

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

Uyku yoksunluğuna bağlı uzamsal öğrenme performansının zayıflamasında

Galectin-1'in rolü: Hücresel ve Moleküler mekanizmalar

Proje No:

TSA-2013-4003

Proje Türü

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Cem SÜER

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Fizyoloji AD

Prof. Dr. Nazan Dolu

Prof. Dr. Meral Aşçıoğlu

Prof. Dr. Narin Liman

TEŞEKKÜR

Bu proje ERÜ BAP birimi tarafından desteklenmiştir.

Bu proje için sağlanan maddi destek 39.989,60 TL'dir. Bu desteğin 11.885,22 TL'si yaptırılması planlanan uyku yoksunluk tankının ihaleyi kazanan firma tarafından teslim edilmemesi üzerine harcanmamıştır. Bu tank, üniversitemiz imkanları ile tedarik edilmiş ve deneylerin yapılması sağlanmıştır. Geri kalan 27.284,60 TL ile ise projede kullanılan sarf malzemenin ve canlı hayvanların alımı gerçekleştirilmiştir.

İçindekiler

ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GEREÇ ve YÖNTEM	11
Grupların oluşturulması:	11
Uyku yoksunluğu oluşturulması:	12
Hipokampal Nöroenezisin belirlenmesi:	12
Hipokampal uzamsal öğrenme performansının saptanması:.....	13
Hipokampal sinaptik plastisitenin ölçülmesi:	13
İmmunhistokimyasal analiz:	14
Veri analizi:	14
3. BULGULAR	15
Elektrofizyoloji bulguları	16
Uzun dönemli güçlenme	17
Morris Su Tankı test sonuçları	18
İmmunohistokimyasal çalışmalar	22
Hipokampal Nöroenezisin belirlenmesi:	24
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	25
KAYNAKLAR	28

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; REM uyku yoksunluğuna bağlı olarak uzamsal öğrenmede oluşan bozulmanın hücresel ve moleküler mekanizmaları, NMDA reseptörleri ve nörogenez kapsamında araştırılmıştır.

Yöntem ve Gereçler: Çalışma 2–3 aylık erkek Wistar cinsi sıçanlar ile yapıldı. Sıçanlar rastgele olarak 10’arlı gruplara (kronik REM uyku yoksunluğu grubu, kafes kontrol grubu, ortam kontrol gruplarına ayrıldı. Uyku yoksunluğu oluşturmak için bu amaçla yapılmış su tankı kullanıldı. Kronik REM uyku yoksunluğu, sıçanların tankta 21 gün süreyle her gün saat 16.00 ile ertesi gün 10.00 arasında barındırılması ile oluşturuldu. Ortam kontrol grubunda sıçanlar daha büyük platforma sahip su tankında, kafes kontrol grubunu oluşturan sıçanlar standart kafeslerinde tutuldu. Sıçanların uzamsal öğrenme performansları Morris Su tankı ile sinaptik plastisitesi uzun dönemli güçlenme (UDG) kayıtları ile ölçüldü. İmmunhistokimyasal yöntemler ile hipokampal kesitlerdeki NR1, NR2a, NR2b reseptör ifadenmesi, galectin–1 ifadenmesi ve nörogenezisi belirlemek için 5-Bromodeoksiüridine (BrdU) antikor boyanma düzeyine bakıldı. Ayrıca hayvanların deney süresince günlük ağırlık değişimleri ve uyku yoksunluğu sonundaki plazma epinefrin ve kortikosteron düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü.

Bulgular: Uyku yoksunluğu grubunda, hipokampal öğrenme bozukluğunun UDG’de azalma, GluN1 ve GluN2A alt birim anlatımındaki azalma ve BrdU ile boyanan hücre sayısında azalma ile birlikte görüldüğü bulundu.

Sonuç: Kronik uygulanan uyku yoksunluğunda, adult nörogenez ve NMDA reseptör alt birimlerinin anlatımındaki azalmayı önleyici yaklaşımların, öğrenme ve bellek bozulmalarında yararlı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Hipokampus; Öğrenme ve bellek; Uyku yoksunluğu; Nörogenez.

