vb. sıklığını artırırken, psöriyazis, astım ve artrit gibi bazı diğer hastalıkları (bunlarda bağışıklık sisteminin baskılanması gerekir) da alevlendirmesidir. Bu bilgilere dayanarak stresin bağışıklık sistemine etkisinin iki yönlü olduğu öne sürülebilir.

Genel olarak stresli durumlarla kronik karşılaşmanın zararlı etkileri olduğu düşünülmeyle birlikte bunu destekleyen kanıtlar az sayıdadır. İnsanların karşılaştığı kronik stres koşullarından birisi olan post travmatik stres sendromunda artmış glukokortikoid ve katekolamin düzeyleri saptanmıştır. Akut stresin bağışıklık sisteminin bazı komponentlerini uyardığı, bağışıklık yanıtında bir kaymaya neden olduğu, kronik stresin ise bağışıklık sisteminde genel işlev bozukluğuna neden olduğu öne sürülmektedir (152).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı

Bu çalışmada Swiss-Albino cinsi 33 adet erişkin (30-40 gr) erkek fare kullanılmıştır. Deney hayvanları kontrol (K; n=11), akut stres (AS; n=11) ve kronik stres (KS; n=11) olmak üzere üç deney grubuna ayrılmıştır.

3.2. Deney Protokolü

Tartılarak rastgele gruplara alınan hayvanların standart yem ve suya sınırsız erişimleri sağlanmış, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde (8.00-20.00 arasında aydınlık olacak şekilde) 22°C oda sıcaklığında standart kafeslerde gruplar halinde barındırılmıştır. Bir haftalık uyum süresinin sonunda (kafes, diğer hayvanlar ve handling açısından) aşağıda ayrıntılı şekilde açıklanan akut ve kronik stres protokolleri uygulandıktan sonra, ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) anestezisi altında hayvanlardan kan örnekleri (toplam 2.5 ml) alınmış ve ekzangüinasyon ile hayvanlar feda edilmiştir. Alınan örneklerden tam kanda lenfosit alt tiplemesi ve lökosit sayımı, serumlarda kortizol ve sitokin tayini yapılmıştır.

3.2.1. Stres Protokolü

Deney gruplarına stres, soğuk/hareketsizlik kombinasyonu ile uygulanmıştır (153). Bu amaçla hayvanlar 22°C'ta 2 saat süresince hareketsizliğe ve takiben 4°C'ta 2 saat soğuğa maruz bırakılmıştır. Soğuk stresi sırasında hareket kısıtlanmamıştır. Hareket 'kısıtlayıcılar' (restrainer) 5 cm × 2,5 cm boyutlarındadır ve 0,5 cm çapında 4 adet hava deliği vardır (Şekil 3.1).

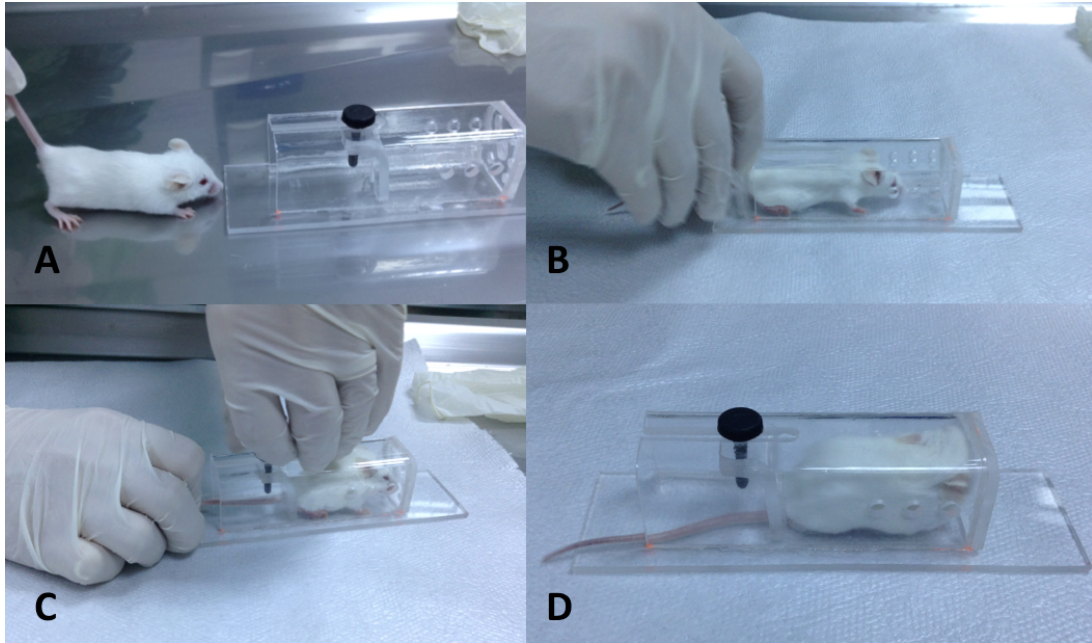
3.2.1.1. Akut Stres

Akut stres gruplarındaki hayvanlara yukarıda tanımlanan stres protokolü sadece bir kez (1 deney günü) uygulanmıştır. Protokolün bitiminde deney sonlandırılmıştır (Bkz. Madde 3.3).

3.2.1.2. Kronik Stres

Kronik stres gruplarındaki hayvanlara yukarıda tanımlanan stres protokolü

birbirini takip eden 5 gün boyunca uygulanmıştır. Günlük stres protokolleri tamamlandığında hayvanlar kafeslerine alınmıştır. 5.gün stres uygulaması tamamlandıktan sonra deney sonlandırılmıştır (Bkz. Madde 3.3).



Şekil 3.1. Deney hayvanının kısıtlayıcıya yerleştirilmesi ve kısıtlayıcı içindeki hayvan görüntüsü.

Seçilen kronik stres protokolünün deney grubundaki hayvanlarda depresyon yaratmayacak bir kalıp olmasına dikkat edilmiştir (153, 154). Ön çalışmalarda protokolün depresyona neden olmadığı gösterilmiş ve deneyler süresince de hayvanlar depresyon belirtileri açısından değerlendirilmiş, depresyon ve/ya agresif davranış gösteren hayvanlar deney grubundan çıkarılmıştır. Deney protokolü HÜ Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve tüm deneylerde Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından hazırlanan “Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Kılavuzu”ndaki (Guide For The Care and Use of Laboratory Animals) ilkelere uyulmuştur.

3.3. Kan Örneklerinin Alınması ve Deneyin Sonlandırılması

Ketamin+Ksilazin anestezisi altında intrakardiyak olarak elde edilen kan örnekleri biyokimya tüplerine (BD Vacutainer CAT REF: 367896, BD Biosciences

Corp., Plymouth, UK) ve EDTA'lı tüplere (BD Vacutainer K2E 5.4 mg REF: 368856, BD Biosciences Corp., Plymouth, UK) konulmuştur. Biyokimya tüplerine alınan kanlar 10000 devir/dk'da 15 dk santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve ölçümlerin yapılacağı güne kadar -80°C'de saklanmıştır. Bu örnekler sitokin ve kortizol düzeylerinin tayini için kullanılmıştır. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ise aynı gün akım sitometri çalışması ve lökosit sayımı için kullanılmıştır.

Kan örnekleri alındıktan sonra yüksek doz anestezi ve egzanguinasyon ile hayvanlara ötanazi uygulanmıştır.

3.4. Lökosit Sayımı

EDTA'lı tüpe alınan kanın 1 mikrolitresi lökosit sayım pipetine alınmış, 3 ml %1'lik asetik asit solüsyonu ve 15-20 gr metilen mavisinin 300 ml distile suda çözünmesi ile hazırlanan (155) Türk solüsyonu ile 10 kat sulandırılarak Thoma lamının sayma karelerine yayılmış, ışık mikroskobu altında sayım gerçekleştirilmiştir. Tüm alanda sayılan toplam lökosit sayısı seyreltme faktörü göz önüne alınarak adet / mm³ olarak ifade edilmiştir.

3.5. Akım Sitometrisi Yöntemi ile Hücrelerin Sayımı

Akım sitometrisi, hücre veya partiküllerin akmakta oldukları bir sıvı içinde kendi karakteristik bulgularının ölçülerek sınıflandırılmasına olanak veren bir laboratuvar tekniğidir. Bu teknikle hücre ya da partikülün immunfenotipleri, DNA içerikleri, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyelleri, canlılıkları gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir. Akım sitometrisi ile hücreler teker teker incelenir ve hücrelerin fiziksel ve biyolojik özelliklerinin kantitatif ölçümleri gerçekleştirilir (156, 157). Hücrelerin bir çok parametresinin ölçülebilmesi ve hücrelerin alt gruplarının birbirlerinden ayırt edilebilmesini sağlayan bu yöntem; hücrelerin yüzey ve hücre içi işaretleyicilerinin tipi ve miktarını belirlediği için;

1. Bir çok hücreyi hızla sayabilme ve ayırabilme özelliği ile B ve T lenfositlerini ve T lenfosit alt gruplarının tayini,
2. Çok az sayıdaki neoplastik hücreyi geniş bir hücre grubu içerisinde saptama,
3. Lösemi ve lenfoma tiplendirilmesi,
4. DNA ve RNA içeriklerinin tespiti,

5. Fagositozun ve otoantikorların tayin edilmesi ve kromozom analizi,
6. Apoptozisin saptanması, floresan in-situ hibridizasyon (FISH) tekniği ve tümör kinetiğinin saptanması gibi birçok konuda kullanılmaktadır (156-159).

Akım sitometrisi ölçümünde ana kural, örnekteki hücrelerin süspansiyon haline getirilmesi ve monoklonal antikorlarla işaretlenmesidir. Hücreler saf olarak elde edildikten sonra bir veya daha fazla prob (floresan bağlı monoklonal antikor veya diğer kromoforlar) ile konjuge edilir. Problar genellikle yüzey antijenine veya hücre içi elemanlara özgüdür (156, 157, 160).

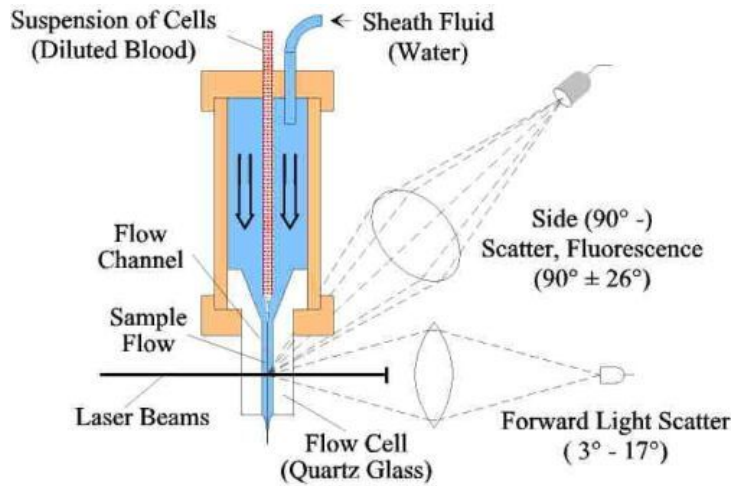
İmmünfloresan işaretleme direkt ve indirekt teknik ile yapılır. Direkt yöntemde antikorla konjuge olmuş florokrom madde [fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamin, phycoerythrin (PE) vb.] kullanılır. İndirekt yöntemde ise süspansiyon halindeki hücrelere önce işaretsiz monoklonal antikor bağlanır, bu antikora da işaretli monoklonal antikor bağlanır. Direkt yöntemde kullanılan antikorun monospesifik olması nedeniyle nonspesifik bağlanma ihmal edilecek kadar azdır. Ancak çok düşük dansiteye sahip yüzey antijenlerinin gösterilememesi bir dezavantajdır. İndirekt yöntemin avantajı ise çok düşük dansiteye sahip yüzey antijenlerini gösterebiliyor olmasıdır. Fakat bu yöntemde nonspesifik bağlanma daha sık görülmektedir (156, 157, 160).

Akım sitometrisi; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), lazer kaynağı, sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik sinyal ve elektrik sinyali), bilgisayar (data toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) ve ayırma mekanizması (cell sorting) olmak üzere pek çok sistemin birleşmesinden oluşur.

Süspansiyon halindeki işaretlenmiş hücreler belirli bir hava basıncı ile akış sistemi içerisinde geçirilir ve hücreler akış kabinine gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Hücreye bağlı florokrom, lazer ışığı ile aktiflenir ve bu enerjiyle ışın yayar. Yayılan ışının yoğunluğuna göre hücre boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinilir (156, 157, 160) (Şekil 3.2). Bu çalışmada direkt yöntem ile lenfositlerin immünofenotiplendirilmesi yapılmıştır. Bu işlemde FITC veya PE ile direkt bağlı anti-mouse CD3 PE, anti-mouse CD4 FITC ve anti-mouse CD25 PE

(BD Biosciences, USA) monoklonal antikorları (MoAb) kullanılmıştır.

Anestezi altında alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere konulmuş ve tüm örnekler +4°C'de saklanarak hızlıca laboratuara ulaştırılmıştır.



Şekil 3.2. Akım sitometrisi cihazının şematik gösterimi (161)

Her bir çalışma için 2 tüp oluşturulmuştur:

1. Birinci tüpe CD3 PE/CD4 FITC ve ikinci tüpe CD4 FITC/CD25 PE monoklonal antikorlarından 10'ar μ L konulmuş ve üzerlerine 100'ar μ L tam kan eklenmiştir.
2. 20 dk karanlıkta inkübe edildikten sonra tüm tüplerin üzerlerine 2 mL lizis solüsyonu eklenmiştir (FACS Lyse lysis buffer: 0,15 M NH_4Cl , 0,01 M KHCO_3 , 100 μ M EDTA, 1000 ml distile su) ve karanlıkta 10 dk daha inkübe edilmiştir.
3. Süre sonunda 300 G'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek çöktelti, 1 ml Fosfat Buffer Salin (PBS: 0,005 M K_2HPO_4 , 0,005 M KH_2PO_4 , 0,014 M NaCl, 1000 ml distile su) ile resüspanse edilmiştir.
4. Tüm numuneler FACS Canto II akım sitometri cihazında okutulmuş (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ve sonuçlar FACS DIVA yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

3.6.Sitokin Tayini

Yukarıda belirtilen şekilde elde edilen serumlarda HÜTF Fizyoloji AD laboratuvarlarında ticari test kitleri kullanılarak, serum sitokin düzeyleri (Fare IL-4; Fare IL-2; Fare $\text{IFN}\gamma$; Fare IL-17) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

yöntemiyle çalışılmıştır. Serumlar çalışma gününe kadar -80 °C’ de saklanmış, çalışmadan önceki gün -20 °C derin dondurucuya transfer edilmiş ve oda sıcaklığında bir kez çözündürülerek sitokin çalışması için kullanılmıştır.

ELISA ölçümleri önce yıkama solüsyonu oluşturulması daha sonra da alttaki basamakların sırasıyla gerçekleştirilmesi ile tamamlanmıştır.

Yıkama solüsyonu 1:20 oranında dilüe edilerek (25 ml Wash Buffer Concentrate üzerine 475 ml distile su eklenerek) hazırlanmıştır. Seyreltilen yıkama solüsyonu kullanılmadığı zamanlarda +4 °C’de tutulmuştur.

1. Standard ve kör kuyucuklarına 15 mikrolitre distile su pipetlenmiştir.
2. Numune kuyucuklarına 100’er mikrolitre distile su pipetlenmiştir
3. Numune kuyucuklarına 50’şer mikrolitre numune pipetlenmiştir
4. Plağın üstü film ile kapatılarak oda sıcaklığında 3 saat ve 200 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
5. Dilüe edilmiş yıkama solüsyonu ile her seferinde 400 mikrolitre olacak şekilde 6 kez yıkanmıştır.
6. Bütün kuyucuklara 100’er mikrolitre 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) substrat pipetlenmiştir.
7. Plağın üstü film ile kapatılmış ve oda sıcaklığında, yaklaşık 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.
8. Bütün kuyucuklara 100’er mikrolitre distile su pipetlenmiştir.
9. 450 nm ve 620 nm de okuma yapılmıştır.
10. Numunelerden alınan sonuçlar seyreltme oranına uygun şekilde hesaplanarak düzeltilmiştir.

3.7.Serum Kortizol Tayini

Deneklerden alınan kan örneklerinden elde edilen serumlardan serum, plazma, idrar ve tükürükte kortizolun *in vitro* kantitatif tayini için kullanılan immünolojik bir test olan Elektro Kemilüminesans İmmünolojik Test (Electro chemiluminescence immune-assay-ECLIA) yöntemiyle Roche P800 Modular Analyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) analizatörü ile ölçüm yapılmıştır. *Elecsys* ve *Cobas* immünolojik test analizörlerinde kullanım içindir. Test prensibi yarışma esasına dayanmaktadır.

Protokol:

1.inkübasyon: 20 µL numune, kortizole spesifik biyotinli antikor ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş bir kortizol türevi ile inkübe edilmiştir. Numune içindeki analit konsantrasyonuna ve ilgili immün kompleksin oluşumu ile işaretli antikor bağlayıcı yer, kısmen numune analiti ve kısmen rutenyumlu haptene ile doldurulmuştur.

2.inkübasyon: Streptavidin-kaplı mikropartiküller eklendikten sonra biyotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığıyla kompleks katı faza bağlı hale gelmiştir.

3.Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edilmiştir. Daha sonra bağlanmamış maddeler ProCell ile uzaklaştırılmıştır. Elektrod üzerine voltaj uygulaması kemilüminesans emisyonuna neden olmuş, bu bir foton sayıcı (photomultiplier) ile ölçülmüştür.

4.Sonuçlar, 2-noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla edinilen bir ana eğri (master) ile tayin edilmiştir.

3.8.İstatistiksel Değerlendirme

Deneylere başlanmadan önce G-power programında ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık testi için tek yönlü varyans analizi kullanarak $\alpha=0,05$ anlamlılık ve $\beta=0,80$ güç değeri ile örneklem genişliği hesaplanmış ve istatistiksel değerlendirmelerin yapılabilmesi için gereken en az hayvan sayısı ($n=11$) belirlenmiştir.

İstatistiksel analizler IBM® SPSS® Statistics 20 for Mac (IBM Corp, Los Angeles, CA, USA) ile sonuçların tabloları Microsoft® Excel® for Mac 2011 (Microsoft Corp, Santa Rosa, CA, USA) ile yapılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen veriler normal dağılım (Shapiro-Wilk testi ile) göstermesi durumunda kontrol ve stres grupları arasındaki kan kortizol, lenfosit alt tiplerinde bulunan hücre yüzdesi ve sitokin miktarları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile; ikili karşılaştırmalar da Post-hoc testlerden Tukey testiyle yapılmış ve Bonferroni düzeltilmesi kullanılmıştır. Deney sonuçlarının normal dağılmaması durumunda yukarıda belirtilen karşılaştırmalar için sırasıyla Wilcoxon testi ve ikili

karşılaştırmalar için de Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Sonuçlar % 95’lik güven aralığında, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

9.Etik Kurul İzni

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 31 Mart 2011 tarih ve 2011/2 nolu toplantısında 2011/03 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir (Ek1).

4. BULGULAR:

4.1. Hayvan Ağırlıkları

Deney hayvanları gruplara ayrılırken ve stres protokolünden hemen sonra kan örnekleri alınmadan tartıldı. Hayvanların son ağırlıkları yönünden deney grupları karşılaştırıldığında KS grubunda vücut ağırlıkları azalmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır [$F(2,32):4,545$ ($p=0,101$; $p>0,05$), (Tablo 4.1)].

Tablo 4.1. Deney gruplarında bulunan hayvanların vücut ağırlıkları

Hayvanların Ağırlıkları (gr)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	38,06 $\pm$ 1,08	36,5 - 40,1
AS	37,64 $\pm$ 1,58	35 - 40,05
KS	36,80 $\pm$ 1,35	34,5 - 38,9

4.2. Serum Kortizol Değerleri

Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır [$F(2,21):3,969$ ($p=0,037$; $p<0,05$); Tablo 4.2, Şekil 4.1].

