



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

STRESLE İNDÜKLENEN DENEYSSEL KOLİT PATOGENEZİNDE  
KORTİKOTROPİN SERBESTLEŞTİRİCİ FAKTÖR, SEROTONİN VE  
KOLESİSTOKİNİN NÖROPEPTİDLERİNİN ROLLERİ

Dr. MEHMET ALİ GÜLPINAR  
UZMANLIK TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Berrak Ç. YEĞEN

İSTANBUL - 2001

103278

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	II
KISALTMALAR .....	III
1. ÖZET .....	1
2. İNGİLİZCE ÖZET .....	3
3. GİRİŞ .....	5
4. STRES ve İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIĞI .....	5
4.1. Stres .....	5
4.1.1. Stres Mediyatörleri .....	7
A. Kortikotropin Serbestleştirici Faktör .....	7
B. Serotonin .....	8
C. Kolesistokinin .....	10
4.1.2. Stres ile Oluşan Yanıtta Santral Sinir Sistemi Yapılarının Katılımları ..	10
A. Hipotalamus .....	11
B. Limbik Sistem .....	11
C. Sağ ve Sol Serebral Hemisferler .....	12
4.2. Stres ve İnflamasyon .....	13
4.2.1. Stres ve İmmün Sistem .....	13
4.2.2. İnflamatuvar Sitokinler ve HPA Aksı .....	15
4.2.3. Stresin İnflamatuvar Barsak Hastalıklarına Etkileri .....	15
4.2.4. Stresin Deneysel Kolit Modelleri Üzerine Etkileri .....	16
5. AMAÇ .....	18
6. GEREÇ ve YÖNTEM .....	18
6.1. Denekler .....	18
6.2. Stereotaksik Cerrahi Yöntemi .....	18
6.3. Kolit Modeli ve Skorlaması .....	19
6.3.1. Makroskopik Skorlama .....	19
6.3.2. Mikroskopik Skorlama .....	20
6.3.3. Doku Miyeloperoksidaz Aktivitesi Ölçümü .....	20
6.4. Stres Yöntemleri .....	21
6.4.1. Akut Stres Modelleri .....	21
6.4.2. Kronik Stres Modeli .....	21
6.4.3. Kronik Zeminde Uygulanan Akut Stres Modeli .....	22
6.5. Santral ve Periferik Enjeksiyonlar .....	22
6.6. Deney Protokolü .....	23
6.6.1. Stres Grupları .....	23
6.6.2. Santral Agonist Grupları .....	23
6.7. İstatistiksel Analiz .....	24
7. BULGULAR .....	24
7.1. TNBS Kolitiyle Oluşan Doku Hasarının Değerlendirilmesi .....	24
7.1.1. Stres Grupları .....	28
7.1.2. Santral Agonist Grupları .....	33
7.1.3. Periferik Yolakların Araştırıldığı Gruplar .....	38
7.2. TNBS Kolitinin Sıçanların Kilo Alımları ve Doku Yaş Ağırlıkları Açısından Değerlendirilmesi .....	41
8. TARTIŞMA .....	44
9. SONUÇLAR .....	59
10. KAYNAKLAR .....	61
11. ÖZGEÇMİŞ .....	68

Çalışmanın her aşamasında göstermiş oldukları titizlik ve hiçbir zihni sınırlamanın hissedilmediği serbest ortam için tez danışmanım Prof. Dr. Berrak Ç. Yeğen'e; yapıcı eleştirileriyle metnin nihai şeklinin oluşmasında katkıda bulunan Prof. Dr. Hızır Kurtel ve Doç. Dr. İnci Alican'a; dokuların histolojik değerlendirmesinde yardımlarından dolayı Prof. Dr. Serap Arbak ve Vet. Hek. Dilek Özbeyli'ye; mali desteğin büyük bir kısmını karşılayan TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu ve Marmara Üniversitesi Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

Dr. Mehmet Ali GÜLPINAR  
Haziran 2001

## KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
ACTH	Adrenokortikotropin hormonu
ADX	Adrenalektomi
AP	Area postrema
AVP	Arjinin vazopressin
CCK	Kolesistokinin
CeA	Amigdalanın santral çekirdeği
CRF	Kortikotropin-serbestleştirici faktör
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DMSO	Dimetil sulfoksit
DVK	Dorsal vagal kompleks
GABA	$\gamma$ -aminobütirik asit
GI	Gastrointestinal
GK	Glikokortikoid
HPA	Hipotalamo-hipofizer adrenal aks
5-HT	Serotonin
İBH	İnflamatuvar barsak hastalıkları
IFN	İnterferon
Ig	İmmünglobulin
IL	İnterlökin
İp	İntraperitoneal
İsv	İntraserebroventriküler
KBB	Kan beyin bariyeri
KS	Kortikosteron
LPS	Lipopolisakkarit
LS	Lokus seruleus
MPO	Miyeloperoksidaz
NE	Norepinefrin
NK	Sitotoksik T lenfosit
NTS	Nukleus traktus solitarius
OT	Oksitosin
OVL	Organum vaskulosum laminae terminalis
PAF	Platelet (trombosit) aktive edici faktör
PG	Prostaglandin
PVN	Paraventricüler çekirdek
RU-486	Glikokortikoid reseptör antagonisti
SAA	Sempato-adrenal aks
SF	Serum fizyolojik
SSS	Santral sinir sistemi
T <sub>H</sub>	Yardımcı T hücreleri
TNBS	2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit
TNF	Tümör nekroz faktörü
T <sub>S</sub>	Süpresor T hücreleri
TX	Tromboksan
VP	Vazopressin

## 1. ÖZET

Stresin kolit patogenezi üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar, santral sinir sistemi (SSS)'nin, otonom sinir sistemi ve hipotalamo-hipofizer-adrenal aks (HPA) üzerinden inflamasyonun çeşitli parametrelerini modüle ettiğine dair bulgular sunmaktadır. Bu çalışmada, birinci amaç “akut stres” ve “kronik stres zemininde uygulanacak akut stres”in kolit patogenezinin seyri üzerindeki etkilerini araştırmak ve santral kortikotropin-serbestleştirici faktör (CRF), serotonin (5-HT)<sub>3</sub> ve kolesistokinin (CCK)<sub>B</sub> reseptörlerinin ve bunların olası etkileşimlerinin kolit patogenezine katkılarını aydınlatmaktır. İkinci amaç ise eksojen CCK-8s ve 5-HT'nin kolit gelişimine etkilerini ve bu etkilerin oluşumunda santral CRF, 5-HT<sub>3</sub> ve CCK<sub>B</sub> reseptör antagonistlerinin rollerini ortaya çıkarmaktır. Son olarak sempatik sinir sistemi ve HPA aksının stres, CCK-8s ve 5-HT'ye bağlı inflamatuvar modülasyona katılımlarını belirlemek amaçlanmıştır.

Ketamin anestezisi altında (100 mg/ kg; ip), Sprague-Dawley sıçanların (200-270 g) lateral ventriküllerine kateter yerleştirildi. Beş günlük iyileşme döneminden sonra akut stres oluşturmak için sıçanlar elektrik şokunun (0.3-0.6 mA aralığında, 5 sn sürelerle; 20 defa/30 dk) uygulandığı özel bir bölmeye yerleştirildi. Kronik stres zemininde uygulanan akut stres için hayvanlar ilk günkü şoktan sonra 3 gün daha, şok uygulanmadan aynı bölmelerde tutuldu ve buna 4. gün 2 saatlik hareket kısıtlama stresi eklendi. Diğer bir grupta, sıçanlara stresten 10 dk önce intraserebroventriküler (isv; 5 µl hacimde) olarak CRF reseptör antagonisti astressin (2.5 µg/sıçan), CCK<sub>B</sub> reseptör antagonisti CI-988 (5 µg/sıçan) veya 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonisti ramosetron (10 µg/sıçan) enjeksiyonu yapıldı. Başka bir grupta ise stres uygulaması ya da CCK-8s (20 ng/sıçan) veya 5-HT (100 µg/sıçan) enjeksiyonu öncesinde sıçanlara sempatik gangliyon blokeri heksametyum (15 mg/kg; ip) veya glikokortikoid reseptör antagonisti RU-486 (10 mg/kg; ip) uygulandı. Son stres veya agonist uygulamasından 4 saat sonra kolit oluşturmak için intrakolonik yolla 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) verilen hayvanlar 3 gün sonra dekapite edildi. Kolonun distal segmenti alınarak tartıldı; makroskopik skorlamadan sonra örnekler mikroskopik değerlendirme ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü için saklandı. Her grupta 6-15 sıçandan elde edilen veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilerek gruplar arasındaki farklılık Student'in t testi ve varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı.

Tek başına kronik stres veya kısıtlama stresinde anlamlı bir değerliklik saptanmazken, akut stres ve kronik zeminde uygulanan akut stres gruplarında MPO aktivitesi, makroskopik ve mikroskopik skorda stres uygulanmayan gruba göre azalma gözlendi (p<0.05-0.01). Akut

stres grubunda, 5-HT<sub>3</sub>, CCK<sub>B</sub> veya CRF reseptör antagonistleriyle söz konusu parametrelerde gözlenen azalma ortadan kalktı (p<0.05-0.001). Eksojen CCK-8s veya 5-HT uygulaması makroskopik skoru ve doku MPO aktivitesini düşürdü (p<0.05-0.01). MPO aktivitesinde CCK-8s enjeksiyonu ile gözlenen azalma, CCK<sub>B</sub> ve 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonistleri ile, 5-HT enjeksiyonu ile gözlenen azalma ise 5-HT<sub>3</sub> ve CRF reseptör antagonistleri ile geri döndürüldü (p<0.05-0.01). CCK-8s grubunda CRF reseptör antagonisti, 5-HT grubunda ise CCK<sub>B</sub> reseptör antagonisti kolit hasar skorunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Doku MPO aktivitesi makroskopik değerlendirmeyi destekler nitelikte idi. Sempatik gangliyon blokajı akut stres, CCK-8s ve 5-HT ile gözlenen anti-inflamatuvar etkileri ortadan kaldırırken, glikokortikoid reseptör blokeri sadece stres ve 5-HT gruplarında anlamlı değişikliğe neden oldu (p<0.05-0.01).

Şu ana kadar kronik stresle yapılan çalışmaların tersine, bu çalışmada kullanılan kronik stres modeli SSS'nde sensitizasyona neden olarak deneysel kolitte anti-inflamatuvar etkiler gösterdi. Aynı zamanda bu sonuçlar, stresin kolon inflamasyonu üzerinde saptanan koruyucu etkisinde CRF, CCK ve 5-HT salınımı ile santral CCK<sub>B</sub>, 5-HT<sub>3</sub> ve CRF reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşimlerin pay sahibi olduğunu düşündürmektedir. Elde edilen veriler ışığında stresle oluşan anti-inflamatuvar etkiler konusunda ileri sürülebilecek bir diğer mekanizma ise sempatik sinir sistemi ve HPA aksının katılımlarıdır.

## 2. SUMMARY

Several studies considering the effects of stress on the pathogenesis of colitis provide evidence that the central nervous system (CNS) may modulate many aspects of inflammation through the alteration of the autonomic nervous system and/or hypothalamo-pituitary adrenal axis. In the present study, the first aim was to examine the impact of “acute stress” and “acute stress upon chronic stress exposure” on the course of colitis pathogenesis and to elucidate the roles of central CRF, 5-HT<sub>3</sub> and CCK<sub>B</sub> receptors and their possible interactions in the modulation of colitis pathogenesis. The second aim was to evaluate the effects of exogenous CCK-8s and 5-HT on the course of colitis. We also attempted to determine the roles of central CRF, 5-HT<sub>3</sub> and CCK<sub>B</sub> receptors in the modulation of colitis severity by centrally administered CCK-8s or 5-HT. The third one was to examine the participation of sympathetic nervous system and HPA in mediating the inflammatory effects of stress, CCK-8s or 5-HT on colitis.

Under ketamine anesthesia (100 mg/kg; ip), male Sprague-Dawley rats (200-270 g) were fitted with a catheter inserted into a lateral ventricle of the brain. Following a 5-day recovery, for the induction of acute stress, rats were placed in a chamber where electric shock (in the range of 0.3-0.6 mA for 5 s; 20 times/30 min) was applied. In order to induce acute stress upon chronic stress exposure, following the electric shock rats were put in the same chamber for 3 days without giving electric shock and a “2-hour restraint stress” was added on the 4<sup>th</sup> day. In other groups, rats were injected intracerebroventricularly (icv) 10 min before stress session (in 5 µl) with CRF receptor antagonist astressin (2.5 µg/rat), CCK<sub>B</sub> receptor antagonist CI-988 (5 µg/rat) or 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ramosetron (10 µg/rat). In the second set of the experiments, rats were injected icv with the same specific receptor antagonists 10 min before icv CCK-8s (20 ng/rat) or 5-HT (100 µg/rat) administration. In another group, rats were given ganglion blocker hexamethonium (15 mg/kg; ip) or glucocorticoid receptor antagonist RU-486 (10 mg/kg; ip) before the stress or the injection of CCK-8s or 5-HT. Colitis was induced by the intracolonic administration of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid on the 4<sup>th</sup> hour after the last stress exposure or after the last injection of the agonist. On the 3<sup>rd</sup> day of colitis induction the rats were decapitated, the colonic segments were removed and weighed, damages were assessed by macroscopic and microscopic evaluation. Tissue samples were stored to determine the myeloperoxidase activity. Data are means ± S.E.M. from 6-15 rats and were analyzed using the Student's t test and ANOVA.

While chronic stress or restraint stress alone had no significant effect, both acute stress and acute stress upon chronic stress decreased MPO activity, macroscopic and microscopic scores ( $p < 0.05-0.01$ ), when compared with non-stressed colitis group. In acute stress group, the reductions in these parameters were abolished by the treatments with 5-HT<sub>3</sub>, CCK<sub>B</sub> or CRF receptor antagonists ( $p < 0.05-0.001$ ). Exogenous CCK-8s or 5-HT administration decreased the macroscopic scores and tissue MPO activity ( $p < 0.05-0.01$ ). Treatment with the CCK<sub>B</sub> (5 µg/rat; icv.) or the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist (10 µg/rat; icv) abolished the reduction in colitis damage scores of CCK-8s-injected rats, while 5-HT<sub>3</sub> or CRF receptor antagonists (2.5 µg/rat; icv) had the same effect in 5-HT-injected rats ( $p < 0.05-0.01$ ). In the CCK-8s group treated with CRF receptor antagonist or 5-HT group treated with CCK<sub>B</sub> receptor antagonist, colitis damage scores were not significantly changed. Tissue MPO activities supported the macroscopic evaluation. Blockade of the sympathetic ganglia reversed the anti-inflammatory effects of stress, CCK-8s and 5-HT, while the glucocorticoid receptor blocker had a significant effect only on the stress and 5-HT groups, but not on CCK-8s group ( $p < 0.05-0.01$ ).

In contrast to previous findings based on chronic stress exposure, in our stress models, chronic stress caused sensitization in the CNS which resulted an anti-inflammatory effect on experimental colitis. The protective effects of stress on colonic inflammation may be mediated by CRF, CCK and 5-HT release and the central mechanisms which involve the interaction of CCK<sub>B</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and CRF receptors. In the central regulation of colonic inflammation, the participation of sympathetic system and HPA axis appears to be a possible mechanism in mediating these anti-inflammatory effects.



### 3. GİRİŞ

Psikobiyolojik bir süreç olan stres, canlının psikolojik sağlığının yanısıra bedensel sağlığını da etkilemektedir. Farklı derecelerde de olsa stres birçok hastalığın patogenezi ve prognozunda etkilidir. Stresin etkili olduğu hastalıklar arasında hipertansiyon ve inflamatuvar barsak hastalığı (İBH), fonksiyonel sendromlar (irritabl kolon, fonksiyonel dispepsi vs), psikosomatik hastalıklar gibi geniş popülasyonları etkileyen hastalıklar vardır. Hatta uygun zemin hazırlamaları ve yatkınlık açısından enfeksiyon hastalıkları da bu listeye eklenebilir. Bu kadar geniş bir etki yelpazesine sahip olmasına rağmen stresin fizyopatolojisi konusunda bugün için bilgilerimiz çok sınırlıdır.

Bu çalışma ile İBH'nın patogenezi ve strese bağlı alevlenmesinde rol alabilecek mekanizmaların ve nöropeptidlerin bir kısmı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Burada ortaya çıkan bulgular İBH'nın yanısıra, fonksiyonel barsak hastalıklarının patogenezinin anlaşılmasına da katkıda bulunacaktır. Benzer çalışmalardan elde edilecek bilgilerle hazırlanacak yeni tedavi protokolleri ile gastrointestinal (GI) sistemi tutan hastalıklar arasında birinci sırada bulunan fonksiyonel barsak hastalıklarının ve ciddi komplikasyonlara neden olan İBH'nın tedavilerine yapılacak katkılarla, bu hastalıklara bağlı insan ve iş gücü kayıpları azaltılabilecektir.

### 4. STRES ve İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIĞI (İBH)

#### 4.1. Stres

Canlının ihtiyaçları ve beklentileri ile bunların karşılanabilir olması arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanabilecek stres durumunda bireysel ihtiyaç ve beklentiler ve/veya çevresel uyarılar organizmanın başedebileceği bir durum olmaktan çıkmıştır. Organizma ile çevresi arasındaki karşılıklı etkileşim sonucunda ortaya çıkan stres, tek başına canlının özellikleri veya çevresi ile açıklanamamaktadır. Bilişsel, davranışsal, emosyonel ve endokrin komponentleri olan strese karşı oluşan yanıtta birden fazla değişken belirleyici olmaktadır. Bu değişkenler arasında stresin çeşidi, sıklığı, süresi ve şiddeti gibi fiziksel faktörler; canlının fizyolojik duyarlılığı, stresin algılanması, tahmin ve kontrol edilebilir olması gibi psikofizyolojik ve stresöre bağlı faktörler bulunmakta ve stresin farklı algılanması farklı fizyolojik süreçlere neden olmaktadır. Strese karşı oluşacak yanıtta stresörün psikolojik

doğası ile deneğin stresi tahmin ve kontrol edebilme yeteneği, stresörün fiziksel doğasından daha belirleyici olabilmektedir (48, 106).

Genetik faktörler ve kazanılmış yaşam tarzı (tecrübeler ve kültür) ile oluşan bireye özgü "PSİKOBIYOLOJİK PROGRAM"la denek strese karşı şu iki 2 mücadele tarzından birisinin daha baskın olduğu bir yanıt oluşturacaktır: Stres oluşturan durumu değiştirmeye yönelik problem çözmeye yönelik strateji; aktif mücadele (active coping) ve eğer stres oluşturan uyarı değiştirilemiyorsa, emosyonu değiştirmeye yönelik emosyonel strateji; pasif mücadele (passive coping). Örneğin, deneklerde davranışsal yanıt olarak savaşıma veya kaçmanın seçildiği aktif mücadelede, testosteronun bazal seviyesinde artma ve sempatik hiperaktivasyon gözlenirken, parasempatik sistemde baskınlık, HPA aksında hiperaktivasyon ve plazma testosteron seviyelerinde azalma saptanan pasif mücadelede davranışsal yanıt çömelme ve immobilizasyondur (48, 106).

Sosyal ve fiziksel çevrenin stres yanıtındaki önemini gösteren iki farklı çalışmada anneden erken ayrılan ve kötüye kullanılan yavrularda serotonerjik sistemde hipoaktivasyon saptanmıştır (28, 42). Domuzlarda yapılan bir çalışmada strese verilen yanıtlarına göre rezistan ve nonrezistan olmak üzere ikiye ayrılan hayvanların dopaminerjik sistemlerinde farklılıklar gözlenmiştir (87). Stresle oluşan yanıtta bir diğer önemli faktör organizmanın strese maruz kalma süresidir. Bireysel farklar göz ardı edilerek yapılacak bir genellemede akut stres ile santral sinir sistemi (SSS)'de meydana gelen patofizyolojik değişiklikler şu şekilde sıralanabilir:

1. Hipotalamusun paraventriküler çekirdeği (PVN)'nin parvosellüler bölümü başta olmak üzere medyal ve bazolateral amigdaloid çekirdekler ve diğer pek çok beyin bölgesinde kortikotropin-serbestleştirici faktör (CRF) içeren nöronlarda hiperaktivasyon (78, 77),
2. Serotonerjik sistemde aktivasyon (2, 52),
3. Özellikle hipokampus ve hipotalamik çekirdekler başta olmak üzere pek çok beyin bölgesinde  $\gamma$ -aminobütirik asit (GABA)'te artış (8), ve
4. Hipotalamusun kolesistokin (CCK)<sub>B</sub> reseptörü aracılı amigdaloid regülasyonunda artış (19, 30).

Kronik stres veya kronik santral CRF enjeksiyonu ile SSS'de saptanan değişiklikler ise;

1. PVN'de CRF mRNA'sında artış, santral amigdalada azalma (2),
2. Bir çok SSS bölgesinde serotonin (5-HT) hipoaktivitesi (52),
3. Özellikle amigdalada GABA ve glutamat; hipokampusta ise kolinerjik sistemde artış, aynı bölgelerde CRF salınımında hafif artma (20, 103), ve
4. Lokus seruleus (LS)'da CRF'ye karşı oluşmuş aşırı hassasiyet ve buna bağlı artmış

sempatik aktivitedir (73).

Akut ve kronik stresle SSS'de gözlenen ve yukarıda sıralanan değişiklikler sonucunda HPA'da oluşan net yanıt akut stresle oluşan "hiperaktivasyon" ile plazma ACTH ve kortizol seviyelerinde saptanan artışlardır. Kronik streste ise "hipoaktivasyon" gelişmektedir. Strese bağlı sempato-adrenal aks (SAA)'da gözlenen hiperaktivite ise plazma epinefrin (E) ve norepinefrin (NE) seviyelerinde artışlara neden olmaktadır (48, 63, 77, 87).

#### 4.1.1. Stres Mediyatörleri

Stresle oluşan davranışsal, otonomik ve nöroendokrin yanıtta rol alan nörotransmitterler ile, stresin doğası, süresi ve uygulanışı gibi birden fazla değişkene göre belirlenen nörotransmitterler arasındaki karşılıklı etkileşimler çok geniş bir konudur. Değişik türde akut ve kronik stres ile yapılan çalışmalarda rol oynadığı bilenen başlıca mediyatörler norepinefrin (NE), glutamat, GABA ve arjinin vazopressin (AVP)'dir. Bunların yanısıra, araştırmanın kapsamına giren ve strese aracılık eden üç önemli mediyatör de CRF, 5-HT ve CCK'dir.

##### A. Kortikotropin Serbestleştirici Faktör (CRF)

Fiziksel ve emosyonel stresin ana mediyatörü olarak kabul edilen CRF'yi içeren nöronlar ve nöron ağları değişik miktarlarda da olsa çok çeşitli beyin bölgelerinde bulunmaktadır. CRF immünoreaktivitesinin yoğun olduğu yerler arasında PVN, amigdala ve beyin sapının otonom, kardiyovasküler, GI homeostatik merkezleri bulunmaktadır. Yine konumuz açısından önemli periferik dokular olan; lenfoid dokular, lökositler, T ve B lenfositleri, fibroblastlar, damar endotel hücreleri, adrenal bez ve GI sistemde de CRF benzeri immünoreaktivite saptanmıştır. Strese bağlı otonom ve nöroendokrin yanıtın oluşmasında merkezi bir yerde duran PVN'nin, parvosellüler bölgesinden kalkan CRF immünoreaktif nöronlar median eminense giderek adrenokortikotropin hormonu (ACTH) salınımına neden olurken, aynı çekirdeğin dorsal bölge kaynaklı CRF nöronları otonom sistemde modülasyona neden olmaktadır. PVN'nin önemli afferent inervasyonları limbik sistem (subikulum, amigdala, septum), beyin sapı (LS, nukleus traktus solitarius; -NTS-, retiküler formasyon, parabrakial çekirdek) ve bazı sirkumventriküler (subfornikal organ veya organum vasculosum laminae terminalis; OVLT) organlardır. Bu inervasyonlar aracılığıyla beyin sapından gelen somatoviseroduysal uyarılar ile limbik yapılardan gelen emosyonel uyarılar hipotalamusta fiziksel ve emosyonel strese karşı uygun otonom ve endokrin yanıtı oluşturur. Beyin sapından

kaynaklanan asendan inputların büyük bir kısmı katekolaminerjiktir. Asendan katekolaminerjik dallar ile raphe çekirdeklerinden kaynaklanan asendan serotonerjik dallar hipotalamik ve limbik yapıları, özellikle hipokampus ve amigdalayı inerve ederek kortikotropik aks üzerinde uyarıcı etkiye neden olur ve sonuçta hipofizer-portal sisteme CRF salınımı artar. Yapılan çalışmalarda NE ve 5-HT dışında asetilkolin (ACh)'in de sıçanlarda CRF salınımını artırdığı saptanmıştır (4, 11, 72, 97, 99).

Otoradyografik analizle yapılan tespitlerde CRF reseptörlerine en çok neokorteks; anterior singulat korteks, frontoparietal korteks (somatoduysal alan) ve amigdalada rastlanılmıştır. Diğer limbik yapılar ve hipotalamusta orta derecede, LS ve NTS'da az miktarlarda saptanan CRF reseptörleri, aynı zamanda periferde adrenal medulla, damar endoteli, makrofaj, monosit, T lenfositleri ve sempatik gangliyonlarda da bulunmaktadır. CRF reseptörlerinin kortikal ve limbik bölgelerdeki dağılımı buralardaki CRF immünoreaktivitesi ile koreledir. Reseptör plastisitesiyle çevresel faktörlere bağlı olarak reseptör sayı ve etkinliklerinde değişiklik yapılarak (up ve down regülasyon) canlının yeni durum karşısında, örneğin strese karşı, kendini adapte etmesine imkan tanınır (1).

Özetle, hipotalamusun bütün çekirdeklerinde bulunan CRF nöronları arasında dorsomedyal parvosellüler alandan kaynaklanan nöronlar bu çalışma açısından önemlidir. Burada medyan eminens ve posteriyor hipofiz ile beyin sapı ve/veya spinal korda projeksiyonlar veren üç ayrı hücre grubu bulunur. Burası aynı zamanda hücre gövdeleri beyin sapında bulunan NTS'nin de içinde bulunduğu 8 ayrı noktadan afferent dallar almaktadır. Hipokampus ve amigdaladan da afferent dallar alan parvosellüler alan bu inervasyonları ile viseral, duysal, endokrin ve limbik bilgiler olarak canlının yeni durum karşısında kendisini adapte etmesine, uygun otonom ve endokrin yanıt oluşturmaya imkan sağlar.

## **B. Serotonin (5-HT)**

Serotoninin %60-90'ı GI sistemde, özellikle kriptlerde ve villuslarda bulunmaktadır. GI sistem dışında mast hücreleri ve SSS'de de gözlünen 5-HT salınımı vagal ve sempatik uyarının yanısıra dolaşımında bulunan katekolaminler ve iskemiyle uyarılır (31).