ABSTRACT

Purpose: We investigated the cellular and molecular mechanisms of learning and memory impairment in sleep deprivation focused on NMDA receptors and neurogenesis.

Materials and Methods: Two or three-month-old male Wistar rats enrolled in this study. They randomly divided in one of the three groups (cage-control, pedestal-control and sleep deprivation groups). Sleep deprivation was induced by putting the animals into a special water pool having small pedestals during 18 hours. Pedestal control group was put into the same pool, its pedestals were much larger, preventing the animals fall into the water. Cage control group was in standard cages. Spatial performance was measured in the Morris water maze. Long term potentiation (LTP) was used to determine rats' plasticity strength. The expression of NMDA receptors sub units (GluN1, GluN2A and GluN2B) and Galectin-1 were measured by immunohistochemical staining. Neurogenetic capacity was determined in rats treated with 5-Bromodeoxyuridine (BrdU). In addition, a plasma corticosterone level was determined as an indicator of stress.

Results: We found that sleep deprivation impaired spatial learning and memory, and that this impairment was concurrent with a decreased neurogenesis and decreased optical density of GluN1 and GluN2A subunit staining.

Conclusion: Treatments preventing decreased adult neurogenesis and decreased expression levels of NMDA receptor subunits could be useful in learning and memory failure observed in chronic sleep deprivation.

Key words: Hippocampus; Learning and memory; Sleep deprivation; Neurogenesis.

1. GİRİŞ

Sinaptik plastisite, nöronlar arasındaki sinaptik bağlantının güçlenmesi veya zayıflamasını sağlayan sürecin tümüne verilen isimdir. Deneysel preparatlarda sinaptik yanıtlar, uyarılan nöronal aktivitenin kalıbına bağımlı olarak güçlendirilebilir ve zayıflatılabilir. Bu güçlenme saatler hatta günler sürebildiğinden uzun dönemli güçlenme (UDG) olarak tanımlanır. Sinaptik plastisitenin, öğrenme ve belleğin altında yatan temel hücresel mekanizma olduğu kabul edilir. Hipokampus ve dentat girus uzamsal öğrenmenin en önemli yapılarından biridir (1). Bu bölgelerde belleğin sinaptik plastisite ile pekiştirildiği ve depolandığı ileri sürülmektedir (2). UDG oluşumunun temelinde yatan anahtar moleküler mekanizma NMDA tipi glutamat reseptörlerinin aktivasyonudur (3). Bu reseptörler glutamat ile aktive olan ve ancak postsinaptik hücre membranı depolarize olduğu zaman açılan Na/Ca kanallarıdır; bu kanallara sadece glutamatın bağlanması iyon akışına neden olmaz. Bu kanalın açılması ile hücre içi Ca düzeyi yükselince CaMKII otofosforillenerek diğer protein kinazları fosforiller (4). Sitoplazmik tepkime zinciri, aktive olan bazı protein kinazların diğer ekstrasellüler sinyal ilişkili kinazları (ERK) aktive etmesi ile devam eder ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunun neden olduğu gen transkripsiyonu ve protein sentezi ile sonuçlanır (5). Bu protein kinazlar arasında UDG oluşumu ile ilgili olanları MAP kinaz, PI3 kinaz, tirozin kinaz, PKC ve CAMKIV olarak sayılabilir (6). Sayılan bu proteinler ise kısa ve uzun süreli mekanizmaları oluşturacak olan karmaşık bir moleküler yanıtı tetikler. CREB gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu belirli genlerin nükleer transkripsiyonuna ve yeni protein sentezine neden olur (7). Bu yeni sentezlenen proteinler, sinaptik etkinliğin güçlenmesine neden olacak şekilde, taşınırlar (8) ve sinapsın şekli değişir, sayısı ve büyüklüğü artar (9).