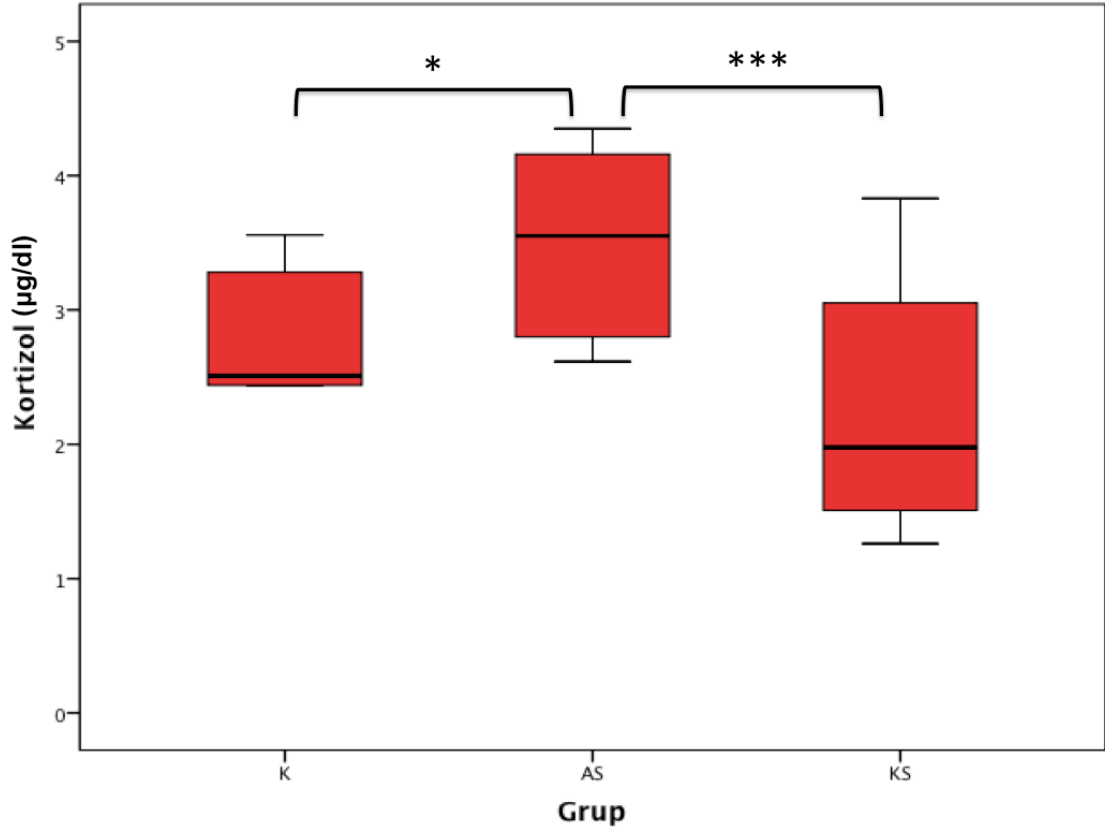
AS grubunun kortizol değerleri, K ve KS grubunun kortizol değerlerinden büyüktür ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p_{K-AS}=0,040$; $p_{AS-KS}=0,021$).

KS grubunun kortizol değerleri K grubunun değerlerine benzerdir ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p_{K-KS}=0,558$)

Tablo 4.2. Deney gruplarının kortizol değerleri

Kortizol Değerleri ($\mu\text{g/dl}$)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	2,47 $\pm$ 1,15	0,6-3,56
AS (*, ***)	3,5 $\pm$ 0,72	2,62-4,35
KS	2,50 $\pm$ 1,12	1,26-4,37

(*) K grubuna, (***) KS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.1. Deney gruplarının serum kortizol değerleri (grafğin orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir). (*) K grubuna, (***) KS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

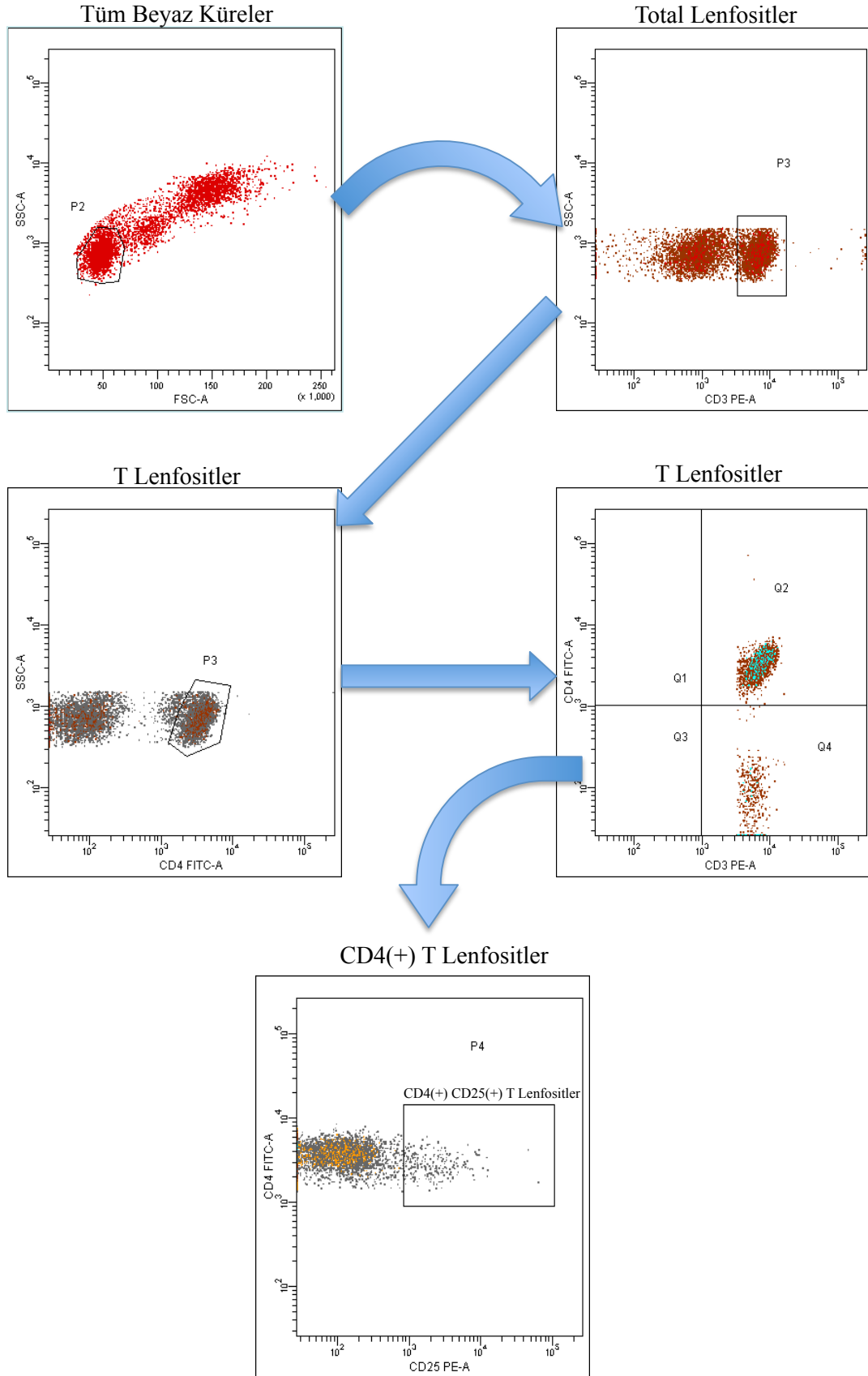
4.3.Akım-Sitometrisi Ölçümleri

Akım sitometrik incelemeler *Forward Scatter(FS)/Side Scatter(SS)* grafikleri (Şekil 4.2) kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna göre;

4.3.1. Beyaz Küre Sayıları

Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır [$F(2,32):8752$ ($p=0,002$) ; Tablo 4.3, Şekil 4.3].

AS ve KS gruplarının beyaz küre sayıları, K grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p_{K-AS}=0,001$; $p_{K-KS}=0,007$). AS grubunun sonuçları KS grubundan elde edilen sonuçlardan yüksektir fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p_{AS-KS}=0,885$).

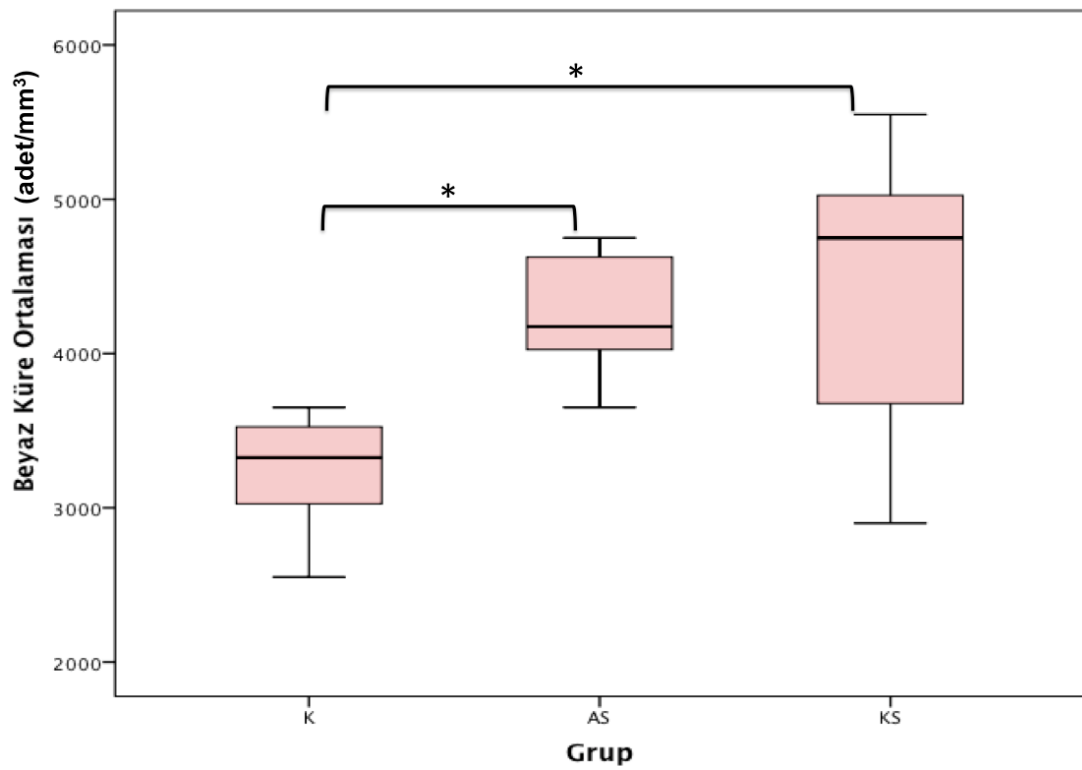


Şekil 4.2. Hücrelerin akım sitometrik görüntülerinin *FS/SS* diyagramında dağılımları

Tablo 4.3. Deney gruplarının beyaz küre sayıları

Beyaz Küre Sayıları (adet/mm ³)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	3316,67 $\pm$ 458,91	2550-4350
AS (*)	4475 $\pm$ 807,21	3650-6350
KS (*)	4427,27 $\pm$ 955,34	2900-5550

(*) K grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).



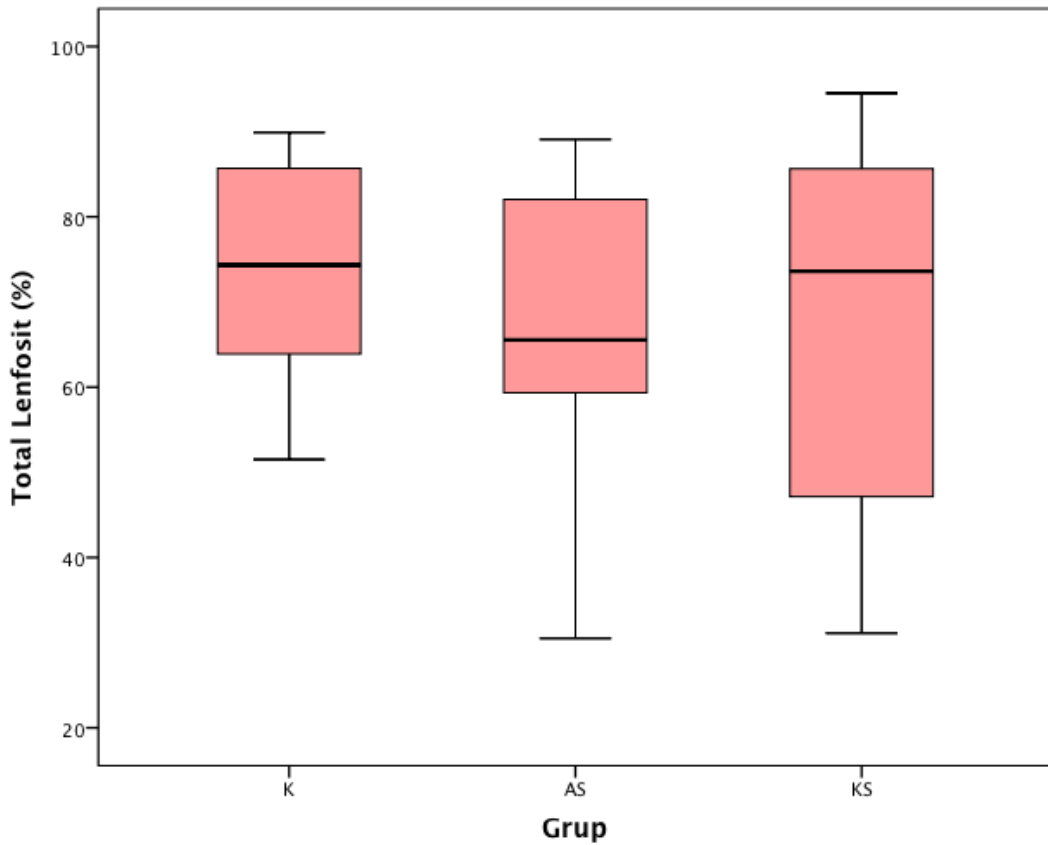
Şekil 4.3. Deney gruplarının beyaz küre değerleri (grafığın orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir.). (*) K grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).

4.3.2. Total Lenfosit Yüzdeleri

Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır [$F(2,32):0,554$ ($p=0,659$); Tablo 4.4, Şekil 4.4].

Tablo 4.4. Deney gruplarının total lenfosit yüzdeleri

Total Lenfosit Yüzdeleri (%)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	73,50 $\pm$ 12,84	51,50-89,90
AS	67,16 $\pm$ 16,51	30,50-89,10
KS	66,35 $\pm$ 23,35	31,10-94,50



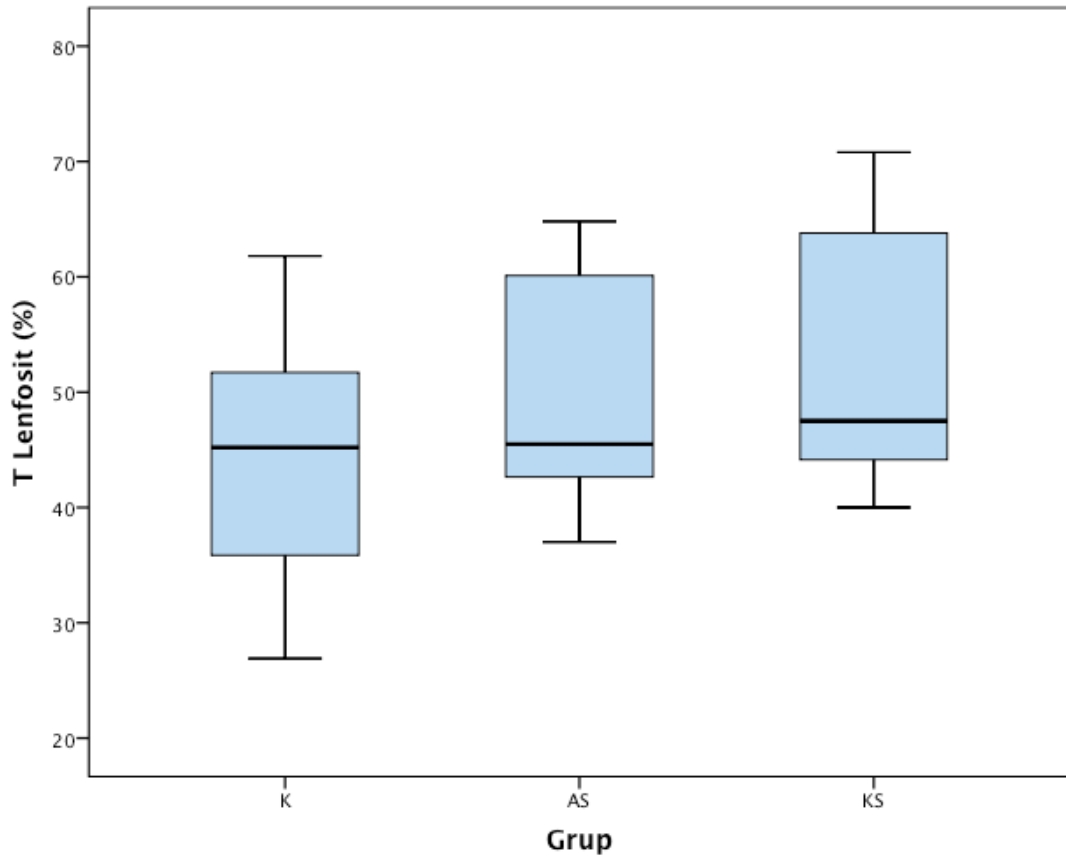
Şekil 4.4. Deney gruplarının total lenfosit yüzdeleri (grafığın orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir.)

4.3.3.T Lenfosit Yüzdeleri

Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır [$F(2,32):0,713$ ($p=0,291$); Tablo 4.5, Şekil 4.5].

Tablo 4.5. Deney gruplarının T lenfosit yüzdeleri

T Lenfosit Yüzdeleri (%)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	44,61 $\pm$ 11,02	26,9-61,8
AS	49,77 $\pm$ 9,71	37-64,8
KS	50,20 $\pm$ 16,56	12,4-70,8



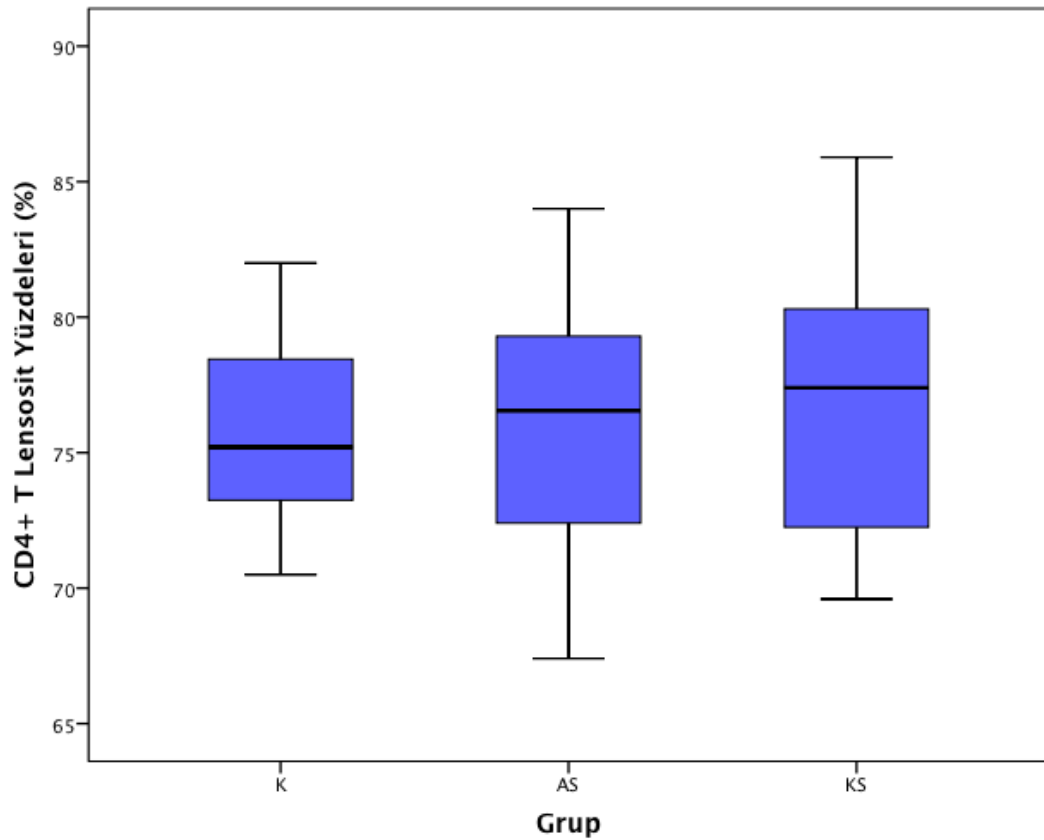
Şekil 4.5. Deney gruplarının T lenfosit yüzdeleri (grafiğin orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir.)