Son zamanlardaki gelişmeler santral serotonerjik aktivitenin SAA'ı ve HPA aksını modüle ettiğini göstermiştir. Fiziksel veya psikolojik stres 5-HT sentez ve metabolizmasını arttırmakta, sempatik sinir sistemi ve HPA aksında aktivasyona neden olmaktadır. Fakat bu aksların uyarılması sonucunda aynı zamanda plazma seviyeleri artan glikokortikoid (GK) ve katekolaminler (-) geri bildirimle santral 5-HT aktivitesini modüle etmektedirler. Serotonerjik hücre gövdelerinin bulunduğu raphe çekirdeklerinden kaynaklanan asendan serotonerjik

dallar hipotalamusu ve limbik yapılardan özellikle hipokampus ve amigdalayı inerve etmektedir. Hipotalamus ve limbik sistem dışında NTS'ye de afferent dallar gönderen raphe çekirdeğın elektrıksel stimölasyonu dorsal vagal kompleks (DVK)'de 5-HT salınımına neden olmuştur (10). PVN'de önemli miktarlarda 5-HT immünoaktivitesine rastlanılmıştır. Dorsal ve median raphe çekirdeklerinden kalkan asendan dallar PVN'de CRF içeren nöronlarla sinaps yapmaktadır. Yine hipotalamusta CRF salınım kapasitesini etkileyen periventriküler serotonerjik nöronlar bulunmaktadır. Kortikotropik aks üzerinde uyarıcı etkiye sahip olan ve hipofizer-portal sisteme CRF salınımını arttıran 5-HT, dolaylı yoldan plazma ACTH ve GK seviyelerini artırırken, aynı etkileri doğrudan hipofiz ve adrenal bez üzerinden de yapmaktadır. Anatomik, histolojik ve biyokimyasal bulgular serotonerjik sistem ile hipofiz ve adrenal bezler arasında doğrudan ilişkinin varlığını ortaya koymaktadır. Santral serotonerjik nöron lezyonu ve 5-HT sentez inhibitörünün ACTH ve kortikosteron (KS) seviyelerini azalttığına gösterildiği çalışma ile hipotalamik serotonerjik nöron lezyonlarının stres sonrasında (hareket kısıtlama stresi, şartlanmış emosyonel stres) gözlenen plazma KS seviyesindeki artışı önlediğinin ortaya konduğu çalışma, 5-HT'nin HPA aksı üzerindeki modölator etkilerini gösteren deneylere iki örnektir. 5-HT'nin HPA aksı dışında sempatik sinir sistemi üzerinde de modölator etkisi olduğu ve bu etkide de HPA aksında olduğu gibi CRF'nin aracılık ettiği düşünölmektedir (15).

Alt gruplar dışında beş tip 5-HT reseptörü bulunmaktadır. 5-HT<sub>1A</sub> reseptörü yoğun olarak dorsal ve median raphe çekirdeklerinde (serotonerjik nöronların hücre gövdeleri ve dendritlerde) bulunmaktadır. Ayrıca hipokampus, septum, hipotalamus, frontal korteks ve spinal kordda 5-HT<sub>1A</sub> reseptörlerine rastlanılmıştır. 5-HT<sub>2</sub> reseptörleri neokorteks, ve hipotalamusta, 5-HT<sub>3</sub> reseptörleri ise amigdala, hipokampus ve nukleus akkumbens'te yoğundur. Aynı zamanda periferde bulunan dokularda, enterik sinir sisteminin miyenterik ve submukozal hücre gövdelerinde, vagal duysal sonlanmalarda ve sempatik sistemde saptanan 5-HT<sub>3</sub> reseptörleri anksiyetenin kontrolünde önemli role sahiptir. 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonistinin amigdalaya mikroenjeksiyonu anksiyolitik etkiye neden olmuştur. Santral serotonerjik sistemin SAA üzerindeki modölasyonu ise daha çok 5-HT<sub>1A</sub>, 1C ve 5-HT<sub>2</sub> reseptörleri üzerindedir (31, 15).



### **C. Kolesistokinin (CCK)**

Beyinde bulunan en yoğun nöropeptidlerden biri olan CCK'in biyolojik etkileri arasında stres, anksiyete ve panik atağın davranışsal ekspresyonu ile öğrenme ve hafızanın modülasyonu vardır. Kolesistokinin SSS'de en çok bulunan moleküler formu CCK-8s (sulfatlanmış oktapeptid)'dir ve iki çeşit CCK reseptörü vardır: CCK<sub>A</sub> ve CCK<sub>B</sub>. Genel olarak periferde bulunan CCK<sub>A</sub> reseptörü aynı zamanda SSS'de NTS, area postrema (AP), interpedüncüler çekirdek ve hipotalamus ile kan beyin bariyerinin (KBB) zayıf olduğu ve periferik dokuların santral modülasyonunun gerçekleştiği bölgelerde bulunmaktadır. CCK<sub>B</sub> reseptörü beyinde geniş bir alana yayılmış olmakla birlikte en yoğun bulunduğu alanlar limbik yapılardır: Hipokampus, olfaktör tuberkül, amigdala ve nukleus akkumbens. CCK-8s her iki reseptör için benzer afiniteye sahiptir. Birçok beyin bölgesinde CCKerjik internöron, terminal veya efferent CCKerjik hücreler bulunmaktadır. Serebral korteks, kauda-putamen, amigdala, hipokampus, hipotalamus ve talamus başta olmak üzere geniş bir alanda saptanan CCKerjik nöronların major projeksiyonları mezolimbik, kortiko-striatal, hipokampo-septal ve talamokortikal projeksiyonlardır (19, 29).

Stresle limbik sistem ve medyodorsal prefrontal kortekste CCK benzeri immünoreaktivitede artma, hipotalamusta ise azalma saptanmıştır. Bu bulgular CCK'in nöroendokrin yanıtı ve bu yanıtın üst beyin yapıları tarafından modülasyonuna katıldığını düşündürmektedir. PVN'de saptanan CRF ve CCK-8 ko-lokalizasyonu ile CCK-8'in sıçan ve insanda plazma ACTH ve KS seviyelerini arttırmış bulunması bu görüşü destekler niteliktedir. Stres çalışmalarında CCK-8 ile CCK<sub>B</sub> reseptörleri arasındaki etkileşim gösterilmiş olmakla birlikte, stres durumunda CCK'in HPA aksı üzerindeki etkisi bilinmemektedir (19, 29).

#### **4.1.2. Stres ile Oluşan Yanıtı Santral Sinir Sistemi Yapılarının Katılımları**

Şu ana kadar yapılan çalışmalar duygulanımın (affect) SSS'de belli bir veya iki yapıya indirgenemeyeceğini, aksine beyinde çok değişik yapıların duygulanımın fizyopatolojik süreçlerine katıldığını göstermiştir. Aynı zamanda, bu çalışmalar santral yapılar arasında özellikle 3 bölgenin duygulanım ve stres ile tetiklenen süreçte daha aktif rol aldıklarını göstermiştir: Hipotalamus, limbik sistem ve korteks.

## **A. Hipotalamus**

Papez tarafından 1937'da ortaya atılan ve Papez döngüsü olarak bilinen teoriye göre talamustan gelen emosyonel duysal uyarılar hipotalamusa gelmekte ve buradan daha üst santral bölgelere (limbik sistem, korteks) değerlendirilmek ve tanımlanmak amacıyla gönderilmektedir. Üst beyin yapılarında işlenen uyarılar tekrar hipotalamusa gelerek döngü tamamlanmakta ve sonuçta stresöre uygun otonom ve nöroendokrin yanıt oluşmaktadır. Bu teori bugün birçok açıdan doğrulanmıştır (106).

Streste indüklenen otonom ve endokrin yanıtta hipotalamusta PVN'nin parvosellüler bölgesinde bulunan CRF içeren nöronlar çok önemlidir. Fakat PVN'nin parvosellüler bölgesinde stresle 4000 CRF (+) hücre saptanmışken, toplam c-fos pozitifliğin 6000 bulunması CRF dışında strese aracılık eden diğer nöronların varlığını akla getirmektedir (53). HPA aksı olarak bilinen yolakta parvosellüler bölgede salınan CRF, ön-hipofizde ACTH salınımına neden olmakta ve dolaşıma verilen ACTH adrenal bezde GK salınımını uyarmaktadır. PVN'nin alt nöron gruplarından salınan CRF ise, beyin sapında LS üzerinden sempatik sinir sisteminde ve DVK üzerinden parasempatik sistemde aktivasyona neden olmaktadır (97).

## **B. Limbik Sistem**

Zaman içinde yapılan anatomik ve fizyolojik çalışmalar Papez teorisini birçok yönden doğrulamış, fakat 1989 ve 1995'de LeDoux tarafından geliştirilen teorilerle limbik sistem daha fazla önem kazanmaya başlamıştır (106). Bazı türlerde içgüdü ile hipotalamus üzerinden düzenlenen davranış ve fizyolojik süreçler, primatlarda ve özellikle insanda, limbik sistem ve korteksin gelişimi sonucunda emosyon ve öğrenmenin katılımı ile çok daha kompleks hale gelmiştir. Emosyonda en önemli limbik sistem yapısı amigdaladır. Hem hipotalamus hem de korteks ile çift yönlü bağlantılara sahip olan amigdala emosyonel yanıt için merkez konumdadır. Amigdala hipokampus ile birlikte duysal girdiler ile uygun pozitif veya negatif emosyonel durum arasındaki bağlantıyı sağlar. LeDoux'a göre emosyonel yanıtın oluşumu için iki önemli yolak mevcuttur:

1. Talamo-amigdaloid yolak: Bu yolakta emosyonel değeri olan uyarılar aynı anda hem amigdala hem de kortekse gider ve öncelikle amigdala kaynaklı hızlı otonomik ve endokrin yanıt oluşur.
2. Talamo-amigdaloid-kortikal yolak: Daha kompleks fakat daha yavaş oluşan ikinci yanıtta amigdalaya gelen ve buradan mevcut bilgilerle amaca yönelik işlenmek üzere kortekse giden uyarı, tekrar amigdalaya gelir. Buradan beyin sapı ve hipotalamusta

bulunan çekirdeklere giderek bu yapılar üzerinden strese bağlı otonom ve endokrin yanıtı modüle eder (106).

Emosyonel durumlarda amigdalanın merkezi konumu birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Örneğin amigdala lezyonlarında, özellikle şartlanmış/öğrenilmiş stresörlere karşı oluşturulan emosyonel cevapta azalma, otonom, nöroendokrin ve davranışsal cevapta yetersizlik/blokaj gözlenirken, fiziksel strese karşı oluşan cevapta bir değişiklik saptanmamıştır. Yine amigdala strese karşı oluşturulan pasif mücadelede rol almaktadır. Amidalanın santral çekirdeği (CeA)'nin vazopressin (VP)'le vazopressin reseptörü V1a üzerinden stimülasyonu pasif mücadeleye neden olurken, oksitosin (OT) veya yüksek doz VP, OT reseptör aracılı CeA inhibisyonu oluşturmaktadır (81). Bunun için amigdaloid VP ve OT reseptörlerindeki yoğunluk veya sensitivite strese bağlı oluşacak yanıtta belirleyicidir. CeA lezyonu davranışsal yanıtın pasif komponentini bozmakta (80), plazma E, NE ve KS seviyeleri CeA lezyonundan etkilenmektedir (79). Streste ana mediyatör olan CRF ve CRF içeren nöronların önemli bir bölümü amigdalada bulunmaktadır. Özellikle CeA kaynaklı bu nöronların dopaminerjik, noradrenerjik ve serotonerjik nöronlara doğrudan projeksiyonları saptanmıştır.

Amigdala dışında emosyonun limbik kontrolünde ve HPA aksının modülasyonunda kritik bir öneme sahip olan yapı hipokampal komplekstir. Kronik streste temporal lob (hipokampus, dentat girus) ve prefrontal korteks CeA üzerinden habituasyona (adaptasyona) neden olmakta, normal şartlarda hipokampus kortikosteroid biyosentezini kolaylaştırırken, streste HPA aksı üzerindeki negatif modülasyon ile inhibisyonuna neden olmaktadır (40).

### C. Sağ ve Sol Serebral Hemisferler

Özellikle primatlarda önem kazanan korteks canlının yeni uyarı karşısında adaptasyonu ile sağlıklılık halinin devamını sağlar. Frontal kortekste oluşan hasar ise uygun duygulanım seçimi ve sosyalizasyon açısından problem oluşturur.

Beynin her iki hemisferi arasında işlevleri açısından belli derecelerde uzmanlaşma göze çarpmaktadır. Hem HPA aksının hem de sempatik sistemin modülasyonu temel olarak sağ yarıküre tarafından sağlanmakla birlikte, stres ile oluşan *defansif yanıtta* (approach-related emotion) sol serebral hemisfer ve sempatik sistem aktivasyonu daha baskın iken, *konservatif-çekilme yanıtında* (avoidance-related emotion) sağ serebral hemisfer ve HPA aksı daha baskındır. Daha çok emosyonel (negatif ve pozitif emosyonlar) durumlar, uyanıklık ve otonom sinir sistemi için özelleşmiş sağ serebral hemisfere karşı, sol serebral hemisfer bilişsel fonksiyonların gerçekleştiği alandır. Defansif yanıtta sol frontal lob, konservatif



yanıtta ise sağ frontal lob aktive olmaktadır. Her iki hemisfer arasında gözlenen bu fizyolojik farklılaşmalar histokimyasal çalışmalarla da desteklenmiştir. Duysal girdilerin analiz edildiği sağ hemisferde uyanıklık (arousal) ve dışa-dönük dikkate (outward-directed attention) aracılık eden nöral ağ daha fazladır. NE'in nörokimyasal dağılımında gözlenen sağ hemisfer baskınlığı da iki hemisfer arasındaki bu asimetriyi doğrulamaktadır.

Sağ ve sol hemisferler arasındaki asimetri pozitif ve negatif duygulanım arasındaki asimetriye neden olmaktadır. Örneğin, sağ ve sol serebral hemisferler ile otonom ve nöroendokrin yanıtta sorumlu sub-kortikal alanlar arasındaki fonksiyonel kopukluk (disconnection) hipotezi ile açıklanan "repressif mücadele" (repressive coping) şeklinde, bu kopukluğa bağlı olarak subjektif ve fiziksel sistem arasındaki ilişki zayıflamakta, emosyonel durumun farkında olma derecesi azalmakta (stresin algılanması ve tanımlanmasında azalma), buna karşılık otonom, somatik ve davranışsal komponentlerde aktivasyon gözlenmektedir. Otonom, somatik ve davranışsal komponentlerinde gözlenen bu hiperaktivasyon, hipertansiyon, inflamatuvar ve fonksiyonel barsak hastalıkları gibi, birçok fonksiyonel ve sistemik hastalıkların patogeneğinde stresin rolüne açıklama getirebilir niteliktedir (106, 88).

## **4.2. Stres ve İnflamasyon**

### **4.2.1. Stres ve İmmün Sistem**

Stresin immün sistem üzerine etkilerini araştıran çalışmalar, stres sonrasında oluşan yanıtın, stresin doğası, süresi ve deneğin psikofizyolojik özellikleri gibi birden fazla değişkene bağlı olduğunu göstermiştir. Bilişsel ve affektif süreçler arasındaki farklılıklar immün sistemde birbirine zıt yanıtlara neden olmaktadır. Örneğin, kontrol ve tahmin edilemeyen stres hücrel immün yanıtta ve sitotoksik T lenfosit (natural killer; NK) aktivitesinde azalmaya; bilişsel aktivitenin de katıldığı akut mental stres ise NK hücrelerin sayısı ve aktivitesinde kısa süreli artmaya neden olmuştur (18).

Başka bir çalışmada, streste aktif mücadele tarzını seçen rezistan domuzlarda (sempatik sinir sistemi baskınlığı olan) in vivo ve in vitro şartlarda spesifik ve nonspesifik antijenlere karşı daha fazla hücrel immün yanıt oluşmuş, nonrezistan domuzlarda (parasempatik sinir sistemi baskınlığı olan) ise hücrel yanıtta gecikme ve humoral yanıtta artma gözlenmiştir (41).

Strese bağlı olarak üst beyin yapılarından korteks ve limbik yapıların katılımı ile hipotalamik düzeyde gerçekleşen santral yanıt, periferdeki dokulara HPA ve/veya SAA ile

taşınmaktadır. HPA aksında, PVN'nin parvosellüler bölgesinden median eminense giden CRF nöronları dolaşıma ACTH salınımına neden olmakta ve dolaşımda bulunan ACTH adrenal korteksten GK salınımını arttırmaktadır. PVN'nin dorsal bölgesinden kalkan ve beyin sapında bulunan otonom merkezi inerve eden diğer CRF nöronlarının stimülasyonu sempatik sinir sistemde aktivasyona neden olmaktadır. Bu iki aksın uyarılması sonucunda artan plazma GK, E ve NE seviyeleri immün sistem yanıtını değiştirmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda plazma steroid ve katekolamin seviyelerinde ve immün sistem aktivitesinde gözlenen santral CRF'ye bağlı artışların HPA aksının blokajı (aminoglutethimid, metirapon, GK reseptör antagonistleri) ve sempatik sinir sisteminin blokajı (sempatik gangliyon blokajı, adreno reseptör blokajı) ile önlediği görülmüştür. Normal şartlarda HPA aksının son ürünü olan GK'ler ile lökosit migrasyonu ve NK hücre aktivitesinde azalma, bradikinin ve histamin salınımı ile sitokinlerin oluşumunda inhibisyon gözlenmektedir (5).

Stresle gözlenen immün sistem yanıtındaki değişikliğin bir diğer açıklaması stresten sonra T lenfosit oranları arasında gözlenen farklılıklardır. Daha çok hücre sel immüniteden sorumlu yardımcı T hücreleri ( $T_H$ )-1 özellikle interlökin (IL)-2, IL-12 ve interferon (IFN)- $\alpha$  salınımına ve makrofaj aktivasyonuna neden olurken, IL-4 ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımının daha çok görüldüğü  $T_{H2}$  hücreleri aracılığıyla humoral immünitede artış, ve makrofajlarda deaktivasyon görülmektedir. İn vivo koşullarda birçok immün olay  $T_{H1}$  hücre baskınlığı ile başlamakta ve bu baskınlık daha sonra  $T_{H2}$  hücrelerine kaymaktadır. Artmış plazma GK'leri bu kaymayı önlemektedir. Sempatik sinir sistemindeki aktivasyon veya lokal kortizol/dehidroepiandrosteron (DHEA) oranındaki artış  $T_H/T_S$  (süpresör T hücreleri) ile  $T_{H1}/T_{H2}$  oranlarında değişikliğe neden olmaktadır (18, 39, 43, 94).  $T_{H1}$  ve  $T_{H2}$  aktivitelerinin HPA aksının aktivitesine göre değişmesi, HPA aksındaki hiper- veya hipoaktiviteye göre, organizmanın strese ve stresle birlikte giden immünolojik komponentli hastalıklara farklı duyarlılık göstermesine neden olmaktadır. Hiporeaktif HPA aksının saptandığı sıçanlarda stresle indüklenen NE seviyesindeki artış ve  $\beta_2$  adrenerjik reseptör sensitivitesi daha az olmaktadır. HPA aksı aktivitesinin normal düzeyde olduğu şartlarda ise, vagal duysal nöronla HPA aksının aktivasyonu sempatik postgangliyonik nöronların uyarılmasına neden olmakta ve bu şekilde anti-inflamatuvar etki oluşmaktadır (24, 32, 38).

#### 4.2.2. İnflamatuvar Sitokinler ve HPA Aksı

Paraventriküler çekirdek ve HPA aksında stresle saptanan bazı değişiklikler, bakteriyal lipopolisakkarit (LPS) ve IL-1 $\beta$  tedavileri sonrasında da gözlenmiştir. İnflamasyon esnasında plazma seviyeleri artan IL-1, IL-2, IL-6, platelet (trombosit) aktive edici faktör (PAF) ve tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$  gibi sitokinler viseral duysal nöronları (özellikle vagus) uyararak etki yaptığı gibi, inflamasyonla bütünlüğünü kaybeden KBB'ni difüzyon veya spesifik aktif transport mekanizması ile geçerek medüller katekolaminerjik hücrelerde aktivasyon oluşturabilmektedir. Lokus seruleus ve NTS'den kalkan katekolaminerjik inervasyonlar, başta amigdala olmak üzere, amigdala ve PVN'ye asendan dallar göndermektedir. Bu yolla dolaşımda bulunan inflamatuvar mediyatör ve sitokinler aracılığıyla bir taraftan doğrudan hipotalamus etkilenmekte, dolaylı yoldan ise amigdalanın modülasyonu ile PVN'de CRF mRNA ekspresyonunda artma ve HPA aksında hiperaktivasyon oluşmaktadır (27, 45, 100). Yapılan çalışmalarda intraserebroventriküler ve sistemik IL-1 veya sistemik LPS tedavileri PVN'de CRF ekspresyonuna neden olmuş, hipofizer-portal sistemde CRF, plazmada ACTH ve GK seviyelerini yükseltmiştir. Sistemik IL-1 $\beta$  uygulaması NTS gibi vagal duysal sonlanmaların bulunduğu bölgelerde c-fos mRNA ve protein ekspresyonunu artırmıştır. Başka bir çalışmada uygulanan TNF $\alpha$  santral NE, dopamin ve 5-HT metabolizmasını değiştirmiş, LS ve dorsal hipokampusta NE aktivasyonuna, prefrontal korteks ve hipokampusta 5-HT hiperaktivasyonuna yol açmıştır (24, 27, 32, 38, 77, 78, 100).

#### 4.2.3. Stresin İnflamatuvar Barsak Hastalıklarına Etkileri

İnflamatuvar barsak hastalıklarına neden olan faktörler tam olarak bilinmemekle birlikte, şu ana kadar yapılan çalışmalarla immün, çevresel ve genetik faktörlerin hastalığın patofizyolojisinde rol oynadıkları ortaya çıkmıştır (76, 84). İBH'da, emosyonel stres semptomların alevlenmesine neden olmakta fakat bu alevlenmenin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Crohn hastalığı ve ülseratif kolit olmak üzere iki formu bulunan İBH, akut alevlenmelerle giden idiyopatik kronik inflamatuvar barsak hastalıklarıdır. Crohn hastalığı sık olarak ileum ve kolon tutulumu göstermekle birlikte, gastrointestinal segmentin herhangi bir yerinde gözlenebilmektedir. Transmural inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile karakterizedir ve bu hastalıkta fokal, kronik granülomatoz inflamasyon oluşmaktadır. İnce barsak tutulumunun gözlenmediği ülseratif kolit ise, kolon ve rektumun mukozal inflamasyonudur (76).

Etiyolojileri tam olarak bilinmeyen İBH'nın, patogenezinde rol alan immünojenik ve inflamatuvar mekanizmalar ile, inflamatuvar mediyatörler konusunda pek çok çalışma bulunmaktadır. Araşidonik asit metabolizmasının siklooksijenaz ve lipooksijenaz yollarının çeşitli ürünlerinin deneysel kolit modellerinde artmış olduğu gözlenmiş, İBH'lı hastaların rektal biyopsilerinde aynı mediyatörler yüksek miktarlarda saptanmıştır. Artış özellikle prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), lökotrien (LT)-B<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), TXB<sub>2</sub> ve PAF seviyelerinde görülmektedir (39-43). Deneysel kolit modelleri göstermiştir ki, dolaşımda artan endotoksin ve sitokinler (IL-1, TNF $\alpha$  ve INF $\gamma$ ) bir taraftan immün sistem hücrelerini aktive etmekte (nötrofiller, makrofajlar, mast hücreleri ve T lenfositleri), diğer taraftan aktive olan bu hücreler siklooksijenaz ürünlerinin de katılımıyla nitrik oksit üretimini arttırmaktadır. Bu şekilde, ortama salınan endotoksin ve sitokinler GI sistemde nitrik oksit aracılı hasar oluşturmaktadır (68-70). Yine stres ile artmış sempatik aktivasyona bağlı kolon kan akımındaki azalma ve bunun sonucunda oluşabilecek iskeminin de İBH patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (33).

Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalar stresin İBH'da alevlenmelere neden olduğunu ve semptomların şiddetini artırdığını göstermiştir. Bu verilerin ışığında, İBH ve fonksiyonel barsak hastalıklarının patogenezinde rol alabilecek nöroenterik-immün aks ile, bu aksın santral sinir sisteminin de katılımı ile ortaya çıkan gastrointestinal modülasyonu konusundaki çalışmalar önem kazanmış ve başta CRF olmak üzere, çeşitli santral nörotransmitterler ile HPA ve SAA'larının rolleri araştırılmaya başlanmıştır (57, 71).

#### 4.2.4. Stresin Deneysel Kolit Modelleri Üzerine Etkileri

İnflamatuvar barsak hastalıklarının patogenezinin çalışabilmek için geliştirilen deneysel kolit modellerinden biri olan etanol/TNBS kolit modeli, bütün yönleriyle İBH'nın özelliklerini taşımasa bile, İBH ile birçok yönden benzerlikler göstermektedir. Etanol ile mukozal geçirgenliğin arttığı bu modelde artmış geçirgenlik sonrasında oluşan ilk hasar vasküler konjesyon ve nekrozdur. Daha sonra mukozada ödem, kalınlaşma ile yoğun inflamasyon ve kanama alanları gelişmekte ve bir hafta içinde mukozal yüzeyde ülserasyon oluşmaktadır. Crohn hastalığında görülen kronik transmural inflamasyon ve histopatolojik özellikler TNBS kolitinde de oluşmaktadır. Transmural inflamasyon tablosunda nötrofil, monosit ve makrofaj infiltrasyonunun yanısıra granülamotöz ve Langhan's tipi dev hücreler ile fibroblast ve damar proliferasyonu gözlenmektedir. Granülamotöz inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve ülserasyon bir hafta içinde gelişmekte, en az 8 hafta sürmektedir.

Makroskopik görünüm, büyük lezyon alanları, ülser morfolojisi, yer yer gözlenen normal alanlar ile etkilenen bölgede oluşan kalınlaşma, ödem ve fibrinoid adezyonlar İBH ile paylaştığı diğer benzerliklerdir. Bu benzerliklerinin yanısıra granülomlara İBH kadar sık rastlanmaması ve periyodik relaps ve remisyonların görülmemesi gibi bazı nedenlerden dolayı, TNBS kolit modeline “İBH modeli” yerine “kronik transmural granüloamatöz kolon inflamasyonu modeli” demek daha doğru bir ifade olacaktır (66, 67).