Uyku fiziksel ve mental sağlık için temel fizyolojik işlevdir. Memelilerde uyku birbirini nispeten düzenli aralarla takip eden non REM ve REM dönemlerinden oluşur. Uyku dönemlerinde gerçekleşen nöral süreçlerin, belleēin hücresel mekanizması olan sinaptik plastisitenin altında yatan hücresel ve moleküler olayları kolaylařtırabileceēi hipotezi uzun süredir aktif bir araştırma konusu olmuştur. Literatürdeki konuyla ilgili çalışmalar gözden geirildiēinde; sinaptik plastisiteyi geliştiren ērenme süreçlerinin sonrasındaki uykuyu etkilediēi; fazla uyuma veya uyku yoksunluklarının sinaptik plastisiteyi gerektiren ērenme ve bellek gibi süreçleri etkilediēi, uyku ve uyku azlıklarının sinaptik baēlantı kalıbını ve sinaptik gücü deēiřtirdiēi ve sinaptik plastisite için gerekli genlerin ve protein sentezinin uyku sırasında da oluřtuēu görülebilir. Bir için ērenilmesinden önce gerçekleşen uyku yoksunluēu, o iş ile ilgili davranışsal performansı bozar; önceki ērenme deneyimi sırasında aktif olan devreler uyku sırasında yeniden aktive olurlar. Bu bulgular açıkça belleēin pekiştirilmesinin uyku sırasında olduēunu gösterir (10).

Sinaptik plastisitede rolü bilinen bazı genler, uykusuzluk ile up-regüle edilirken uyku ile down-regüle edilir (11). Bu genler, AMPA ve NMDA reseptörlerinin alt birimlerinin, iki önemli protein kinazın, kalmodulinin ve BDNF'nin sentezini saēlayan genlerdir (12). rneēin sıcak evre koşullarında uykunun plastisite ilişkili MMP-9 geninin ekspresyonunu up-regüle ettiēi gösterilmiştir (13). zif-268'in REM baēımlı aktivasyonu zenginleştirilmiş çevreye maruziyetin ardından gösterilmiş ve hipokampal UDG kayıtları ile ilişkilendirilmiştir (14). Bu çalışmalarla birlikte, plastisite ile ilişkili genlerin bazal ekspresyonunun uyanıklık sırasında olduēu; uyku sırasında sinaptik yeniden modellenmeye uērayan nöral devrelerde sınırlı bir up-regülasyona uēradıkları bildirilmektedir. Uyku sırasında sentezlendiēi gösterilen ve Ca ile kalmodulin etkileşmesini saēlayan nrogranin (15) ve dentritik spinlerin oluşmasını saēlayan dentrin adlı proteinlerin sinaptik plastisite ile ilişkili oldukları iddia edilmiştir (16). Üstelik 24 saatlik

uykusuzluk serebral kortekste bu proteinlerin azalmasına neden olmuştur (17). Pek çok çalışmada REM uyku yoksunluğunun öğrenme ve belleği bozduğu davranış çalışmaları (18, 19) ve hipokampal UDG çalışmaları ile gösterilmiştir (20, 21). Çalışma grubumuz, ratlarda 21 günlük uyku yoksunluğunun dentat girus UDG yanıtlarını baskıladığını ve bu baskılamanın hipokampustaki oksidan/antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması ile birlikte olduğunu göstermiştir (22). Hipokampusta uyku yoksunluğu ile tetiklenen oksidan stres ile UDG ve öğrenme bozukluğu arasındaki ilişkiyi açıklayabilecek bir molekülün varlığı ise bilinmemektedir. Ancak uyku yoksunluğu ile hipokampal öğrenme bozukluğu arasındaki bağlantıyı açıklayabilecek bir molekül, galektin olabilir. Çünkü bazı araştırma bulguları Galectin-1'in redükte formunun subventriküler zonda sinirsel kök hücrelerde proliferasyonu ile ilgili yönünde iken diğer bazı bulgular okside formunun dentat girus subgranüler zon hücrelerinde proliferasyonu baskıladığını göstermektedir (28). Bu nedenle uyku yoksunluğunda artan hipokampal oksidan stresin Galectin-1'in okside formunu artırması ve bu yolla nörojeneze etki etmesi beklenebilir.