4.3.4.CD4(+) T lenfosit Yüzdeleri

Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır [$F(2,32):0,250$ ($p=0,395$), Tablo 4.6, Şekil 4.6].

Tablo 4.6. Deney gruplarının CD4(+) T lenfosit yüzdeleri

CD4(+) T Lenfosit Yüzdeleri (%)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	$76 \pm 3,56$	70,5-82
AS	$76,15 \pm 5,06$	67,4-84
KS	$74,09 \pm 12,23$	40-85,9



Şekil 4.6. Deney gruplarının CD4(+) T lenfosit yüzdeleri (grafığın orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir.)

4.3.5.CD25(+) T lenfosit Yüzdeleri

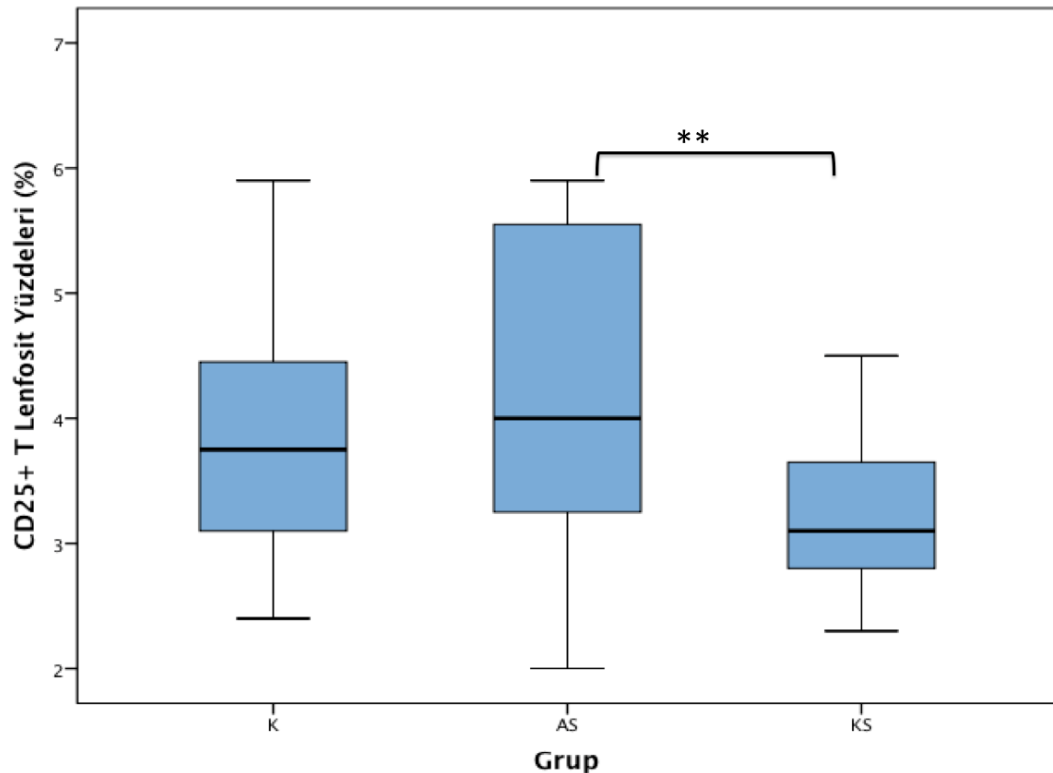
Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır [$F(2,32):1.768$ ($p=0,046$), Tablo 4.7, Şekil 4.7].

K grubuna göre karşılaştırıldığında AS grubundaki artma ve KS grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p_{K-KS}=0,315$; $p_{K-AS}=0,140$). Stres protokolleri karşılaştırıldığında AS grubunun CD25(+) T lenfosit yüzdeleri KS grubunun yüzdelерinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde büyüktür ($p_{AS-KS}=0,026$).

Tablo 4.7. Deney gruplarının CD25(+) T lenfosit yüzdeleri

CD25(+) T Lenfosit Yüzdeleri (%)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	$3,97 \pm 1,24$	2,4-6,5
AS ^(**)	$4,2 \pm 1,34$	2-5,9
KS	$3,3 \pm 0,85$	2,3-5

(**) AS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.7. Deney gruplarının CD25(+) T lenfosit yüzdeleri (grafiğin orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir.) (**) AS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).

Akut ve kronik stres, hem önemli ölçüde lökosit sayısını arttırmış hem de T hücrelerinin dağılımı değiştirmiştir. Treg hücreler AS grubuna göre KS grubunda önemli ölçüde azalmıştır.

4.4. Serum Sitokin Değerleri

Th1, Th2 ve Th17 yanıtının göstergesi olarak sırasıyla salgıladıkları sitokinler olan INF- γ , IL-4 ve IL-17 seviyeleri ölçülmüştür.

4.4.1. INF- γ

Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır [F(2,14):243,001; (p=0,000; p<0,05) Tablo 4.8, Şekil 4.8]. Stres protokolleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, INF- γ düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. AS grubunun INF- γ değerleri KS grubuna göre de yüksektir (p_{K-AS}:0,000; p_{K-KS}:0,000; p_{AS-KS}:0,000).

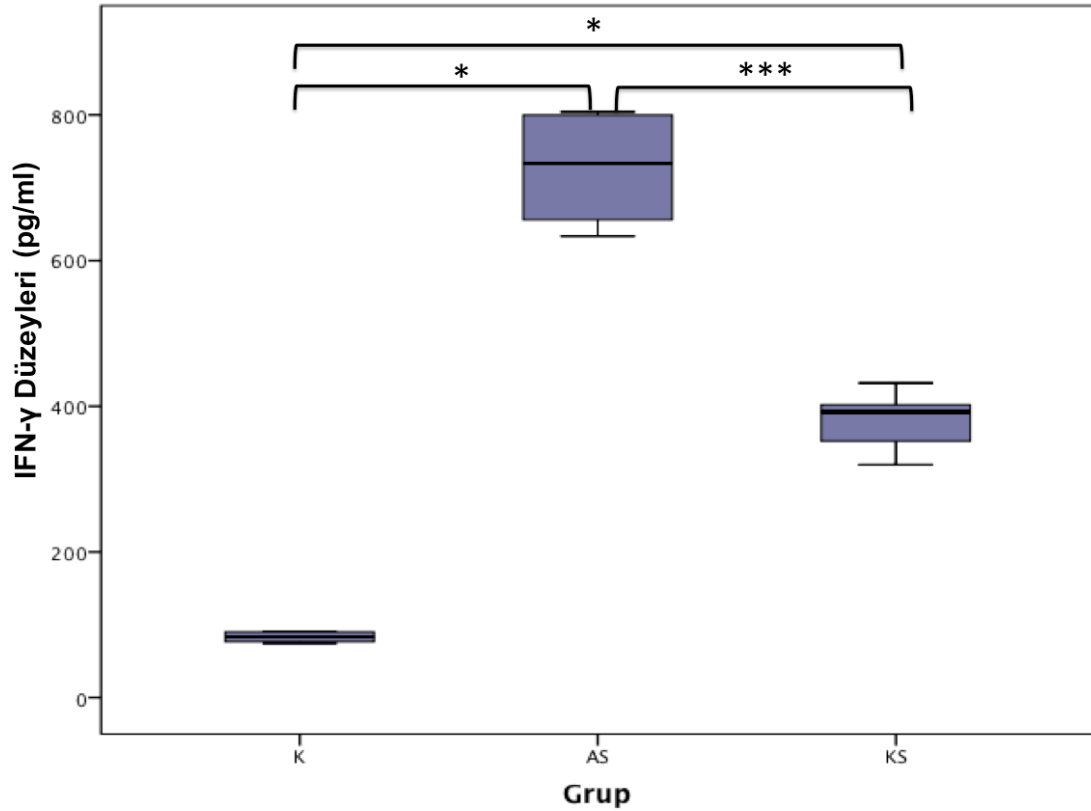
Tablo 4.8. Deney gruplarının INF- γ değerleri

INF- γ değerleri (pg/ml)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	86,73 $\pm$ 14,09	74,46-112,30
AS (*, ***)	726,81 $\pm$ 73,12	633,68-804,38
KS (*)	379,69 $\pm$ 44,04	319,78-432,06

(*) K grubuna, (***) KS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).

4.4.2. IL-4

Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır [F(2,15):166,700 (p= 0,000, p<0,05); Tablo 4.9, Şekil 4.9]. Stres protokolleri IL-4 düzeylerini kontrol grubuna göre arttırmakta, ayrıca kronik stres protokolü IL-4 düzeylerini akut strese göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmaktadır (p_{K-AS}:0,014; p_{K-KS}:0,000; p_{AS-KS}:0,000).



Şekil 4.8. Deney gruplarının IFN- γ değerleri (grafikğin orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir). (*) K grubuna, (***) KS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.9. Deney gruplarının IL-4 değerleri

IL-4 değerleri (pg/ml)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K	8,76 $\pm$ 1,25	7,98-10,20
AS (*)	19,25 $\pm$ 8,21	9,02-31,34
KS (*, **)	217,25 $\pm$ 33,15	178,62-272,56

(*) K grubuna, (**) AS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

4.4.3. Th1/Th2 Profilinin Göstergesi Olarak IFN γ /IL-4 Oranı:

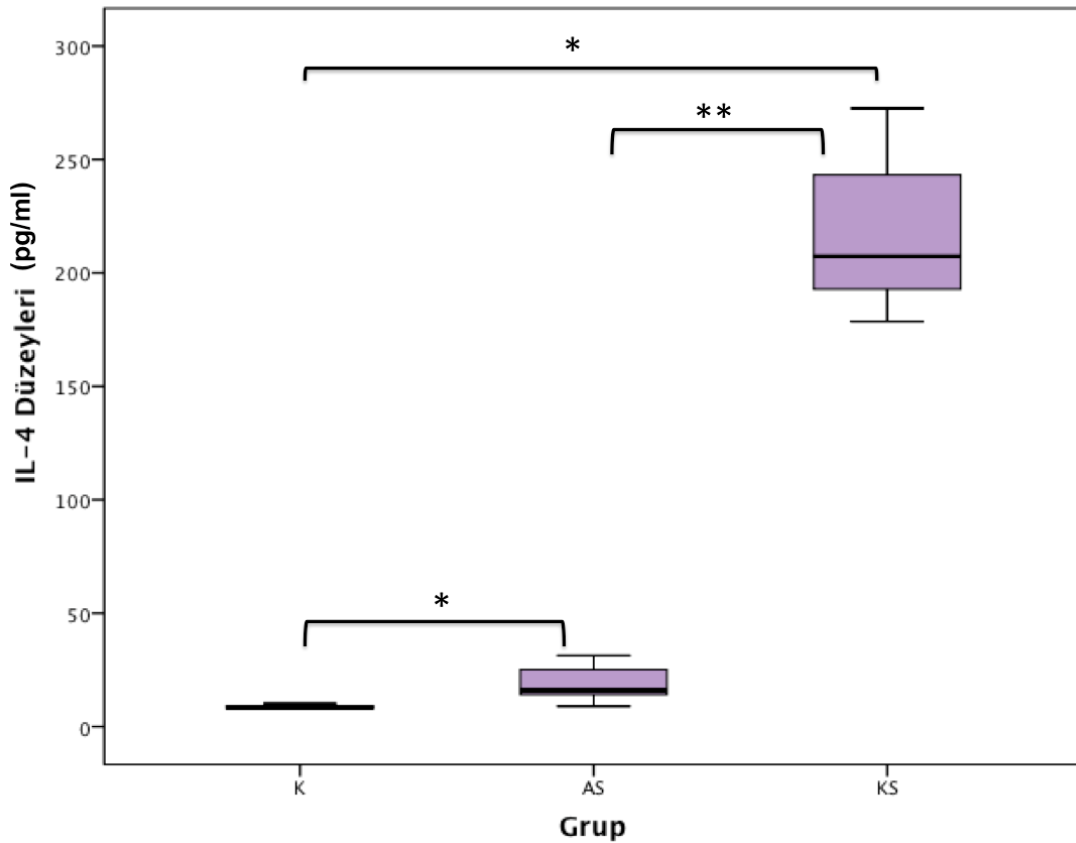
Th1 ve Th2 hücrelerinin dengesini gösteren IFN γ /IL-4 değerlerinin ortalamalarının oranları Tablo 4.10'de verilmiştir. Buna göre AS grubunda Th1, KS grubunda Th2 lehine kayma olmaktadır.

Tablo 4.10. Deney gruplarının IFN γ /IL-4 Oranı

Grup	IFN γ /IL-4 Oranı
K	9,90
AS	37,75
KS	1,74

4.4.4. IL-17

Deney gruplarının üçlü karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır [F(2,21):7,911; (p=0,003; p<0,05) Tablo 4.11, Şekil 4.10]. En düşük IL-17 seviyesi KS grubunda ölçülmüştür ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p_{AS-KS}=0,001; p_{K-KS}=0,006). K ve AS grubu arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p_{K-AS}=0,419).

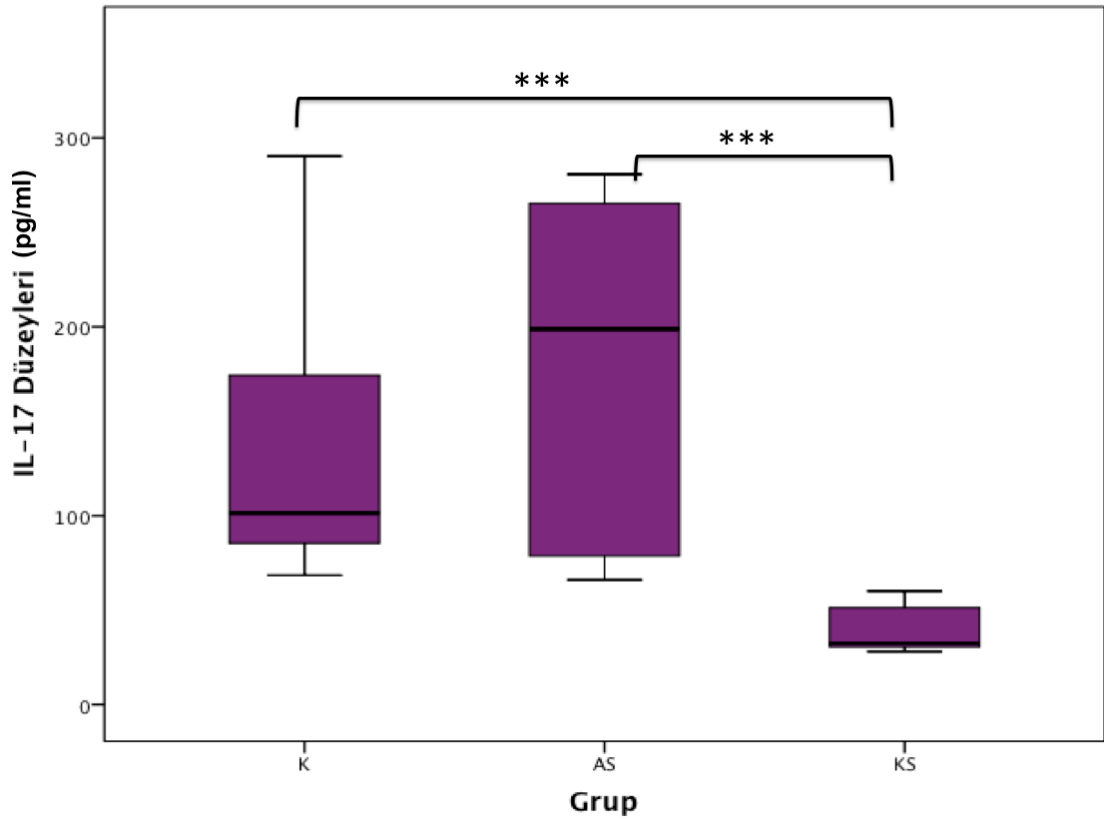


Şekil 4.9. Deney gruplarının IL-4 değerleri (grafikğin orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir.). (*) K grubuna, (**) AS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).

Tablo 4.11. Deney gruplarının IL-17 değerleri

IL-17 değerleri (pg/ml)		
Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max
K (***)	139,95 $\pm$ 86,17	68,50-290,38
AS (***)	179,06 $\pm$ 93,92	65,98-280,76
KS	44,10 $\pm$ 19,22	28,08-84,52

(***) KS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).



Şekil 4.10. Deney gruplarının IL-17 değerleri (grafığın orta çizgisi medyan değerini ifade etmektedir). (***) KS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

İntrauterin dönemden yaşamın son anına kadar günümüz yaşam koşullarının ayrılmaz parçası olan stresin istisnasız tüm vücut sistemlerini etkilediği; zamana, diğer koşullara ve bireylere bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte belirli yoğunluktaki stresin yararlı etkileri olduğu bilinmektedir (78, 162).

”Stres kaçınılmazı gereken bir şey değildir. Gerçekten de sadece yaşamı sürdürmek için gerekli enerjiyi sağlar. Stresten kurtulmak sadece ölümden sonra beklenebilir.”

Hans Selye (1936)

Ancak stresörler ile karşılaşan organizmada aktive olan stres sisteminin yanıtı organizmayı çok geniş bir perspektifte etkilemektedir (78). Basit bir soğuk algınlığından otoimmün hastalıklara ve kanserlere kadar stresin tetiklediği tüm hastalık koşullarında bağışıklık sisteminin işlev bozukluğu veya işlevsizliği olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada stresin bağışıklık sistemi üzerine etkilerini konu alan çok sayıda araştırmada şimdiye kadar incelenmediğini düşündüğümüz, kazanılmış ve doğal bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önemli rolü olan Th hücre cevabını araştırdık. Çalışmamızın sonuçlarına göre akut veya kronik strese maruz kalan farelerde efektör Th hücreleri farklı şekilde etkilenmekte; Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerinin dağılımları değişiklik göstermektedir.

Stres Modeli

Farklı stres modelleri stres sistemi ve bileşenlerini farklı düzeylerde etkilemekte ve homeostazise etkileri de farklı derecelerde olmaktadır. Biz bu çalışmada akut ve kronik stresin Th hücrelerinin dağılımına ve fonksiyonuna etkisini araştırdık. Deneysel stres modeli olarak fiziksel ve psiko-sosyal stresörlerin birlikte uygulandığı soğuk-hareketsizlik stresinin kombine edildiği bir yöntem kullandık (163). Yapılan çalışmalar 2-2,5 saat kısıtlayıcı stresi uygulamasının lökositlerin yeniden dağılımını etkilemesinin yanısıra cilt bağışıklık yanıtını da arttırdığını göstermiştir (125, 164-166).