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda stres - santral CRF - deneysel kolit ilişkisi ve santral modülasyona HPA aksının katılımı açısından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Deneysel kolit modelleriyle yapılan çalışmaların bir kısmında kronik stresin TNBS ile oluşturulan kolit tablosunu artırdığı, santral uygulanan CRF'nin anti-inflamatuvar etki gösterdiği ve yine CRF reseptör antagonisti astresinin kolitin strese olan cevabında artışa neden olduğu gözlenmiştir. HPA aksı açısından hiporeaktif veya hiperreaktif olan sıçanlar arasında strese verilen yanıtlar karşılaştırıldığında, kronik stresin HPA-hiporeaktif hayvanlarda TNBS ile oluşan koliti daha fazla ağırlaştırdığı saptanmıştır (64). Hiporeaktif olan türde 5-HT agonisti, IL-1 $\beta$  veya eksojen CRF uygulaması ile plazma kortikotropin ve KS yanıtında yetersizlik gözlenmiştir (16). Başka bir çalışmada, stres ile indüklenmiş gastrointestinal patofizyolojik değişiklikler de, santral CRF salınımına bağlı fakat HPA aksının uyarısından bağımsız bir mekanizma ile açıklanmıştır (34). Diğer bir çalışmada ise strese indüklenen deneysel kolitteki artışın CRF ve AVP'den farklı bir mekanizma ile gerçekleştiği ileri sürülmüştür (37).

Stresin periferdeki etkilerini araştırmak için yapılan çalışmalarda ise, akut ve kronik stresin GI geçirgenlik (iyonik ve makromoleküler geçirgenlik) ile epitel sekresyonlarda (iyon, immüoglobülin-A; IgA ve müsin sekresyonunda) artışlara neden olduğu, benzer etkilerin eksojen CRF uygulamasıyla da gözlemlendiği belirtilmiştir (82, 83, 86). Stres ve eksojen CRF ile epitelde görülen değişikliklerin oluşumuna kolinerjik sistem ve mast hücreleri aracılık etmektedir (83, 93). Strese bağlı epitel bariyer fonksiyonunda gözlenen söz konusu değişikliklerle, bir taraftan mikrobiyal antijenlerde dahil olmak üzere lüminal içeriğin mukozaya geçmesi kolaylaşmış mukozada immün olaylar tetiklenmekte, diğer taraftan artmış iyon, müsin ve IgA sekresyonlarıyla anti-inflamatuvar etki oluşabilmektedir (93).

Özetle, stres GI inflamasyonu değişik seviyelerde modüle etmektedir. Stresle ortaya çıkacak net inflamatuvar yanıtın şekli ise HPA aksı, sempatik sinir sistemi, enterik sinir sistemi ve kolonda meydana gelecek değişikliklerle belirlenmektedir. Stresin süresi ve doğası ile canlının psikofizyolojik özellikleri bu bölgelerde farklı modülasyonlara neden olmakta ve bölgelerden bir veya ikisinin baskınlık kazanması veya diğerlerinin etkinliğinin azalmasıyla strese ait net yanıt anti- veya pro-inflamatuvar yönden birisine doğru kaymaktadır.



## 5. AMAÇ

Üç bölüm halinde tasarlanan bu çalışmanın ilk bölümünde amaç, akut ve kronik stresin yanısıra kronik stres zemininde uygulanan akut stresin TNBS ile oluşturulan kolite etkilerini araştırmak ve santral olarak uygulanan CRF, 5-HT<sub>3</sub> ve CCK<sub>B</sub> reseptör antagonistleriyle bu etkilerin oluşumunda rol alabilecek olası santral nöron ve aracıları ortaya koymaktır. İkinci bölümde santral olarak verilen eksojen 5-HT ve CCK agonistleriyle görülebilecek olası anti- veya pro-inflamatuvar etkiler üzerine CRF, 5-HT<sub>3</sub> ve CCK<sub>B</sub> reseptör antagonistlerinin etkileri araştırılarak, bu üç santral reseptör arasındaki karşılıklı etkileşimler gösterilmeye çalışılmıştır. Son bölümde ise stres, santral 5-HT veya CCK agonistleriyle oluşan santral yanıtın GI sisteme taşınmasında rol alabilecekleri düşünülen iki yolağın; HPA aksı ve sempatik sinir sisteminin santral modülasyona katılımlarını açığa çıkarmak amaçlanmıştır.

## 6. GEREÇ ve YÖNTEM

### 6.1. Denekler

Deneylerde 200-270 g ağırlığında erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 22 ± 2 °C sıcaklığında, %65-70 nem içeren ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık dönemleri sağlanan bir ortamda tutularak standart laboratuvar yemiyle beslendiler. Kolit oluşturulmasından 16 saat önce aç bırakılan sıçanlarda cerrahi öncesinde ve deney sırasında su kısıtlaması yapılmadı. Bu çalışma için, kullanılan stres modelleri de dahil olmak üzere, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Etik Kurulundan onay alındı (Onay tarihi: 19.10.1999, Onay no: 28-99).

### 6.2. Stereotaksik Cerrahi Yöntemi

Aseptik koşullarda ketamin (100 mg/kg) ve klorpromazin (30 mg/kg; ip) anestezisi uygulanan sıçanların, stereotaksik alet kullanılarak, sağ lateral ventriküllerine (intracerebroventriküler; isv) paslanmaz çelik iğneden kılavuz kanül (22 gauge) yerleştirildi. Paxinos & Watson'un sıçan beyin atlasına göre bregmadan 1.1 mm arkaya, 1.5 mm yana ve ventrikül yüzeyinden 1 mm yukarıda olacak şekilde kafatasından 3.2 mm derine yerleştirilen

kanüller kafatasına sıkıştırılan 2 adet paslanmaz çelik vidaya dental akrilik yardımıyla tutturuldu (74).

### 6.3. Kolit Modeli ve Skorlaması

Akşamdan aç bırakılan sıçanlara hafif eter anestezisinden sonra polietilen kateterle intrakolonik olarak anüsten 8 cm proksimale taşıyıcı grubunda 0.5 ml hacminde %38 etanol ve kolit grubunda %38'lik etanol içinde çözündürülmüş 0.5 ml TNBS (15mg/sıçan; Sigma) solüsyonu verildi. TNBS uygulamasından 3 gün sonra dekapite edilen hayvanların kolonlarının distal 8 cm'lik kısımları çıkartılarak fizyolojik tuzlu su ile yıkandıktan sonra tartıldı. Makroskopik değerlendirmeden sonra segmentlerin bir parçası mikroskopik değerlendirme için %10 formol içine konarak oda sıcaklığında, kalan parçası ise doku miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

#### 6.3.1. Makroskopik Skorlama

Deneyin son günü dekapitasyonla öldürülen sıçanlardan çıkarılan 8 cm'lik distal kolon segmentlerinin makroskopik hasar değerlendirmesi Tablo 1'deki kriterlere göre yapıldı (104).

**Tablo 1. Kolon hasarının makroskopik skorlamasında kullanılan kriterler.**

Skor	Makroskopik Görünüm
0	Hasar yok
1	Fokal hiperemi var, ülser yok
2	Hiperemi veya kolon duvarında kalınlaşma olmaksızın lineer ülserasyon
3	Bir bölgede inflamasyonla birlikte lineer ülserasyon
4	İki ya da daha fazla bölgede inflamasyon ve ülserasyon
5	İki veya daha fazla bölgede major inflamasyon ve ülserasyon veya bir yerdeki hasarın 1 cm'den daha uzun olması
6-10	Ülser ve inflamasyonun 2 cm'den daha uzun bir bölgeyi tutması (her 1 cm'lik hasar için skor bir birim artırıldı).

### 6.3.2. Mikroskopik Skorlama

Mikroskopik kesitler ve değerlendirmeler Marmara Üniversitesi Histoloji Abd ile birlikte yapıldı. Formol (%10'luk) içinde fikse edilen kolon segmentlerinden parafinle bloklamadan sonra mikroskopik kesitler elde edildi. Hematoksilen ve Eozin ile boyanan kesitlerde gözlenen hasarın derecesi ışık mikroskopisi kullanılarak aşığıdaki skorlama sistemine göre belirlendi (Tablo 2; 37. referanstan uyarlama).

**Tablo 2. Kolon hasarının mikroskopik skorlamasında kullanılan kriterler**

Değişkenler	Mikroskopik Görünüm			
	0	1	2	3
Epitelde dökülme ve hasar	Yok	Hafif	Orta	Ağır
Bez hasarı	Yok	Hafif	Orta	Ağır
Mukozal kanama	Yok	Hafif	Orta	Ağır
İnterstisiyel ödem	Yok	Hafif	Orta	Ağır
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	Yok	Hafif	Orta	Ağır

### 6.3.3. Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Ölçümü

Dokulardan alınan 0.2-0.3 g ağırlığındaki örnekler 20 mM  $K_2HPO_4$  (pH=7.4) çözeltisi ile 10 kez sulandırılıp homojenize edildikten sonra 12.000 devirde 10 dakika süreyle 4 °C'de santrifüje edildi. Aynı hacimde %0.5'lik heksadesiltrimetilamonyum hidroksit içeren 50 mM  $K_2HPO_4$  ile yeniden homojenize edilen örneklerde MPO aktivitesi, o-dianizidin.2HCl'nin  $H_2O_2$ 'e bağlı oksidasyonunun spektrofotometrik ölçümüyle saptandı. Bir ünite enzim aktivitesi, 37 °C'de 460 nm absorbansta (1.0 ml/dk) meydana gelen değişiklik olarak değerlendirildi (9).



## 6.4. Stres Yöntemleri

Bu çalışmada akut ve kronik strese bağlı gelişecek olası yanıtta limbik sistem yapıları ve korteksin katılımlarını sağlamak için, son senelerde “emosyonel stres modeli” olarak kabul gören elektrik şoku kullanıldı (12, 34, 48). Kronik stres modelinde ise elektrik şoku ve uygulama şekli modifiye edilerek öğrenme ve emosyonel durum pekiştirilmeye çalışıldı. İkinci stres modeli olarak da, göreceli olarak daha hafif ve nonülserojenik olan ve hem fiziksel hem de emosyonel olduğu kabul edilen ve sıkça kullanılan “kısmi hareket-kısıtlama stresi” uygulandı (26, 48). Stres modellerinin seçimi, etik açıdan çok dikkatli olunması gereken özel koşulları gerektirdiği için, mümkün olan “en insani” yöntemlerin seçilmesine özen gösterildi. Sirkadian ritm dikkate alınarak bütün stres uygulamaları sabah 10<sup>00</sup>-12<sup>00</sup> arasında gerçekleştirildi.

### 6.4.1. Akut Stres Modelleri

Çalışmada iki çeşit akut stres modeli kullanıldı. İlk modelde karanlık pleksiglas kutulara (32x32x44 cm) konulan sıçanlara alternatif akım (60 V) ile 30 dakika içinde 0.3-0.5 mA aralığında toplam 20 adet 5 saniye süreli elektrik şoku verildi. Deneklerin maruz kaldığı şokun derecesi sıçanlarda stres oluşturan ve ağrı yapmayan aralıkta bulunmakta ve aynı zamanda HPA ve SAA'larını uyararak plazma KS ve katekolamin seviyelerini artırmaktadır (12, 48, 101). Ayrıca şoktan sonra hayvanlarda sıçramanın gözlenmemesi uygulanan elektriğin ağrı oluşturan seviyenin altında olduğunu desteklemektedir. Şoku takiben hayvanların sergilediği davranışlar immobilizasyon (bölmede bir köşeye saklanma) veya kurtulma/kaçma (bölmenin üst kapağından çıkma denemeleri) şeklinde idi. İkinci modelde hafif eter anestezisi altında sıçanlara, üst ekstremitelerini de içine alacak şekilde toraks ve omuz bölgeleri bandajla 2 saat süre ile sarılarak, kısmi hareket-kısıtlama stresi uygulandı.

### 6.4.2. Kronik Stres Modeli

Kronik stres modelinde, ilk gün uygulanan elektrik şokundan sonraki üç günde sıçanlar aynı saatlerde (10<sup>00</sup>-12<sup>00</sup>) ve yine 30 dk'lık süreler içinde, şok uygulanmadan stresin uygulandığı karanlık bölmede tutuldu. Elektrik şokuna maruz kalmasalar dahi 3 gün süreyle aynı bölmede kalmakla deneklerde emosyonel stres oluşturulduğu düşünüldü. Ayrıca bu bölmelerde kurulan düzenekte sıçanlar şoku sadece dedektörün (fotosel) önüne geldikleri

zaman aldıkları için 5-6 şoktan sonra saklanarak kaçmayı öğreniyorlardı. Böyle bir deney düzeneği oluşturularak, bir şekilde öğrenmenin ve emosyonun, dolayısıyla limbik sistem yapılarının sürece katılması amaçlandı.

#### **6.4.3. Kronik Zeminde Uygulanan Akut Stres Modeli**

Bu modelle, 4 günlük stres uygulaması ile SSS'nde ve dolayısıyla HPA aksı ve/veya otonom sinir sisteminde gerçekleşen modülasyon (sensitizasyon veya desensitizasyon) sonrasında, uygulanan farklı bir akut stresin etkisini ne yönde göstereceği saptanmak istendi. Burada amaç, basit bir şekilde de olsa, İBH'larında gözlenen kronik stres zeminindeki akut alevlenmeleri taklit etmeye çalışmaktı. Bunun için yukarıda tarif edilen kronik strese 4. gün 2 saatlik kısmi hareket-kısıtlama stresi eklendi.

#### **6.5. Santral ve Periferik Enjeksiyonlar**

Butün santral agonist ve antagonist enjeksiyonları isv kanülasyondan en az 5 gün sonra 50 µl'lik Hamilton enjektörüyle 5 µl hacminde yapıldı. Santral antagonist uygulamalarında, maddeler herbir isv agonist veya stres uygulamasından 10 dk önce enjekte edildi. Agonistlerden CCK-8s (Sigma) ve serotonin (Sigma), antagonistlerden 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonisti ramosetron (Sigma) ve CRF reseptör antagonisti astressin (Dr. Jean Rivier, The Salk Institute) serum fizyolojik (SF) içinde; CCK<sub>B</sub> reseptör antagonisti CI-988 (Parke-Davis, Neuroscience Res. Centre, Cambridge) ise %3'lük dimetil sulfoksit (DMSO; Sigma) içinde çözüldürüldü. Santral "taşıyıcı" gruplarında serum fizyolojik veya %3'lük DMSO isv olarak verildi.

Intraperitoneal (ip) enjeksiyonlardan glikokortikoid reseptör antagonisti RU-486 (mifepriston; Sigma) %25'lik etanol içinde süspansiyon halinde hazırlanarak 1 ml hacminde yapıldı, diğer ip enjeksiyonların hacmi 0.3 ml idi. Agonist ve antagonistlerin ip enjeksiyonları isv verilen dozlarında uygulandı. Sempatik gangliyon blokeri heksametyum bromid (Sigma) serum fizyolojik içinde çözüldürülerek ip uygulandı.

## 6.6. Deney Protokolü

Deneylere isv kanülasyonu takiben 5 günlük bir iyileşme ve alışma döneminden sonra başlandı. Sirkadian ritm dikkate alınarak bütün deneyler sabah 10<sup>00</sup>-12<sup>00</sup> ile öğleden sonra 14<sup>00</sup>-16<sup>00</sup> arasında yapıldı. Çalışma stres ve santral agonist grupları olmak üzere 2 ana grupta yürütüldü. Alt gruplar en az 6 (6-15) hayvandan oluştu. Elektrik şoku veya kısmi hareket kısıtlama stresi gruplarında, stresten 4 saat sonra, kronik stres ve kronik zeminde uygulanan akut stres grupları ile isv agonist gruplarında ise son uygulamadan 4 saat sonra TNBS ile kolit oluşturulan hayvanlar 3. günde dekapite edilerek kolit hasarı açısından değerlendirildi.

### 6.6.1 Stres Grupları

Akut stres grubunda 30 dk süreli elektrik şoku veya 2 saatlik kısmi hareket kısıtlama stresi uygulandı. Literatüre uygun olarak antagonist veya blokerler ile bunların taşıyıcılarının kullanıldığı gruplarda isv enjeksiyonlar stresten veya isv agonist enjeksiyonundan 10 dk önce; ip heksametyum 30 dk önce ve 24 saat sonra olmak üzere iki doz; ip RU-486 ise 12 ve 1 saat önce, 24 saat sonra verilmek üzere toplam 3 doz şeklinde yapıldı (14, 62). Santral antagonistlerden astressin ve ramosetron literatüre uygun olarak sırası ile 2.5 µg/sıçan ve 10 µg/sıçan dozlarında yapılırken (52, 74), CI-988'nin 2.5, 5 ve 10 µg/sıçan dozları denendi ve 2.5 µg/sıçan dozunda bir etki gözlenmedi. Etki açısından 5 ve 10 µg/sıçan dozları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı için çalışmanın devamında 5 µg/sıçan dozu kullanıldı. Heksametyum 15 mg/kg ve RU-486 10 mg/kg dozlarında enjekte edildi (14, 62). Akut stres, kronik stres ve kronik zeminde uygulanan akut stres gruplarıyla bu bölümde, değişik stres modellerinin oluşturduğu santral yanıtın deneysel kolit patogenezinin etkileri ile bu etkilere katılan santral ve periferik mekanizmaların rolleri araştırılmış oldu.

### 6.6.2 Santral Agonist Grupları

Stresle oluşan akut süreçte ilk 24 saat önemli olduğu için stresle tetiklenen santral modülasyona ve sirkadian ritme uygunluk açısından santral agonist enjeksiyonları sabah 10<sup>00</sup>, öğleden sonra 14<sup>00</sup> ve ertesi sabah 10<sup>00</sup>'da olmak üzere 3 doz halinde yapıldı. Nitekim 4 gün arka arkaya sadece sabahları yapılan enjeksiyonlarda anlamlı bir yanıt oluşmadı. Stres grubunda olduğu gibi santral antagonistler herbir isv agonist uygulamasından 10 dk önce aynı

dozlarda enjekte edildi. Heksamatonyum ve RU-486'nın tedavi şeması da stres grubundaki uygulamanın aynısı idi.

Stresle ortaya çıkan modülasyonun santral olup olmadığını test etmek için santral uygulanan her agonist veya antagonist aynı miktarlarda fakat 0.3 ml hacminde ip olarak uygulandı. Yine herbir grupta deney düzeneğine ve enjeksiyona bağlı olarak verilerin etkilenmesinin önüne geçmek için bu grupların aynı zamanda taşıyıcıları da yapıldı ve istatistiksel anlamlılık, grupların kendi taşıyıcıları ile karşılaştırılarak saptandı.

## 6.7. İstatistiksel Analiz

TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde değişik stres modellerinin etkilerini saptamak için kullanılan ölçütler doku yaş ağırlığı, hayvanların kilo alımları, makroskopik ve mikroskopik skor ile doku MPO aktivitesi idi. Doku yaş ağırlığında deney sonrasında çıkartılan 8 cm'lik distal kolon segmentleri tartılarak gram cinsinden ifade edildi. Deney esnasındaki vücut ağırlığı değişiklikleri hayvanların TNBS uygulaması öncesinde ve öldürülürken alınan tartım sonuçlarının farkının gram cinsinden ifadesi şeklinde kaydedildi. Makroskopik skor en fazla 10, mikroskopik skor ise 3 olacak şekilde makroskopik ve mikroskopik hasarın derecesi sayısal verilere dönüştürüldü. Doku MPO aktivitesinde ise dokunun 1 gramı başına düşen enzim aktivitesi "ünite" cinsinden (ünite/gram) ifade edildi.

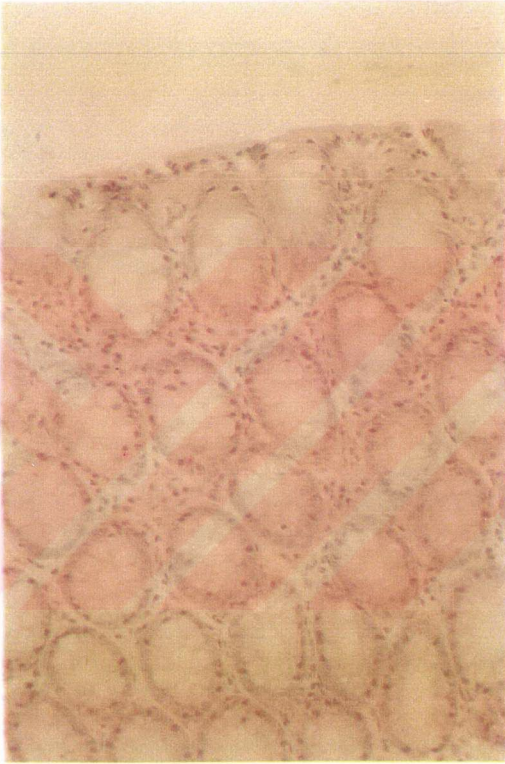
Deney sonucunda elde edilen bütün veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. İki grup arasındaki farklılık Student'ın t testi ile karşılaştırılırken, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında varyans analizi (ANOVA) ve Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması ( $p < 0.05$ ) halinde veriler istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

## 7. BULGULAR

### 7.1. TNBS Kolitiyle Oluşan Doku Hasarının Değerlendirilmesi

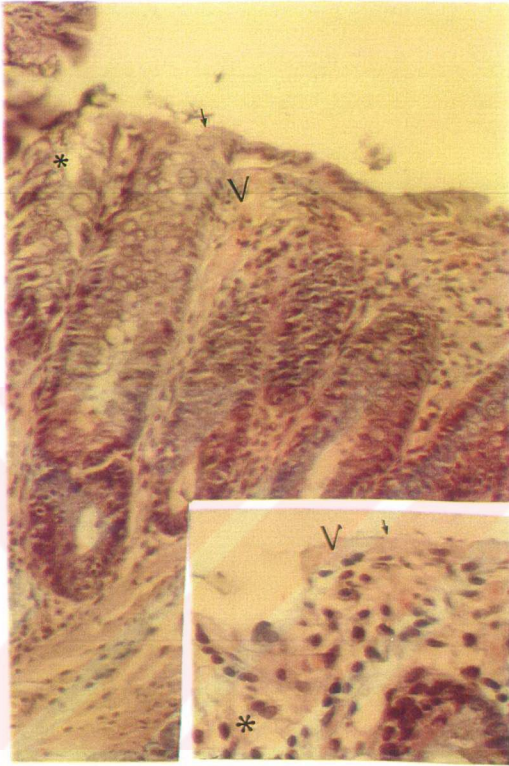
Erkek Sprague-Dawley sıçanlarda TNBS (15 mg/sıçan) ile oluşan doku hasarının derecesi makroskopik ve mikroskopik skor ile doku MPO aktivitesi kullanılarak belirlendi. Kolit grubunda makroskopik skor ( $4.75 \pm 0.52$ ), mikroskopik skor ( $2.9 \pm 0.01$ ) ve MPO aktivitesi ( $162.62 \pm 10.49$  ü/g) açısından taşıyıcı grubu (sırasıyla;  $2.6 \pm 0.49$ ,  $0.15 \pm 0.05$  ve  $102.06 \pm 17.24$  ü/g) ile kıyaslandığında anlamlı farklılıklar saptandı (Şekil 1,  $p < 0.05-0.01$ ).

Histolojik incelemede taşıyıcı grupta yer yer çok dar alanlarda epitel döküntüleri gözlenmekle birlikte genelde epitel ve bez yapısı normal idi. Kolit grubunda ise bezlerde ve epitelde yoğun harabiyet, submukozaya kadar inen lökosit infiltrasyonu, yoğun kanama odakları, epitelde döküntü ve interstisyel ödem saptandı (Resim 1 ve 2).



**Resim 1.** Taşıyıcı (%38'lik etanol) grubunun ışık mikroskopisi görüntüsünde izlenen normal kolon mukoza morfolojisi. Hemotoksilen ve Eozin x66.





**Resim 2.** TNBS (15 mg/sıçan) ile oluşturulan kolitin ışık mikroskopisi görüntüsü. Epitelde dökülme (→), bez hücrelerinde harabiyet (\*) ve kanama bölgeleri (>). Hemotoksilen ve Eozin x66. Küçük Resim: Epitelde dökülme (→), lökosit infiltrasyonu (\*) ve kanama bölgeleri (>). Hemotoksilen ve Eozin x132,

### 7.1.1 Stres Grupları

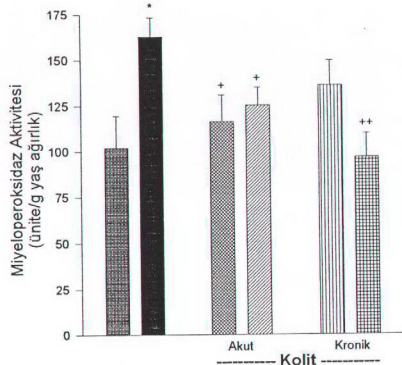
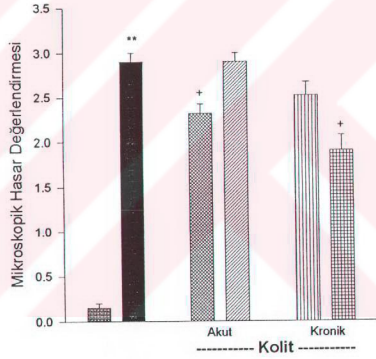
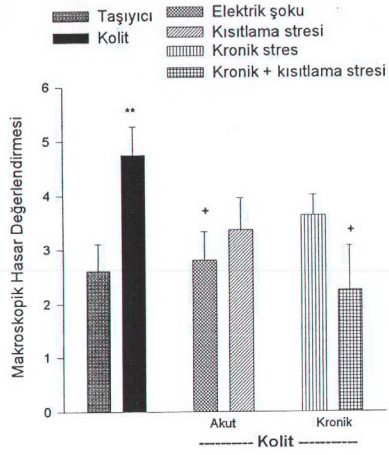
*Akut stres grubunda* elektrik şoku kolit grubuna göre hem makroskopik ( $2.8 \pm 0.53$ ) ve mikroskopik ( $2.31 \pm 0.1$ ) skorda hem de doku MPO aktivitesinde ( $115.99 \pm 14.66$  ü/g) anlamlı azalmaya neden oldu (Şekil 1). İki saatlik kısmi hareket kısıtlama stresinde sadece doku MPO aktivitesindeki ( $125.15 \pm 9.64$  ü/g) düşme anlamlı idi ( $p<0.05$ ). Diğer iki ölçütten makroskopik skorda ( $3.36 \pm 0.59$ ) belli oranda bir düşme eğilimi gözlenirken, mikroskopik değerlendirmede kolit grubu ile kısıtlama stresi arasında hiçbir fark saptanmadı ( $2.9 \pm 0.1$ ). Elektrik şokunda lökosit infiltrasyonu ve interstisyel ödem kolit grubunda gözlenen tabloya benzer iken, epitelde dökülme, kanama ve bez hasarı daha az idi (Resim 3).

*Kronik stres grubunda* makroskopik skor ( $3.63 \pm 0.38$ ) ve doku MPO aktivitesinde ( $135.88 \pm 13.55$  ü/g) belli oranlarda bir azalma gözlendi, ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Histolojik incelemede, ilk iki parametre ile saptanan anti-İnfamatuvar eğilimi destekleyecek şekilde, bezde ve epitel dokuda orta-belirgin harabiyet, orta-yoğun lökosit infiltrasyonu, belirgin interstisyel ödem ve orta derecede mukozal kanamayla giden bir tablo ile karşılaşıldı ve mikroskopik skor  $2.52 \pm 0.15$  olarak ölçüldü.