Galectinler, laminin, integrinler, osteopontin ve fibrinonektin gibi glikoproteinlerin yüzeylerinde bulunan beta betagalaktozidleri bağlayan ve bu yolla hücre ve ekstrasellüler matriks (ECM) arasındaki etkileşimlere aracılık eden bir lektin protein ailesidir (23, 24). Yapılan çalışmalar Galectin-1'in başlıca sinir sisteminde motor nöronların aksonal rejenerasyonuna, Wallerian aksonal dejenerasyona, nöral kök hücrelerin proliferasyonuna ve inmeden sonraki nörojeneze aracılık eden bir ekstrasellüler sinyallemeye proteini olduğuna işaret etmektedir (25). Galectin-1 kemirgenlerin beyin gelişimleri sırasında yaygın olarak sentezlenir ve özellikle olfaktor bulbus nöral ağının oluşmasında önemli bir rol oynar (26). Hipokampal formasyonun dentat girus (DG) bölgesi adult dönemde de nörojenizin devam ettiği iki beyin bölgesinden biridir (27). Dentat girusun subgranüler zonunda doğan hücreler, granül hücre

tabakasına göç ederek granül hücresi haline gelirler (28). Galectin-1'in hipokampusun DG bölgesinde nöral progenitör hücrelerde eksprese edilip bu hücrelerin proliferasyonunu module ettiği gözlenmiştir (29). Galectin 1 knock-out farede subgranüler zondaki Tip-1 hücre proliferasyonunda gözlenen artış, Galectin-1'in nörojenezi baskılayıcı etkisini desteklemektedir (30). Bu modülasyonun Galactin-1'in okside ve redükte formları arasındaki dengeye bağlı olması da olasıdır. Galectin-1'in okside formları adult nörojenezi inhibe etmektedir. Öte yandan adult nörojenizin öğrenme ve bellek ile yakından ilişkili olduğuna dair deliller de giderek güçlenmektedir (20).

Glutamat reseptörleri özellikle nöron membranlarında bulunurlar ve postsinaptik iyon akımına neden olan mekanizma dikkate alındığında ikiye ayrılırlar. 1- İyonotropik glutamat reseptörleri, glutamat bağlandığı zaman açılan iyon kanal proteinidirler. 2-Metabotropik reseptörler ise G proteinini içeren bir sinyal yolağını aktive etmek suretiyle iyon kanallarını aktive ederler. İyonotropik reseptörler AMPA (α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate), NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) ve Kainat reseptörleridir. Bu reseptörlerin her birinin de farklı alt tipleri belirlenmiştir. NR1, NR2a-2d ve NR3a-3b reseptörleri NMDA; GluR1-4 reseptörleri AMPA ve GluR5-7, KA1 ve KA2 ise Kainat reseptörleridir. Glutamat reseptörlerinin en önemli işlevlerinden biri sinaptik plastisiteyi modüle etmeleridir. Hem metabotropik hem de iyonotropik reseptörler sinaptik plastisiteyi etkilerler.

Dentat girusta nöroenezisi belirlemek için kullanılabilecek bir madde timidin analogu olan 5-bromodeoksiüridindir (BrdU). BrdU vücuda ip yoldan verildikten sonra mitoz gösteren hücreler tarafından mitozun S fazında tutularak DNA'sı içine korpore olur. Sunulan çalışmada BrdU uygulaması uyku yoksunluğu yapılan sıçanlarda nöroenezin değişimini incelemek için kullanılacaktır (29).