Kısıtlayıcı stres protokolünün, fiziksel etkisinin yanısıra büyük ölçüde ‘çökmüş bir tünelin içinde kalmış olma duygusu’ ile daha güçlü bir psikolojik etkisinin olduğuna inanılmaktadır ve OSS’nin ve hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin dahil olduğu çeşitli endokrin parametreleri etkilediği gösterilmiştir (167-

170). Bu çalışmalar hipotalamusta paraventriküler çekirdekte norepinefrin düzeylerini, plazmada da ACTH ve kortikosteron düzeylerini en fazla arttıran stres modeli olduğu ortaya koymuştur. Ayrıca bu model kullanılarak stres sisteminin nöroendokrin yollar aracılı bağışıklık (hümorale veya hücresele) cevabına etkileri bazı araştırmalara konu olmuştur (93, 96).

Bu model uygulama kolaylığı ve stres sistemini hızla aktive etme özellikleri nedeni ile en sık uygulanan stres modellerinden biridir (82, 95). Bu stres modelini fiziksel bir stres olan soğuk stresle kombine ederek stresin her türünü (psikolojik, sosyal, fiziksel) modelledik. Böylece stres sistemini farklı yollar aracılığıyla uyarmayı amaçladık.

Genel bilgiler (2.2.1) bölümünde ayrıntılı şekilde açıklandığı gibi seçilen bu protokol hem kanıtlanmış bir stresör, hem de deney grubundaki hayvanlarda depresyon yaratmayacak bir kalıptır (154). Ön çalışmalarda da protokolün depresyona neden olmadığı gösterilmiş ve deneyler süresince de hayvanlar depresyon belirtileri açısından değerlendirilmiş, herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

Uygulanan protokolün stres sistemini uyardığını göstermek yani stresi ölçebilmek ve düzeyini tespit edebilmek de önemli bir noktadır. Stres düzeyi endokrin, davranışsal, OSS ve bağışıklık sistemi nin bazı uç nokta ölçümleriyle anlaşılabilir. Stres yanıtının karşılaşılan stres ve/ya bireysel özelliklere göre de değişiklik gösterdiği ve buna bağlı olarak değişebildiği bilinmekle beraber (128) bu yanıtın mutlak bileşenleri hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin son ürünü kortizol ve SSS'inin nörotransmitterleri epinefrin ve norepinefrindir (171). Biz çalışmamızda stres yanıtını serum kortizol düzeylerine bakarak değerlendirdik. Bunun nedenlerini şöyle açıklayabiliriz:

1. OSS araçları çok hızlı bir şekilde yıkılmakta bu nedenle yıkım ürünleri asıl olarak 24 saatlik idrar örneklerinde ölçülmektedir. Stres protokolümüz hayvanların protokol sonlandıktan sonra 30 dakika içinde sakrifiye edilmesini öngördüğü ve ayrıca metabolik kafeslerde barındırmanın da ayrı bir stres yaratacağı bilindiğinden bizim çalışmamızda bu yıkım ürünlerinin idrarda gösterilmesi oldukça zordur.

2. Stres ve ilişkili patolojik durumlar asıl olarak glukokortikoid sinyal mekanizmasındaki değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir, stres sisteminin en güçlü

yanıtını hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin aktive edilmesi gerçekleştirmektedir ve bu eksenin son ürünü kortizoldür. Kan kortizol düzeyi ile doğrusal bir ilişkisinin olduğu gösterilen tükrük kortizol düzeyi çalışmaları (172, 173) laboratuvar şartlarında stres sonrası kortizol düzeyinin 20-40.dk'lar arasında maksimuma ulaştığını göstermektedir (174). Bu zaman aralığı bizim stres protokolümüzü de desteklemektedir.

Stres Yanıtı

Homeostazisin tehdit altında olduğu durumlarda glukokortikoidler ve katekolaminler savunma sisteminin ilk hattını oluşturur ve pek çok çalışmada gözlemlendiği şekli ile kontrol grubundan yüksektir. Buna karşın bizim çalışmamızın sonuçlarına göre; akut stres grubunda anlamlı olarak yükselen kortizol düzeyi kronik stres grubunda kontrol seviyesine düşmektedir. Yapılan stres araştırmaları stresin türüne (psikolojik, sosyal, fiziksel), süresine ve yoğunluğuna göre kortizol cevaplarının değiştiğini ortaya koymaktadır.

Aynı tür streslerdeki kortizol yanıtı ile ilgili olarak dahi farklı sonuçlar rapor edilmektedir. Örneğin, hafif-orta şiddette stres olarak kabul edilen doktor muayenesi sırasında kortizol salgılanmasının arttığını (175-177), değişim olmadığını (178, 179) veya azaldığını (180) gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır.

Depresyon tanısı almış hastalarda kortizol düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu fakat aralarındaki farkın anlamlı olmadığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada; kontrol ve hasta grubuna akut stres uygulandığında hasta grupta kortizol düzeylerinin kontrole göre daha fazla arttığı ve stresin kronikleştiği devam eden günlerde kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek kalmaya devam ettiği gözlenmiştir (181). Kronik yorgunluk sendromu olan veya kronik strese maruz kalan kişilerde diüurnal ritmin düzleştiği ortaya konmuştur (173, 182-185).

Sonuçlarımıza benzer şekilde stresin kronik dönemde tükrük kortizol düzeyinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (186). Bowers ve ark. farklı stres protokolleri arasında stres yanıtı açısından fark olduğunu gösterirken hareketsizlik veya soğuk streslerine maruz kalan hayvanlarda akut uygulanan protokolün, kronik protokole göre (15 gün) daha yüksek kortizol seviyelerine neden olduğunu göstermiştir (163).

Syrian altın hamsterlarında uygulanan akut ve kronik stres protokollerinin plazma glukokortikoid seviyesine etkisini inceleyen bir başka çalışmada akut ve kronik stresin kortizol düzeyini kontrol grubuna göre artırdığını ancak bu artışın akut stres grubunda belirgin şekilde yüksek iken kronik streste artışın daha az olduğu bulunmuştur (187).

Sıçanlarda akut hareketsizlik stresi (30 dakika yüksek yoğunluklu fiziksel-duygusal-psikososyal stres) uygulaması plazma kortizol düzeyini anlamlı olarak artırırken (188-190), 21 gün kronik izolasyon stresi (düşük yoğunluklu, uzun süreli psikososyal stres) kortizol cevabında önemli bir azalmaya yol açmıştır (191, 192). Kronik strese maruz kalan hayvanlara akut hareketsizlik stresi uygulandığında; akut stres sonrası gözlenen serum kortizol seviyesine benzer değerlere yükseldiği ortaya konmuştur (190).

Harpaz ve ark. yaptıkları çalışmada kronik strese maruz kalan erkek farelerde kortizol düzeylerinin kontrole göre farklı olmadığını saptamıştır (193). Kronik izolasyon stresi uygulanan farelerde pek çok diğer değişiklik ile birlikte kortikotropine azalmış glukokortikoid salıverilme yanıtı da gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları kortizolün stres uygulanan birinci gün yükseldiğini ve daha sonra stres devam etmesine karşın normal düzeye düştüğünü göstermiştir (152, 194).

Glukokortikoidler hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen aktivitesinin yanıtında son ürün olarak inflamasyon yanıtına etki eder (195, 196). Yapılan bu çalışmalar aslında kronik stres döneminde her ne kadar stresörün varlığı devam ediyor olsa da zamanla hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen aktivitesinin stres yanıtındaki rolünü azalttığını ve kronik stres ile azalmış hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen aktivitesi ilişkisini göstermektedir (80). Bizim çalışmamızda da stres protokolümüz akut dönemde artan kortizol düzeyi ile stres sistemini hızla ve etkili bir şekilde aktive etmiş ancak kronik dönemde azalmış hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen aktivitesi ile kontrol seviyesine düşmüştür.

Stres ve Bağışıklık Sistemi

Stres ve bağışıklık sistemi ilişkisini inceleyen önceki çalışmalarda toplanan bilgiler stres sistemi aktivasyonunun beyaz küre alt gruplarının sayı ve işlevlerinde değişikliğe neden olduğunu, sayısal değişikliğin ise asıl olarak hücrelerin farklı

ölümler arasındaki dağılımının değişmesine bağlı olduğunu göstermektedir. Buradan hareket ederek, çalışmamızda uyguladığımız akut/kronik stresin bağışıklık sistemi üzerine etkisini incelerken ilk olarak lökosit sayılarını test ettik. Buna göre; en fazla kronik stres grubunda olmak üzere stres gruplarında beyaz küre sayısında artış görülmekteydi. Bu durum glukokortikoid düzeyi ve beyaz küre sayısı arasındaki anlamlı negatif korelasyonla da desteklenmektedir. Çalışmamızın amacını Th hücrelerinin stres protokolünden nasıl etkilendiğini incelemek şeklinde belirlediğimiz için lökositlerden sonra bir alt hücre grubu olarak total lenfosit sayısını inceledik. Stres gruplarında total lenfosit sayılarında azalma gözlenmişti ancak bu azalma istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşamamıştı. Lenfositlerin arasından da odaklandığımız hücre grubunu kapsayan T lenfositlerinin yüzdeleri incelediğimizde stres gruplarında gözlenen artışın kontrol grubuna göre anlamlı olmadığını saptadık. Benzer sonuçlar CD4(+) Th lenfosit yüzdeleri için de geçerli idi. Ancak Th hücre yanıtının dengesinden sorumlu olan CD4(+) CD25(+) Treg lenfosit yüzdelinde akut stresin anlamlı artışa, kronik stresin ise önemli bir azalmaya neden olduğunu gözlemledik.

Lökosit ve T lenfosit sayıları ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Ör.; lökosit sayısının insanda egzersiz sonrasında enflamatuvar göstergelerden CRP ile birlikte artış gösterdiği (197), sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada akut kısıtlayıcı stres ile değişmediği; kronik stres döneminde ise başlangıç düzeylerine göre anlamlı bir düşüş olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ayrıca total lenfosit sayısında da başlangıç düzeylerine göre anlamlı bir düşüşü göstermiştir (198). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada Neeman ve ark. lökosit sayısının akut stres sonrası artış gösterdiğini kronik strese sabit kaldığını göstermiştir (199).

Bu sonuçlara göre akut veya kronik strese maruz kalan farelerde gözlenen lökosit sayısındaki artış lenfosit dışı bağışıklık sistemi hücrelerine bağlıdır. Literatür bilgileri de özellikle akut stres koşullarında bu artıştan NK hücrelerinin sorumlu olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada Th hücre yanıtını incelemeyi amaçladığımız için diğer hücre gruplarının strese yanıtındaki değişiklikleri çalışmamızın kapsamı dışındadır ve daha önce pek çok çalışmada incelenmiştir (131, 138, 200).

Daha önce yapılmış çalışmaların sonuçları incelendiğinde; Atanackovic ve ark. akut stresin lökosit ve total lenfosit sayısını arttırdığını, CD4(+) T lenfositlerin sayısını etkilemediğini rapor ettikleri görülmektedir (201). Ayrıca T lenfosit sayısının akut stres sırasında anlamlı derecede azaldığı, stres sonrasında artmaya başladığı ve stresten sonra dördüncü saatte normale döndüğü rapor edilmiştir (199). Strese maruz kalan sıçanlarda total lenfosit sayısının azaldığı 35 günlük kronik stres uygulamasının bu etkiyi sabit hale getirdiği gösterilmiştir (125).

Bauer ve ark. akut (bir defa 30 dak kısıtlayıcı stresi) ve kronik (birbirini takip eden 12 gün 30 dak/gün kısıtlayıcı stresi) stres uygulanan sıçanlarda total lenfosit sayılarının kontrol grubuna göre yüksek olduğunu; en yüksek sayının kronik stres grubunda saptanmasına karşın, gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde T lenfositleri açısından da gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu çalışmada CD4(+) Th hücrelerinin yüzdesi, akut stres grubunda kontrole göre anlamlı bir düşüş gösterirken; kronik stres grubunda artış eğiliminde olmasına karşın anlamlılık bulunmamıştır. Ancak kortikosteron düzeyleri ile Th hücrelerin yüzdeleri arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (202).

Farelerde yapılan bir başka çalışmada; farklı stres protokollerinin [kısıtlayıcı (2 saat), zorlu yüzme (2 dak), soğuk (2 saat), izolasyon (2 saat), kısa süre (30 sn) elde tutmak] akut ve kronik koşullarda bağışıklık sistemi hücrelerine etkisi incelenmiştir. Farklı stres modellerinin akut veya kronik uygulanması lökosit sayısında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, diğer hücrelerin sayısında kontrol ve/ya farklı protokoller arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Akut koşullarda özellikle, soğuk ve elde tutma stresinin lökosit alt gruplarında zorlu yüzme stresine göre daha fazla değişikliğe yol açtığı, total lenfosit sayısındaki stres kaynaklı değişikliklerin ise kısıtlayıcı grubunda daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kronik stres uygulandığında ise, kısıtlayıcı, soğuk ve izolasyon stresi total lenfositlerin sayısını, zorlu yüzme ve elde tutma stresine göre azaltmıştır (163).

Stresin bağışıklık sistemi üzerinde çok güçlü etkileri olduğu ve bu etkilerin katekolaminler ve asıl olarak glukokortikoid ile oluşturulduğu bilinmektedir. Glukokortikoidler anti-enflamatuvar özelliğe sahip olup bağışıklık yanıtını; lökosit trafiği ve işlevinde değişiklik oluşturarak, sitokinlerin ve inflamasyon araçlarının

üretimini ve salgısını modüle ederek ve bazı koşullarda hedef dokulardaki etkisini ortadan kaldırarak etkiler. Bu etkileri nedeni ile klinik kullanımları çok geniştir (69). Ancak glukokortikoidlerin bağışıklık hücreleri üzerindeki pleiotropik etkilerinin olduğu, *in vivo* ve *in vitro* sonuçlarının farklılık gösterdiği (203), türler arasında (134) ve aynı türde dahi cinsiyet (204) ve stres protokolüne (163) göre değişebileceği de bilinmektedir.

Naif Th hücrelerinin farklılaşması Th1 ve Th2 efektör hücrelerinin gelişimi temel olarak sitokinler tarafından kontrol edilir (Şekil 2.5) ve regülasyon bozukluğu patolojik olarak Th1/Th2 hücrelerinin değişimiyle sonuçlanabilir (205). Bu nedenle biz de Th yanıtında Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerinin arasındaki dengeyi incelemek için bu hücrelerce spesifik olarak sentezlenen sitokinleri kullandık.

Th1 ve Th2 hücrelerinin aktivitesi bu hücrelerin salgıladığı sırası ile proenflamatuvar sitokin IFN- γ ve antienflamatuvar sitokin IL-4 ile değerlendirildi. Çalışmamızın sonuçlarına göre hem akut hem de kronik stres IFN- γ düzeyini artırmakta, akut ve kronik uygulamalar arasındaki karşılaştırma akut stres lehine anlamlı bir artışı göstermektedir. Bu sonuçlar uyguladığımız stres protokolünün Th1 hücrelerinin aktivitesini artırdığını ve hücrel bağışıklığı tetiklediğini işaret etmektedir. Th2 hücrelerinin cevabını incelediğimizde ise kronik stres grubunda IL-4 seviyelerinin kontrol ve akut stres grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdiğini bulduk. Kronik strese maruz kalan hayvanlarda Th2 hücrelerinin aktivitesinin arttığı ve bağışıklık yanıtının humoral bağışıklığa kaydığı görülmektedir. Bu sonuç literatür bilgileri ile uyumludur (34-36).

Th1/Th2 hücre oranlarını değerlendirmek hücrel bağışıklık yanıtının aktivasyonu ve baskılanması arasındaki denge ile ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır. IFN- γ /IL-4 oranı Th1/Th2 hücre profilinin indeksi olarak kullanılabilir (206, 207). Bu indekse göre değerlendirildiğinde çalışmamızda akut stres grubunda Th1 hücre yanıtının arttığı ve kronik stres grubunda ise baskılandığı görülmektedir. Bu bulgular daha önce rapor edilmiş çalışmaların sonuçları ile de uyumludur (164, 208). Stres hormonları, antijen sunulması, lenfositlerin proliferasyonu ve dağılımı, sitokinlerin ve antikorların salgılanması Th1 ya da Th2 hücre yanıtının seçilmesi gibi temel bağışıklık işlevlerini etkiler.

Önceleri stresin bağışıklık sistemine etkisinin her zaman baskılama yönünde olduğu düşünülmekte idi. Ancak günümüzde ulaşılan bilimsel kanıtlar stresin bağışıklık sistemini pek çok değişkene bağlı olarak farklı şekilde etkileyebildiğini göstermiştir. Bu değişkenlerden en önemlisi stresöre maruziyet süresi yani akut ya da kronik koşullardır. Genel olarak kronik stres koşullarında antienflamatuvar etkilerin ve Th2 yanıtına kaymanın gözlemlendiği kabul edilmektedir. Ancak akut koşullarda ya da bazı yerel yanıtlarda proenflamatuvar etkiler de baskın hale gelmektedir (209). Agarwal ve ark.'nın çalışmaları da stres hormonlarına kısa süreli maruziyetin Th1 hücrelerinin sitokinlerini artırdığını göstermiştir (210). Yakın zamanda insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada akut stresin Th1 hücre yanıtını artırdığı gösterilmiştir (211). Akut psikolojik stresin, P maddesini artırarak Th1 hücre yanıtını güçlendirdiği ve bu şekilde enfeksiyonları kontrol edebildiği öte yandan kronik stresi olan bireylerin enfeksiyonlara daha yatkın olduğu rapor edilmiştir (212). Bu sonuçlar ve bizim çalışmamızın sonuçları glukokortikoidlerin akut dönemde Th2 hücre yanıtını baskılaması ve Th1 hücre yanıtını artırması ile açıklanabilir (213).

Daha önce yapılan çalışmalarda glukokortikoidlerin *in vitro* ve *in vivo* olarak insanda ve hayvanda TNF- α , IFN- γ ve IL-2 üretimini baskıladığı gösterilmiştir (214). Böylece glukokortikoidler ve katekolaminlerin tip 1 sitokin inhibisyonu ve tip 2 sitokin salgılanmasını sağladığı; bunun da selektif olarak hücresel bağışıklığı baskılarken, yanıtı Th2 hücresi aracılı humoral bağışıklığa kaydıracağı düşünülmüştür (107, 209, 215). Bizim bulgularımızın ve yukarıda özetlenen literatür bulgularının aksi yönde verilen bu bilgiler ya doğrudan eksojen glukokortikoidlerin etkisini inceleyen ya *in vitro* olarak yapılmış ya da strese maruziyet süresinin dikkate alınmadığı çalışmalardan alınmıştır.

Stres ve bağışıklık sistemi ile ilgili çalışmalarda ne yazık ki pek çok konuda henüz görüş birliği sağlanamamıştır. Stresin Th1/Th2 hücre yanıtına etkisi de bunlardan birisidir. Ancak Dhabhar tarafından da dikkat çekildiği gibi stresle indüklenen bağışıklık sistemi baskılanması evrimsel adaptif bir süreç değildir. Aslında organizmanın aktif bir bağışıklık cevabına gereksinim duyduğu bir zamanda örneğin; stresörün etkisiyle yaralanabileceği veya enfekte olabileceği stres durumlarında bağışıklık sisteminin baskılanması çelişkili görünmektedir. Bir başka deyişle akut stres koşullarında Th1 hücre yanıtının artması organizmanın hayatta

kalışı için önemlidir (164).

Klasik Th1/Th2 hücre paradigmasına eklenen üçüncü efektör Th hücresi alt tipi proenflamatuvar sitokin IL-17 salgılayan Th17 hücreleridir (38-43). Th17 hücreleri asıl olarak salgıladıkları sitokinler aracılığıyla proenflamatuvar etki gösterir. Özellikle otoimmün enflamasyondaki rolü pekçok hayvan modelinde gösterilmiştir (40-43). Bu modellerde Th17 hücre sayısında ve/ya IL-17 düzeyinde azalmanın hem hastalığın başlangıcını geciktirdiği hem de şiddetini azalttığı gözlenmiştir.