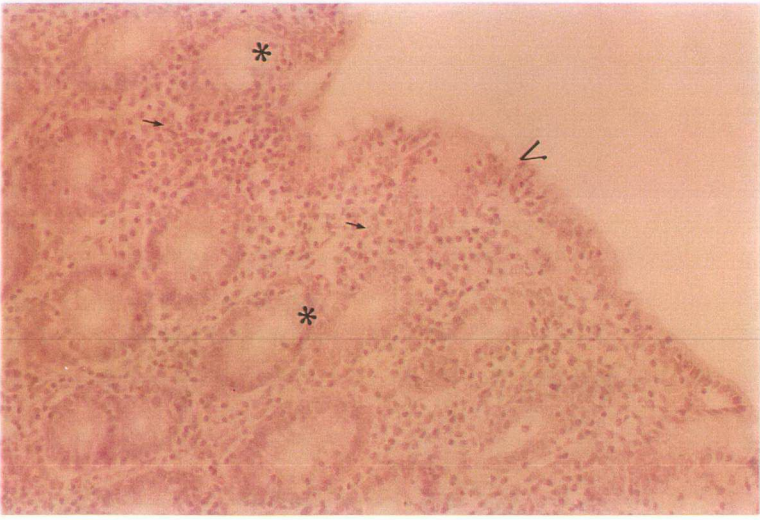
Kısıtlama stresinde düştüğü gözlenen MPO aktivitesi hariç, tek başlarına kronik stres veya hareket kısıtlama stresiyle, diğer parametrelerde fark gözlenmezken, *kronik stres zeminde uygulanan kısıtlama stresi grubunda* tüm parametrelerde anlamlı farklılık saptandı. Bu grupta makroskopik skor  $2.25 \pm 0.82$ , mikroskopik skor  $1.9 \pm 0.17$  ve MPO aktivitesi  $96.65 \pm 13.02$  ü/g olarak ölçüldü (Şekil 1,  $p<0.05-0.01$ ). Aynı zamanda *kronik stres, kısıtlama stresi* ve *kronik zeminde uygulanan kısıtlama stresi* arasında yapılan karşılaştırmada gruplar arasında makroskopik ( $F= 3.015$ ;  $p<0.05$ ) ve mikroskopik ( $F= 7.52$ ,  $p<0.01$ ) skor açısından anlamlılık vardı. Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ile yapılan ileri analizde ise *kronik stres zeminde uygulanan kısıtlama stresinde* saptanan mikroskopik skor, tek başına kronik stres veya kısıtlama stresi gruplarındaki skordan daha düşük idi ( $p<0.05$ ). Işık mikroskopu ile yapılan histolojik incelemede *kronik+kısıtlama stresinde* yer yer hasarlı bölgeler olmakla birlikte epitel ve bez yapısı genelde düzgün, yüzeye yakın bölgelerde dar kanama alanları ve orta derecede lökosit infiltrasyonu gözlendi (Resim 4).

**Şekil 1.** Uygulanan akut ve kronik stres modellerinin, TNBS ile oluşturulan deneysel kolitte gözlenen hasarın derecesi üzerinde gösterdikleri etkilerinin makroskopik ve mikroskopik skor ile doku MPO aktivitesi açısından değerlendirilmesi.

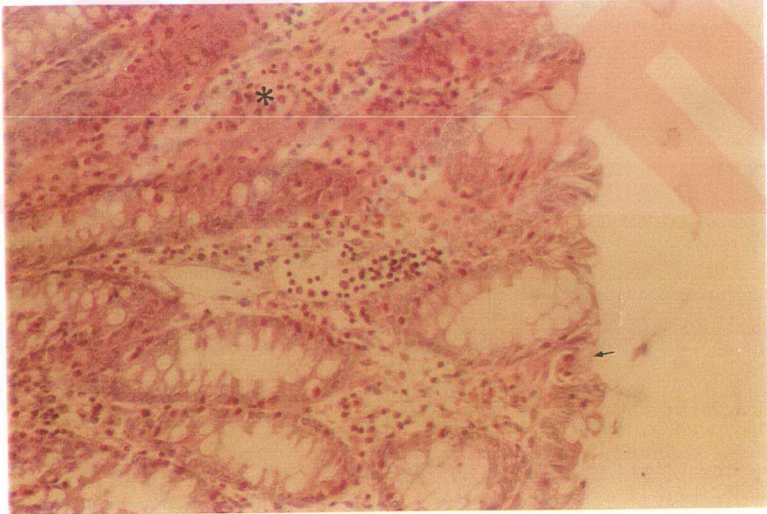
MPO, miyeloperoksidaz; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit  
 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , taşıyıcı grubuna göre  
 + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ , kolit grubuna göre





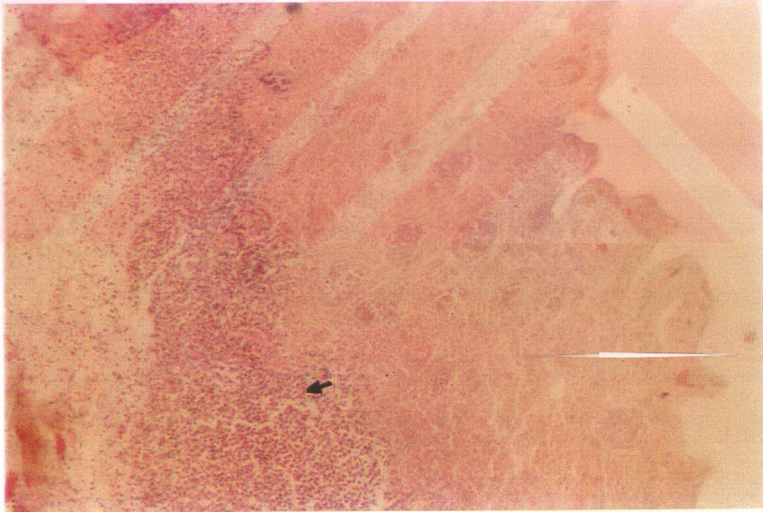


**Resim 3.** Elektrik şoku sonrasında kolit hasarında gözlenen iyileşmeye ait histolojik görüntü. Epitelde dökülme ve harabiyet (>), bez hücrelerinde harabiyet (\*) ve mukozada lökosit infiltrasyonu (→). Hemotoksilen ve Eozin x66.



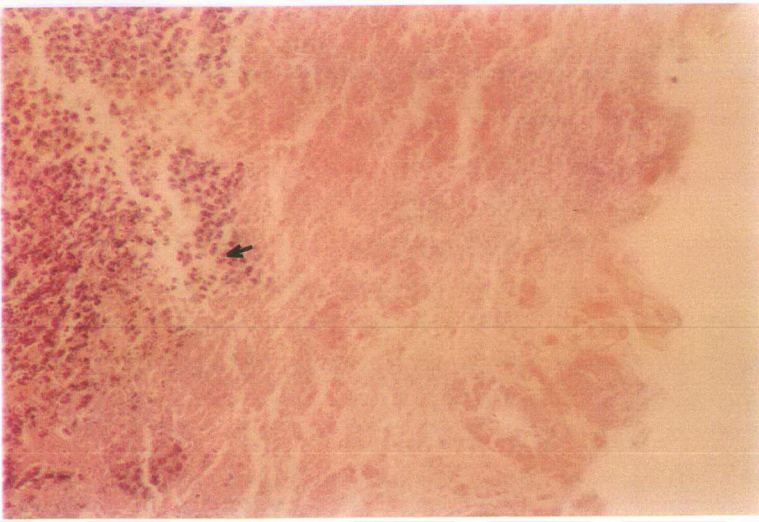
**Resim 4.** Kronik stres zemininde uygulanan kısıtlama stresine bağlı kolit grubunda gözlenen iyileşmeye ait histolojik görüntü. Epitelde hafif harabiyet (→), mukozada lökosit infiltrasyonu (\*). Hemotoksilen ve Eozin x66.

Elektrik şoku ile gözlenen anti-inflamatuvar etkilerin santral mekanizmalarını araştırmak için planlanan *santral reseptör antagonisti + akut stres* gruplarında elektrik şoku ile kolit hasar derecesinde (her üç ölçüt açısından) gözlenen azalmalar isv CRF (makroskopik skor;  $7.38 \pm 0.92$ , mikroskopik skor;  $2.72 \pm 0.14$  ve MPO aktivitesi;  $175.67 \pm 12.29$  ü/g), isv 5-HT<sub>3</sub> (makroskopik skor;  $6 \pm 0.53$ , mikroskopik skor;  $2.96 \pm 0.04$  ve MPO aktivitesi;  $155.38 \pm 5.57$  ü/g) veya isv CCK<sub>B</sub> (makroskopik skor;  $5.26 \pm 0.48$ , mikroskopik skor;  $2.72 \pm 0.1$  ve MPO aktivitesi;  $175.21 \pm 13.65$  ü/g) reseptör antagonistleri ile ortadan kalktı (Şekil 2). Hatta makroskopik değerlendirmede CRF reseptör antagonistiyle elde edilen skor kolit grubundan da yüksek idi ( $p < 0.01$ ). Periferik enjeksiyon gruplarında, CCK<sub>B</sub> (makroskopik skor;  $3.34 \pm 0.56$ , MPO aktivitesi;  $122.64 \pm 13.75$  ü/g) ve 5-HT<sub>3</sub> (makroskopik skor;  $4.14 \pm 0.94$ , MPO aktivitesi;  $133.45 \pm 6.12$  ü/g) reseptör antagonistlerinin aynı dozlardaki ip uygulanması ile akut stres grubunda (makroskopik skor;  $2.8 \pm 0.53$ , MPO aktivitesi;  $116.00 \pm 14.66$  ü/g) gözlenen azalma ortadan kalkmadı. Bu gruplarda yapılan histolojik değerlendirmelerde bez ve epitel hücre hasarı, lökosit infiltrasyonu, ödem ve kanama derecesi genelde kolit grubunda görülen miktarlara yakın idi (Resim 5-7).

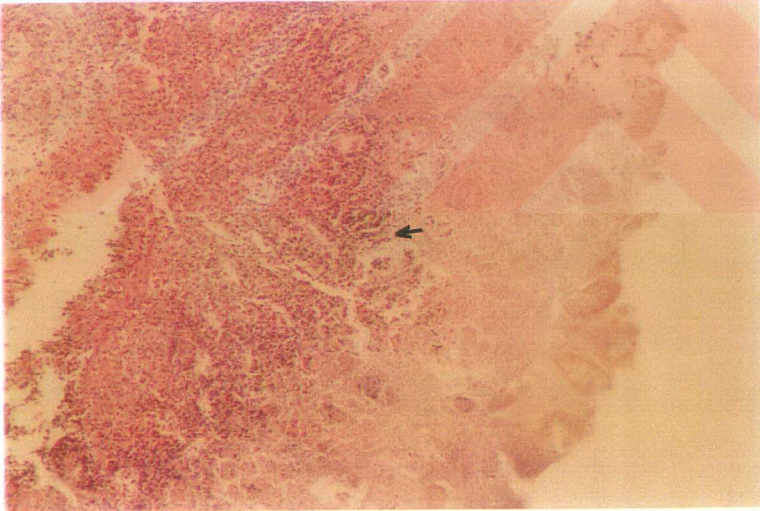


**Resim 5.** Elektrik şoku ile kolit hasarında gözlenen iyileşmenin santral CRF reseptör antagonistiyle geri dönmesine ait histolojik görüntü. Kolon mukozasında yoğun nekrotik harabiyet ve submukozada yoğun lökosit infiltrasyonu (→). Hemotoksilen ve Eozin x66





**Resim 6.** Elektrik şoku ile kolit hasarında gözlenen iyileşmenin santral 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonistiyle geri dönmesine ait histolojik görüntü. Kolonda yoğun mukozal harabiyet ve submukozada lökosit infiltrasyonu (→). Hemotoksilen ve Eozin x66



**Resim 7.** Elektrik şoku ile kolit hasarında gözlenen iyileşmenin santral CCK<sub>B</sub> reseptör antagonistiyle geri dönmesine ait histolojik görüntü. Kolon mukozasında yoğun nekrotik harabiyet ve submukozada yoğun lökosit infiltrasyonu (→). Hemotoksilen ve Eozin x66.

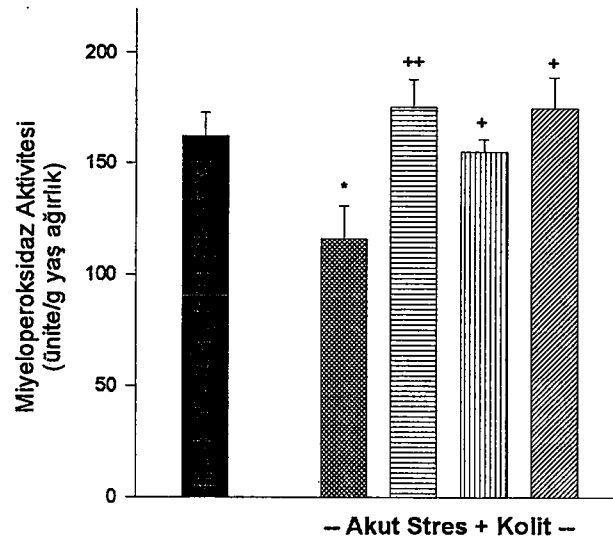
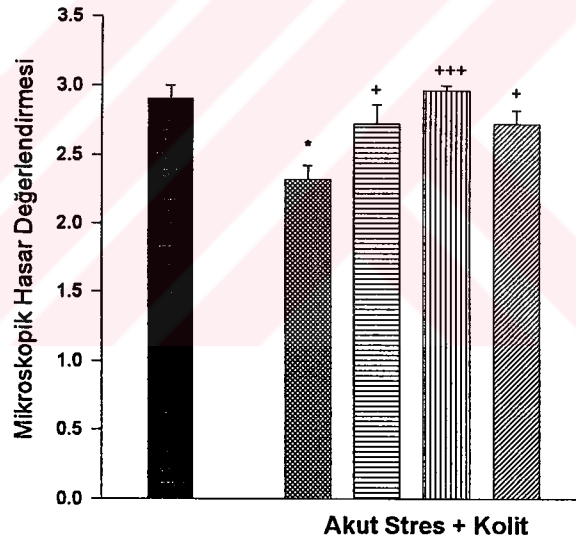
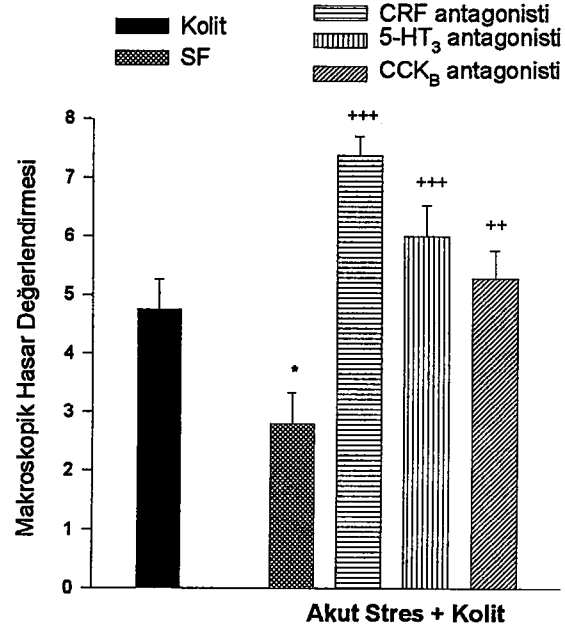
**Şekil 2.** CRF (2.5 µg/sıçan; isv), 5-HT<sub>3</sub> (10 µg/sıçan ; isv) ve CCK<sub>B</sub> (5 µg/sıçan; isv) reseptör antagonistlerin deneysel TNBS kolit modelinde akut stresle görülen anti-inflamasyon üzerine etkilerinin makroskopik ve mikroskopik skor ile doku MPO aktivitesi açısından değerlendirilmesi.

CCK, kolesistokinin; CRF, kortikotropin-serbestleştirici faktör; 5-HT, serotonin; isv, intraserebroventriküler; MPO, miyeloperoksidaz; SF, serum fizyolojik; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit.

\*p<0.05; kolit grubuna göre

+p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001;

SF grubuna göre



### 7.1.2. Santral Agonist Grupları

Ön çalışmada CCK-8s'in 10, 20 ve 40 ng/sıçan ve 5-HT'nin 5, 50, 100 ve 200 µg/sıçan dozları denendi. CCK-8s'de 20 ve 40 ng/sıçan, 5-HT'de ise 100 µg/sıçan dozları makroskopik değerlendirmede anlamlı değişikliklere neden olduğu için çalışmaya sırasıyla 20 ng/sıçan ve 100 µg/sıçan dozlarıyla devam edildi (Tablo 3). Akut strese gözlenen anti-inflamatuvar etkilerle paralellikler gösterecek şekilde santral CCK-8s veya 5-HT enjeksiyonları kolit hasar derecesinde anlamlı azalmalara neden oldu. Kolit grubunda makroskopik skor ( $4.75 \pm 0.52$ ) ve doku MPO aktivitesinde ( $162.61 \pm 10.48$  ü/g) gözlenen artma santral CCK-8s (20 ng/sıçan) enjeksiyonu ile sırasıyla  $3.00 \pm 0.50$  ve  $93.01 \pm 16.64$  ü/g değerlerine, isv 5-HT ile  $2.71 \pm 0.57$  ve  $123.13 \pm 8.64$  ü/g değerlerine geriledi. Santral agonist gruplarının histolojik incelemesinde CCK-8s grubunda orta-yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenirken, bez hücresi harabiyeti, interstisyel ödem ve kanama orta, epitel dökülme ve harabiyet hafif-orta derecede idi (Resim 8). Kolit grubuna ( $2.91 \pm 0.1$ ) göre belirli bir iyileşmenin görüldüğü CCK-8s grubunda mikroskopik skor  $2.13 \pm 0.13$  olarak ölçüldü ( $p < 0.05$ ). Mikroskopik skor ( $2.73 \pm 0.13$ ) açısından anlamlı bir farklılığın saptanmadığı 5-HT grubunda ise, ışık mikroskopisi altında, kolit grubunda gözlenen tabloya yakın bir manzara ile karşılaşıldı. Santral agonistlerin aynı dozlardaki ip uygulamaları kolit hasar derecesini değiştirmedi. Makroskopik skor ve doku MPO aktivitesi ip CCK-8s (20 ng/sıçan) grubunda sırasıyla  $4.10 \pm 0.60$  ve  $145.62 \pm 5.42$  ü/g, ip 5-HT (100 µg/sıçan) grubunda  $4.63 \pm 0.75$  ve  $151.37 \pm 12.86$  ü/g olarak hesaplandı.

*Santral antagonist + agonist gruplarında* makroskopik hasar değerlendirmesinde isv CCK-8s grubunda gözlenen iyileşme CCK<sub>B</sub> ( $5.13 \pm 0.83$ ;  $p < 0.05$ ) ve 5-HT<sub>3</sub> ( $5.12 \pm 0.64$ ;  $p < 0.05$ ) reseptör antagonistleri ile, isv 5-HT grubunda gözlenen iyileşme ise 5-HT<sub>3</sub> ( $5.71 \pm 0.61$ ;  $p < 0.01$ ) ve CRF ( $4.86 \pm 0.59$ ;  $p < 0.05$ ) reseptör antagonistleriyle geri döndü. MPO aktivitesi isv CCK-8s grubunda CCK<sub>B</sub> ( $153.38 \pm 9.51$  ü/g) ve CRF ( $157.37 \pm 12.94$  ü/g) reseptör antagonistleri ( $p < 0.05$ ) ile, isv 5-HT grubunda ise 5-HT<sub>3</sub> ( $146.81 \pm 5.77$  ü/g;  $p < 0.05$ ) ve CRF ( $147.07 \pm 4.39$  ü/g;  $p < 0.05$ ) reseptör antagonistleri ile tekrar kolit değerine ( $162.61 \pm 10.48$  ü/g) çıktı (Şekil 3 ve 4). Tek başlarına uygulanan isv reseptör antagonistleri (isv reseptör antagonisti + isv SF + kolit) makroskopik hasar değerlendirmesinde bir değişikliğe neden olmadı. Bu gruplarda isv CRF ( $4.29 \pm 0.75$ ), 5-HT<sub>3</sub> ( $4.88 \pm 0.81$ ) veya CCK<sub>B</sub> reseptör antagonisti ( $4.71 \pm 0.78$ ) enjeksiyonuyla ölçülen makroskopik skorlar kolit grubunda ölçülen değerlere yakın bulundu.

**Tablo 3. Santral uygulanan agonistlerin TNBS ile oluşturulan kolite etkilerinin makroskopik görünüm açısından değerlendirilmesi.**

Gruplar	Makroskopik Skor
Taşıyıcı (n=10 )	2.60 ± 0.50
Kolit (ko; n=12 )	4.75 ± 0.52**
<b>A. Santral CCK-8s dozları</b>	
İsv CCK-8s + ko (n=6; 10 ng/sıçan)	5.33 ± 0.92
İsv CCK-8s + ko (n=8; 20 ng/sıçan)	3.00 ± 0.50 <sup>+</sup>
İsv CCK-8s + ko (n=7; 40 ng/sıçan)	2.86 ± 0.67 <sup>+</sup>
<b>B. Santral 5-HT dozları</b>	
İsv 5-HT + ko (n=6; 5 µg/sıçan)	4.66 ± 0.88
İsv 5-HT + ko (n=8; 50 µg/sıçan)	4.87 ± 0.55
İsv 5-HT + ko (n=7; 100 µg/sıçan)	2.71 ± 0.57 <sup>+</sup>
İsv 5-HT + ko (n=9; 200 µg/sıçan)	5.33 ± 0.67

\*\* p< 0.01, taşıyıcı grubuna göre; <sup>+</sup>p<0.05, kolit grubuna göre

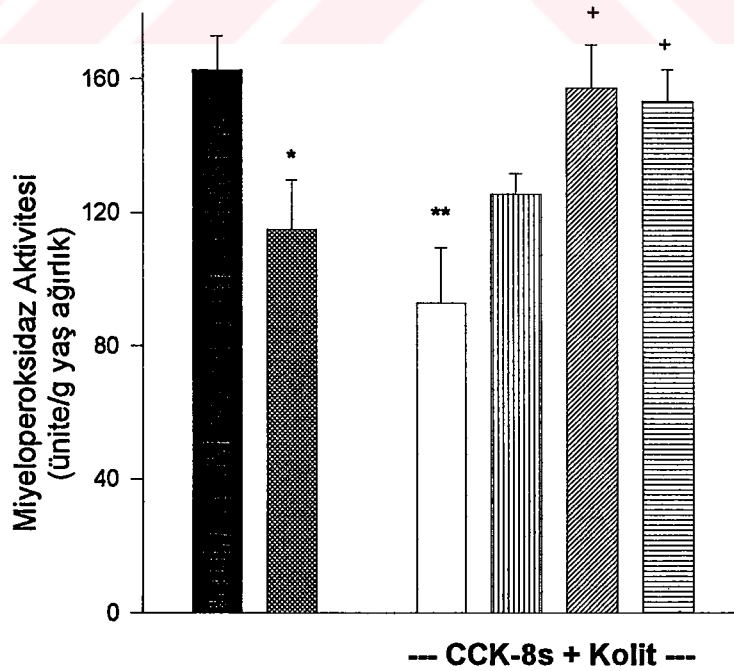
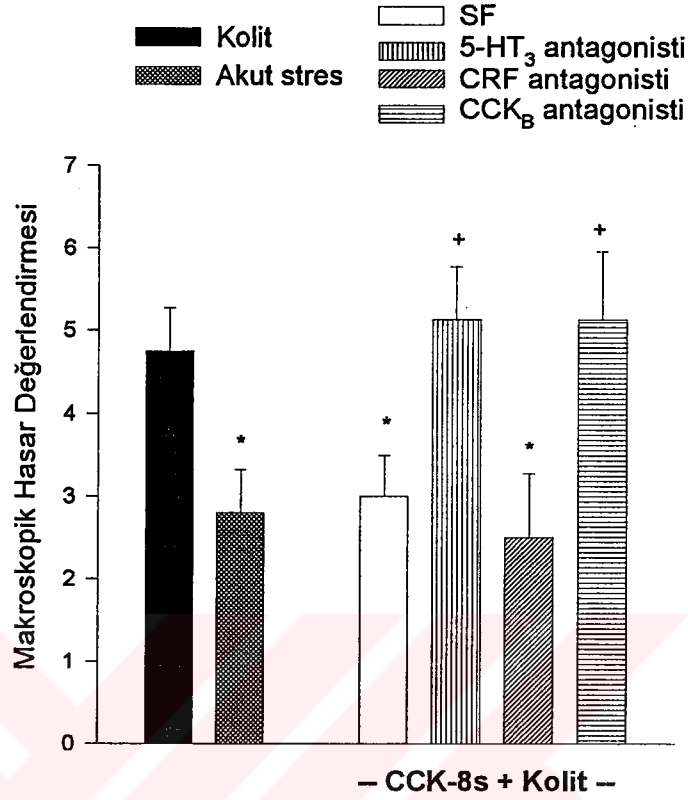
CCK; kolesistokinin, 5-HT; serotonin, isv; intraserebroventriküler, ko; kolit.



Resim 8. Santral CCK-8s enjeksiyonu sonrasında kolit hasarında gözlenen iyileşmeyi gösteren histolojik görüntü. Epitel yapıda hafif dejenerasyon (→). Hemotoksilen ve Eozin x66. Küçük Resim: Bez hücrelerinde harabiyet (>) ve lökosit infiltrasyonu (\*). Hemotoksilen ve Eozin x132.

**Şekil 3.** CRF (2.5 µg/sıçan; isv), 5-HT<sub>3</sub> (10 µg/sıçan ; isv) ve CCK<sub>B</sub> (5 µg/sıçan; isv) reseptör antagonistlerinin deneysel TNBS koliti modelinde isv CCK-8s (20 ng/sıçan) ile gözlenen anti-inflamasyon üzerine etkilerinin makroskopik skor ve doku MPO aktivitesi açısından değerlendirilmesi.