Yukarıda verilen literatür bilgisi ışığında uyku yoksunluğu durumunda, sinaptik plastisitenin değişmesi ve bunun sonucunda öğrenme ve bellek işlevlerinin bozulması beklenebilir. Bunun altında yatan mekanizmalar ise tam olarak açıklanamamıştır. Biz daha önceki çalışmamızda, uyku yoksunluğuna maruz bıraktığımız sıçanlarda, hipokampus antioksidan savunmanın bozulduğunu ve bunun elektrofizyolojik bozuklukla birlikte olduğunu göstermiştik (22). Galectin-1 proteinin okside olması durumunda adult nörogenziste inhibisyon olduğu da başka yazarlar tarafından bildirilmiştir. Bu nedenle, uyku yoksunluğunda oluşan hipokampal oksidan stresin galectin-1'in oksitlenmesine ve bunun da nörogenezisi bozmasına neden olacağı düşünülmüştür.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma laboratuvarında (ErU-DEKAM)'dan temin edilen 2-3 aylık erkek Wistar cinsi sıçanlar üzerinde yapıldı. Sıçanlar rastgele olarak 20'şerli gruplara (kronik REM uyku yoksunluğu grubu, kafes kontrol grubu, ortam kontrol gruplarına ayrıldı.

Grupların oluşturulması:

REM uyku yoksunluğunun etkilerini karşılaştırmak ve uyku yoksunluğuna maruziyet ve öğrenme/bellek işlevinin zamanlaması ile olan ilişkinin belirlenmesi için gruplar aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Kronik REM uyku yoksunluğu (UY) grubu: Bu gruptaki sıçanlar DS60nci günden itibaren 21 gün süre ile her gün saat 16.00 ile ertesi gün 10.00 arasında uyku yoksunluğu tankında tutuldu, öğrenme deneylerine DS78nci gününde başlandı.

Kafes kontrol (KK) grubu: Öğrenme deneylerinin tüm sıçanlarda aynı doğum sonrası günde olabilmesi için, bu sıçanlarda öğrenme deneylerine doğum sonrası DS78. günde başlandı.

Ortam kontrol (OK): Bu gruptaki sıçanlar DS60nci günden itibaren 21 gün süre ile büyük platformlu tankta tutuldu, öğrenme deneylerine DS78nci gününde başlandı.

Uyku yoksunluğu oluşturulması:

Kronik REM uyku yoksunluğu bir su tankında oluşturuldu. Tank, çapı uyku yoksunluğu grubu için 6,5 cm ortam kontrol grubu için 10 cm olan 14 adet platform içermektedir. Gruptaki deney hayvanı sayısı ve tankta 14 platformun bulunması nedeni ile, sıçanların tankta serbestçe dolaşabilmesine imkan vermeye yönelik boş platform bırakmak amacı ile, bir gruba ait sıçanlar iki partide uyku yoksunluk tankına konuldu. Bu işlem sırasında deney hayvanlarının sosyal izolasyon stresine maruz kalmamalarına dikkat edildi. Tank, platform yüzeyinin 1cm altında kalacak şekilde su ile dolduruldu. Deney grubu sıçanlar, platform üzerinde iken REM uykusuna girdiklerinde kas tonusunun azalması nedeni ile platform üzerinde duramayıp suya düşerek uyandılar ama ortam kontrol grubu sıçanlar, REM sırasında geniş platformda bulundukları için uykularına devam ettiler.

Hipokampal Nörogenезisin belirlenmesi:

Bu amaç için BrdU (ip; 100 mg/kg) kullanıldı. Tüm sıçanlara bu uygulama DS78nci günde, öğrenme denemelerine başlamadan bir kez yapıldı ve enjeksiyondan dört gün sonra dentat girustaki yeni oluşan genç hücrelerin etiketlenmesi sağlandı. Hipokampal kesitlerde BrdU ile etiketlenen hücre sayısı, öğrenme denemeleri sırasında oluşan yeni hücrelerin sayısını yansıtır.

Bu hücreler mikroskop altında ErÜ Veteriner Fakültesi Histoloji Anabilim dalında bulunan sayma sistemi kullanılarak sayıldı.