Th17 hücrelerinin yukarıda örnekleri verilen pro-enflamatuvar etkilerinin yanı sıra, anti-enflamatuvar etkileri de bildirilmiştir (216). Ke ve ark. tarafından IL-17'nin T hücre aktivasyonunu baskıladığı ve deneysel otoimmün üveit gelişimini düzelttiği rapor edilmiştir (217). Bir başka çalışma IL-17'nin Th1 hücre farklılaşmasını baskıladığını ve *helicobacter pylori* kaynaklı gastritte anti-enflamatuvar etkilerini ortaya koymuştur (218).

Özellikle otoimmün hastalıklar ile ilişkisi gösterilmiş olan Th17 hücrelerinin stresten nasıl etkilendiği konusundaki az sayıda araştırmanın sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Tavuklarda yapılmış deneysel bir soğuk stres çalışmasına göre soğuk stresinin uygulandığı 24 saat boyunca ince bağırsakta IL-17 mRNA ekspresyonu 0., 1., 2., 3., 6., 12. ve 24. saatlerde ölçülmüş ve zamanla artış gösterdiği görülmüştür (219). Bir başka çalışmada 12 saat kısıtlayıcı stresine maruz bırakılan farelerde IL-17 düzeyinin artmış olduğu bulunmuştur (220). Kronik stres koşullarında farelerde Th1/Th2 dengesinin Th2 hücre yanıtına ters olarak proenflamatuvar Th1/Th17 hakimiyetine doğru kaydığı ve Treg hücrelerinin azaldığı gösterilmiştir (193).

Otoimmün hastalıkların ör.; Tip 1 DM gelişiminde Th1 hücre yanıtının da önemli rolü olduğunu bilinmektedir (221, 222). Stresli çocuklarda özellikle Th1 hücre yanıtının aracı sitokini IFN- γ 'nın arttığı yine bu çocuklarda DM, romatoid artrit ve Crohn hastalığı gibi otoimmün hastalıklarda anahtar rolü olan Th17 hücrelerinin aktivitesinin yükselmiş olduğu gözlenmiştir (37, 223-228). IFN- γ 'nın Th2 ve Th17 hücrelerinin çoğalmasını engellemesi, artmış Th1 hücre yanıtının Th2 ve Th17 hücre aktivitesinin azalmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (223, 229, 230).

Bizim sonuçlarımız farelerde akut stresin IL-17 düzeyini arttırdığını, kronik stresin ise azalttığını göstermektedir. Bu da özellikle akut stres koşullarında otoimmün hastalıkların tetiklenmesi ve/ya alevlenmesini açıklayabilir. Ancak daha önceki çalışmalar kronik stresin, multiple skleroz, psöriyazis gibi otoimmün hastalıkların alevlenmesi ile ilişkisi olduğunu, bu ilişkinin glukokortikoidlerin bağışıklık sistemini baskılayıcı etkisinden bağımsız olduğunu işaret etmektedir. Bu hastalıkların Th1/Th17 hücrelerinin proenflamatuvar yanıtı ile karakterize olması, kronik stresin glukokortikoidlerin etkisini azalttığı şeklinde yorumlanmıştır (86). Toll-benzeri reseptör (Toll Like reseptör, TLR) sinyal yolağı da Th17 hücrelerinin üretimi, idamesi ve büyümesinde önemli bir rol oynar (231, 232). TLR2 uyarımının kronik stresle indüklenen Th1, Th2 ve Th17 hücrelerinin sitokin değişikliklerine yol açtığı, apoptoz ile ilgili faktörler ve bağışıklığı modüle edebilen maddelerle uyarılarak etki oluşturduğu gösterilmiştir (220).

Harpaz ve ark. kronik strese maruz kalan ve kalmayan farelerden elde ettikleri dalak hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmalarda kortizol etkisine duyarsızlaşma ve/ya bağışıklık yanıtında Th1/Th17'den Th2 hücreleri yönüne bir kayma saptamışlardır (193). Bunu destekleyecek şekilde yüksek stres altındaki (ör.; ciddi bir hayati olay yaşamış, ebeveyn stresi ile karşılaşmış, sosyal destekten yoksun) çocuklarda yapılan bir çalışmada IL-5, IL-10, IL-13 ve IL-17 gibi sitokinlerin spontan salgılanması düşük bulunmuştur. Bu yüksek stres altındaki çocuklarda; baskılayıcı bir bağışıklık sistemi yanıtını gösteren azalmış Th1, Th2 ve Th17 hücrelerinin aktivitesini ortaya koymaktadır (223). Ayrıca yapılan bazı çalışmalar strese kronik maruziyetin azalmış hücresel bağışıklık yanıtıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (151, 233).

Stres gibi sistemik yanıt oluşan koşullarda bağışıklık sistemi hücrelerinin tek tek yüzde ve işlevlerinden çok hep birlikte değerlendirilmesi uygun olacaktır. Buna göre bu çalışmada uyguladığımız soğuk/hareketsizlik stresi, protokole akut maruz kalan farelerde Th1/ Th17 hücrelerinin proenflamatuvar yanıtında artışa, Th2 hücre yanıtında azalmaya neden olmuştur. AS grubunda Treg hücre yüzdesinde de artış gözlenmiştir. Aynı protokolün 5 ardışık gün uygulandığı kronik stres durumunda bağışıklık sistemi tablosunun tamamen değiştiği Th2 hücre yanıtının baskın hale geldiği ve Treg hücrelerinin azaldığı saptanmıştır. Özellikle Treg ve Th17 hücreleri

arasında zıt yönde bir ilişki olduğu rapor edilmektedir (234, 235). Akut ve kronik stres koşullarında gözlediğimiz Th17 ve Treg hücrelerinde aynı yönde değişim gösteren sonuçlarımız bu durum ile uyumlu değildir. Ancak önceki çalışmalar asıl olarak periferel/indüklenebilir Treg hücrelerini incelemektedir. Bizim çalışmamızda ise bazı kısıtlılıklar nedeni ile toplam Treg hücre popülasyonu sayılabilmektedir. Ayrıca Treg ve Th17 hücrelerinin tanımlanmasından sonra gelişim sürecindeki ortak transkripsiyon faktörlerini de göze alarak Th17/Treg hücrelerinin oranından bahsedilmişken bugün daha çok Teff hücrelerinin (Th1, Th2 ve Th17) Treg hücrelerine (Teff/Treg) oranı dikkate alınmaktadır (45, 236).

Treg hücrelerindeki glukokortikoid reseptörlerinin biyolojik rolünü araştıran çalışmalar hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini ile OSS arasındaki bağlantı, periferel T hücre alt gruplarının işlev ve sayılarında stresle birlikte ortaya çıkan değişiklikleri açıklamaya yardımcı olacaktır (151). Bu da Treg hücrelerinin sayısındaki değişikliğe paralel olarak sadece Th17 hücrelerinde değil, Teff hücre gruplarından bir ya da daha fazlasında azalma olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu durum Teff hücre gruplarının Treg hücresi aracılı düzenlemeye dirençli olması, bu hücrelerin salgıladığı sitokinlerin yarattığı lokal çevre etkisi ile ya da Teff hücre grubunu oluşturan alt grupların büyüklüğü ile açıklanabilir (237). Romatoid artrit modellerinden alınan Teff ve Treg hücreleri arasındaki ilişki hastalığın başlangıç, semptomatik ve iyileşme dönemlerinde olması ile de farklılık göstermektedir (238).

T lenfositlerinin gelişiminin doğal sürecinde timusta farklılaşarak dolaşıma çıkan CD4(+)CD25(+) Treg hücreler immün homeostazide anahtar role sahiptir ve otoimmün hastalıkların engellenmesini sağlayan kritik işlevleri ile tanımlanmışlardır. Vücudun kendi antijenlerine karşı toleransı otoreaktif lenfositlerin timusta negatif seleksiyonunun yanı sıra T reg hücrelerinin baskılayıcı etkisi ile sağlanır (239). Treg hücreleri ayrıca enfeksiyon, doku reddi, hipersensitivite reaksiyonu, tümör gelişimi gibi tüm bağışıklık yanıtlarında önemli rol oynar (240). Treg hücrelerinin sayısının azalması ve/ya işlevinin bozulması otoimmün hastalıklara daha büyük bir yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (241-244).

Bizim çalışmamızda akut atres protokolü Treg hücrelerinde artışa, kronik stres ise kontrol seviyesine dönüşe neden olmuştur. Bu sonuçları destekleyecek şekilde CD4(+) CD25(+) Treg hücrelerinin atopik ve sağlıklı katılımcılarda,

muayene stresiyle birlikte artış gösterdiği, bu artışın stres algısı yüksek olan bireylerde daha fazla olduğu ortaya konmuştur (245). Braitch ve ark. glukokortikoidlerin CD4(+) CD25(+) Treg hücrelerinin yüzdesini artırdığını göstermişler ve bu durumu özellikle otoimmün hastalıkların akut dönemlerinde bağışıklık sistemi yanıtının kontrolünün sağlanmasında glukokortikoid tedavisinin rolünü açıklamakta kullanmışlardır (246). Diğer bağışıklık sistemi işlevleri gibi stres sisteminin uyarılması ve glukokortikoid ve katekolaminlere maruziyet, Treg hücrelerinin sayı ve/ya işlevlerini değiştirir (247, 248). Bu etkinin glukokortikoid ile indüklenen TNF ilişkili reseptör (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related receptor; GITR) aracılığı ile meydana geldiği düşünülmektedir (236). GITR üzerinde yapılan agonist ve antagonist çalışmaları, GITR-ligandı uygulanan farelerde kısa sürede Treg hücrelerinin sayılarının arttığını göstermiştir (249).

Ancak literatür bilgileri incelendiğinde yukarıdaki çalışmalarla çelişen, farklı stres protokollerinin hücrelerinin aktivitesi ve sayısı üzerine etkisinin farklı sonuçlarının da bildirildiği görülmektedir.

Akut mental stresöre maruz kalan insanlarda CD4(+) FOXP3(+) Treg hücrelerin sayısının azaldığı, stresten sonra normal düzeye döndüğü gösterilmiştir (250). 2010 yılında Freier ve ark. periferik kanda dolaşan CD4(+) FOXP3(+) Treg hücrelerinin insanda mental stresle azaldığını bulmuşlar ve bu durumu otoimmünite gibi enflamatuvar durumlarda alevlenmeye neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (151). Ancak bu çalışmanın sonuçları Teff hücrelerinde de azalma olduğunu göstermektedir. Oysa beklenen yanıt Treg hücrelerindeki artışa diğer hücrelerdeki azalmanın eşlik etmesidir, bu durum belki çalışmanın stresten sonraki kısa süre içerisinde akut koşullarda yapılmış olması ile açıklanabilir. Bizim bulgularımız AS grubunda Treg hücrelerinin artışıyla beraber azalmış total lenfosit sayısını işaret etmektedir. Literatür bilgisini destekleyen bu sonuç, T ya da Th hücre grubunun toplamında fark yaratmamıştır ancak Th1/Th2 hücre dengesindeki kayma ile beraber değerlendirildiğinde Treg hücre artışından etkilenen hücrelerin kuvvetle B lenfositleri ve/ya Treg hücrelerinin baskıladığı diğer hücre grupları olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürdeki farklı sonuçlar Treg hücrelerinin tanımlanması için seçilen yöntem ile de ilişkilidir. CD25 yüzey antijeni, IL-2 reseptörünün alfa zincirinden

oluşmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda sadece Treg hücrelerin değil aynı zamanda aktive olmuş CD4(+) T hücreleri üzerinde eksprese edildiğini; FOXP3'ün ise hücre içi bir işaretçi, ana düzenleyici gen olması nedeni ile Treg hücrelerinin tanımlanmasında daha özgül olduğu ifade edilmektedir (251, 252). Çalışmamızda FOXP3 işaretleyicisini kullanamamış olmamız zayıf yönlerimizdendir. Ancak elde ettiğimiz sonuçlar yukarıda da belirtildiği gibi önceki bazı çalışmalar ile uyumludur, stresin bağışıklık sisteminin efektör ve düzenleyici hücrelerinin yanıtına etkisinin farklı olabileceği ve bu farkın mikro çevre, stres modeli, bireysel farklılıklar gibi pek çok faktör ile ilişkili dinamik bir sonucu olabileceği fikrini desteklemektedir (248).

Çalışmamızda KS grubundaki hayvanlarda Treg hücrelerinin sayısal olarak K grubundan farklı olmadığı, diğer bir söyleyiş ile AS grubunda artan Treg hücrelerinin kronik koşullarda normal değerlere düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar kronik dönemde strese maruz bırakılan farelerde Treg hücrelerinin oranının azaldığını gösteren Harpaz ve ark. bulgularını desteklemektedir. Bu azalmanın deneysel ensefalit gibi otoimmün hastalıkların alevlenmesinde rolü olabileceğini öne sürmüşlerdir (193). Sağlıklı bireylerden alınan örneklerin kullanıldığı hücre kültürü çalışmaları kronik deksametazon uygulanan hücrelerde FOXP3-mRNA düzeyinin kontrol seviyesinde olduğunu göstermiştir (253). Ayrıca akut stres yanıtlarında CD4(+) CD25(+) Treg hücrelerinde artan glukokortikoid reseptör ekspresyonu glukokortikoidlerin rolünün akut dönemde daha belirgin olabileceğini de işaret etmektedir (201).

Yapılan araştırmalar ve bizim sonuçlarımız stresin bağışıklık yanıtına etkisinin bir çok faktör ile değişebildiğini ortaya koymaktadır. Bunlar stresörün tipi, süresi, strese maruz kalan canlının türü, aynı tür içerisinde bireysel farklılıklar, stresten sonra etkinin gözleendiği süre, deneyin *in vivo* veya *in vitro* yapılmış olması ve mikroçevredeki çeşitli faktörler olabilir. Bu etkenler arasından mikroçevredeki faktörler, ör; sinerjistik veya karşıt etkili sitokinlerin bir arada olması, detaylı olarak incelenmemiştir. Bundan sonraki çalışmalarda bu faktörlerin göz önüne alınması stres ve bağışıklık sistemi ilişkisinin anlaşılmasında anahtar rol oynayacaktır.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde farelerde soğuk/hareketsizlik stresinin akut ve kronik koşullarda bağışıklık sistemi yanıtını farklı etkilediği görülmektedir. Kazanılmış bağışıklık yanıtının temel hücresi olarak nitelendirilen Th hücrelerini

incelediğimizde akut/kronik stresle bu hücre alt gruplarının farklı yönlerde kaydığı anlaşılmıştır. Ancak yukarıda da belirttiğimiz gibi ileri çalışmalarda özellikle indüklenebilen periferel Treg hücrelerinin ve sitokin havuzunun daha geniş ve ayrıntılı incelenmesi Th hücre yanıtının anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Ek olarak stres sisteminin OSS bileşeninin incelenmesi de bu konudaki bilgilerimizi daha ileriye taşıyacaktır. Tüm bu bilgiler, stresin insan sağlığı, hastalık mekanizmaları ve hastalıklara yatkınlık üzerindeki etkisinin, korunma ve tedavi seçeneklerinin açığa çıkmasına yol gösterecektir.

6.SONUÇ

Akut veya kronik strese maruz kalan farelerde, periferal kandaki yardımcı T hücreleri ve alt gruplarının incelendiği bu çalışmanın sonuçları şöyle özetlenebilir;

1. Akut stres protokolü plazma kortizol düzeylerini artırmış, kronik stres protokolü kortizol düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik yapmamıştır.
2. Akut veya kronik strese maruz kalan farelerde toplam beyaz küre sayısı artmıştır.
3. Akut veya kronik stres protokolleri total, T ve CD4(+) T lenfosit yüzdelерinde anlamlı değışikliğe neden olmamıştır.
4. Akut ya da kronik strese maruz kalan farelerde gözlenen beyaz küre sayısındaki artış lenfosit dışı bağışıklık sistemi hücrelerine bağlı olabilir.
5. Akut stres, Th1/Th17 hücre yanıtını artırmış, Th2 hücre yanıtını baskılamış, bağışıklık sistemi yanıtını hücresel yöne kaydırmıştır.
6. Kronik stres, Th2 hücre yanıtını güçlendirmiş Th1/Th17 hücre yanıtını baskılamış, bağışıklık sistemi yanıtını humoral yöne kaydırmıştır.
7. Th17 hücre yanıtında akut stres ile gözlenen artış, akut stres koşullarında otoimmün hastalıkların tetiklenmesi ve/ya alevlenmesini açıklayabilir.
8. Düzenleyici T hücre yüzdesi akut stres ile artmış, kronik stres koşullarında azalmıştır.
9. Bu değışiklikler ve akut ve kronik stres koşullarındaki farklılıklar glukokortikoidlerin akut dönemde Th2 hücre yanıtını doğrudan baskılaması ve böylece Th1 hücre yanıtını artırması ve düzenleyici T hücreleri üzerindeki etkileri ve bu hücrelerin aracılık ettiği dolaylı etki ile açıklanabilir.
10. Düzenleyici T hücreleri ve glukokortikoid reseptörlerinin biyolojik rolünü inceleyecek ileri çalışmalar, hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini ile OSS arasındaki bağlantıyı daha açık bir şekilde ele alarak periferal T hücre alt gruplarının işlev ve sayılarında stresle birlikte ortaya çıkan değışiklikleri açıklamaya yardımcı olacaktır.
11. Stresin bağışıklık yanıtına etkisi stresörün tipi, süresi, strese maruz kalan canlının türü, aynı tür içerisindeki bireysel farklılıklar, stresten sonra etkinin

gözlendiği süre, deneyin *in vivo* veya *in vitro* yapılmış olması ve mikroçevre gibi birçok faktör ile değişebilmektedir. Bu nedenle stres çalışmalarında sonuçların farklı olabileceği unutulmamalıdır.