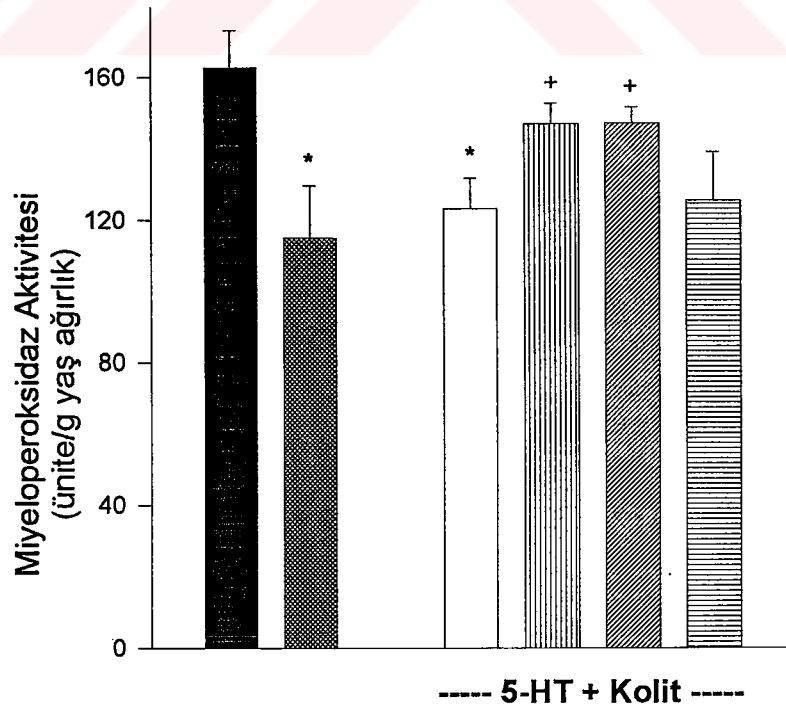
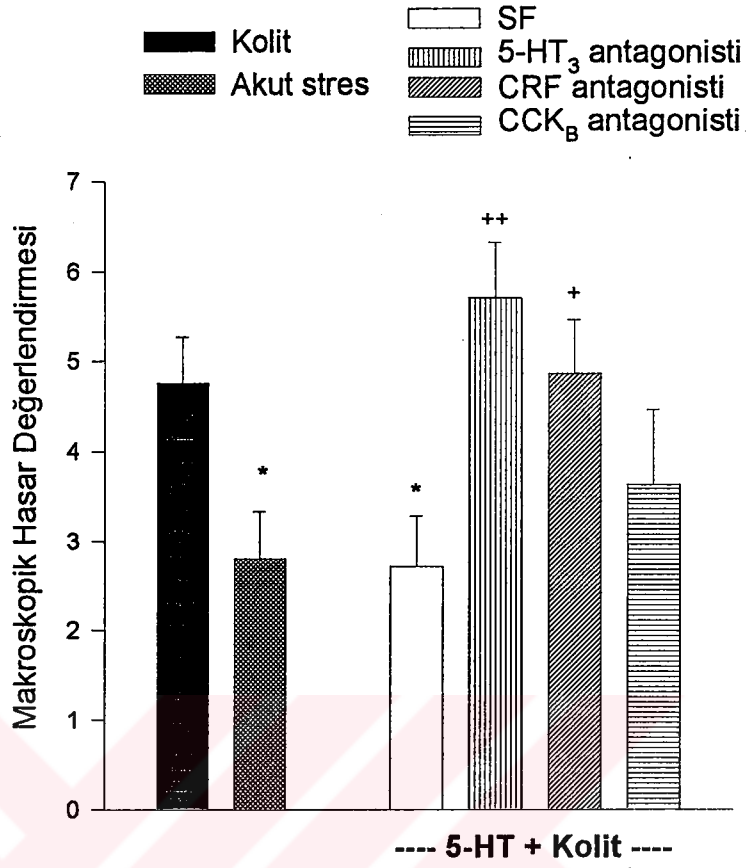
CCK, kolesistokinin; CRF, kortikotropin-serbestleştirici faktör; 5-HT, serotonin; isv, intraserebroventriküler; MPO, miyeloperoksida; SF, serum fizyolojik; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit. \*p<0.05; kolit grubuna göre +p<0.05, ++p<0.01; SF grubuna göre





**Şekil 4.** CRF (2.5 µg/sıçan; isv), 5-HT<sub>3</sub> (10 µg/sıçan ; isv) ve CCK<sub>B</sub> (5 µg/sıçan; isv) reseptör antagonistlerinin deneysel TNBS koliti modelinde isv 5-HT (100 µg/sıçan) ile gözlenen anti-inflamasyon üzerine etkilerinin makroskopik skor ve doku MPO aktivitesi açısından değerlendirilmesi.

CCK, kolesistokinin; CRF, kortikotropin-serbestleştirici faktör; 5-HT, serotonin; isv, intraserebroventriküler; MPO, miyeloperoksidaz; SF, serum fizyolojik; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit.  
\*p<0.05; kolit grubuna göre  
+p<0.05, ++p<0.01; SF grubuna göre

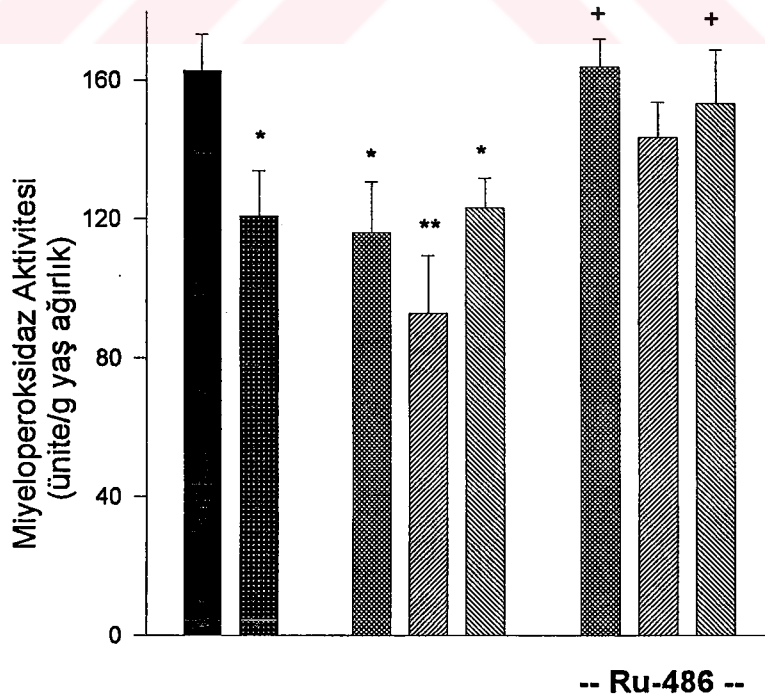
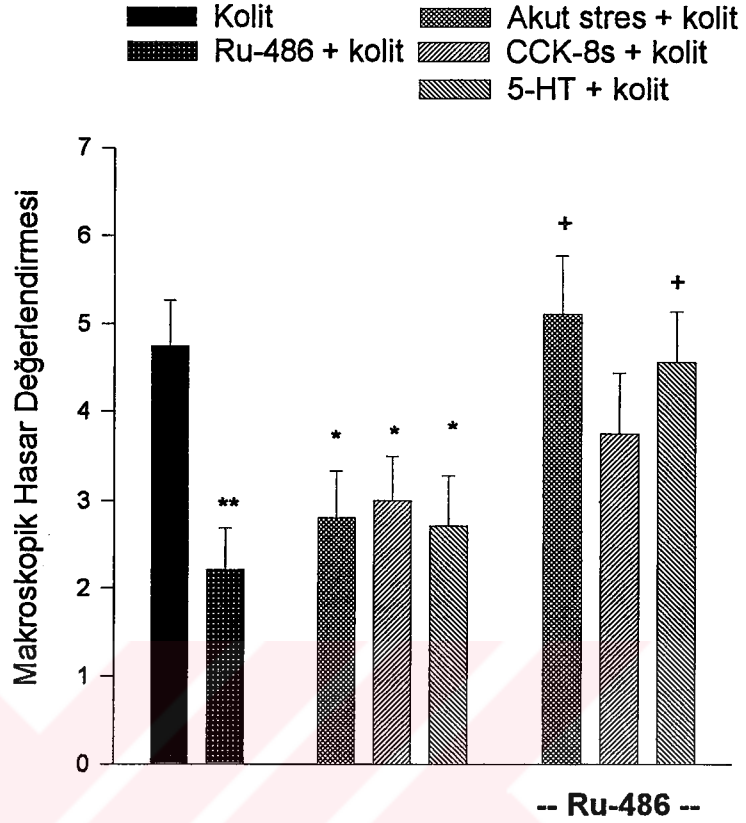


### 7.1.3. Periferik Yolakların Araştırıldığı Gruplar

Daha önceki gruplarda deneysel TNBS kolitinin stres, santral 5-HT veya santral CCK-8s'le regüle edildiğinin belirlenmesi ile stres veya agonist enjeksiyonlarına bağlı santral modülasyonun periferik dokuya (kolona) nasıl taşındığı sorusu ortaya çıktı. Bu soruya kısmen de olsa bir yanıt bulmak ve söz konusu santral modülasyonlara HPA aksı ile sempatik sinir sisteminin katılımlarını araştırmak için planlanan son grupta, glikokortikoid reseptör antagonisti RU-486 akut stres ve isv 5-HT (sırasıyla;  $5.11 \pm 0.66$  ve  $4.55 \pm 0.58$ ) ile, sempatik gangliyon blokleri heksametyum ise akut stres, isv 5-HT ve isv CCK-8s (sırasıyla;  $5.55 \pm 0.77$ ,  $5.09 \pm 0.73$  ve  $5.13 \pm 0.85$ ) ile makroskopik skorda görülen azalmaları istatistiksel olarak geri döndürdü (Şekil 5 ve 6). Doku MPO aktivitesi açısından yapılan değerlendirmede (Şekil 5 ve 6), RU-486 akut stres ve isv 5-HT (sırasıyla;  $155.86 \pm 10.23$  ü/g ve  $153.56 \pm 9.86$  ü/g) ile, heksametyum ise akut stres ve CCK-8s (sırasıyla;  $163.76 \pm 8.16$  ü/g ve  $143.56 \pm 10.10$  ü/g) ile saptanan azalmaları kolit değerlerine çıkardı. RU-486 + CCK-8s + kolit ( $132.44 \pm 9.11$  ü/g) ile heksametyum + 5-HT + kolit ( $153.28 \pm 15.39$  ü/g) gruplarında MPO aktivitesinde gözlenen artma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Her iki ölçüt ile yapılan değerlendirmede ip heksametyum + kolit grubunda tek başına (stres uygulamaksızın) heksametyum (makroskopik skor;  $4.5 \pm 0.85$  ve MPO aktivitesi;  $150.64 \pm 9.08$  ü/g) kolit hasarında bir değişikliğe neden olmazken, ip RU-486 + kolit grubunda tek başına RU-486 (makroskopik skor;  $2.21 \pm 0.48$  ve MPO aktivitesi;  $120.82 \pm 14.48$  ü/g) kolit hasarını azalttı ( $p < 0.01$ ).

**Şekil 5.** Akut stres, CCK-8s (20 ng/sıçan; isv) veya 5-HT (100 µg/sıçan; isv) ile gerçekleşen deneysel TNBS koliti üzerindeki santral modülasyona glikokortikoid reseptör antagonisti (RU-486; 10 mg/kg, ip)'nin etkilerinin makroskopik skor ve doku MPO aktivitesi açısından değerlendirilmesi.

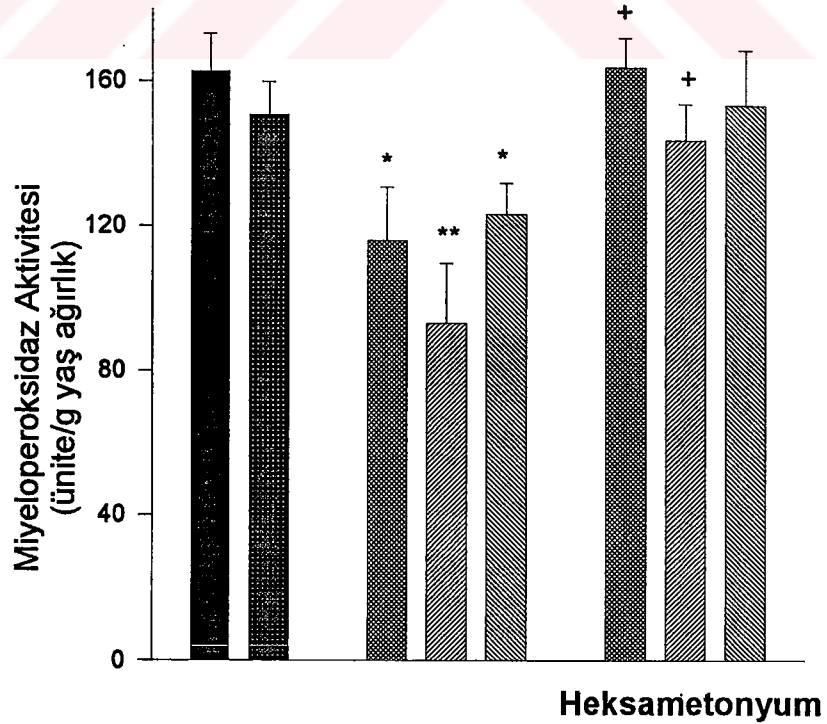
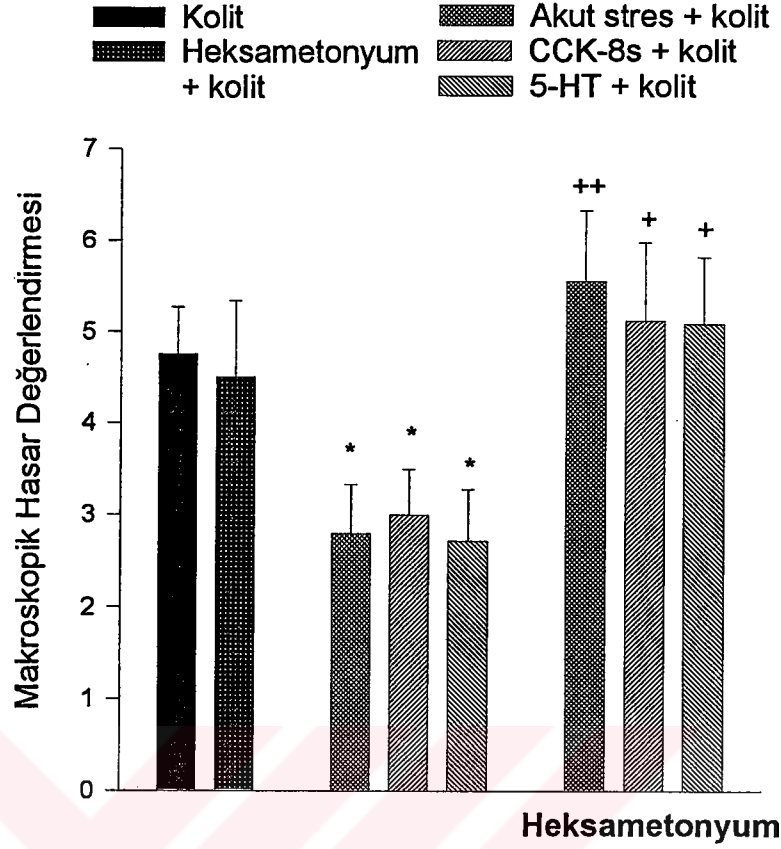
CCK, kolesistokinin; 5-HT, serotonin; ip, intraperitoneal; isv, intraserebroventriküler; MPO, miyeloperoksidaz; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit  
 \*p<0.05, \*\*p<0.01; kolit grubuna göre  
 †p<0.05; akut stres, CCK-8s veya 5-HT gruplarına göre



**Şekil 6.** Akut stres, CCK-8s (20 ng/sıçan; isv) veya 5-HT (100 µg/sıçan; isv) ile gerçekleşen deneysel TNBS koliti üzerindeki santral modülasyona sempatik gangliyon blokeri (Heksametoniyum; 15 mg/kg, ip)'nin etkilerinin makroskopik skor ve doku MPO aktivitesi açısından değerlendirilmesi.

CCK, kolesistokinin; 5-HT, serotonin; ip, intraperitoneal; isv, intraserebroventriküler; MPO, miyeloperoksidaz; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; kolit grubuna göre  $^+p < 0.05$ ,  $^{++}p < 0.01$ ; akut stres, 5-HT veya CCK-8s gruplarına göre



## 7.2 TNBS Kolitinin Sıçanların Kilo Alımları ve Doku Yaş Ağırlıkları Açısından Değerlendirilmesi

Kolit oluşumu ile birlikte kilo kayıpları gözlenen sıçanlarda taşıyıcı grubuna göre negatif değerlere düşen kilo alımları bütün stres gruplarında anlamlı olacak şekilde yükselirken ( $p<0.05-0.001$ ), elektrik şoku ( $p<0.001$ ) ve kronik+kısıtlama stresinde ( $p<0.01$ ) tamamen taşıyıcı değerine geri döndü (Tablo 4). Santral agonist grubunda ise sadece CCK-8s deneklerin kilosunda anlamlı bir düzelmeye neden oldu ( $p<0.05$ ). Genelde isv reseptör antagonistlerin veya ip blokerlerin enjeksiyonu sonrasında stres veya isv agoniste bağlı vücut ağırlığındaki düzelmeler ortadan kalkarken, ip bloker gruplarında heksametyum, isv CRF ve CCK<sub>B</sub> reseptör antagonistleri CCK-8s'e bağlı düzelmeye anlamlı değişikliğe neden olmadı.

Doku yaş ağırlığında elektrik şoku ve kronik+ akut stres gruplarında ( $p<0.05$ ) kolite göre anlamlı bir azalma görülürken bu azalma sadece elektrik şokunda heksametyum ( $p<0.05$ ) uygulaması ile kolit değerine yükseldi. Genelde diğer gruplar arasında doku yaş ağırlıkları açısından anlamlı bir farklılığa rastlanılmadı (Tablo 5).

**Tablo 4. Stres (a), santral agonist (b) ve periferik yolak (c) gruplarında TNBS ile oluşturulan kolitin sıçanların dekapitasyona kadar süren üç günlük dönemdeki toplam kilo alımları açısından değerlendirilmesi.**

**A. Stres grupları**

Gruplar	Kilo Alımları (gr/sıçan)
Taşıyıcı (n=8)	19.70 ± 2.17
Kolit (ko; n=7)	-7.18 ± 2.89***
Elektrik şoku (EŞ) + ko (n=8)	15.42 ± 4.12 <sup>+++</sup>
Kısmi hareket kısıtlama stresi + ko (n=10)	10.10 ± 5.79 <sup>+</sup>
CRF res. ant. + EŞ +ko (n=6)	-10.33 ± 2.59 <sup>88</sup>
5-HT <sub>3</sub> res. ant. + EŞ + ko (n=8)	4.03 ± 2.03 <sup>8</sup>
CCK <sub>B</sub> res. ant. + EŞ + ko (n=6)	-6.91 ± 6.67 <sup>8</sup>
Kronik stres + ko (n=6)	5.65 ± 2.73 <sup>+</sup>
Kronik + kısıtlama stresi + ko (n=6)	15.25 ± 6.71 <sup>++</sup>

**B. Santral agonist grupları**

Gruplar	Kilo Alımları (gr/sıçan)
Taşıyıcı (n=8)	19.70 ± 2.17
Kolit (n=7)	-7.18 ± 2.89***
İsv 5-HT (100 µg/sıçan) + ko (n=7)	-1.13 ± 2.76
CRF res. ant. + isv 5-HT +ko (n= 7)	-7.30 ± 5.90
5-HT <sub>3</sub> res. ant. + isv 5-HT + ko (n=6)	-17.55 ± 7.25 <sup>8</sup>
CCK <sub>B</sub> res. ant. + isv 5-HT + ko (n= 8)	-6.52 ± 9.19
İsv CCK-8s (20 ng/sıçan) + ko (n=8)	1.66 ± 2.76 <sup>+</sup>
CRF res. ant. +isv CCK-8s +ko (n=8)	3.73 ± 4.50
5-HT <sub>3</sub> res. ant. + isv CCK-8s + ko (n=8)	-11.86 ± 5.35 <sup>8</sup>
CCK <sub>B</sub> res. ant. + isv CCK-8s + ko (n=8)	1.46 ± 1.19

**C. Periferik yolak grupları**

Gruplar	Kilo Alımları (gr/sıçan)
Kolit (ko; n=8)	-7.18 ± 2.89
Ru-486 + ko (n=13)	2.89 ± 3.00 <sup>+</sup>
Heksametonyum (Heks) + ko (n=8)	-10.97 ± 6.07
EŞ + ko (n=8)	15.42 ± 4.12 <sup>+++</sup>
İsv 5-HT (100 µg/sıçan) + ko (n=7)	-1.13 ± 2.76
İsv CCK-8s (20 ng/sıçan) + ko (n=8)	1.66 ± 2.76 <sup>+</sup>
Ru-486 + EŞ + ko (n= 8)	-17.86 ± 2.80 <sup>888</sup>
Ru-486 + isv 5-HT +ko (n= 8)	-16.04 ± 4.02 <sup>8</sup>
Ru-486 + isv CCK-8s + ko (n= 11)	-17.69 ± 5.58 <sup>8</sup>
Heks + EŞ + ko (n= 9)	-12.02 ± 4.53 <sup>888</sup>
Heks + isv 5-HT + ko (n= 12)	-21.05 ± 4.96 <sup>88</sup>
Heks + isv CCK-8s + ko (n= 8)	-8.13 ± 5.14

CCK; kolesistokinin, CRF; kortikotropin-serbestleştirici faktör, EŞ; elektrik şoku, Heks; heksametonyum, 5-HT; serotonin, isv; intraserebroventriküler, ko; kolit.

\*\*\*p<0.001; taşıyıcı grubuna göre, <sup>+</sup>p< 0.05, <sup>++</sup>p<0.01, <sup>+++</sup>p<0.001; kolit grubuna göre, <sup>8</sup>p<0.05, <sup>88</sup>p<0.01, <sup>888</sup>p<0.001; elektrik şoku veya santral agonist gruplarına göre.



**Tablo 5. Stres (a), santral agonist (b) ve periferik yolak (c) gruplarında TNBS ile oluşturulan kolitin doku yaş ağırlığı açısından değerlendirilmesi.**

**A. Stres grupları**

Gruplar	Doku Yaş Ağırlığı (gr/8 cm'lik distal kolon segmenti)
Taşıyıcı (n=8)	0.93 ± 0.07
Kolit (ko; n= 11)	1.58 ± 0.16**
Elektrik şoku (EŞ) + ko (n=8)	1.24 ± 0.12*
Kısmi hareket kısıtlama stresi + ko (n=11)	1.18 ± 0.13
CRF res. ant. + EŞ +ko (n=8)	1.96 ± 0.11 <sup>888</sup>
5-HT <sub>3</sub> res. ant. + EŞ + ko (n=8)	1.93 ± 0.11 <sup>88</sup>
CCK <sub>B</sub> res. ant. + EŞ + ko (n=7)	1.66 ± 0.12 <sup>8</sup>
Kronik stres + ko (n=8)	1.19 ± 0.17
Kronik stres + kısıtlama stresi + ko (n=8)	1.01 ± 0.14 <sup>+</sup>

**B. Santral agonist grupları**

Gruplar	Doku Yaş Ağırlığı (gr/8 cm'lik distal kolon segmenti)
Taşıyıcı (n=8)	0.93 ± 0.07
Kolit (n=11)	1.58 ± 0.16**
İsv 5-HT (100 µg/sıçan) + ko (n=7)	1.32 ± 0.13*
CRF res. ant. + isv 5-HT +ko (n=7)	1.57 ± 0.09
5-HT <sub>3</sub> res. ant. + isv 5-HT + ko (n=7)	1.69 ± 0.14
CCK <sub>B</sub> res. ant. + isv 5-HT + ko (n=6)	1.18 ± 0.18
İsv CCK-8s (20 ng/sıçan) + ko (n= 6)	1.11 ± 0.11
CRF res. ant. + isv CCK-8s +ko (n=6)	1.09 ± 0.12
5-HT <sub>3</sub> res. ant. + isv CCK-8s + ko (n=8)	1.74 ± 0.18 <sup>8</sup>
CCK <sub>B</sub> res. ant. + isv CCK-8s + ko (n=8)	1.67 ± 0.19 <sup>8</sup>

**C. Periferik yolak grupları**

Gruplar	Doku Yaş Ağırlığı (gr/8 cm'lik distal kolon segmenti)
Kolit (n=11)	1.58 ± 0.16
Ru-486 + ko (n=14)	0.96 ± 0.09 <sup>++</sup>
Heksametyonyum (Heks) + ko (n=8)	1.65 ± 0.70
EŞ + ko (n=8)	1.24 ± 0.12
İsv 5-HT + ko (n=7)	1.32 ± 0.13
İsv CCK-8s + ko (n= 6)	1.11 ± 0.11
Ru-486 + EŞ + ko (n= 9)	1.68 ± 0.17
Ru-486 + isv 5-HT +ko (n= 9)	1.54 ± 0.14
Ru-486 + isv CCK-8s + ko (n= 12)	1.24 ± 0.14
Heks + EŞ + ko (n= 9)	1.81 ± 0.21 <sup>8</sup>
Heks + isv 5-HT + ko (n= 11)	1.45 ± 0.12
Heks + isv CCK-8s + ko (n= 8)	1.66 ± 0.16 <sup>8</sup>

CCK; kolesistokinin, CRF; kortikotropin-serbestleştirici faktör, EŞ; elektrik şoku, Heks; heksametyonyum, 5-HT; serotonin, isv; intraserebroventriküler, ko; kolit.

\* p<0.05, \*\*p<0.01; taşıyıcı grubuna göre, <sup>+</sup>p< 0.05, <sup>++</sup>p<0.01; kolit grubuna göre, <sup>8</sup>p<0.05,

<sup>88</sup>p<0.01, <sup>888</sup>p<0.001; elektrik şoku veya santral agonist gruplarına göre.

## 8. TARTIŞMA

Birden fazla stres modelinin kullanıldığı bu çalışmada elde edilen ilk sonuç TNBS ile oluşturulan kolit modelinde akut elektrik şoku uygulamasının anti-inflamatuvar etki göstermiş olmasıdır. “Stres - deneysel kolit - santral CRF reseptörü” ilişkisinin çalışıldığı deneylerde inflamasyonun stresle oluşan santral modülasyonunda CRF reseptörlerinin katılımları ortaya konmuştur (37, 64). Bu çalışmada ilk defa CRF reseptörleri dışında CCK<sub>B</sub> ve 5-HT<sub>3</sub> reseptörleri de çalışılmış ve her üç santral reseptörün akut strese bağlı anti-inflamatuvar etkilerin oluşumunda rol oynadıkları görülmüştür. Yine ilk defa, akut stres grubunda gözlenen etkilere paralel olacak şekilde, santral CCK-8s ve 5-HT agonist enjeksiyonlarının deneysel kolitin hasar derecesinde iyileşmeye neden olduğu gösterilmiş ve her iki agonist grubunda yapılan santral reseptör antagonisti enjeksiyonlarıyla, reseptörler ve dolayısıyla nöropeptidler arası etkileşimlere kısmen de olsa açıklamalar getirilmiştir. Şu ana kadar yapılan kronik stres-deneysel kolit çalışmalarında santral desensitizasyon ile pro-inflamatuvar etkiler görülmüşken (37, 64), bu çalışmada kullanılan kronik stres modeli ile santral modülasyon anti-inflamatuvar yöne kaymış ve tek başlarına kısıtlama stresi veya kronik stres uygulamalarıyla gözlenmeyen net anti-inflamatuvar etkiler kronik stres zemininde uygulanan kısıtlama stresi ile ortaya çıkmıştır. HPA aksı ve sempatik sinir sisteminin çalışıldığı periferik yolak gruplarında ise hem stres hem de eksojen agonistlerle SSS’de gerçekleşen yanıtların kolona HPA aksı ve/veya sempatik sinir sistemi ile taşındıkları gösterilmiştir.

Daha önce de belirtildiği gibi, stresle oluşan nöroendokrin ve davranışsal yanıtta stresin şiddeti, süresi, uygulama şekli ve psikolojik doğası ile deneğin stresi algılama şekli gibi birden fazla değişken belirleyici olabilmektedir (48). Stresin süresi dikkate alınarak yapılacak bir değerlendirmede ilk defa akut stresin TNBS ile oluşan kolitte makroskopik ve mikroskopik düzeyde iyileşmeye neden olduğu ve doku MPO aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Kolit grubunda gözlenen bez ve epitel hücrelerindeki yoğun harabiyet, sübmukozaya kadar inen lökosit infiltrasyonu, yoğun kanama odakları ve interstisyel ödem akut stres ve kronik zeminde uygulanan kısıtlama stresi ile azalmıştır. Bu bulgular stresin diğer inflamasyon modellerinde yaptığı etkilerle paralellikler göstermektedir. Örneğin iki çalışmada akut stresle deneysel gastrik hasarda CRF aracılı anti-inflamatuvar etkiler gözlenmiştir (90, 105). Başka bir çalışmada ise kısıtlama stresi deneysel otoimmün ensefalomyelitinin insidansı ve hasar derecesinde azalmaya neden olmuştur (50).

Bu çalışmada kronik stres grubunda gözlenen anti-inflamatuvar eğilimin aksine, deneysel kolit modelleriyle yapılan diğer çalışmalarda kronik stresin pro-inflamatuvar etkilere

neden olduğu gösterilmiştir. Örneğin bir çalışmada, İBH'da saptanan histolojik bulgulara benzer şekilde, soğuk-kısıtlama stresine bağlı proksimal kolonda PGE<sub>2</sub> ve lökotrien C4 sentezinde artma görülmüştür (95). *Gue ve ark* (37)'nin TNBS kolit modeliyle yaptıkları başka bir çalışmada ise 4 günlük kısmi kısıtlama stresi ile makroskopik ve mikroskopik skor ile doku MPO aktivitesinde artma saptanmıştır. Stres öncesinde uygulanan santral CRF veya AVP antagonisti ile bu pro-inflamatuvar etkilerin daha da artması nedeniyle santral CRF ve AVP'nin deneysel kolit üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu düşünülerek, kronik strese bağlı kolit hasarında gözlenen artışın CRF ve AVP'den bağımsız başka bir mekanizma veya mekanizmalarla oluşabileceği sonucuna varılmıştır. Söz konusu hipotez varlığını korumakla birlikte, daha sonra *Million ve ark* (64) tarafından yapılan deney dikkate alındığında konuya farklı bir açıklama getirmek mümkün olabilmektedir. Bu çalışmada HPA aksı açısından hiporeaktif ve hiperreaktif olan iki farklı sıçan kullanılmış ve her iki grupta kronik stresle TNBS kolitinde pro-inflamatuvar etkiler gözlenirken, bu etkiler HPA hiporeaktif hayvanlarda daha fazla oluşmuştur. Aynı çalışmada santral CRF reseptör antagonisti stresle saptanan pro-inflamatuvar etkileri daha da artırmış, 6 günlük isv CRF enjeksiyonu TNBS kolitinin hasar derecesinde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca HPA hiperreaktif grupta 1. ve 3. günde ölçülen plazma KS seviyeleri hiporeaktif hayvanlara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (64). Benzer şekilde, HPA hiporeaktif sıçanlarla yapılan diğer çalışmalarda 5-HT agonisti, IL-1β veya eksojen CRF enjeksiyonlarıyla plazma kortikotropin ve KS yanıtlarında yetersizlikler saptanması (16) ve hiporeaktif sıçanlarda kolitte spontan uzun süreli reaktivasyonlar gözlenirken hiperreaktif hayvanlarda reaktivasyonun görülmemesi (59, 85) nedeniyle kronik stresle İBH'nın patogenezinde gözlenen kötüleşme ve alevlenmelere şöyle bir açıklama getirilebilir: kronik stres, CRF aktivitesi ve HPA aksında hipoaktivasyona neden olarak inflamasyonun modülasyonunda koruyucu etkiye sahip olan santral mekanizmalarda yetersizliğe neden olmakta ve sonuçta canlıda inflamasyona yatkınlık geliştirmektedir.

Bu iki yaklaşımın ışığında tekrar çalışmamıza dönersek, kronik stres gruplarımızda elde edilen bulgulara nasıl bir açıklama getirebiliriz? Daha önce kronik stresle yapılan çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda kronik stresle kolit hasarında anlamlı olmasa da bir düşme eğilimi saptanmış ve bu eğilim kronik zeminde uygulanan akut stresle net anti-inflamatuvar etki şeklinde sonuçlanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, stres sonrasında gözlenen santral regülasyonunun yönünün belirlenmesinde stresin süresi önemli olmakla birlikte, stresin psikolojik doğası ve deneğin psikofizyolojik özellikleri daha belirleyici değişkenlerdir (48, 106). Stresin emosyonel olması, kontrol ve tahmin edilebilir olmasıyla farklı santral yapılar farklı derecelerde santral regülasyona katılmakta ve buna türe ait

özellikler ile geçmiş deneyimlere ait bireysel özelliklerin eklenmesiyle yanıtın son şekli belirlenmektedir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar strese bağlı immün yanıtın şeklinin büyük oranda bilişsel ve affektif süreçlere bağlı olduğunu göstermiştir. Kontrol ve tahmin edilemeyen stresle hücrel immün yanıtta ve NK aktivitesinde azalma saptanmış, kontrol edilemeyen 30 dk süreli hafif elektrik şoku uygulaması ile lenfoproliferatif yanıtta azalma gözlenirken, kontrol edilebilen elektrik şoku immün sistemde bir değişiklik yapmamıştır (18). Yine kaçınılmaz elektrik şoku KS'lerin katılımı ile hücrel immün yanıtı değiştirirken humoral immünitede bir değişikliğe neden olmamıştır (46). Stresöre bağlı faktörlerin yanında deneğin bilişsel ve duygusal durumu da immün modülasyonunu etkilemekte, örneğin çevresel uyarıların farkında olan ve yoğun duygusallık yaşayan fakat durumunu ifade edemeyen kişilerde endişe ile immün sistemin baskılanması daha fazla olmaktadır. Bilişsel aktivitenin de katıldığı akut mental streste kısa süreli NK hücrelerin sayısı ve aktivitesinde artma, kontrol edilemeyen aversif uyarıda ise baskılanma saptanmıştır (107). Türe ve canlının kendisine ait özellikler dikkate alınarak yapılan hayvan çalışmalarının birisinde, rezistan domuzlarda (sempatik sinir sisteminde baskınlık olan) spesifik ve non-spesifik antijenlerle indüklenen hücrel yanıtta baskınlık ve humoral immünitede azalma, rezistan olmayan hayvanlarda ise (parasempatik sinir sistem baskınlığı olan) hücrel yanıtta kronik bozukluk ve humoral immünitede artma gözlenmiştir (41). Diğer bir çalışmada 5 dakikalık elektrik şoku (2.0 mA) ile Wistar-Kyoto sıçanlarda plazma E ve NE seviyelerinde saptanan artış Brown-Norway sıçanlarda ölçülen katekolamin seviyelerindeki artıştan daha fazla bulunmuştur (60).

Çalışmamızda, kurulan deney düzeneğiyle şokun uygulandığı bölmelere konulan denekler sadece dedektör hizasına geldikleri zaman devrenin kapanması sonucunda emosyonel stres modeli olarak kabul edilen elektrik şokuna maruz kalmışlardır. Bu nedenle 5-6 şoktan sonra hayvanlar dedektörden uzak bir alanda saklanarak şoktan kurtulmayı öğrenebildikleri için uygulanan stres modeli kontrol edilebilir emosyonel stres olarak kabul edilmiş ve kontrol edilebilir emosyonel stres modelleriyle immün sistem modülasyonunda saptanan bulguları destekleyecek şekilde 30 dakikalık elektrik şoku TNBS kolitinde anti-inflamatuvar etki göstermiştir. Elektrik şoku ile gözlenen bu net etkinin yanında hafif psikofizyolojik stres modeli olan 2 saatlik hareket kısıtlama stresiyle doku inflamatuvar hücre infiltrasyonunda belirgin ve makroskopik hasarda kısmi bir azalma görülmüş olmasına rağmen, mikroskopik incelemede anlamlı bir değişikliğin saptanmaması stresle oluşan inflamatuvar regülasyonda stresörün psikolojik doğasının önemini ortaya koymaktadır. Bu bulgular aynı zamanda yukarıda tartışılan kronik stres modellerinde görülen TNBS kolit hasarındaki pro-inflamatuvar etkilerin neden bu çalışmada kullanılan kronik stres modeliyle

tersine döndüğü sorusuna da açıklık getirmektedir. Söz konusu diğer iki çalışmada kullanılan kontrol edilemeyen psikofiziksel kısıtlama stresi modellerine göre, bu çalışmada kullanılan stres modeli kontrol edilebilir ve psikolojik komponenti ağır basan bir stres modelidir ve bu modelde üst beyin yapılarının santral yanıt katılımlarının daha fazla olduğu düşünülmektedir. Bunu destekleyen bir çalışmada, kontrol edilebilir elektrik şokuna maruz kalan farelerde ilk gün serebral korteks ve hipokampusta mRNA c-fos aktivitesinin arttığı gözlenmiş ve bu artış 9 günlük uygulama sonucunda normal değerlere düşmüştür (3). Dolayısıyla limbik sistem ve üst beyin yapılarında gerçekleşen benzer bir değişiklik kronik stres modelimizde strese bağlı santral modülatör etki anti-inflamatuvar yöne kaymış olabilir. Bu ise yukarıda stresle İBH'nın patogenezi arasındaki ilişkiyi açıklamak için ileri sürülen iki yaklaşımdan ikincisini destekler niteliktedir. Buna göre, strese İBH'da gözlenen alevlenmeler kontrol edilemeyen kronik strese bağlı HPA aksındaki hipoaktivasyonla açıklanmıştır. Yukarıda ileri sürülen açıklamalar sadece strese bağlı santral modülasyon dikkate alınarak yapılmıştır, ancak stres ve inflamatuvar süreçler ile ilgili yapılan birçok çalışma göstermiştir ki, stres aynı zamanda doğrudan periferik dokularda da değişikliklere neden olmaktadır. Bundan dolayı strese bağlı santral ve periferik modülasyonlar birlikte düşünülerek daha kompleks ve daha kapsamlı açıklamalara gidilmelidir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, stres ve eksojen CRF'nin santral regülasyon dışında periferik etkilerle de immün sistem ve inflamatuvar olayları modüle ettiği görülmüştür. İnflamatuvar hücreler üzerinde doğrudan etkiyle stimülasyona neden olan CRF, lenfosit proliferasyonu, IL-2 reseptör ekspresyonu ve lökositlerden ACTH salınımını uyarmakta, NK'e bağlı hücrel immüniteyi artırmaktadır (54, 55, 91, 92, 96). Stres veya inflamasyon ile artan plazma CRF konsantrasyonlarının bu uyarılara neden olabilecek miktarlara çıkmasının zorluğu nedeniyle, CRF aracılı periferik etkiden stresle artan lokal CRF (inflamatuvar ve enterokromafin hücrelerden vs) salınımları sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca stres, dalak ve timus gibi lenfoid organ ve dokuları da etkileyerek inflamatuvar hücrelerin vücuttaki dağılımlarını değiştirebilmektedir (39).

Stres, immün sistem üzerine etkileri dışında, GI epitel bariyer fonksiyonlarını da değiştirerek periferik modülasyona neden olmaktadır. Bilindiği gibi, normal şartlarda GI'de bulunan fizyolojik, enzimatik ve immünolojik bariyerler çok az miktarlarda gerçekleşen antijen geçişleri dışında lümen içeriğinin GI sistem dokularına penetrasyonunu engellemektedir. Fakat bu bariyerlerin üçü de nörohormonal kontrol altında bulunduğu için stresin etkilerine açıktır. Stres veya periferik CRF uygulamasıyla kolonun iyonik ve moleküler geçirgenliği ile epitel iyon, IgA ve müsin sekresyonları artmaktadır (62, 82, 83, 86,



93). Bakteriyel kemotaktik bir peptid olan N-formilmethionilüsil fenilalaninde dahil olduğu, müküller geçirgenlikte gözlenen artışla bir taraftan kolonda strese bağlı pro-inflamatuvar etkiler ortaya çıkarken, diğer taraftan artmış sıvı, müsin ve Ig A sekresyonları ile lümen içeriği dilüe olmakta, yıkanmakta ve patojenik maddelerin yapışması engellenerek anti-inflamatuvar etki oluşmaktadır. Ama daha çok strese bağlı akut etkilerle ortaya çıkan bu koruyucu mekanizmaların, IgA sekresyonu örneğinde olduğu gibi, uzun süreli stres ile azaldığı bilinmektedir (106). Stres aynı zamanda GI sistemde bulunan normal bakteriyel florayı da değiştirmektedir (93). Deneysel kolitle yapılan stres çalışmalarının stres iyonik sekresyon ve geçirgenlik artırmış, enterik sinir sisteminde meydana gelen değişikliklerle stimülasyona bağlı elektriksel yanıt değiştirmiş, PGE<sub>2</sub> ve siklooksijenaz-2 mRNA'sını arttırırken, goblet hücre sayısında azalmaya ve musin sekresyonuna artışa neden olmuştur (83, 86). GI sistem bariyer fonksiyonlarında stresle veya eksojen CRF uygulamasıyla oluşan bu değişiklikler mast hücrelerinden yoksun farelerde görülmemiş, CRF reseptör antagonisti, atropin, mast hücre stabilizatörü, adrenaletomi (ADX) ve glikokortikoid reseptör antagonistiyle ortadan kalkmış ve deksametazon tedavisiyle stres benzeri etkiler gözlenmiştir (62, 82, 93). Lokal düzeydeki etkiler detaylı olarak çalışılmamış olmakla birlikte, santral modülasyonu perifere taşıyan yolakların araştırıldığı gruplarda glikokortikoid reseptör antagonisti ve/veya heksametonyum akut stres ve santral agonist gruplarında gözlenen anti-inflamatuvar etkileri ortadan kaldırmıştır.

Şu ana kadar yapılan çalışmalar stresle oluşan santral nöroendokrin yanıtta en önemli aracının CRF olduğunu göstermiştir. Santral CRF enjeksiyonu ile akut psikolojik stresle oluşan davranışsal ve fizyolojik yanıtlara benzer etkiler ortaya çıkmakta, bu etkiler CRF reseptör antagonisti uygulaması ile azalmakta ve yine CRF reseptörlerinden yoksun hayvanlarda stresle oluşan yanıtta azalma görülmektedir (56). İmmün sistem ile CRF arasındaki ilişkileri araştıran çalışmalardan birinde, isv CRF'nin immün fonksiyonları inhibe ettiği ve NK hücre aktivitesindeki inhibisyonun sempatik sinir sistemi üzerinden gerçekleştiği bulunmuştur (23). Elektrik şoku ile yapılan bir başka çalışmada, strese bağlı NK aktivitesindeki indüksiyonun CRF aracılı olduğu görülmüş, isv CRF antikorunun enjeksiyonu ile etki önlenirken aynı antikorun periferik uygulaması etkisiz olmuştur (23). *Casadevall ve ark.* (14) tarafından yapılan çalışmada ise, santral CRF enjeksiyonun bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenmiş lökosit trafiğini ve endotel ICAM-1 ekspresyonundaki artışı ortadan kaldırdığı saptanmıştır (14). TNBS kolit modeliyle yapılan çalışmalarda ise, kronik stresle ortaya çıkan pro-inflamatuvar etkilerin santral CRF reseptör antagonisti enjeksiyonu sonrasında daha da artmasıyla santral CRF'nin koruyucu etkiye sahip

olabileceği sonucuna varılmıştır (37, 64). CRF dışında AVP'nin de stres ile oluşan inflamatuvar yanıtta koruyucu olduğu saptanmış (37), fakat bugüne kadar değişik stres modelleriyle yapılan deneysel kolit modellerinde CRF ve AVP dışında başka santral aracı çalışılmamıştır. Bizim çalışmamız stresle oluşan yanıtta daha önceki çalışmalarda gözlenen CRF'nin anti-inflamatuvar etkilerini desteklemekle kalmayıp, aynı zamanda 5-HT<sub>3</sub> ve CCK<sub>B</sub> reseptörlerinin katılımlarını da ortaya çıkarmıştır. Santral reseptör antagonisti + elektrik şoku gruplarında, akut stresle TNBS koliti hasar parametrelerinde gözlenen azalmaların herbiri (makroskopik skor, mikroskopik skor ve doku MPO aktivitesi) CRF, 5-HT<sub>3</sub> veya CCK<sub>B</sub> reseptör antagonistiyle kolit değerlerine geri dönmüştür. Aynı zamanda TNBS kolit ile hayvanlarda gözlenen ve stres ile azalan kilo kayıpları santral reseptör antagonistleri ile tekrar kolit değerlerine ulaşmıştır. Hatta makroskopik incelemede CRF reseptör antagonistiyle saptanan hasar derecesinin tek başına kolit grubunda ölçülen değerinde de üstüne çıktığı görülmüştür. Bilindiği gibi, inflamasyon sonrasında plazma seviyeleri artan sitokinler vagal duysal sinirleri uyatarak veya KBB'nin zayıf olduğu bölgelerde doğrudan etki göstererek CRF immünoreaktivitesi ve HPA aksında hiperaktivasyona neden olmaktadır (100). Bu bilgilerin ışığında santral CRF reseptör antagonisti ile saptanan pro-inflamatuvar etkinin kolit sonrası oluşan CRF hiperaktivitesi ile açıklanabileceği düşünülmüş, fakat bu düşünceyi doğrulamak için yapılan in vivo CRF reseptör antagonisti + kolit grubunda kolit hasar derecesinde beklenen pro-inflamatuvar etki gözlenmemiştir. Ayrıca her üç reseptörün periferik dokularda da bulunmasına rağmen, CRF, 5-HT<sub>3</sub> veya CCK<sub>B</sub> reseptör antagonistlerinin periferik uygulamasıyla strese bağlı kolit hasarında bir değişikliğin gözlenmemesi, anti-inflamatuvar etkilerin santral modülasyonla gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Stresle oluşan santral nöroendokrin yanıtın oluşumunda CRF önemli bir aracı olmakla birlikte bu yanıt CRF dışında NE, 5-HT ve CCK gibi birden fazla santral aracının katılımı ile gerçekleşen kompleks bir süreçtir. Bu çalışmada deneysel kolit hasarının akut strese bağlı santral modülasyonunda CRF dışında 5-HT<sub>3</sub> ve CCK<sub>B</sub> reseptörlerinin de etkili olduğunun bulunması ile bu kompleks süreç kısmen de olsa ortaya konmuş ve çalışmanın ikinci bölümünde bu reseptör ve nöropeptidler arasındaki karşılıklı etkileşimler araştırılmıştır. Bu amaçla planlanan agonist gruplarında, akut strese gözlenen bulgularla paralellikler gösterecek şekilde santral CCK-8s veya 5-HT uygulamasıyla makroskopik skor ve doku MPO aktivitesinde azalma saptanmıştır. Mikroskopik değerlendirmede santral CCK-8s enjeksiyonu sonrasında epitel ve bez hücre harabiyeti ile interstisyel ödemde iyileşme saptanmış ve kolit grubuna göre daha az kanama olmuştur. Santral 5-HT grubunda ise diğer iki parametrenin aksine mikroskopik düzeyde kolit grubuna yakın bir tablo ile karşılaşılmıştır. Hafif bir azalma

gözlenmekle birlikte bunun istatistiksel anlamlılık göstermemesi mikroskopik skorda kullanılan dar ölçüt (0-3) ile açıklanabilir. Nitekim makroskopik skor ve MPO aktivitesinde saptanan anlamlılık ile diğer gruplarında gözlenen santral 5-HT ve 5-HT<sub>3</sub> reseptörüne bağlı modülatör etkiler bu ihtimali kuvvetlendirmektedir. Santral 5-HT veya CCK-8s enjeksiyonlarıyla saptanan bulguların bir benzerinin agonistlerin periferik uygulanmasıyla tekrarlanmaması üzerine modülasyonun santral olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak periferik CCK-8s uygulamasıyla bir etkinin gözlenmemiş olması, santral CCK-8s'le gerçekleşen modülasyonun santral olduğunu düşündürmekle beraber, CCK-8s'in olası periferik etkisini ekarte etmemektedir. Çalışmamızda kullanılan CCK-8s'in santral etkili dozu (20 ng/sıçan) büyük bir olasılıkla periferik etki oluşturacak miktarda değildir. Nitekim çok daha yüksek ( $\mu\text{g}$  düzeylerinde) dozların uygulandığı çalışmalarda vagal duysal sinirlerin uyarılması ile plazma ACTH ve KS seviyelerinde artış gözlenmiştir (20, 21, 95).

Santral reseptör antagonistlerinin uygulandığı gruplarda isv CCK-8s enjeksiyonuyla makroskopik hasarda gözlenen azalma CCK<sub>B</sub> ve 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonistleriyle ortadan kalkmış, CRF reseptör antagonisti MPO aktivitesindeki azalmayı geri döndürmekle birlikte makroskopik hasarda bir etki göstermemiş ve bu bulguların ışığında CCK'e bağlı santral modülasyonun CRF'den bağımsız bir yolla gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Stres - CCK ve stres - CCK - GI fonksiyonlar ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte, santral CCK-8s ve deneysel kolit modeli arasındaki ilişki daha önce çalışılmamıştır. İmmünohistokimyasal ve radyoreseptör tekniklerle yapılan çalışmalarda AP, dorsal motor nukleus (DMN), NTS, hipotalamus ve amigdala gibi nöroendokrin yanıtın oluşumu ve GI fonksiyonlarla ilgili alanlarda saptanan CCK, CCK<sub>B</sub> reseptörü aracılığıyla genel anksiyojenik etki göstermekte ve GI fonksiyonların santral regülasyonuna katılmaktadır (29). Örneğin GI motilitenin santral regülasyonu ile ilgili çalışmalardan birinde, CCK-8s'in strese bağlı modülasyonda rol aldığı ve santral CCK-8s uygulamasıyla emosyonel stres veya CRF ile indüklenmiş kolon motilitesinin azaldığı gözlenmiştir (36). CCK ve 5-HT arasındaki etkileşimin çalışıldığı başka bir çalışmada ise 5-HT<sub>1A</sub> agonistinin santral CCK-8s salınımına neden olarak kolon motilitesini artırdığı görülmüştür (35). Benzer bir etkileşim santral 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonisti + CCK-8s grubumuzda gözlenmiş, isv CCK-8s'le kolitin makroskopik hasarında saptanan azalma 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonisti ile ortadan kalkmıştır. Bu iki çalışmada elde edilen bulgular santral CCK ile 5-HT arasındaki ilişkinin çift yönlü olabileceğini göstermektedir.

Santral CCK-8s uygulamasının aksine, isv 5-HT ile doku hasarında gözlenen iyileşmede CRF reseptörleri aracılık etmektedir. Santral 5-HT ile makroskopik skor ve doku MPO aktivitesinde ölçülen azalmalar 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonistinın yanısıra CRF reseptör

antagonisti ile ortadan kalkarken, CCK<sub>B</sub> reseptör antagonistleri ile değişmemiştir. Şu ana kadar 5-HT ile ilgili yapılan çalışmaların ışığında bu bulgular, santral 5-HT'nin TNBS koliti üzerindeki santral modülasyonunun CRF içeren nöronlar üzerinden gerçekleşebileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda PVN'de önemli miktarlarda 5-HT immünoaktivitesine rastlanılmıştır. Dorsal ve median raphe çekirdeklerinden kalkan asendan serotonerjik dallar bir taraftan PVN'de CRF içeren nöronlarla sinaps yaparken, diğer taraftan limbik yapılardan özellikle hipokampus ve amigdalayla inerve etmektedir. Bu asendan dalların stimülasyonu kortikotropik aks üzerinde uyarıcı etki oluşturmakta ve bu hipofizer portal sistemde artmış CRF salınımı ile sonuçlanmaktadır. Yine PVN dışında hipotalamusta periventriküler serotonerjik nöronlar bulunmakta ve CRF salınım kapasitesi bu nöronlar tarafından da kontrol edilmektedir (15).