12. Stresin tetiklediği hastalıkların, stresin beraberinde gözlenen metabolizma düzensizliklerinin ve kişide rastlanan davranış bozukluklarının sağaltım sürecinin zorluğu, ayrıca bu durumların devletlere getirdiği ekonomik yük, Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarına göre dünya genelinde çok yaygın ve sayıca fazladır. Stresin birçok hastalığın etiyolojisinde rol oynadığı düşünüldüğünden stresin hangi fizyolojik mekanizmaları aktive ederek bağışıklık sistemini etkilediğini anlamak, hastalıkların patogenezi açıklamak için gereklidir. Bağışıklık yanıtını etkileyen psiko-fizyolojik faktörlerin anlaşılması, ayrıca koruyucu önlemlerin ve/ya tedavilerin geliştirilmesini de kolaylaştıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Peter, J., Delves, D., Ivan, M., (2000). The Immune System. *N Engl J Med*, 343, 37-49.
2. Janeway, Ca. Jr., Medzhitov, R., (2002). Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
3. Bowie, Ag., Unterholzner, L., (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 911-922.
4. Pillai, S., (2010). Properties And Overview Of Immune Responses. Abbas, AK., Lichtman, H.A., Pillai, S.(Ed). *Cellular And Molecular Immunology* (6. bs)(s.1-8). Philadelphia: Saunders Elsevier.
5. Kuby, H., (1997). Overview of The Immune System: Cells and Organs of The Immune System. *Immunology*. (3. bs)(s.1-83). USA: W.H. Freeman And Company
6. Punt, J.A., Singer, A.T., (1997). Cell Development. Rich, RR., Fleisher, TA, Schwartz, B.D., Shearer, W.T., Strober, W.(Ed). *Clinical Immunology Principles and Practice* (1. bs) (s.157-176). St Louis: Mosby
7. Haynes, BF., Fauci, AS., (2001). Introduction of the Immune System. Braunwald, E., Fauci, AS., Kasper DL, .(Ed)(s.1805-1830). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (15. bs). New York: Mc Graw-Hill
8. Fike, DJ., (1997). Cells and Tissues of The Immune System. Sheehan, C. (Ed.) (s.7-18.). *Clinical Immunology Principles and Laboratory Diagnosis* (2. bs). Philadelphia : Lippincott - Raven Publishers
9. Moser, B., (2010). Basic Concepts in Immunology Murphy K.(Ed.)(s.10). *Janeway's Immunobiology* .(8. bs). New York: Garland Science
10. Dalva, K., Beksac, M., (1999). Mononüklear Hücrelerin Matürasyonu. Ustaçelebi Ş.(Ed)(s.153-159). *Temel Ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara : Güneş Kitabevi
11. Human Cell Differentiation Molecules.(2013). Erişim: 17 Nisan 2014,

<http://www.hcdm.org>

12. Chaplin, DD., (2010). Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 3-23.
13. Ciccone, E., Moretta, A., Moretta, L. (1992). Specific Functions Of Human NK Cells. *Immunol Lett.* 31(2), 99-103.
14. Yokoyama, WM., (1993). Recognition Structures on Natural Killer Cells. *Curr Opin Immunol.* 5(1), 67-73.
15. Warren, HS., Smyth, MJ. (1999). NK Cells and Apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 77(1), 64-75.
16. Hodgkin, PD., Heath, WR., Baxter, AG.(2007). The Clonal Selection Theory: 50 Years Since the Revolution. *Nat Immunol.* 8(10), 1019-1026.
17. Bonilla, FA., Oettgen HC. (2010). Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 33-40.
18. Kılıçturgay, K., (2003). Kan Hücrelerinin Gelişimi. (s.15-51) *İmmünoloji*. Bursa: Nobel&Güneş Kitabevi
19. Imboden Jb. (1997) T Lymphocytes&Natural Killer Cells. Stites, DP., Terr, AI., Parslow, TG .(Ed). *Medical Immunology*. (9. bs) (s.130-145). California: Appleton & Lange
20. Anderson, G., Hare, KJ., Jenkinson, EJ.(1999). Positive Selection of Thymocytes: The Long and Winding Road. *Immunol Today.* 20(10), 463-468.
21. Huston, D.P., (1997). The biology of the immune system, *JAMA*, 278, 1804–1814
22. Chinen, J., Finkelman, F., Shearer, WT.(2006). Advances In Basic And Clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol*, 118(2), 489-495.
23. Kindt, TJ., Goldsby, RA., Osborne, BA., Kuby J.(2007). Major Histocompatibility Complex.(s.223-248). *Kuby Immunology*. New York: Macmillan

24. Weiss, A., Littman, DR., (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 76(2), 263-274.
25. Samelson, LE., Donovan, JA., Isakov, N., Ota, Y., Wange, RL., (1995). Signal Transduction Mediated by the T-Cell Antigen Receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 7(766), 157-172.
26. Romagnani, S., (2000). T-Cell Subsets (Th1 Versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 85(1), 9-18.
27. Araslı, M., (1999). Lökosit Yüzey Molekülleri (s.21-32). Yılmaz MT. Deniz G.(Ed.). *Flow Sitometri ve Tıpta Kullanımı*. İstanbul: Bilim Medya Grup.
28. Sasada, T., Reinherz, EL., (2001). A critical role for CD2 in both thymic selection events and mature T cell function. *J Immunol*, 166(4), 2394-2403.
29. Mosmann, TR., Cherwinski, H., Bond, MW., Giedlin, MA., Coffman, RL., (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition According To Profiles Of Lymphokine Activities And Secreted Proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
30. Maniati, EL., Soper, R., Hagemann, T.(2010). Up for mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene*. 29(42), 5653-62.
31. Mesquita Jr, D., Cruvinel, WM., Câmara, NOS., Kállas EG., Andrade LEC., (2009). Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res* 42, 476-486.
32. Fehérvári, Z., Sakaguchi, S. (2004). CD4(+) Tregs and Immune Control. *J Clin Invest*. 114(9), 1209-17.
33. Bi, Y., Liu, G., Yang, R.(2007). Th17 Cell Induction and Immune Regulatory Effects. *J Cell Physiol*. 211(2), 273-8.
34. Mosmann, TR., Sad, S., (1996). The Expanding Universe of T-Cell Subsets: Th1, Th2 and More. *Immunol. Today*. 17, 138–146.
35. Fearon, DT., Locksley RM., (1996). The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response. *Science*. 272, 50–53.

36. Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133–146.
37. Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13, 139-145.
38. Ouyang, W., Kolls, JK., Zheng, Y., (2008). The Biological Functions of T helper-17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity*, 28, 454-467.
39. Kao, CY., Chen, Y., Thai, P., Wachi, S., Huang, F., Kim, C., Harper, RW., Wu, R. (2004). IL-17 Markedly Up-Regulates Beta-Defensin-2 Expression In Human Airway Epithelium via JAK and NF-kappa B Signaling Pathways. *J Immunol*, 173, 3482-3491.
40. Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, DJ., Takayanagi, H. (2006). Th17 Functions as an Osteoclastogenic Helper T Cell Subset that Links T Cell Activation and Bone Destruction. *J Exp Med* 203, 2673-2682.
41. Bush, KA., Farmer, KM., Walker JS., Kirkham, BW. (2002). Reduction of Joint Inflammation and Bone Erosion In Rat Adjuvant Arthritis by Treatment with Interleukin-17 Receptor Ig-G1 Fc Fusion Protein. *Arthritis Rheum*, 46, 802-805.
42. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., Iwakura, Y. (2003). Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis In IL-17 Deficient Mice. *J Immunol*, 171, 6173-6177.
43. Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., Iwakura, Y. (2006). IL-17 Plays an Important Role In The Development Of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 177, 566-573.
44. Wang, Y., Wu, LP., Fu, J., Lv, HJ., Guan Xy, Xu L, Chen P, Gao Cq, Hou P, Ji Mj, Shi By. (2013). Hyperthyroid Monkeys: A Nonhuman Primate Model Of Experimental Graves' Disease. *J Endocrinol.* 219(3), 183-93.
45. Torchinsky, MB., Blander, Jm. (2010). *Cell Mol Life Sci.* May;67(9):1407-21 .T Helper 17 Cells: Discovery, Function, And Physiological Trigger.

46. Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., Sakaguchi, S. (1998). Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25(+)CD4(+) Naturally Anergic and Suppressive T Cells: Induction of Autoimmune Disease by Breaking Their Anergic/Suppressive State. *Int Immunol*, 10(12), 1969-80.
47. Thornton, AM., Shevach, EM. (1998). CD4(+)CD25(+) Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation in Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production, *J Exp Med*. 188(2), 287-96.
48. Liston, A., Gray, DH. (2014). Homeostatic Control of Regulatory T Cell Diversity. *Nat Rev Immunol*. 14(3), 154-65.
49. Lehtimäki, S., Lahesmaa, R.(2013). Regulatory T Cells Control Immune Responses Through Their Non-Redundant Tissue Specific Features. *Front Immunol*. 4, 294.
50. Mempel, TR., Pittet, MJ., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., Von Boehmer, H., Von Andrian, UH. (2006) Regulatory T Cells Reversibly Suppress Cytotoxic T Cell Function Independent Of Effector Differentiation. *Immunity*. 25(1), 129-41.
51. Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., Powell, J.D., Pardoll, D.M., Drake, C.G., Vignali, D.A., (2004). Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* 21(4), 503—513.
52. Kim, HR., Moon, S., Lee, HK., Kang, JL., Oh, S., Seoh, JY. (2012)..; Immune Dysregulation in Chronic Stress: a Quantitative and Functional Assessment of Regulatory T Cells. *Neuroimmunomodulation*. 19(3), 187-94.
53. Marie, JC., Letterio, JJ., Gavin, M., Rudensky, AY. (2005). TGF-Beta1 Maintains Suppressor Function And Foxp3 Expression in CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells. *J Exp Med*, 201(7), 1061-7.
54. Bolaman, Z., Müftüoğlu, E., Bilgiç, O., Ertan, S. (1993). *İmmünoloji* . Müftüoğlu E. (Ed.) (s.77-100). İzmir: Saray Medikal Yayıncılık
55. Oppenheim, JJ., Ruscetti, FW. (2001) Cytokines. Parslaw TG, Stites OP, Terr AI,

- Imoden JB (Eds). *Lange Medical Immunology*. (10. Bs) (s.148-167). New York: Lange Medical Books/Mc Graw Hill
56. Elgert, KDA., (1996). *Immunology: Understanding The Immune System* (s.199-217). New York: John Wiley & Sons Inc Publishing Company
 57. Abbas, AK., Lichtman, AH., Shiv, P., (2010). Cytokines. *Cellular and Molecular Immunology* (6. bs) (s.249-278). , Philadelphia: Saunders Elsevier,
 58. Vilcek, J. (2003). The Cytokines: An Overview. Thomson AW, Lotze MT (Eds). *The Cytokines Handbook* (4. bs.)(s.3-19) Oxford: Elsevier Science Ltd.
 59. Gallo, E., Katzman, S., Villarino, AV. (2012). IL-13-Producing Th1 and Th17 Cells Characterize Adaptive Responses To Both Self And Foreign Antigens. *Eur J Immunol.* 42(9), 2322-8.
 60. Rosloniec, EF., Latham, K., Guedez, YB.(2002). Paradoxical Roles Of IFN-Gamma in Models of Th1-Mediated Autoimmunity. *Arthritis Res.* 4(6), 333-6.
 61. Hemdan, NY., Birkenmeier, G., Wichmann, G., Abu El-Saad, AM., Krieger, T., Conrad, K., Sack, U. (2010). Interleukin-17 Producing T Helper Cells In Autoimmunity. *Autoimmunity Reviews.* 9(11), 785–792.
 62. Jansen, JH., Fibbe, WE., Willemze, R., Kluin-Nelemans, JC. (1990). Interleukin-4: A Regulatory Protein. *Blut.* 60(5), 269-74.
 63. O'Garra, A., Murphy, K. (1996). Role Of Cytokines In Development of Th1 and Th2 Cells. *Chem Immunol.* 63, 1-13.
 64. Takeda, K., Kishimoto, T., Akira, S. (1997). STAT6: Its Role In Interleukin-4 Mediated Biological Functions. *J Mol Med.* 75(5), 317-26.
 65. Moore, KW., O'Garra, A., De Waal Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, TR. (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 11, 165-90.
 66. Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., (1996). T Cell Interleukin-17 Induces Stromal Cells to Produce Proinflammatory and

Hematopoietic Cytokines. *J Exp Med.* 183(6),2593-603.

67. Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., (2001). IL-17 is Increased in Asthmatic Airways and Induces Human Bronchial Fibroblasts To Produce Cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 108, 430-38.
68. Park, H., Li, Z., Yang, XO., Chang, SH., Nurieva, R. (2005). A Distinct Lineage Of CD4 T Cells Regulates Tissue Inflammation By Producing Interleukin 17. *Nat Immunol.* 6,1133-41.
69. Yao, Z., Fanslow, WC., Seldin, MF., Rousseau, AM., Painter, SL. (1995). Herpesvirus Saimiri Encodes a New Cytokine, IL-17, Which Binds To A Novel Cytokine Receptor. *Immunity.* 3,811-21.
70. Yang, XO., Chang, SH., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L. (2008). Regulation of Inflammatory Responses by IL-17F. *J Exp Med.* 205,1063-75.
71. Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., (2006). Interleukin-17 is a Negative Regulator of Established Allergic Asthma. *J Exp Med.* 203, 2715-25.
72. Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I.(2002) Antigen-Specific T Cell Sensitization Is Impaired In IL-17-Deficient Mice, Causing Suppression Of Allergic Cellular and Humoral Responses. *Immunity* 17, 375-87.
73. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., Iwakura, Y.(2003). Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis in IL-17-Deficient Mice. *J Immunol*, 171, 6173-7.
74. Sanchez, MM., Ladd, CO., Plotsky, PM.(2001). Early Adverse Experience As A Developmental Risk Factor For Later Psychopathology: Evidence From Rodent And Primate Models. *Dev. Psychopathol.* 13, 419-449.
75. Selye, H., (1976). Forty Years Of Stress Research: Principal Remaining Problems and Misconceptions, *Can Med Assoc J.* 115, 53-56.

76. Selye, H. (1956)., *The Stress Of Life*, New York: Mcgraw-Hill
77. Koolhaas, JM., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, SF., Flügge, G., Korte, SM., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T, Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E. (2011). Stress Revisited: A Critical Evaluation Of The Stress Concept. *Neurosci Biobehav Rev*, 35, 1291-1301,
78. Chrousos, GP., (2009). Stress and Disorders of the Stress System. *Nat Rev Endocrinol*. 5, 374-381.
79. Chrousos, GP., Gold, PW.(1992). The Concepts Of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA* 267(9), 1244-52.
80. Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, GP,. Endocrinology of Stress Response. *Ann. Rev. Physiol*. 67, 259-284.
81. Brown, KJ., Grunberg, NE.(1995). Effects of Housing on Male and Female Rats: Crowding Stresses Male But Calm Females. *Physiol Behav*. 8(6), 1085-9.
82. Bowman, RE., Zrull, MC., Luine, VN. (2001). Chronic Restraint Stress Enhances Radial Arm Maze Performance In Female Rats. *Brain Res*. 904(2), 279-89.
83. Endo, Y., Shiraki, K.(2000). Behavior and Body Temperature in Rats Following Chronic Foot Shock or Psychological Stress Exposure. *Physiol Behav*. 71(3-4), 263-8.
84. Stefanski, V. (2000). Social Stress In Laboratory Rats: Hormonal Responses And Immune Cell Distribution. *Psychoneuroendocrinology* 25(4), 389-406.
85. Cryan, JF., Valentino RJ., Lucki, I. (2005). Assessing Substrates Underlying The Behavioral Effects Of Antidepressants Using The Modified Rat Forced Swimming Test. *Neurosci Biobehav Rev*. 29(4-5), 547–569
86. Schmidt, D., Reber, SO., Botteron, C., Barth, T., Peterlik, D. Uschold N., Männel DN., Lechner, A. (2010). Chronic Psychosocial Stress Promotes Systemic Immune Activation And The Development Of Inflammatory Th Cell Responses. *Brain Behav Immun*. 24(7), 1097–1104.

87. Nakamura, T., Walker, AK., Sominsky, L., Allen, T., Rosengren, S., Hodgson, DM. (2011). Maternal Separation In Early Life Impairs Tumor Immunity In Adulthood In The F344 Rat. *Stress* 14(3): 335-343.
88. Baum, A., Koman, S.,(1976). Differential Responses To Anticipated Crowding: Psychological Effects Of Social And Spatial Density. *J. Pers. Soc. Psychol.* 34, 526-536.
89. Palanza, P., Gioiosa, L., Parmigiani, S. (2001). Social Stress In Mice: Gender Differences And Effects Of Estrous Cycle And Social Dominance. *Physiol Behav.* 73(3),411-20.
90. Fritzsche, P., Riek, M., Gattermann, R.(2000). Effects Of Social Stress On Behavior And Corpus Luteum In Female Golden Hamsters (*Mesocricetus Auratus*). *Physiol Behav.* 68(5),625-30
91. Anderson, SM., Saviolakis, GA., Bauman, RA., Chu, KY., Ghosh, S., Kant, GJ.(1996). Effects of Chronic Stress on Food Acquisition, Plasma Hormones, And The Estrous Cycle of Female Rats. *Physiol Behav.* 60(1):325-9.
92. Marchlewska-Koj, A., Pochron, E., Galewicz-Sojecka, A., Galas, J. (1994) Suppression Of Estrus In Female Mice By The Presence Of Conspecifics Or By Foot Shock. *Physiol Behav.* 55(2), 317-21
93. Pacák, K, Palkovits, M., Kvetnanský, R., Yadid, G., Kopin, IJ., Goldstein, DS. (1995). Effects Of Various Stressors On In Vivo Norepinephrine Release In The Hypothalamic Paraventricular Nucleus And On The Pituitary-Adrenocortical Axis. *Ann N Y Acad Sci.* 29(771), 115-30.
94. Raap, DK., Morin, B., Medici, CN., Smith, RF.(2000). Adolescent Cocaine and Injection Stress Effects on the Estrous Cycle. *Physiol Behav.* 70(5), 417-24.
95. Hatanaka, K., Ikegaya, H., Takase, I., Kobayashi, M., Iwase, H., Yoshida, K. (2001). Immobilization Stress-Induced Thymocyte Apoptosis In Rats. *Life Sci.* 69(2),155-65.
96. Jeong, KH., Jacobson, L., Widmaier, EP., Majzoub, JA. (1999). Normal Suppression

- Of The Reproductive Axis Following Stress In Corticotropin-Releasing Hormone-Deficient Mice. *Endocrinology*. 140(4), 1702-8.
97. Stepanov, MG., Savchenko, ON., Proïmina, FI., Altukhov, VV. (1991). Hormonal Regulation of Reproductive Function in Rats in Response to Cold Stress in a Context of Chronic Toluene Poisoning. *Probl Endokrinol* 37(3), 59-61.
 98. Young BA.(1981). Cold Stress As It Affects Animal Production. *J Anim Sci* 52(1), 154-63.
 99. Sesti-Costa, R., Baccan, GC., Chedraoui-Silva, S., Mantovani, B. (2010) Effects Of Acute Cold Stress On Phagocytosis Of Apoptotic Cells: The Role Of Corticosterone. Neuroimmunomodulation. 17(2),79-87.
 - 100.Nappi, RE., Petraglia, F., Guo, AL., Criscuolo, M., Trentini, GP., Genazzani, AR. (1996). Estrous Cycle- And Acute Stress-Related Changes Of Rat Ovarian Immunoreactive Corticotropin-Releasing Factor. *Gynecol Endocrinol*. 10(2), 75-82.
 - 101.Moberg, GP., Mench, JA.(2000). Basic Principles And Implications For Animal Welfare. *The Biology Of Animal Stress*. New York: CABI Publishing
 - 102.Mackowiak, PA. (1998). Concepts Of Fever. Evaluates The History Of Fever In Medicine And The Many Benefits Conferred By The Process Defined As Fever. *Arch Intern Med* 158, 17-1870.
 - 103.Chrousos, GP., (2002). Organization and Integration of the Endocrine System (s. 1-14). Sperling, M.,(Ed). *Pediatric Endocrinology*, Philadelphia: Saunders
 - 104.Stratakis, CA., Chrousos, GP. (1995). Neuroendocrinology and Pathophysiology of the Stress System. *Ann N Y Acad Sci*. 771, 1-18.
 - 105.Gross, KL., Lu, NZ., Cidlowski, JA. (2009)., Molecular Mechanisms Regulating Glucocorticoid Sensitivity And Resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 300, 7-16.
 - 106.Oakley, RH., Cidlowski, JA., (2011). Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms For Generating Tissue-Specific Actions

Of Glucocorticoids. *J Biol Chem* 286, 3177-3184.