Akut stres ve santral agonistlerle gerçekleşen santral modülasyonun periferik taşınmasında rol alabilecek mekanizmalardan HPA aksı ve sempatik sinir sisteminin rollerinin araştırıldığı gruplardan elde edilen sonuçlar, santral agonist gruplarıyla ortaya çıkan kolitin çok yönlü santral modülasyonuna daha fazla netlik kazandırmıştır. Akut stres grubunda elektrik şoku uygulamasıyla makroskopik skor ve doku MPO aktivitesinde saptanan azalmalar sempatik gangliyon blokleri heksametyum veya glikokortikoid reseptör antagonistleri RU-486 ile kolit değerlerine geri dönmüştür. Bu sonuçlar akut stresle deneysel kolit modelinde oluşan santral anti-inflamatuvar etkilerin her iki periferik yolak üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Santral agonist gruplarından ilkinde isv CCK-8s enjeksiyonuyla oluşan anti-inflamatuvar yanıtlar RU-486 ile değişmezken, heksametyum ile hem makroskopik hasar derecesi hem de lökosit infiltrasyonunda santral CCK-8s'le gözlenen azalmalar geri dönmüştür. Santral 5-HT uygulaması sonrasında gelişen anti-inflamasyon ise her iki periferik blokajla önlenmiştir. Heksametyum enjeksiyonu ile MPO aktivitesinde anlamlı olmasa bile bir yükselme eğilimi görülmüş, ip heksametyum veya RU-486 ile 5-HT'ye bağlı makroskopik skorda saptanan azalmalar ortadan kalkmıştır. Bu sonuçlarla santral reseptör antagonistleri + santral agonist gruplarında elde edilen bulgular birarada düşünüldüğü zaman, stresle TNBS kolitinde gözlenen anti-inflamatuvar yanıtın oluşumuyla ilgili olarak şu mekanizmalar ileri sürülebilir: (1) Deneysel kolitte akut stresle oluşan anti-inflamatuvar etkide santral CRF, CCK<sub>B</sub> ve 5-HT<sub>3</sub> reseptörlerinin üçü de rol almaktadır. (2) Akut stresle artan 5-HT aktivitesi, CRF aracılı HPA hiperaktivasyonu ve sempatik sistem stimülasyonu aracılığıyla ve/veya CRF-dışı sempatik sistem aktivasyonu ile anti-inflamatuvar etki oluşturmaktadır. (3) Akut stresle CCK<sub>B</sub> reseptör sisteminde gözlenen aktivasyon ise CRF-dışı santral bir mekanizmayla sempatik sistemi uyararak kolit hasar



*derecesini düşürmekte ve CCK'e bağlı koruyucu etkide HPA aksı rol almamaktadır. CCK-8s ile ilgili bu mekanizma aynı zamanda uzun süreli kontrol edilemeyen stresle TNBS kolitinde gerçekleşen pro-inflamatuvar etkilerin patogenezi açıklamak için ileri sürülen mekanizmalardan birine de açıklık getirebilecek niteliktedir. Bu mekanizmada kronik stres - deneysel kolit çalışmalarında gözlenen pro-inflamatuvar etkilerin oluşumunda CRF-dışı santral yolak veya yolakların sorumlu olabileceği düşünülmüştü. Ancak, kontrol edilemeyen kronik stres modelleriyle ve/veya sempatik sistem baskınlıklarının farklı olduğu bilinen Wistar Kyoto ve Brown-Norway sıçanlarla çalışıldığı takdirde santral CCKerjik sistemin deneysel kolit hasarı üzerindeki sempatik sinir sistemi aracılı modülasyonuna ait mekanizmalara açıklık getirmek mümkün olabilecektir.*

Kronik stresin GK aracılığıyla immünosupresif etki yaptığı bilinmekle birlikte akut strese bağlı artmış plazma GK'leri immün sistemi kuvvetlendirmektedir. Akut stres grubunda elde ettiğimiz bulguları destekler şekilde birçok hayvan deneyinde hafif akut stresin immün yanıtı arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca fizyolojik dozlardaki GK'ler normal immün yanıt için gereklidir. Optimal KS dozunun ADX yapılmış deneklerde yara iyileşmesi için esansiyel olduğu görülmüş (103), TNBS kolit modeliyle yapılan çalışmalarda endojen ve eksojen GK'ler histolojik skor ve MPO aktivitesini azaltmıştır (64, 102). GK'ler bu anti-inflamatuvar etkilerini lenfositlerin vücuttaki dağılımlarını değiştirerek, transkripsiyon faktörü nükleer faktör- $\kappa$ B'nin inhibisyonuyla sitokinlerin sentezini engelleyerek, lökosit migrasyonu ve NK hücre aktivitesini azaltarak, bradikinin ve histamin salınımında inhibisyona neden olarak yapmaktadır (5). Periferde gösterdikleri bu anti-inflamatuvar etkiler dışında stresle birlikte plazma seviyeleri artan GK'ler aynı zamanda (-) geri bildirim mekanizması ile santral modülasyonu da etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda GK'lerin CRF motor nöronlarında bulunan CRF, vazopressin, anjiyotensin ve CCK salınımlarını baskıladıkları, cerrahi veya farmakolojik ADX'nin PVN'deki CRF ve AVP mRNA'sını artırdıkları görülmüş, plazma GK'lerinin ortamdaki çekilmesi ile hipofizer portal sisteme yüksek miktarlarda CRF salınımı olmuştur (17, 97). Benzer şekilde santral serotonerjik aktivite de GK'e bağlı (-) geri bildirim mekanizmasından etkilenmekte, raphe-hipokampal projeksiyonlarda ADX'le 5-HT sentezi ve reseptör yoğunluğunda gözlenen artma KS tedavisi ile geri dönmektedir (15, 22). Özetlersek, plazma seviyeleri artan stres hormonları CRF, 5-HT ve CCK'in de içinde bulunduğu nöronlar üzerinde (-) geri bildirim mekanizması ile düzenleyici etkiler göstererek canlıyı strese bağlı aşırı hasarlardan korumaktadır. Çalışmamızda beklentiler doğrultusunda ip GK reseptör antagonisti ile stres ve santral agonistlere bağlı anti-inflamatuvar etkiler geri dönerken, sürpriz bir şekilde tek başına kolit grubunda RU-486 uygulaması anti-inflamatuvar etkiye neden oldu.



İntraperitoneal RU-486 ile makroskopik skor ve doku MPO aktivitesinde gözlenen bu azalmanın endojen GK aktivitesinin blokajına bağlı fizyolojik geri bildirim mekanizmasıyla gerçekleştiği öne sürülerek, buna bağlı artmış santral CRF, 5-HT ve CCK gibi nöropeptid salınımların uyardığı sempatik sinir sistemi aktivasyonu sonucu olduğu söylenebilir. Ama mevcut bilgilerle RU-486 ile makroskopik skor ve MPO aktivitesinde gözlenen bu etkilere tatmin edici bir yanıt bulmak kolay gözükmemektedir.

Glikokortikoidlere bağlı (-) geri bildirim mekanizması başta hipokampus ve serebral korteks olmak üzere hipotalamus, diğer limbik sistem yapıları ve beyin sapı gibi alanlar üzerinden çalışmaktadır (61, 75). Bu yapılar arasında hipokampal kompleks, emosyonun limbik kontrolünde ve HPA aksının modülasyonunda kritik bir öneme sahiptir. Hipokampusun uyarılması normal şartlarda kortikosteroid biyosentezini kolaylaştırırken, strese maruz kalan hayvanda inhibisyonuna neden olmaktadır. Plazma seviyeleri artan GK'ler hipoakampuste reseptör down-regülasyonuna neden olurken, ADX ile up-regülasyon gözlenmiş ve benzer bir regülasyon hipotalamusta da gerçekleşmiştir. Fakat stresörün doğasına göre (kontrol edilebiliyor olması, hipokampusun katılımı vs) GK'lere bağlı regülasyon değişmektedir (61). Örneğin bir çalışmada sosyal stresle GK bağlanması 1 hafta içinde hipotalamus ve hipokampuste düşerken 3. haftada sadece hipokampuste düşük saptanmış, hipotalamusta ise normale dönmüştür (13). Bu mekanizmanın, stres veya inflamasyon ile oluşan santral yanıtı belli oranlarda tutarak, organizmayı maksadını aşan aşırı etkilerden koruduğu kabul edilmektedir. Özellikle uzun süreli kontrol edilemeyen stres için geçerli olan bu nokta, başedilemeyen kronik strese bağlı pro-inflamatuvar etkilerin oluşumunu açıklayabilir. Bu aynı zamanda "deneysel kolit - kontrol edilemeyen kronik stres" çalışmalarının aksine, bizim çalışmada neden kronik stres ile anti-inflamatuvar eğilim saptandığı sorusuna da farklı bir açıklama getirmektedir. Kontrol edilebilir kronik ve kronik zeminde uygulanan akut streslerin uygulandığı gruplarımızda gerçekleşen olası hipokampal katılımı plazma GK seviyelerinin belli bir aralıkta tutulmuş olması denekleri pro-inflamatuvar etkilerden korumuş olabilir.

Son zamanlarda yapılan kronik stres çalışmaları inflamatuvar modülasyonda GK'ler dışında sempatik sinir sistemi ve SAA'nın katılımlarını da ortaya koymuştur. Hatta strese bağlı NK hücre fonksiyonlarının regülasyonunda katekolaminlerin majör role sahip olduğu ileri sürülmektedir (23). Lenfositlerde  $\alpha$ - ve  $\beta$ -adrenerjik reseptörler bulunmakta, yine lenfositler dışında timus, dalak, kemik iliği ve lenf nodları sempatik dallar ile inerve edilmektedir (23). İn vitro çalışmalarda  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin lenfositlerde daha çok inhibitör etki

gösterirken,  $\alpha$ -adrenerjik reseptörlerin stimülasyona neden olduğu ve NK hücre aktivitesinin  $\beta$ -adrenerjik uyarıyla inhibe olduğu saptanmıştır (23). Fakat in vivo çalışmalar sempatik sisteme bağlı modülasyonun daha kompleks olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sempatektomi sonrasında genelde hayvanlarda immün aktivitenin baskılandığı gözlenmiş, fakat lenfosit proliferasyonu ve B hücre farklılaşması ile ilgili çelişkili bulgular elde edilmiştir. Bir çalışmada isv CRF'ye bağlı NK aktivitesindeki inhibitör etkinin gangliyon blokeri ile önlediği görülmüş, başka bir çalışmada ise stresle indüklenen NK hücre aktivitesi  $\beta$ -adrenerjik reseptör blokajı ile ortadan kalkmıştır (23). Periferik yollardan sempatik sinir sistemi katılımının araştırıldığı gruplarımızda elde edilen bulgular, sempatik sinir sisteminin immün sistemi modüle ettiğini ortaya çıkaran bu genel çalışmaları destekler niteliktedir. Aynı zamanda bu çalışmayla ilk defa sempatik sinir sisteminin akut stres ve santral agonistlerle oluşan kolitin santral modülasyonuna katıldığı gösterilmiş, akut stres, isv CCK-8s ve isv 5-HT enjeksiyonlarına bağlı anti-inflamatuvar etkilerin HPA aksı dışında sempatik sinir sistemi aracılığıyla olduğu saptanmıştır. Hatta santral CCK-8s'e bağlı santral modülasyonda sempatik sistemin daha baskın olduğu, HPA aksının kısmi katılımına karşın, sempatik gangliyon blokerinin isv CCK-8s uygulamasıyla makroskopik skor ve MPO aktivitesinde saptanan azalmaları tamamen önlediği gözlenmiştir.

Akut stresle HPA aksı ve sempatik sinir sistemde gerçekleşen hiperaktivasyon anti-inflamatuvar etkilere neden olurken, kronik stresle immün sistemde meydana gelen değişiklikler sonucunda canlıda inflamatuvar olaylara karşı yatkınlık gelişmektedir. Normal şartlar altında çoğu zaman  $T_{H1}$  ile başlayan immün yanıt  $T_{H2}$  ile devam etmektedir. GK'ler  $T_{H2}$  dönüşümü engellemekte ve sempatik sistemdeki aktivasyon veya lokal kortizol/DHEA oranındaki artış  $T_{H1}/T_{H2}$  arasındaki dengeyi değiştirmekte ve sonuçta kronik stresle hücresel immün sistem zayıflarken humoral immünite artmaktadır. Stresle birlikte görülen kortizol miktarındaki artış ve DHEA'daki azalmayla kortizol/DHEA oranı artmakta ve bu artış IL-1, IL-2, IL-12 ve IFN- $\gamma$  de azalma, IL-4, IL-6 ve IL-10 artışa neden olmaktadır. IL-2 ve IFN- $\gamma$  salınımında gözlenen azalmayla IL-2'e bağlı T ve B hücreleri ile NK hücrelerin proliferasyonu azalmaktadır. Aynı zamanda makrofaj aktivasyonu için en önemli uyarıcılar olan IL-2 ve IFN- $\gamma$  miktarındaki düşmeler fagositozda azalmaya neden olmakta ve dolayısıyla bakteri ve virüslerin öldürülmesinde yetersizlik gelişmektedir. Ayrıca  $T_{H1}$  hücrelerin azalmasıyla hücresel immün sistemde görülen bu zayıflık,  $T_{H2}$  hücre artışıyla daha da derinleşmektedir. Çünkü  $T_{H2}$  hücre artışı ile daha fazla salınan IL-4 ve IL-10 gibi sitokinler makrofajların aktivasyonlarını bozarak hücresel immünitede zayıflamaya neden olmaktadır

(18, 39).  $T_{H1}/T_{H2}$  oranına bağımlı immün yanıtta meydana gelen bu değişiklikler İBH patogenezi kısmen de olsa bir açıklama getirebilecek potansiyeldedir. Nitekim bu açıklamayı destekleyecek şekilde, anti-inflamatuvar sitokinler arasında bulunan IL-10'dan yoksun hayvanlarda doğumdan sonra 3-4 ay içinde kendiliğinden kronik enterokolit gelişmektedir. Kliniği, histopatolojik görünümü ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından İBH tablosuna benzeyen kronik kolitin gelişiminde (58), yapılan bir çalışmada,  $T_{H1}$  yanıtında gözlenen değişiklikler sorumlu tutulmuştur (6). Ülseratif kolitli hastalarla yapılan bir diğer çalışmada hastalığın aktif döneminde IL-1ra/IL-1 $\beta$  oranı düşmekte, iyileşme döneminde ise bu oranın yanısıra anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10 ve TGF- $\beta$ 'nin salınımları artmaktadır. Bunun için IL-1ra/IL-1 $\beta$  oranının İBH'nin patogeneziinde rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu oranı belirleyen en önemli faktörler arasında anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-4, IL-10 ve TGF- $\beta$  bulunmakta, IL-1ra'nin üretimi bu sitokinler ile artmaktadır (44). Bu nedenle IL-10 ile IL-1ra/IL-1 $\beta$  oranı arasında, dolayısıyla stresle sempatik sistem ve HPA aksında meydana gelen değişiklikler ile  $T_{H1}/T_{H2}$  oranı arasında ve nihayet  $T_{H1}/T_{H2}$  oranı ile İBH patogenezi arasında bir ilişki kurmak mümkün gözükmemektedir.

Sempatik sinir sistemi ve GK'lerin immün sistem üzerinde yapmış oldukları etkilerin araştırıldığı çalışmalarda elde edilen bulguları değerlendirdikten sonra stres ile sempatik sistem ve HPA aksı arasındaki ilişkiyi tartışmak gerekmektedir. Bilindiği gibi PVN'de bulunan CRF içeren nöronlar hem HPA'nı hem de beyin sapında bulunan otonom sinir sistemini kontrol eden merkezleri inerve etmekte ve nöronların stimülasyonu ile plazma KS ve katekolaminlerinin seviyeleri artmakta, sempatik ve parasempatik sinir sistemleri uyarılmaktadır. Yapılan birçok çalışmada akut ve kronik stresin PVN ve amigdala gibi nöroendokrin yanıtta önemli olan bölgelerde CRF reaktivitesini ve stres hormonlarının plazma seviyelerini artırdığı görülmüştür. Bu çalışmalardan birisinde 1 saatlik kısıtlama stresiyle PVN ve amigdala CRF mRNA seviyesinde artma saptanırken, diğer bir çalışmada 15 dakika süreli 1 mA'lik elektrik şoku uygulamasının HPA aksında 1 ay kadar süren fonksiyonel değişikliklere neden olduğu saptanmıştır (47, 101). Bu çalışmalarda kullanılan her iki stres modeli modifiye edilerek çalışmamızda kullanılmıştır. Stresle HPA aksında gözlenen değişikliklerin araştırıldığı başka bir çalışmada ise kısa süreli sosyal stres (2 günlük) sonrasında 1. ve 3. haftada iv CRF uygulamasıyla HPA aksının yanıtına bakılmış ve 1. haftada iv CRF uygulamasıyla HPA aksında saptanan hiperaktivite ve buna bağımlı artmış ACTH yanıtı 3. haftada normale dönerken plazma KS seviyelerinde de benzer bir eğilim gözlenmiştir (13). Kısa süreli emosyonel streslerle HPA aksında gözlenen ve 3-4 haftaya

kadar süren bu değişikliklerin ışığında, çalışmamızda akut stresle saptanan ve RU-486 veya isv CRF reseptör antagonisti ile geri dönen anti-inflamatuvar etkilerden CRF'ye bağlı HPA aksında gelişen hiperaktivite ve artmış plazma GK'leri sorumlu tutulabilir. Bu savı destekler şekilde kronik stresin TNBS koliti üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada birinci günde hem tek başlarına stres ve TNBS koliti grupları hem de stres + kolit gruplarında plazma KS seviyesinde saptanan artış, üçüncü günde sadece stres gruplarında görülürken, tek başına kolit grubunda plazma seviyeleri normale dönmüştür (64).

Kullanılan stresin çeşidi, periferik yollardan hangisi veya hangilerinin uyarılacağı veya baskınlık kazanacağını belirlemektedir. Farklı stres modelleri ile birlikte farklı beyin yapıları öne çıkararak nöroendokrin yanıt değişik şekillerde modüle edilmekte ve psikolojik stres modelleriyle serebral korteks ve limbik sistem yapılarının katılımları daha fazla önem kazanmaktadır. Amigdalanın nöroendokrin yanıt katıldığını gösteren bir çalışmada CeA'nın strese bağlı otonom ve nöroendokrin yanıtı etkilediği ve plazma E, NE, ve KS seviyelerinin CeA lezyonundan etkilendiği gözlenmiştir (79). Stresin doğasına bağlı oluşan yanıtlarda amigdalanın rolünün ortaya konduğu bir başka çalışmada şartlandırılmamış stres, CeA otonom ve nöroendokrin (HPA aksı) yanıtta genel stimulusa neden olurken, şartlandırılmış stresle yanıt daha spesifik bir alana sıkıştırılarak parasempatik aktivitede stimulus ile sonuçlanmaktadır (81). Sosyal stresle yapılan diğer bir çalışmada ise, sempatik sinir sistemde aktivasyon, plazma katekolamin ve KS seviyelerinde artış gözlenirken, kısıtlama stresıyla sempatik ve parasempatik sinir sisteminde aktivasyon saptanmıştır (48). Sosyal stres grubunda saptanan bulgularla paralellik gösterecek şekilde, çalışmamızda akut strese bağlı santral anti-inflamatuvar yanıtın sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve GK'lerle ortaya çıktığı görülmüştür. Bu paralellikler aynı zamanda çalışmamızda kullanılan ve psikolojik komponentini kuvvetlendirmek için modifiye edilen stres modelinin, bu modifikasyonla limbik yapıların olası katılımlarını artırarak, sosyal stres modeli kadar olmasa da, emosyonel strese daha fazla yaklaştığını göstermektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla elde edilen gelişmeler CRF dışında santral serotonerjik aktivitenin de SAA ve HPA aksını modüle ettiğini göstermektedir. Fiziksel veya psikolojik stres 5-HT sentezi ve kullanımında artışa neden olmakta, 5-HT sempatik sinir sistemi ve HPA aksı üzerinden plazma GK ve katekolamin seviyelerini artırmaktadır. Santral serotonerjik nöron lezyonu veya 5-HT sentez inhibitörü, plazma ACTH ve KS seviyelerini azaltmakta, hipotalamik serotonerjik nöron lezyonunda ise stresle (immobilizasyon stresi, şartlanmış emosyonel stres) indüklenen plazma KS seviyelerindeki artış önlenmektedir. Ayrıca anatomik, histolojik ve fizyolojik çalışmalarda elde edilen bulgular 5-HT ile hipofiz ve

adrenal bezler arasında doğrudan etkileşimler olduğunu göstermekte; 5-HT bu bezlere yaptığı doğrudan etkiyle plazma ACTH ve KS seviyelerini artırmaktadır (15). Bu çalışmalarda elde edilen bulguları destekler şekilde çalışmamızda TNBS kolit modelinde akut stresle ortaya çıkan anti-inflamatuvar etki 5-HT<sub>3</sub> reseptör antagonisti ile önlenmiş, santral 5-HT enjeksiyonuna bağlı anti-inflamatuvar etkilerin oluşumunda HPA aksının ve sempatik sinir sisteminin katılımları ortaya konmuş, fakat ip 5-HT enjeksiyonu ile kolit hasarında bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca serotonerjik ve hipotalamik CRF içeren nöronlar arasındaki anatomik bağlantılar bu çalışmayla fizyolojik olarak da gösterilmiştir. Bu bağlantıları tekrarlırsak, raphe çekirdeklerinden kaynaklanan asendan serotonerjik dallar hipotalamik ve limbik yapıları; özellikle hipokampus ve amigdalayı inerve etmekte ve bu nöronların stimülasyonu ile kortikotropik aks uyarılarak hipofizer portal sisteme CRF salınımı artmaktadır. Santral 5-HT agonist grubunda CRF reseptör antagonisti ile isv 5-HT'ye bağlı anti-inflamatuvar etkilerin ortadan kalmış olması, stresle artan serotonerjik aktivitenin CRF üzerinden HPA aksında ve sempatik sinir sisteminde aktivasyona neden olarak anti-inflamatuvar etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. 5-HT gruplarında elde edilen bulguları destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin bir çalışmada kaçınılmaz strese maruz kalan hayvanlarda serotonerjik nöronlarda hipersensitivite geliştiği ve bunun HPA aksının hiperaktivasyonu ile sonuçlandığı görülmüştür. Başka bir çalışmada anksiyolitik 5-HT<sub>1A</sub> reseptör agonisti doza bağımlı olarak strese maruz kalan sıçanlarda plazma KS ve katekolamin seviyelerini artırmıştır (49). CRF ve 5-HT nöronları arasındaki etkileşimi gösteren bir diğer çalışmada ise, santral CRF reseptör antagonisti santral 5-HT'ye bağlı termojenik etkiyi önlemiştir. Akut stresle serotonerjik sistemde gözlenen hiperaktivasyonun aksine uzun süreli stres hipoaktivasyona neden olmaktadır. Bir çalışmada 2 saatlik immobilizasyon stresiyle 5-HT<sub>2</sub> reseptör sayısında ani yükselme ve dorsal hipokampusta 5-HT<sub>1A</sub> reseptör bağlanması artma görülmüştür. Aynı stresin 4 gün uygulanması plazma triptofan seviyesini azaltmış, 14 günlük uygulama ile 5-HT immünoreaktivitesinde azalma ve dorsal raphe çekirdeğinde GK bağlanması kapasitesinde artma saptanmıştır (15).

Özetle, başedilemeyen kronik stresin İBH'nın patogenezindeki rolünü açıklamak için ileri sürülen mekanizmalara son bulgular ışığında nihai şeklini vermek gerekirse şu şekilde bir değerlendirme yapılabilir: Akut stresle santral CRF, CCK ve 5-HT sisteminde gözlenen hiperaktivasyon ile sempatik sinir sistemi ve HPA aksı uyarılmakta ve bu uyarı anti-inflamatuvar etkiyle sonuçlanmaktadır. Fakat daha çok akut dönemde koruyucu olan bu mekanizmalarla oluşan net etki, stresin kontrol altına alınamaması ve kronikleşmesi ile pro-inflamatuvar yöne kaymaktadır. Çünkü başedilemeyen kronik stresle (a) CRF ve 5-HT



sisteminde gelişen hipoaktivasyon sonucu akut dönemde gözlenen santral koruyucu etkiler zayıflamakta, (b) uzun süreli sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve artmış GK'ler ile  $T_{H1}/T_{H2}$  dengesi bozularak immünoşüpresif etki oluşmakta, (c) kronik strese bağılı periferik modülasyonla GI epitel fonksiyonlarda akut dönemde saptanan anti-inflamatuvar mekanizmalar zayıflarken, pro-inflamatuvar mekanizmalar varlığını devam ettirmekte ve (d) son olarak kronik stresle CRF-dışı santral pro-inflamatuvar mekanizmalar aktive olmakta ve/veya santral anti-inflamatuvar etkilerin zayıflaması ile baskınlık kazanmakta ve bütün bu değişikliklerin net sonucu olarak inflamasyona yatkınlık gözlenmektedir.



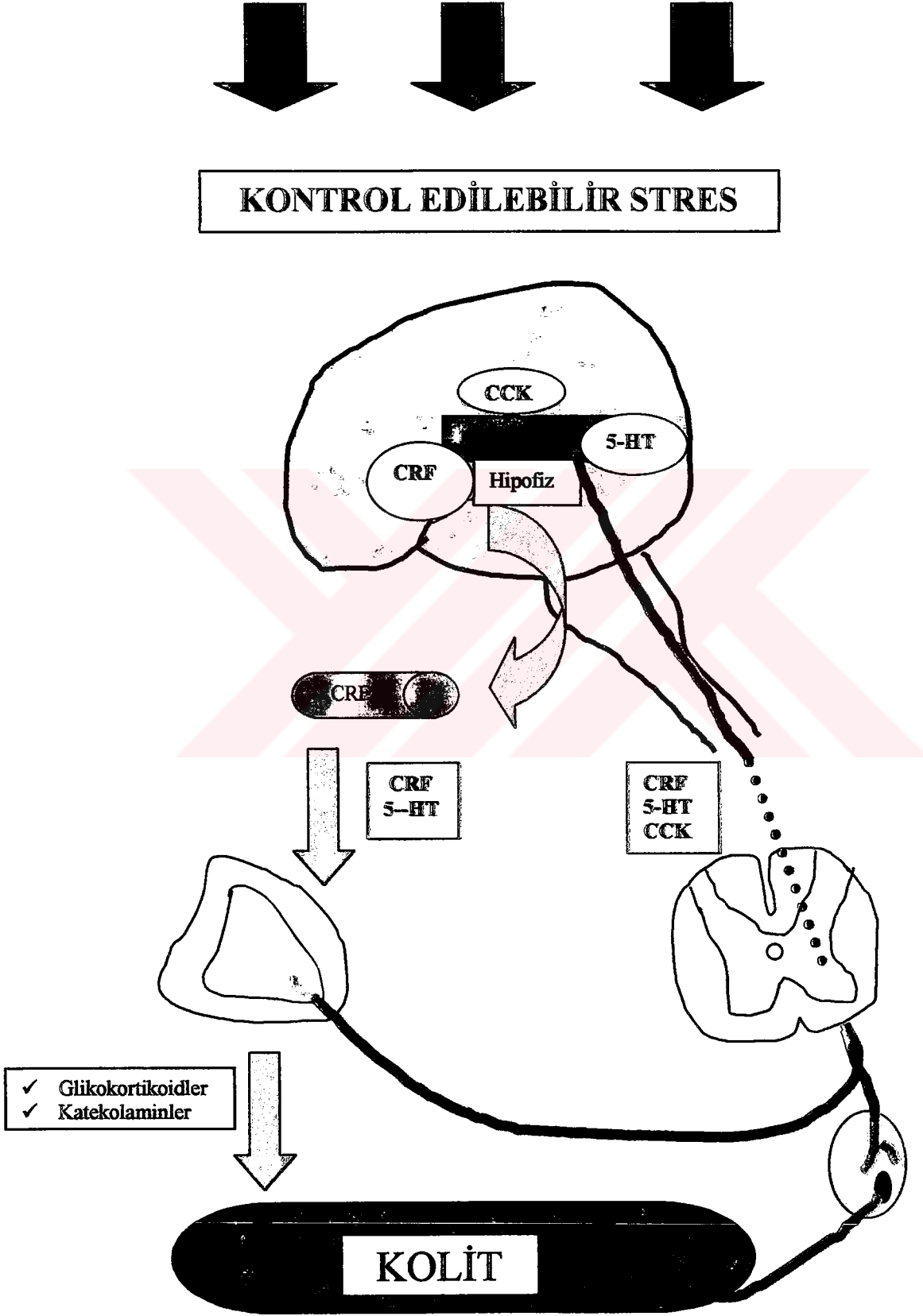


## 9. SONUÇLAR

Birden fazla stres modelinin kullanıldığı bu çalışmada akut ve kronik stresin TNBS kolit hasarı üzerindeki modülatuvar etkileri araştırılmıştır. Stres ve santral agonist gruplarında elde edilen bulgular stresle indüklenen nöroimmünolojik modülasyonlarla ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalarla birarada düşünüldüğü zaman şu sonuçlar ileri sürülebilir (Şekil 7):

- I. Kontrol edilebilir akut stres santral CRF, CCK<sub>B</sub> ve 5-HT<sub>3</sub> reseptörlerinin katılımı ile sempatik sinir sistemi ve HPA aksında aktivasyona neden olmakta ve bu hiperaktivasyon deneysel kolit hasarında anti-inflamatuvar etki oluşturmaktadır.
- II. Kontrol edilebilir kronik stres modeli ile anti-inflamatuvar etki yönünde bir eğilim kazanan santral modülasyonun, kronik zeminde uygulanan ikinci akut stresle net anti-inflamatuvar etkiye neden olması, kullanılan stres modelleriyle santral yanıtın sensitizasyon ile sonuçlanmış olduğunu düşündürmektedir. Bu ise daha önceki çalışmalarda kontrol edilemeyen kronik stresle kolit hasarında gözlenen santral desensitizasyona bağlı pro-inflamatuvar etkilerin aksine bu çalışmada neden anti-inflamatuvar etkilerin görüldüğünü açıklamaktadır.
- III. Santral agonist gruplarında elde edilen santral modülatör etkiler her ne kadar eksojen CCK-8s ve 5-HT'ye bağlı etkiler olsalar da, santral reseptör antagonisti - akut stres gruplarında saptanan bulgularla beraber düşünüldüğü zaman, akut stresle TNBS koliti üzerindeki santral modülasyona CRF dışında santral CCK ve 5-HT nöropeptidlerinin de katıldığı sonucuna varılabilir. Bu santral nöropeptidlerden 5-HT, CRF içeren nöronlar üzerinden, CCK ise CRF-dışı farklı bir yolakla strese bağlı santral nöroendokrin modülasyona katılmaktadır.
- IV. Kontrol edilebilir akut strese bağlı nöroendokrin yanıt, kolona hem HPA aksı hem de sempatik sinir sistemi ile taşınmaktadır. Santral 5-HT hiperaktivitesine bağlı nöroendokrin yanıtın kolona taşınmasında da her iki periferik yolak rol oynarken, CRF-dışı farklı bir mekanizma ile santral modülasyona katılan CCK daha çok sempatik sinir sistemini tercih etmektedir.

Şekil 7. Çalışmanın sonuçlarına göre akut ve kronik stresin kolit hasarındaki olası santral düzenleyici etkileri.



## 10. KAYNAKLAR

1. Aguilera G., Millan M.A., Hauger R.L., Catt K.J.: Corticotropin-releasing factor receptors: Distribution and regulation in brain, pituitary, and peripheral tissues. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 48-66, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
2. Albeck D.S., McKittirick C.R., Blanchard D.C., Blanchard R.J., Nikulina J., McEwen B.S., Sakai R.R.: Chronic social stress alters levels of CRF and AVP mRNA in rat brain. *J. Neurosci.*, 17(12): 4895-4903, 1997.
3. Anokhin K.V., Riabinin A.E., Sudakov K.V.: The expression of the c-fos gene in the brain of mice in the dynamic acquisition of defensive behavioral habits. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pavlova*, 50(1):88-94, 2000.
4. Assenmacher I., Szafarczyk A., Alonso G., Ixart G., Barbanel G.: Physiology of neural pathways affecting CRH secretion. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 149-161, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
5. Auphan N., Didonato J.A., Rosette C., Helmsberg A., Karin M.: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270:286-290, 1995.
6. Berg D.J., Davidson N., Kuhn R., Muller W., Menon S., Holland G., Thompson-Snipes L., Leach N.W., Rennick D.: Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10 deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.*, 98:1010-1020, 1996.
7. Boughton-Smith N.K., Wallace J.L., Morris G.P., Whittle B.J.R.: Evaluation of the role of arachidonic acid metabolites in a rat model of Crohn's disease. *Gastroenterology*, s.A1332, Abst.:88, 1985.
8. Bowers G., Cullinan W.E., Herman J.P.: Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA expression in central stress circuits. *J. Neurosci.*, 18(15):5938-5947, 1998.
9. Bradley P.P., Priebat D.A., Christensen R.D., Rothstein G.: Measurement of cutaneous inflammation. Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.*, 78:206-209, 1982.
10. Brodin E., Linderoth B., Giony M., Yamamoto Y., Gazelius B., Millhorn D.E., Hokfelt T., Ungerstedt U.: In vivo release of serotonin in cat dorsal vagal complex and cervical ventral horn by electrical stimulation of the medullary raphe nuclei. *Brain Res.*, 535:227-236, 1990.
11. Bruhn T.O., Engeland W.C., Anthony E.L.P., Gann D.S., Jackson I.M.D.: Corticotropin-releasing factor in the adrenal medulla. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 115-128, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
12. Buéno L., Gué M., Derio C.: CNS vasopressin mediates emotional stress and CRH-induced colonic motor alterations in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 262:G427-G431, 1992.
13. Buwalda B., De Boer S.F., Schmidt E.D., Felszeghy K., Nyakas C., Sgoifo A., Van Der Veegt B.J., Tilders F.J.H., Bohus B., Koolhaas J.M.: Long-lasting deficient dexamethasone suppression of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activation following peripheral CRF challenge in socially defeated rats. *J. Neuroendocrinology*, 11(7):513-520, 1999.
14. Casadevall M., Esteban E., Panes J., Salas A., Anderson D.C., Malagelada J.R., Pique J.Q.: Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of central corticotropin-

- releasing factor. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 276:G1016-G1026, 1999.
15. Chaouloff F.: Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res. Reviews*, 18:1-32, 1993.
  16. Collins S.M.: Stress and the gastrointestinal tract-IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280:G315-G318, 2001.
  17. Dallman M.F., Akana S.F., Jacobson I., Levin N., Cascio C.S., Shinsako J.: Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 402-414, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
  18. Dantzer R.: Stress and immunity: what have we learned from psychoneuroimmunology? *Acta Physiol. Scand.*, Vol. 161, (Suppl. 640):43-46, 1997.
  19. Daugé V., Léna I.: CCK in anxiety and cognitive process. *Neuroscience and Biobehav. Review*, Vol.22, 6:815-825, 1998.
  20. Day, J.C., Koehl M., Deroche V., Le Moal M., Maccari S.: Prenatal stress- and CRF – induced stimulation of hippocampal acetylcholine release in adult rats. *J. Neurosci.*, 18(5): 1886-1892, 1998.
  21. Day H.E.W., Akil H.: Evidence that cholecystokinin receptors are not involved in the hypothalamic-pituitary–adrenal response to intraperitoneal administration of interleukin-1 $\beta$ . *J. Neuroendocrinology*, 11(7):561-568, 1999.
  22. De Kloet E.R., Ratka A., Reul J.M.H.M., Sutanto W., Eekelen V.: Corticosteroid receptor types in brain: regulation and putative function. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 351-361, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
  23. Dunn A.J.: Interactions between the nervous system and the immune system: implications for psychopharmacology. Ed: Bloom F.E., Kupfer D.J., *Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress*, s. 719-731, Raven Press, New York, 1995.
  24. Ek M., Kurosawa M., Lundeberg T., Ericson A.: Activation of vagal afferents after intravenous injection of IL-1 $\beta$ : role of endogenous prostaglandins. *J. Neurosci.*, 18(22): 9471-9479, 1998.
  25. Eliakim R., Karmeli F., Razin E., Rachmilewitz D.: Role of platelet activating factor in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 95:1167-1172, 1988.
  26. Enck P., Holtmann G.: Stress and gastrointestinal motility in animals: a review of the literature. *J. Gastrointest. Mot.*, 1:83-90, 1992.
  27. Feldman S., Weidenfeld J.: Involvement of amygdalar alpha adrenoreceptors in HPA responses. *Neuroreport.*, 7: 3055-3057, 1996.
  28. Ferris C.F.: Adolescent stress and neural plasticity in hamsters: a vasopressin-serotonin model of inappropriate aggressive behaviour. *Experimental Physiol.*, 85S: 85-90, 2000.
  29. Fink H., Rex A., Voits M.: Major biological actions of CCK – a critical evaluation of research findings. *Exp. Brain Res.*, 123:77-83, 1998.
  30. Frankland P.W., Josselyn S.A., Bradwejn J., Vaccarino F.J., Yeomans J.S.: Activation of amygdala CCK<sub>B</sub> receptors potentiates the acoustic startle response in the rat. *J. Neurosci.*, 17(5): 1838-1847, 1997.
  31. Ganigella T.S.: Serotonin in the intestinal tract: A synopsis. Ed: Gaginella T.S., Galligon J.J., *Serotonin and Gastrointestinal Function*. s.1-9, CRC Press Inc., Florida, 1995.

32. Green P.G., Janig W., Levine J.D.: Negative feedback neuroendocrine control of inflammatory response in rat is dependent on the sympathetic postganglionic neuron. *J. Neurosci.*, 17(8):3234-3238, 1997.
33. Grisham M.B., Granger D.N.: Neutrophil-mediated mucosal injury: role of reactive oxygen metabolites. *Dig. Dis. Sci.*, 33:6-15, 1988.
34. Gué M., Junien L., Buéno, L.: Conditioned emotional response in rats enhances colonic motility through the central release of corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology*, 100:964-970, 1991.
35. Gué M., Lacheze D.R., Junien J.L., Buéno L.: Central CCK-8s receptors trigger the sigma ligand- and 5-HT<sub>1A</sub> agonists-induced acceleration of post-prandial colonic transit in rats. *Neurogastroenterol. Mot.*, 6:29-35, 1994.
36. Gué M., Tekamp A., Tabis N., Junien J.L., Buéno L.: Cholecystokinin blockade of emotional stress- and CRF-induced colonic motor alterations in rats: role of the amygdala. *Brain Res.*, 658:232-238, 1994.
37. Gué, M., Bonbonne C., Fioramonti J., More J., Del Rio-Lacléze C., Comera C., Buéno L.: Stress-induced enhancement of colitis in rats: CRF and arginine vasopressin are not involved. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 272:G84-G91, 1997.
38. Hansen, M.K., Taishi P., Chen Z., Krueger J.M.: Vagotomy blocks the induction of IL-1 $\beta$  mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1 $\beta$ . *J. Neurosci.*, 18(6): 2247-2253, 1998.
39. Hassig A., Wen-Xi L., Stampfli K.: Stress-induced suppression of the cellular immune reactions. A contribution on the neuroendocrine control of the immune system. *Medical Hypothesis*, 46:551-555, 1996.
40. Henry J.P.: Psychological and physiological responses to stress: The right hemisphere and HPA axis, an inquiry into problems of human bonding. *Acta Physiol. Scand.*, Vol 161, (Suppl. 640):10-25, 1997.
41. Hensing M.J.C., Coenen G.J., Vaiman M., Renard C.: Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 41:97-113, 1995.
42. Higley J.D., Suomi S.J., Linnoila M.: A longitudinal assessment of CSF monoamine metabolites and plasma cortisol concentration in young rhesus monkeys. *Biol. Psychiatry*, 32:127-145, 1992.
43. Irwin M.: Stress-induced immune suppression: role of brain corticotropin-releasing hormone and autonomic nervous system mechanisms. *Advances in Neuroimmunology*, 4:29-47, 1994.
44. Ishizuka K., Sugimura K., Homma T., Matsuzawa J., Mochizuki T., Kobayashi M., Suzuki K., Otsuka K., Tashiro K., Yamaguchi O., Asakura H.: Influence of interleukin-10 on the interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1 $\beta$  ratio in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Digestion*, 63(1):22-27, 2001.
45. Itoi K., Helmreich D.L., Lopez-Figueroa M.O., Watson S.J.: Differential regulation of CRH and vasopressin gene transcription in the hypothalamus by norepinephrine. *J. Neurosci.*, 19(13): 5464-5472, 1999.
46. Jessop J.J., West G.L., Sobotka T.J.: Immunomodulatory effects of footshock in the rat. *J. Neuroimmunol.*, 25(2-3):241-9, 1989.
47. Kalin N.H., Takahashi L.K., Chen F-L.: Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. *Brain Res.*, 656:182-186, 1994.
48. Koolhaas J.M., De Boer S.F., De Ruiter A.J.H., Meerlo P., Sgoifo A.: Social stress in rats and mice. *Acta Physiol. Scand.*, Vol.161, (Suppl. 640): 69-72, 1997.
49. Korte S.M., Bouws G.A., Bohus B.: Adrenal hormones in rats before and after stress-



- experience: effects of ipsapirone. *Physiol. Behav.*, 51(6):1129-1133, 1992.
50. Levine S., Strebel R., Wenk E., Harman P.: Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by stress. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109:294-298, 1962.
  51. Ligumsky, M., Karmeli F., Sharon P., Zor U., Cohen F., Rachmilewitz D.: Enhanced thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin production by cultured rectal mucosa in ulcerative colitis and its inhibition by steroids and sulfasalazine. *Gastroenterology*, 81:444-449, 1981.
  52. Linthorst, A.S.C., Flachskamm C., Hopkins S.J., Hoadley M.E., Labeur M.S., Holsboer F., Reul J.M.H.M.: Long-term intracerebroventricular infusion of CRH alters neuroendocrine, neurochemical, autonomic, behavioral and cytokine response to a systemic inflammatory challenge. *J. Neurosci.*, 17(11): 4485-4460, 1997.
  53. Liposits Z.: Ultrastructural immunocytochemistry of the hypothalamic corticotropin releasing hormone synthesizing system: anatomical basis of neuronal and humoral regulatory mechanisms. *Progr. Histochem. Cytochem.*, 21:1-96, 1990.
  54. Lue S.J.C., Singh V.K.: Modulation of natural killer cell-mediated lysis by corticotropin-releasing hormone. *J. Neuroimmunol.*, 33:253-260, 1991.
  55. Lue S.J.C., Singh V.K.: Stimulation of interleukin-6 production by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol.*, 143:220-227, 1992.
  56. Mayer E.A., Naliboff B.D., Chang L., Countinho S. V.: Stress and the gastrointestinal tract-V. Stress and irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280:G519-G524, 2001.
  57. McCafferty D-M., Wallace J.L., Sharkey K.A.: Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 35: G272-G280, 1997.
  58. McCafferty D-M., Shito E., Muscara M., Wallace J.L., Sharkey K.A., Kubes P.: Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279:G90-G99, 2000.
  59. McCall R.D., Haskill S., Zimmermann E.M., Lund P.K., Thompson R.C., Sartor R.B.: Tissue interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist expression in enterocolitis in resistant and susceptible rats. *Gastroenterology*, 106:960-972, 1994.
  60. McCarty R., Kirby R.F., Garn P.G.: Strain differences in sympathetic-adrenal medullary responsiveness and behavior. *Behav. Neural. Biol.*, 40(1):98-113, 1984.
  61. McEwen B., Chao H., Spencer R., Brinton R., Macisaac L., Harrelson A.: Corticosteroid receptors in brain: relationship of receptors to effects in stress and aging. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 394-401, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
  62. Meddings J.B., Swain M.G.: Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology*, 119:1019-1028, 2000.
  63. Melia K.R., Ryabinin A.E., Schroeder R., Bloom F.E., Wilson M.C.: Induction and habituation of early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J. Neurosci.*, 14(10):5929-5938, 1994.
  64. Million M., Taché Y., Anton P.: Susceptibility of Lewis and Fischer rats to stress-induced worsening of TNB-colitis: protective role of brain CRF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 39:G1027-G1037, 1999.
  65. Miyata K., Ito H., Fukudo S.: Involvement of the 5-HT<sub>3</sub> receptor in CRH-induced defecation in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 274:G827-G831, 1998.
  66. Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R., Wallace J. L.: Hapten-induced model of chronic inflammation in the rat colon. *Gastroenterology*,

- 96:795-803, 1989.
67. Morris G.P., Beck P.L., Wallace J.L., Herridge M.S., Fallone C.A.: Animal models and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Ed: Szabo S., Taché Y., Neuroendocrinology of Gastrointestinal Ulceration. s.73-91, Plenum Press, New York, 1995.
  68. Neilly P.J.D., Gardiner K.R., Kirk S.J., Jennings G., Anderson N.H., Alia M., Rowlands B.J.: Endotoxaemia and cytokine production in experimental colitis. *Br. J. Surgery*, 82:1479-1482, 1990.
  69. Neilly P.J.D., Kirk S.J., Gardiner K.R., Anderson N.H., Rowlands B.J.: Manipulation of the L-arginine-nitric oxide pathway in experimental colitis. *Br. J. Surgery*, 82:1188-1191, 1995.
  70. Nussler A.K., Billiar T.R.: Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukocyte Biol.*, 54:171-178, 1993.
  71. Ottaway C.A.: Role of the neuroendocrine system in cytokine pathway in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharma. Ther.*, (Suppl. 2):10-15, 1996.
  72. Palkovits M.: Anatomy of neural pathways affecting CRH secretion. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 139-148, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
  73. Pavcovich L.A., Valentino R.J.: Regulation of a putative neurotransmitter effect of CRF: effects of adrenalectomy. *J. Neurosci.*, 17(1): 401-408, 1997.
  74. Paxinos G., Watson C.: *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic, 1996.
  75. Plotsky P.M.: Regulation of hypophysiotropic factors mediating ACTH secretion. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 205-217, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
  76. Porth C.M.: *Pathophysiology: Concepts of Altered Health States*. 5. Edition, s.730-732, Lippincott-Revan Publisher, New York, 1998.
  77. Riverst S., Rivier C.: Stress and IL-1 $\beta$  induced activation of c-fos, NGFI-B and CRF gene expression in the hypothalamic PVN: Comparison between Sprague-Dawley, Fisher-344 and Lewis rats. *J. Neuroendocrinology*, 6:101-117, 1994.
  78. Riverst S., Laflamme N., Nappi R.E.: Immune challenges and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus. *J. Neurosci.*, 15(4): 2680,2695, 1995.
  79. Roozendaal B., Koolhaas J.M., Bohus B.: Attenuated cardiovascular, neuroendocrine, and behavioral responses after a single footshock in central amygdaloid lesioned male rats. *Physiol. Behav.*, 50:771-775, 1991.
  80. Roozendaal B., Koolhaas J.M., Bohus B.: Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. *Physiol. Behav.*, 50:777-781, 1991.
  81. Roozendaal B., Koolhaas J.M., Bohus B. The role of the central amygdala in stress and adaptation. *Acta Physiol. Scand.*, Vol 161, (Suppl. 640):51-54, 1997.
  82. Santos J., Saunders P.R., Hanssen N.P., Yang P.C., Yates D., Groot J.A., Perdue M.H.: Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 277:G391-G399, 1999.
  83. Santos J., Benjamin M., Yang P.C., Prior T., Perdue M.H.: Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 278:G847-G854, 2000.
  84. Sartor R.B.: Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel diseases provided by new rodent models of spontaneous colitis. *Inflam. Bowel Dis.*, 1:64-75, 1995.
  85. Sartor R.B., Rath H.C., Litchman S.N., Van T.E.: Animal models of intestinal and

- joint inflammation. *Bail. Clin. Rheumatol.*, 10:55-76, 1996.
86. Saunders P.R., Kosecka U., McKay D.M., Perdue M.H.: Acute stress stimulates ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 267:G794-G799, 1994.
  87. Schouten W.G.P., Wiegant V.M.: Individual responses to acute and chronic stress in pigs. *Acta Physiol. Scand.*, Vol.161, (Suppl. 640): 88-91, 1997.
  88. Shapiro D., Jamner L.D., Spence S.: Cerebral laterality, repressive coping, autonomic arousal and human bonding. *Acta Physiol. Scand.*, Vol 161, (Suppl. 640):60-64, 1997.
  89. Sharon P., Stenson W.F.: Enhanced synthesis of leukotriene B<sub>4</sub> by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 86:453-460, 1984.
  90. Shibasaki T., Yamauchi N., Hotta M., Masuda A., Oono H., Wakabayashi I., Ling N., Mura H.: Brain corticotropin-releasing factors acts as inhibitor of stress-induced gastric erosion in rats. *Life Sci.*, 47:925-932, 1990.
  91. Singh V.K.: Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression. *J. Neuroimmunol.*, 23:257-262, 1989.
  92. Singh V.K., Leu S.J.C.: Enhancing effect of corticotropin-releasing neurohormone on the production of the interleukin-1 and interleukin-2. *Neuroscience*, 120:151-154, 1990.
  93. Söderholm J.D., Perdue M.H.: Stress and the gastrointestinal tract-II. Stress and intestinal barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280:G7-G13, 2001.
  94. Stein M.R., Schiavi R.C., Camerino M.: Influence of brain and behavior on the immune system. *Sc. Wash. DC*, 191: 435-440, 1976.
  95. Stein T.A., Keegan L., Auguste L.J., Bailey B., Wise L.: Stress induced experimental colitis. *Mediators Inflammation*, 2:253-256, 1993.
  96. Stephanou A., Jessop D.S., Knight R.A., Lightman S.L.: Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav. Immun.*, 4:67-73, 1990.
  97. Swanson L.W., Sawchenko P.E., Lind R.W., Rho J.H.: The CRH motoneuron: differential peptide regulation in neurons with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 12-23, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
  98. Swanson L.W., Simmons D.M.: Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the PVN: a hybridization histochemical study in rat. *J. Comp. Neurol.*, 285: 413-435, 1989.
  99. Thompson R.C., Seasholtz A.F., Douglass J.O., Herbert E.: The rat corticotropin-releasing hormone gene. Ed: Ganong W.F., Dallman M.F., Roberts J.L., *The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis Revisited*. s. 1-11, The New York Academy of Sciences, New York, 1987
  100. Turnbull A.V., Rivier C.L.: Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. Ed: Boron W.F., *Physiological Reviews*, USA, 79(1):1-79, 1999.
  101. Van Dijken H.H., De Goeij D.C.E., Sutanto W., Mos J., De Kloet E.R., Tilders F.J.H.: Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis adult male rats. *Neuroendocrinology*, 58:57-64, 1993.
  102. Vergnolle N., Comera C., More J., Alvinerie M., Bueno L.: Expression and secretion of lipocortin-1 in gut inflammation are not regulated by pituitary-adrenal axis. *Am. J. Physiol. Reg. Inter. Comp. Physiol.*, 280:R623-R629, 1997.

103. Walker D.L., Davis M.: Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J. Neurosci.*, 17(23): 9375-9383, 1997.
104. Wallace J.L., Braquet P., Ibbotson G.C.: Assessment of the role of platelet activating factor in an animal model of inflammatory bowel disease. *J. Lipid Med.*, 1:13-23, 1989.
105. Wang L., Cardin S., Martinez V., Tache Y.: Intracerebroventricular CRF inhibits cold restraint-induced c-fos expression in the dorsal motor nucleus of the vagus and gastric erosions in rats. *Brain Res.*, 736:44-53, 1996.
106. Westen D.: *Psychology Mind, Brain and Culture: Emotion, Stress and Coping*. Second Edition, John Wiley & Sons Inc., New York, 1999.
107. Wittling W.: The right hemisphere and the human stress response. *Acta Physiol. Scand.*, Vol. 161, (Suppl. 640):55-59, 1997.
108. Zipser R.D., Nast C.C., Lee M., Kao H.W., Duke R.: In vivo production of leukotriene B<sub>4</sub> and leukotriene C<sub>4</sub> in rabbits colitis. *Gastroenterology*, 95:11-17, 1988.



## 11. ÖZGEÇMİŞ

Bulgurlu M. Libade C. Teknik S. Tel: 0.216.4430256  
Çamdibi S. B. Blok D. 11 Üsküdar E-Mail: subilge@turk.net

# Mehmet Ali Gülpınar

**Doğum yeri/tarihi** Oğuzeli/Gaziantep, 12.01.1970

**Eğitim ve Deneyim** 1998– Marmara Üniv. Fizyoloji ABD İstanbul  
**Araştırma görevlisi, Tıpta uzmanlık öğrencisi**  
Stresin gastrointestinal fonksiyonlar ve patolojiler üzerine etkileri konusunda yapılan araştırmalar  
M.Ü. Diş Hekimliği ve Atatürk Eğitim (Biyoloji) Fakülteleri ile Sağlık Meslek Yüksek Okulunda fizyoloji derslerinde görevlendirme.  
M. Ü. Tıp Fakültesi fizyoloji pratik derslerinde görevlendirme.

1996–1998 Alman Hastanesi Kalp-Damar Cerrahisi İstanbul  
**Servis Doktorluğu**  
Cerrahi sonrasında hastaların takip ve tedavisi

1988–1996 Marmara Üniv. Tıp Fakültesi İstanbul  
–1988 Oğuzeli Lisesi G.Antep

**İlgi Alanları** Nörofizyoloji ve nöropsikoloji

**Yayınlar** Gülpınar M.A., Yeğen B.Ç: Kolon motilitesinin nörohümorale kontrolü. Güncel Gastroenteroloji, 3/4:445-452, 1999.

Gülpınar M.A., Bozkurt A., Coşkun T., Ulusoy N.B., Yeğen B.Ç: Glucagon-like peptide (GLP-1) is involved in the central modulation of fecal output in rats. Am. J. Physiol., 278:G924-G929, 2000.

**Bildiriler** **Ulusal Bildiriler:**

- Oktar B.K., Gülpınar M.A., Alican İ., Yeğen B.Ç: Sıçan ileit modelinde safra tuzlarının ince barsak motilitesi ve hasar parametreleri üzerine etkisi. 25. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Elazığ, 6-10 Eylül 1999.
- Gülpınar M.A., Yeğen B.Ç: Stresle indüklenen deneysel kolit patogeneğinde kortikotropin serbestleştirici faktör, serotonin ve kolesistokininin nöropeptidlerinin rolü. 26. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Eskişehir, 4-8 Eylül 2000.
- İşman Ç.A., Gülpınar M.A., Kurtel H., Alican İ., Yeğen B.Ç: Fizyolojide interaktif çalışma modülü (İÇM) uygulaması. II. Ulusal Tıp Eğitimi Kongresi, İzmir, 24-28 Nisan 2001.



#### Uluslararası Bildiriler:

- Oktar B.K., Gülpınar M.A., Bozkurt A., Yeğen B.Ç., Moini H., Bilsel S., Kurtel H: Role of endothelin-1 in ischemia-reperfusion-induced mucosal dysfunction in rat small intestine. Digestive Disease Week, Orlando, FL, 16-19 Mayıs 1999 (Gastroenterology, 116(4):A947, 1999).
- Bozkurt A., Gülpınar M.A., Deniz M., Coşkun T., İmeryüz N., Ulusoy N.B., Yeğen B.Ç: Glucose-induced 'ileal brake' on gastric emptying: role of capsaicin-sensitive vagal fibers, and adrenergic and glucagon like peptide-1 receptors The Physiological Society, Budapeşte, 2000.
- Topçu T. Gülpınar M.A., Ayhan C., Yeğen B.Ç., Yeğen C: Remodulation of enterogastric brake following segmental bowel resection: role of capsaicin-sensitive extrinsic nerves. EuroSurgery 2000 (Ulusal Cerrahi Kongresi 2000), İstanbul, 22-24 Haziran 2000.
- Gülpınar M.A., Yeğen B.Ç: The anti-inflammatory effect of central CCK-8s administration on colitis in rats: role of central corticotropin-releasing factor, serotonin and cholecystokinin-B receptors. The Physiological Society Meeting, Oxford, 19-21 Mart 2001.
- Gülpınar M.A., Özbeyli D., Arbak S., Yeğen B.Ç: The role of CRF, 5-HT and CCK in the pathogenesis of stress-induced experimental colitis. Digestive Disease Week, Atlanta, Georgia, ABD, 20-23 Mayıs 2001 (Gastroenterology 2001, 120 (5): A-525).
- Oktar B.K., Gülpınar M.A., Ercan F., Cingi A., Alican İ., Yeğen B.Ç: Beneficial effects of glycocholic acid on gut mucosal damage in bile duct ligated rats. Digestive Disease Week, Atlanta, Georgia, ABD, 20-23 Mayıs 2001 (Gastroenterology 2001, 120 (5): A-525).