- 107.Elenkov, IJ., Chrousos, GP. (2006). Stress System-Organization, Physiology And Immunoregulation. *Neuroimmunomodulation*. 13(5-6), 257-67.
- 108.Frankenhaeuser, M., Mellis, I., Rissler, A., Björkvall, C., Pátkai, P. (1968). Catecholamine Excretion As Related To Cognitive And Emotional Reaction Patterns. *Psychosom Med*. 30(1), 109-24.
- 109.Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J.(1981). Characterization Of a 41-Residue Ovine Hypothalamic Peptide that Stimulates Secretion of Corticotropin and Beta-Endorphin. *Science*. 213, 1394-1397.
- 110.Grigoriadis, DE., (2005). The Corticotropin-Releasing Factor Receptor: A Novel Target For The Treatment Of Depression And Anxiety-Related Disorders. *Expert Opin Ther Targets*. 9, 651-684.
- 111.Paul, SM., Purdy, RH. (1992). Neuroactive Steroids. *FASEB J* 6,2311-2322
- 112.McEwen, BS. (1991). Non-Genomic And Genomic Effects Of Steroids On Neural Activity. *Trends Pharmacol Sci*; 12, 141-147
- 113.Ramirez, VD., Zheng, J. (1996). Membrane Sex-Steroid Receptors In The Brain. *Front Neuroendocrinol*. 17,402-439
- 114.Baulieu, EE. (1998). Neurosteroids: a Novel Function of the Brain. *Psychoneuroendocrinology* 23, 963-987.
- 115.Charmandari, E., Kino, T., Souvatzoglou, E., Chrousos GP.(2003). Pediatric Stress: Hormonal Mediators and Human Development. *Horm Res* 59, 161- 179
- 116.Nader N., Chrousos GP., Kino T., (2009). Circadian Rhythm Transcription Factor CLOCK Regulates The Transcriptional Activity Of The Glucocorticoid Receptor By Acetylating Its Hinge Region Lysine Cluster: Potential Physiological Implications. *FASEB J*. 23, 1572-1583.
- 117.Nader N., Chrousos GP., Kino T., (2010). Interactions Of The Circadian CLOCK

System And The HPA Axis. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 277-286

- 118.Chrousos GP., Kino T., (2011). Circadian CLOCK-Mediated Regulation Of Target-Tissue Sensitivity To Glucocorticoids: Implications For Cardiometabolic Diseases. *Endocr. Dev.* 20, 116-126.
- 119.Wyrwoll, CS., Holmes MC., Seckl JR., (2011). 11 α -Hydroxysteroid Dehydrogenases and The Brain: From Zero To Hero, A Decade Of Progress. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 265-286.
- 120.Holmes, MC., Carter RN., Noble J., Chitnis S., Dutia A., Paterson JM., Mullins JJ., Seckl JR., Yau JL.(2010). 11 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type-1 Expression is Increased in The Aged Mouse HippoCampus and Parietal Cortex and Causes Memory Impairments. *J. Neurosci.* 30, 6916-6920
- 121.Sooy, K., Webster, SP., Noble, J., Binnie, M., Walker, BR., Seckl JR., Yau JLW., (2010). Partial Deficiency Or Short-Term Inhibition Of 11- α Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Improves Cognitive Function In Aging Mice. *J. Neurosci.* 30, 13867-13872.
- 122.Cottrell EC., Holmes MC., Livingstone DE., Kenyon CJ., Seckl JR., (2012). Reconciling The Nutritional And Glucocorticoid Hypotheses Of Fetal Programming. *FASEB J.* 26, 1866-1874
- 123.Miller, WL., Huang, N., Agrawal V., Giacomini KM., (2009). Genetic Variation in Human P450-oxidoreductase. *Mol Cell Endocrinol*,300, 180-184.
- 124.McEwen, BS, Wingfield, JC. (2010). What is in a name? Integrating Homeostasis, Allostasis and Stress. *Horm Behav.* 57(2), 105-11.
- 125.Dhabhar, FS., McEwen, BS.(1997). Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity In Vivo: A Potential Role For Leukocyte Trafficking. *Brain Behav Immun* 11(4), 286-306.
- 126.Dhabhar, FS., McEwen, BS., Spencer RL.(1997). Adaptation To Prolonged Or Repeated Stress--Comparison Between Rat Strains Showing Intrinsic Differences In

- Reactivity To Acute Stress. *Neuroendocrinology*. 65(5),360-8.
- 127.Laukova, M., Vargovic, P., Vlcek, M., Lejavova, K., Hudecova, S., Krizanova, O., Kvetnansky, R (2013). Catecholamine Production is Differently Regulated in Splenic T and B-Cells Following Stress Exposure. *Immunobiology*. 218(5), 780-9.
 - 128.Dhabhar, FS., (2009). Enhancing Versus Suppressive Effects Of Stress On Immune Function: Implications For Immunoprotection and Immunopathology. *Neuroimmunomodulation*; 16, 300-317.
 - 129.Chryssikopoulos, A.(1997). The Relationship Between The Immune and Endocrine Systems. *Ann N Y Acad Sci*. 816, 83-93.
 - 130.Mormede, P., Dantzer, R., Michaud, B., Kelley, KW., Le Moal, M. (1988). Influence Of Stressor Predictability And Behavioral Control On Lymphocyte Reactivity, Antibody Responses And Neuroendocrine Activation In Rats. *Physiol Behav*. 43(5), 577-83.
 - 131.Schedlowski, M., Wiechert, D., Wagner, TO., Tewes, U.(1992). Acute Psychological Stress Increases Plasma Levels Of Cortisol, Prolactin and TSH. *Life Sci*. 50(17),1201-5.
 - 132.Rinner, I., Schauenstein, K., Mangge, H., Porta, S., Kvetnansky, R. (1992). Opposite Effects of Mild and Severe Stress on in Vitro Activation of Rat Peripheral Blood Lymphocytes. *Brain Behav Immun*. 6, 130-140.
 - 133.Sudo, N., Yu, XN, Sogawa H, Kubo C (1997). Restraint Stress Causes Tissue-Specific Changes in the Immune Cell Distribution. *Neuroimmunomodulation*, 4, 113-119.
 - 134.Dhabhar, FS., Malarkey, WB., Neri, E., McEwen BS. (2012). Stress-Induced Redistribution Of Immune Cells--From Barracks To Boulevards To Battlefields: A Tale Of Three Hormones-Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*. 37(9):1345-68.
 - 135.Benschop, RJ., Jacobs, R., Sommer, B., Schürmeyer, TH., Raab, JR., Schmidt, RE., Schedlowski, M. (1996). Modulation of the Immunologic Response to Acute Stress in

Humans by Beta-Blockade or Benzodiazepines. *FASEB J.* 10(4), 517-24.

136. Fauci, AS., Dale, DC. (1974). The Effect Of In Vivo Hydrocortisone On Subpopulations Of Human Lymphocytes. *J Clin Invest.* 53(1), 240-6.
137. Schedlowski, M., Falk, A., Rohne, A., Wagner, TO., Jacobs, R., Tewes, U., Schmidt, RE.(1993) Catecholamines Induce Alterations Of Distribution And Activity Of Human Natural Killer Cells. *J Clin Immunol.* 13(5), 344-51.
138. Cacioppo JT, Poehlmann KM, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Burleson MH, Berntson GG, Glaser R.(1998). Cellular Immune Responses To Acute Stress In Female Caregivers Of Dementia Patients And Matched Controls. *Health Psychol.* 17(2), 182-9.
139. Kiecolt-Glaser JK, Dyer CS, Shuttleworth EC.(1988). Upsetting Social Interactions And Distress Among Alzheimer's Disease Family Care-Givers: A Replication And Extension. *Am J Community Psychol.* 16(6), 825-37.
140. Kennedy, S., Kiecolt-Glaser, JK., Glaser R, (1988) Immunological Consequences Of Acute And Chronic Stressors: Mediating Role Of Interpersonal Relationships., *Br J Med Psychol.* 61(1), 77-85.
141. Bosch, JA., Berntson, GG., Cacioppo, JT., Dhabhar, FS., Marucha, PT. (2003). Acute Stress Evokes Selective Mobilization Of T Cells That Differ In Chemokine Receptor Expression: A Potential Pathway Linking Immunologic Reactivity To Cardiovascular Disease. *Brain Behav Immun.* 17(4):251-9.
142. Brosschot, JF., Benschop, RJ., Godaert, GL., Olf, M., De Smet, M., Heijnen, CJ., Ballieux, RE.(1994). Influence of Life Stress on Immunological Reactivity to Mild Psychological Stress. *Psychosom Med.* 56(3), 216-24.
143. Mills, PJ., Berry, CC., Dimsdale, JE., Ziegler, MG., Nelesen, RA., Kennedy BP. (1995). Lymphocyte Subset Redistribution In Response To Acute Experimental Stress: Effects Of Gender, Ethnicity, Hypertension and The Sympathetic Nervous System. *Brain Behav Immun.* 9(1):61-9.

- 144.Stefanski, V., Grüner, S. (2006). Gender Difference In Basal And Stress Levels Of Peripheral Blood Leukocytes In Laboratory Rats. *Brain Behav Immun.* 20(4), 369-77.
- 145.Scheu, S., Stetson, DB., Reinhardt, RL., Leber, JH., Mohrs, M., Locksley, RM. (2006). Activation Of The Integrated Stress Response During T Helper Cell Differentiation. *Nat Immunol.* 7(6), 644-51.
- 146.Awasthi, A., Kuchroo, VK. (2009). IL-17A Directly Inhibits TH1 Cells And Thereby Suppresses Development Of Intestinal Inflammation. *Nat Immunol.* 10(6), 568-70.
- 147.Hemdan, NY., Abu El-Saad, AM., Sack, U. (2013). The Role Of T Helper (TH)17 Cells As A Double-Edged Sword In The Interplay Of Infection And Autoimmunity With A Focus On Xenobiotic-Induced Immunomodulation. *Clin Dev Immunol.* 2013, 374769.
- 148.Hong, M., Zheng, J., Ding, ZY., Chen, JH., Yu, L., Niu, Y., Hua, YQ., Wang, LL.. (2013). Imbalance Between Th17 And Treg Cells May Play An Important Role In The Development Of Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression In Mice. *Neuroimmunomodulation.* 20(1), 39-50.
- 149.Dube, SR., Fairweather, D., Pearson, WS., Felitti, VJ., Anda, RF., Croft, JB. (2009). Cumulative Childhood Stress and Autoimmune Diseases In Adults. *Psychosom Med.* 71(2), 243-50.
- 150.Masi, F., Leggio, B., Nanni, G., Scheggi, S., De Montis, MG., Tagliamonte, A., Grappi, S., Gambarana C. (2003). Effects Of Long-Term Acetyl-L-Carnitine Administration In Rats-II: Protection Against The Disrupting Effect of Stress on the Acquisition of Appetitive Behavior. *Neuropsychopharmacology.* 28(4), 683-93.
- 151.Freier, E., Weber, CS., Nowottn, U., Horn, C., Bartels, K., Meyer, S., Hildebrandt, Y., Luetkens, T., Cao, Y., Pabst, C., Muzzulini, J., Schnee, B., Brunner-Weinzierl, MC., Marangolo, M., Bokemeyer, C., Deter, HC., Atanackovic, D. (2010). Decrease of CD4(+)FOXP3(+) T Regulatory Cells In The Peripheral Blood Of Human Subjects Undergoing A Mental Stressor. *Psychoneuroendocrinology.* 35(5), 663-73.
- 152.Schmidt, D., Reber, SO., Botteron, C., Barth, T., Peterlik, D., Uschold, N., Männel,

- DN., Lechner, A.(2010). Chronic Psychosocial Stress Promotes Systemic Immune Activation and The Development Of Inflammatory Th Cell Responses. *Brain Behav Immun.* 24(7), 1097-104.
- 153.Korneva, EA., Rybakina, EG., Orlov, DS., Shamova, OV., Shanin, SN., Kokryakov, VN.(1997). Interleukin-1 And Defensins In Thermoregulation, Stress, And Immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 813, 465-73.
- 154.Schweizer, MC., Henniger, MS., Sillaber, I .(2009). Chronic Mild Stress (CMS) In Mice: Of Anhedonia, 'Anomalous Anxiolysis' And Activity. *Plos One.* 4(1), E4326.
- 155.Collins L., (2007). Body Fluids In The Hematology Laboratory Bernadette, FR., George, A., Doig, FK. (Ed) (s.205-206) *Hematology: Clinical Principles & Applications.* Missouri: Saunders Elsevier
- 156.Givan, AL.,(2004). Flow Cytometry: An Introduction. Hawlet TS, Hawley RG. (Ed). *Flow Cytometry Protocols*, (2.bs) (s.1-31). , New Jersey: Humana Press Inc
- 157.Dean, PN.(1997). Overview Of Flow Cytometry Instrumentation (Unit:1.1.1-1.1.8). *Current Protocols In Cytometry*, New York: John Wiley & Sons Inc.
- 158.Rose, AS., Knox, KS.(2007). Bronchoalveolar Lavage As A Research Tool. *Semin Respir Crit Care Med.* 28(5),561-73.
- 159.Ozdogu, H., Sozer, O., Boga, C., Kozanoglu, I., Maytalman, E., Guzey, M. (2007). Flow Cytometric Evelation Of Circulating Endothelial Cells: A New Protocol For Identifying Endothelial Cells At Several Stages Of Differentiation. *Am J Hematol.* 82(8), 706-115.
- 160.Nguyen, A., Henry, J.,(2001). Principles Of Instrumentation. Henry J. (Ed). *Clinical Diagnosis And Management By Laboratory Methods.* (20.bs.) (s.60-78). Philadelphia: W. B. Saunders
- 161.Principle of Laser Flow Cytometry.(2013). Erişim: 17 Nisan 2014, <http://www.ptb.de/cms/en/fachabteilungen/abt8/fb-83/ag-832/laser-durchfl-zytometrie.html>

- 162.Rowshan, A.(2000). *Stres Yönetimi* (2.bs). İstanbul:Sistem Yayıncılık.
- 163.Bowers, SL., Bilbo, SD., Dhabhar, FS., Nelson, RJ.(2008). Stressor-Specific Alterations In Corticosterone And Immune Responses In Mice. *Brain Behav Immun*, 22(1), 105-13.
- 164.Dhabhar, FS., Satoskar, AR., Bluethmann, H., David, JR., McEwen, BS. (2000). Stress-Induced Enhancement Of Skin Immune Function: A Role For IFN- γ . *PNAS*, 97, 2846–2851.
- 165.Viswanathan, K., Dhabhar, FS.(2005). Stress-Induced Enhancement of Leukocyte Trafficking Into Sites Of Surgery or Immune Activation *PNAS*, 102, 5808–5813.
- 166.Viswanathan, K., Daugherty, C., Dhabhar, FS.(2005). Stress As An Endogenous Adjuvant: Augmentation Of The Immunization Phase Of Cell-Mediated Immunity. *Int. Immunol.*, 17, 1059–1069.
- 167.Dhabhar, FS.Viswanathan, K., (2005). Short-Term Stress Experienced At Time Of Immunization Induces A Long-Lasting Increase In Immunologic Memory. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, R738–R744.
- 168.Glavin, G., Paré, W., Sandbak, T., Bakke, H., Murison, R.(1994). Restraint Stress In Biomedical Research: An Update. *Neurosci Biobehavioral Rev.* 18(2), 223-49.
- 169.Keim, K., Sigg, E.(1976). Physiological And Biochemical Concomitants Of Restraint Stress In Rats. *Pharmacol.Biochem Behav.* 4, 289-97.
- 170.Kvetnansky, R., Weise, V., Gewirtz, GP., Kopin, I.(1971). Synthesis Of Adrenal Catecholamines In Rats During And After Immobilization Stress. *Endocrinol.* 89, 46-9.
- 171.Elenkov, IJ., Chrousos GP.(2002). Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines and Autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 966, 290-303.
- 172.Hellhammer, DH., Wüst, S., Kudielka, BM.(2009). Salivary Cortisol as a Biomarker In Stress Research. *Psychoneuroendocrinology.* 34(2), 163-71.

173. Nater, UM., Maloney, E., Boneva, RS., Gurbaxani, BM., Lin, JM., Jones, JF., Reeves, WC., Heim, C.(2008). Attenuated Morning Salivary Cortisol Concentrations in a Population-Based Study of Persons With Chronic Fatigue Syndrome And Well Controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(3), 703-9.
174. Dickerson, SS., Kemeny, ME.(2004). Acute Stressors And Cortisol Responses: A Theoretical Integration And Synthesis Of Laboratory Research. *Psychol Bull.* 130(3), 355-91.
175. Lacey, K., Zaharia, MD., Griffiths, J., Ravindran, AV., Merali, Z., Anisman, H.(2000). A Prospective Study of Neuroendocrine and Immune Alterations Associated With The Stress of an Oral Academic Examination Among Graduate Students. *Psychoneuroendocrinology.* 25(4), 339-56.
176. Murphy, L., Denis, R., Ward, CP., Tartar, JL.(2010). Academic Stress Differentially Influences Perceived Stress, Salivary Cortisol, And Immunoglobulin-A In Undergraduate Students. *Stress.* 13(4), 365-70.
177. Weekes, N., Lewis, R., Patel, F., Garrison-Jakel, J., Berger, DE., Lupien, SJ. (2006). Examination Stress As An Ecological Inducer Of Cortisol And Psychological Responses To Stress In Undergraduate Students. *Stress* 9(4), 199-206.
178. Hulme, PA., French, JA., Agrawal, S.(2011). Changes In Diurnal Salivary Cortisol Levels In Response To An Acute Stressor In Healthy Young Adults. *J Am Psychiatr Nurses Assoc.* 17(5), 339-49.
179. Takatsuji, K., Sugimoto, Y., Ishizaki, S., Ozaki, Y., Matsuyama, E., Yamaguchi, Y.(2008). The Effects Of Examination Stress On Salivary Cortisol, Immunoglobulin A, And Chromogranin A In Nursing Students. *Biomed Res.* 29(4), 221-4.
180. Vedhara K, Shanks N, Anderson S, Lightman S.(2000). The Role of Stressors and Psychosocial Variables In The Stress Process: A Study Of Chronic Caregiver Stress. *Psychosom Med.* 62(3), 374-85.
181. Rao, U., Hammen, C., Ortiz, LR., Chen, LA., Poland, RE.(2008). Effects of Early and Recent Adverse Experiences on Adrenal Response to Psychosocial Stress in

- Depressed Adolescents. *Biol Psychiatry*. 64(6), 521-6.
- 182.Jerjes, WK., Taylor, NF., Wood, PJ., Cleare, AJ.(2007). Enhanced Feedback Sensitivity To Prednisolone In Chronic Fatigue Syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 32, 192–198.
 - 183.Adam, EK., Hawkley, LC., Kudielka, BM., Cacioppo, JT.(2006). Day-To-Day Dynamics Of Experience–Cortisol Associations In A Population-Based Sample Of Older Adults. *Proc Natl Acad Sci*. 103, 17058–17063.
 - 184.Ranjit, N., Young, EA., Kaplan, GA.(2005). Material Hardship Alters The Diurnal Rhythm Of Salivary Cortisol. *Int J Epidemiol*. 34(5), 1138-43.
 - 185.Vachon-Preseu, E., Roy, M., Martel, MO., Caron, E., Marin, MF., Chen, J., Albouy, G., Plante, I., Sullivan, MJ., Lupien, SJ., Rainville, PV. (2013). The Stress Model Of Chronic Pain: Evidence From Basal Cortisol And Hippocampal Structure And Function In Humans. *Brain* 136(3), 815-27.
 - 186.González-Cabrera, J., Fernández-Prada, M., Iribar-Ibabe C., Peinado JM., (2014). Acute And Chronic Stress Increase Salivary Cortisol: A Study In The Real-Life Setting Of A National Examination Undertaken By Medical Graduates. *Stress*. 17(2), 149-56.
 - 187.Ottenweller, JE., Tapp, WN., Burke, JM., Natelson, BH.(1985). Plasma Cortisol and Corticosterone Concentrations in the Golden Hamster, (*Mesocricetus Auratus*). *Life Sci*. 37(16), 1551-8.
 - 188.Merino, JJ., Cordero, MI., Sandi, C.(2000). Regulation of Hippocampal Cell Adhesion Molecules NCAM And L1 by Contextual Fear Conditioning is Dependent Upon Time And Stressor Intensity. *Eur J Neurosci*. 12, 3283–3290.
 - 189.Wren, AM., Small, CJ., Abbott, CR., Jethwa, PH., Kennedy, AR., Murphy, KG.(2002). Hypothalamic Actions Of Neuromedin U. *Endocrinology*. 143, 4227–4234.
 - 190.Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojcic,

- M., Krstic-Demonacos, M.(2009). Acute or Chronic Stress Induce Cell Compartment-Specific Phosphorylation of Glucocorticoid Receptor and Alter its Transcriptional Activity in Wistar Rat Brain. *J Endocrinol.* 202, 87-97.
- 191.Sanchez, MM., Aguado, F., Sanchez-Toscano, F., Saphier, D. (1998).Neuroendocrine and Immunocytochemical Demonstrations of Decreased Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Responsiveness To Restraint Stress After Long-Term Social Isolation. *Endocrinology.* 139, 579–587.
- 192.Malkesman, O., Maayan, R., Weizman, A., Weller, A.(2006). Aggressive Behavior and HPA Axis Hormones After Social Isolation in Adult Rats of Two Different Genetic Animal Models For Depression. *Behav Brain Res.* 175, 408–414.
- 193.Harpaz, I., Abutbul, S., Nemirovsky, A., Gal, R., Cohen, H., Monsonego, A .(2013). Chronic Exposure To Stress Predisposes To Higher Autoimmune Susceptibility In C57BL/6 Mice: Glucocorticoids As A Double-Edged Sword. *Eur J Immunol.* 43(3), 758-69.
- 194.Reber, SO., Birkeneder, L., Veenema, AH., Obermeier, F., Falk, W., Straub, RH., Neumann, ID.(2007). Adrenal Insufficiency And Colonic Inflammation After A Novel Chronic Psycho-Social Stress Paradigm In Mice: Implications And Mechanisms. *Endocrinology.* 148(2), 670-82.
- 195.Sternberg, EM.(2006). Neural Regulation Of Innate Immunity: A Coordinated Nonspecific Host Response To Pathogens, *Nat Rev Immunol.* 6, 318-328.
- 196.Reiche EM., Nunes, SO., Morimoto, HK.(2004). Stress, Depression, The Immune System And Cancer, *Lancet Oncol.* 5, 617-625.
- 197.Chatzinikolaou, A., Draganidis, D., Avloniti, A., Karipidis, A., Jamurtas, AZ., Skevaki, CL., Tsoukas, D., Sovatzidis, A., Theodorou, A., Kambas, A., Papassotiriou, I., Taxildaris, K., Fatouros, I.(2014). The Microcycle Of Inflammation And Performance Changes After A Basketball Match. *J Sports Sci.* 32(9), 870-82.
- 198.Suresh, PS., Koner, BC.(2012). Effect of Acute And Chronic Stress On Leucocyte Count: Modulation by Chlordiazepoxide. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 34(4),

586-9.

199. Neeman, E., Shaashua, L., Benish, M., Page, GG., Zmora O., Ben-Eliyahu S., (2012). Stress And Skin Leukocyte Trafficking As A Dual-Stage Process. *Brain Behav Immun.* 26(2), 267–276.
200. Okamoto, H., Tsunoda, T., Teruya, K.(2008). An Occupational Health Study Of Emergency Physicians In Japan: Health Assessment By Immune Variables (CD4, CD8, CD56, And NK Cell Activity) At The Beginning Of Work. *J Occup Health.* 50,136–146.
201. Atanackovic, D., Schnee, B., Schuch, G., Faltz, C., Schulze, J., Weber, CS., Schafhausen, P., Bartels, K., Bokemeyer, C., Brunner-Weinzierl, MC., Deter, HC.(2006). Acute Psychological Stress Alerts The Adaptive Immune Response: Stress-Induced Mobilization Of Effector T Cells. *J Neuroimmunol.* 176 (1-2), 141-52.
202. Bauer, ME., Perks, P., Lightman, SL., Shanks, N.(2001). Are Adhesion Molecules Involved In Stress-Induced Changes In Lymphocyte Distribution? *Life Sci.* 69 (10), 1167-79.
203. Kugler, DG., Mittelstadt, PR., Ashwell, JD., Sher, A., Jankovic, D.(2013). CD4+ T Cells Are Trigger and Target of the Glucocorticoid Response that Prevents Lethal Immunopathology in Toxoplasma Infection. *J Exp Med.* 210(10), 1919-27.
204. Pehlivanoglu, B., Bayrak, S., Gurel, EI., Balkanci, ZD.(2012). Effect Of Gender And Menstrual Cycle On Immune System Response To Acute Mental Stress: Apoptosis As A Mediator. *Neuroimmunomodulation.* 19(1), 25-32.
205. Kelso, A., Troutt, AB., Maraskovsky, E., Gough, NM., Morris, L., Pech, MH.(1991). Heterogeneity In Lymphokine Profiles Of CD4+ And CD8+ T Cells And Clones Activated In Vivo And In Vitro. *Immunol Rev.* 123, 85-114.
206. Koglin, J., Glysing-Jensen, T., Mudgett, JS., Russell, ME.(1998). Exacerbated Transplant Arteriosclerosis In Inducible Nitric Oxide-Deficient Mice. *Circulation.* 97, 2059-65.

- 207.Cheng, X., Ding, Y., Xia, C., Tang, T., Yu, X., Xie, J., Liao, M., Yao, R., Chen, Y., Wang, M., Liao, YH.(2009). Atorvastatin Modulates Th1/Th2 Response In Patients With Chronic Heart Failure. *J Card Fail.* 15(2), 158-62.
- 208.Glaser, R., Kiecolt-Glaser, JK.(2005). Stress-Induced Immune Dysfunction: Implications For Health. *Nat Rev Immunol*; 5, 243-251.
- 209.Elenkov, IJ., Chrousos, GP.(1999). Stress Hormones, Th1/Th2 Patterns, Pro/Anti-Inflammatory Cytokines And Susceptibility To Disease. *Trends Endocrinol Metab.* 10, 359-368.
- 210.Agarwal, SK., Marshall Jr, GD., (2001) Dexamethasone Promotes Type 2 Cytokine Production Primarily Through Inhibition Of Type 1 Cytokines. *J Interferon Cytokine Res.*, 21(3), 147-55.
- 211.Xiang, L., Del Ben, KS., Rehm, KE., Marshall Jr GD.(2012). Effects Of Acute Stress-Induced Immunomodulation On TH1/TH2 Cytokine And Catecholamine Receptor Expression In Human Peripheral Blood Cells. *Neuropsychobiology.* 65(1), 12-19.
- 212.Barros, PO., Ferreira, TB., Vieira, MM., Almeida, CR., Araújo-Lima, CF., Silva-Filho, RG., Hygino, J., Andrade, RM., Andrade, AF., Bento, CA.(2011). Substance P Enhances Th17 Phenotype In Individuals With Generalized Anxiety Disorder: An Event Resistant To Glucocorticoid Inhibition. *J Clin Immunol.* 31(1), 51-59.
- 213.Wu, CY., Fargeas, C., Nakajima, T., Delespesse, G.(1991). Glucocorticoids Suppress The Production Of Interleukin 4 By Human Lymphocytes. *Eur J Immunol.* 21(10), 2645-7.
- 214.Chrousos, GP.(1995). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis And Immune-Mediated Inflammation. *New Engl J Med.* 332, 1351-1362.
- 215.Elenkov IJ.(2004). Glucocorticoids And The Th1/Th2 Balance. *Ann N Y Acad Sci.* 1024, 138-46.
- 216.Kolls, JK., Linden A.(2004), Interleukin-17 Family Members And Inflammation. *Immunity.* 21, 467-476.

- 217.Ke, Y., Liu, K., Huang, GQ., Cui, Y., Kaplan, HJ., Shao, H., Sun, D.(2009). Anti-Inflammatory Role Of IL-17 In Experimental Autoimmune Uveitis, *J Immunol.* 182, 3183-3190.
- 218.Otani, K., Watanabe, T., Tanigawa, T., Okazaki, H., Yamagami, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Arakawa, T.(2009). Anti-Inflammatory Effects Of IL-17A on Helicobacter Pylori-Induced Gastritis, *Biochem Biophys Res Commun* 382(2), 252-258.
- 219.Zhao, FQ., Zhang, ZW., Yao, HD, Wang, LL., Liu, T., Yu, XY., Li, S., Xu, SW.(2013). Effects Of Cold Stress On mRNA Expression Of Immunoglobulin And Cytokine In The Small Intestine Of Broilers *Res Vet Sci.* 95(1), 146-55.
- 220.Hu, D., Denney, J., Liang, M., Javer, A., Yang, X., Zhu, R., Yin, D.(2013). Stimulatory Toll-Like Receptor 2 Suppresses Restraint Stress-Induced Immune Suppression. *Cell Immunol.* 283(1-2), 18-24.
- 221.Chiricozzi, A., Zhang, S., Dattola, A., Cannizzaro, MV., Gabellini M., Chimenti, S., Nistico, SP.(2012). New Insights Into The Pathogenesis Of Cutaneous Autoimmune Disorders. *J Biol Regul Homeost Agents.* 26, 165-170.
- 222.Shah, A.(2012). The Pathologic And Clinical Intersection Of Atopic And Autoimmune Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 12, 520-529.
- 223.Carlsson, E., Frostell, A., Ludvigsson, J., Faresjö, M. (2014). Psychological Stress In Children May Alter The Immune Response. *J Immunol.* 192(5), 2071-81.
- 224.Harrington, LE., Hatton, RD., Mangan, PR., Turner, H., Murphy, TL., Murphy, KM., Weaver, CT.(2005). Interleukin 17-Producing CD4(+) Effector T Cells Develop Via A Lineage Distinct From The T Helper Type 1 and 2 Lineages. *Nat Immunol.* 6(11), 1123-1132.
- 225.Stockinger, B., Veldhoen, M.(2007). Differentiation and Function of Th17 T Cells. *Curr Opin Immunol.* 19, 281-286.
- 226.Hedman, M., Ludvigsson, J., Faresjö MK.(2006). Nicotinamide Reduces High

- Secretion of IFN-Gamma In High-Risk Relatives Even Though It Does Not Prevent Type 1 Diabetes. *J Interferon Cytokine Res.* 26(4), 207-213.
- 227.Karlsson Faresjö, MG., Ludvigsson, J.(2005). Diminished Th1-Like Response To Autoantigens In Children With A High Risk Of Developing Type 1 Diabetes. *Scand J Immunol.* 61, 173-179.
- 228.Karlsson Faresjö, MG., Lawesson SS., Ludvigsson, J.(2000). Th1-Like Dominance In High-Risk First-Degree Relatives Of Type I Diabetic Patients. *Diabetologia* 43: 742-749.
- 229.Kidd, P.(2003). Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, Its Limitations, And Implications For Health And Disease. *Altern Med Rev.* 8, 223-246.
- 230.Moudgil, KD., Choubey, D.(2011). Cytokines In Autoimmunity: Role In Induction, Regulation, And Treatment. *J Interferon Cytokine Res.* 31, 695-703.
- 231.Teixeira-Coelho M1, Cruz A, Carmona J, Sousa C, Ramos-Pereira D, Saraiva AL, Veldhoen M, Pedrosa J, Castro AG, Saraiva M.(2011). TLR2 Deficiency By Compromising P19 (IL-23) Expression Limits Th 17 Cell Responses To Mycobacterium Tuberculosis, *Int Immunol.* 23(2), 89-96.
- 232.Yu, CF., Peng, WM., Oldenburg, J., Hoch, J., Bieber, T., Limmer, A., Hartmann, G., Barchet, W., Eis-Hübinger, AM., Novak N.(2010). Human Plasmacytoid Dendritic Cells Support Th17 Cell Effector Function In Response To TLR7 Ligation. *J Immunol.* 184(3), 1159-67.
- 233.Marshall Jr, GD.(2011). The Adverse Effects Of Psychological Stress On Immunoregulatory Balance: Applications To Human Inflammatory Diseases. *Immunol Allergy Clin North Am.* 31(1), 133-40.
- 234.Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, TB., Oukka, M., Weiner, HL., Kuchroo, VK.(2006). Reciprocal Developmental Pathways For The Generation Of Pathogenic Effector TH17 And Regulatory T Cells. *Nature* 441(7090), 235-238.
- 235.Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, JP., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, RA.,

- Kuchroo, VK., Oukka, M., Weiner, HL.(2007). A Dominant Function For Interleukin 27 In Generating Interleukin 10-Producing Anti-Inflammatory T Cells. *Nat Immunol.* 8(12), 1380-9.
- 236.Ephrem, A., Epstein, AL., Stephens, GL., Thornton, AM., Glass, D., Shevach, EM.(2013). Modulation Of Treg Cells/T Effector Function By GITR Signaling Is Context-Dependent. *Eur J Immunol.* 43(9), 2421-9.
- 237.Korn, T., Anderson, AC., Bettelli, E., Oukka, M.(2007). The Dynamics Of Effector T Cells And FOXP3+ Regulatory T Cells In The Promotion And Regulation Of Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 191(1–2), 51–60.
- 238.Van Amelsfort, JM., Jacobs, KM., Bijlsma, JW., Lafeber, FP., Taams, LS.(2004). CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells In Rheumatoid Arthritis: Differences in The Presence, Phenotype And Function Between Peripheral Blood And Synovial Fluid. *Arthritis Rheum.* 50(9), 2775-2785
- 239.Goodnow, CC., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., Vinuesa, CG.(2005). Cellular And Genetic Mechanisms Of Self Tolerance And Autoimmunity. *Nature* 435(7042), 590-597
- 240.Sakaguchi, S.(2004). Naturally Arising CD4(+) Regulatory T Cells For Immunologic Self-Tolerance And Negative Control Of Immune Responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531-562.
- 241.Kriegel, MA, Lohmann, T., Gabler, C., Blank, N., Kalden, JR., Lorenz, HM.(2004). Defective Suppressor Function Of Human CD4+ CD25+ Regulatory T Cells In Autoimmune Polyglandular Syndrome Type II. *J Exp Med.* 199, 1285–1291.
- 242.Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, HL., Hafler, DA.(2004). Loss Of Functional Suppression By CD4+CD25+ Regulatory T Cells In Patients With Multiple Sclerosis. *J Exp Med.* 199, 971–979.
- 243.Lindley, S., Dayan, CM., Bishop, A., Roep, BO., Peakman, M., Tree, TI.(2005). Defective Suppressor Function In CD4(+)CD25(+) T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 54, 92–99.

- 244.Yamanouchi, J., Rainbow, D., Serra, P., Howlett, S., Hunter, K., Garner, VE., Gonzalez-Munoz, A., Clark, J., Veijola, R., Cubbon, R., Chen, SL., Rosa, R., Cumiskey, AM., Serreze, DV., Gregory, S., Rogers, J., Lyons, PA., Healy, B., Smink, LJ., Todd, JA., Peterson, LB., Wicker, LS., Santamaria, P.(2007). Interleukin-2 Gene Variation Impairs Regulatory T Cell Function And Causes Autoimmunity. *Nat Genet.* 39(3), 329-37
- 245.Höglund, P.(2006). Induced Peripheral Regulatory T Cells: The Family Grows Larger. *Eur J Immunol.* 36(2), 264-6.
- 246.Braitch, M., Harikrishnan, S., Robins, RA., Nichols, C., Fahey, AJ., Showe, L., Constantinescu, CS.(2009). Glucocorticoids Increase CD4 CD25 Cell Percentage And FOXP3 Expression In Patients With Multiple Sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 119(4), 239-45.
- 247.Bhowmick, S., Singh, A., Flavell, RA., Clark, RB., O'Rourke, J., Cone, RE.(2009). The Sympathetic Nervous System Modulates CD4(+) FOXP3(+) Regulatory T Cells Via A TGF-Beta-Dependent Mechanism. *J Leukoc Biol.* 86(6), 1275-83.
- 248.Pandolfi, J., Baz, P., Fernández, P., Discianni Lupi, A., Payaslián, F., Billordo, LA., Fainboim, L., Arruvito, L.(2013). Regulatory And Effector T-Cells Are Differentially Modulated By Dexamethasone. *Clin Immunol.* 149(3), 400-10.
- 249.Liao, G., Nayak, S., Regueiro, J. R., Berger, S. B., Detre, C., Romero, X., De Waal Malefyt, R.(2010). GITR Engagement Preferentially Enhances Proliferation Of Functionally Competent CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) Regulatory T Cells. *Int Immunol.* 22(4), 259-70.
- 250.Atanackovic, D., Schulze, J., Kroger, H., Brunner-Weinzierl, MC., Deter, HC.(2003). Acute Psychological Stress Induces A Prolonged Suppression Of The Production Of Reactive Oxygen Species By Phagocytes. *J Neuroimmunol.* 142 (1-2), 159-165.
- 251.Fontenot, JD., Gavin, MA., Rudensky, AY.(2003).FOXP3 Programs The Development And Function Of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Nat Immunol.* 4(4), 330-6.

- 252.Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S.(2003). Control Of Autoimmunity By Naturally Arising Regulatory CD4⁺ T Cells. *Adv Immunol.* 81, 331-71.
- 253.Xiang, L., Marshall Jr GD.(2011). Immunomodulatory Effects Of In Vitro Stress Hormones On Foxp3, Th1/Th2 Cytokine And Costimulatory Molecule mRNA Expression In Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Neuroimmunomodulation.* 18(1), 1-10.

EK 1: ETİK KURUL İZNİ



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 31

04 Nisan 2011

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 31.03.2011 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2011/2
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2011/03
KARAR NUMARASI	: 2011/03-1
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Yrd. Doç. Dr. Bilge Pehlivanoglu
HAYVAN DENEYLERİNDEN	: Yrd. Doç. Dr. Bilge Pehlivanoglu, Öğrt. Gör. Dr.
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Meltem Sevgili, Arş. Gör. Dr. Murat Doğan
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Doç. Dr. İlknur Kozanoğlu
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 78 adet Swiss Albino Fare
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	: 12 ay

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Bilge Pehlivanoglu'nun yürütücüsü olduğu 2011/03 dosya numaralı ve *"Stresin Periferik Kandaki Yardımcı T Hücre Yanıtına ve Düzenleyici T Hücre Aktivitesine Etkisi: Vit-D'nin Düzenleyici Rolü"* isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı

EK 2: KONGRE SÖZLÜ SUNUM ÖZETİ

OC05(EYP5) (Ref.0100): DOES ACUTE OR CHRONIC STRESS AFFECT PERIPHERAL BLOOD HELPER AND REGULATORY T CELLS?

09/05/14 00:58

[OC05(EYP5)]

DOES ACUTE OR CHRONIC STRESS AFFECT PERIPHERAL BLOOD HELPER AND REGULATORY T CELLS?

Murat Dogan, Bilge Pehlivanoglu, Ayşe Meltem Sevgili, İlknur Kozanoğlu
Department of Physiology, Hacettepe University, Ankara, Turkey

Objective: An effective immune response protects organism, differentiate self from non-self and terminate rapidly when threat disappears. Smooth functioning of the immune response, controlled by cytokinergic interactions of helper T (Th1, Th2&Th17) and regulatory T (Treg) cells, is crucial and modulated by stressors. Albeit the extensive studies on stress-immune system interactions, Th17 and Treg response to stress has not been investigated, yet. We aimed to determine the effect of acute or chronic stress on peripheral T lymphocyte distribution.

Methods: Male, Swiss-albino mice (30-40 g) were allocated in 3 groups as; control (n=11), acute stress (n=11) and chronic stress (n=11). Cold-immobilization stress was applied in a restrainer at 4°C once for 6 hours in acute stress group and 5 consecutive days for 6 hours/day for chronic stress group. In the blood samples withdrawn after stress protocols and corresponding times in control groups serum cortisol and cytokine levels (IL-2, IL-4, TNF α , IL-17) were measured and distribution of lymphocyte subgroups were determined flow-cytometrically.

Results: The effect of acute and chronic stress on distribution of T-lymphocyte subgroups was different. Chronic stress attenuated the number of Th17 and Treg cells more.

Conclusions: Stress is a key modulator of immune response altering the reaction of Th cells, chief executive officers of acquired immune system. Further insights about mutual interaction of Treg and Th17 cells will help better understanding of the pathogenesis and provide a new era in management of especially autoimmune diseases. This study is granted by HUBAB (Project number: 011 D04 101 003)