Hipokampal uzamsal öğrenme performansının saptanması:

Bu amaçla ErU-DEKAM davranış fizyoloji laboratuvarında bulunan Morris Su tankı (130 cm çapında 45 cm yüksekliğinde) ve video-izleme ve kayıt sistemi kullanıldı. Su tankı alanının dört çeyreğinden birine sıçanların üzerinde durabilecekleri bir kaçma platformu (çapı:10 cm; yüksekliği 22 cm) yerleştirildi ve tank, bu platformun 1 cm üstünde olacak seviyeye kadar su ile dolduruldu. Su mavi toksik olmayan bir boya ile boyandı. Platformun yeri, tüm öğrenme denemeleri sırasında sabit tutuldu ve su sıcaklığının 20–22 oC arasında kalmasına dikkat edildi. Her öğrenme denemesi sırasında sıçan, platformun bulunduğu çeyrek alan dışında diğer bir çeyrek alandan etraftaki büyük ipuçlarını görecektir şekilde suya bırakıldı. Bu denemelerde öğrenilmesi istenen iş, 2 dakikalık yüzme süresi içinde sıçanın platformu bulması ve üzerine çıkarak sudan kurtulmasıdır. Bir dakikalık süre içerisinde platformu bulamayan sıçanlara el ile yardım edildi ve platformun yerini bulmaları sağlandı. Her sıçana 4 gün boyunca, her gün dört kez (yarım saat ara ile) olmak üzere öğrenme denemeleri yapıldı. Son öğrenme denemesinden (16ncı deneme) 24 saat sonra tanktaki platform yerinden alındı ve aynı test platformsuz halde iken yapıldı (probe denemesi). Her denemede sıçanların davranışı video-izleme ve analiz sistemi tarafından kayıt edildi, sıçanın platformu bulma süresi, yüzme mesafesi, platformlu alanda geçirdiği süre, yüzme hızı ve her bir çeyrek alanda bulunma süreleri ölçüldü.

Hipokampal sinaptik plastisitenin ölçülmesi:

Hipokampal sinaptik plastisite, mediyal perforan yol (PP) ile hipokampal formasyonun dentat girus (DG) nöronları arasındaki sinapslardan kayıt edildi. Bu amaçla, uretan anestezisi altında streotaksik çatiya yerleştirilmiş olan sıçanda, PP (AP:-8 mm; ML:4.2 mm, bregmaya göre) bir

uyarı izolasyon ünitesine bağlı tungsten elektrot ile uyarıldı; dentat girus nöronlarının (AP:3.5 mm, ML:2.13 mm) aktivitesi 3M NaCl doldurulmuş cam bir mikroelettrot ile kayıt edildi. Kayıt edici elektrodun sinyali bir headstage vasıtasıyla uygun yükselticilerden geçirilerek A/D çeviriciye iletildi. Bu A/D çevirici uyarı verilmesini de tetikledi. UDG, PP'in 100Hz frekanslı 0.175 milisaniye süreli kare pulse'lar ile uyarılması ile elde edildi. DG-UDG yanıtları, çalışmaya alınan tüm sıçanlardan, probe denemesinden 1 saat sonra alındı ve kayıt sırasında 5'er dakika arayla uygulanan 4 tetanik uyarım (100 Hz 1 sn süreli) ile tetiklendi.

ACTH düzeylerinin tayini: Uyku yoksunluğunun stres hormonlarının düzeylerini yükseltmesi mümkündür. Uyku yoksunluğunun stresör etkisini tayin etmek için, UDE kayıtları tamamlandıktan hemen sonra ve immunhistokimyasal analizler için beyin perfüze edilmesi sırasında alınan kandan ACTH ölçümü yapıldı.

İmmunhistokimyasal analiz:

UDE kayıtları yapılmış sıçanların beyni transkardiyak olarak %10 formalin ile perfüze edildikten sonra çıkartıldı. Çıkartılan beyinlerden hazırlanacak olan hipokampal kesitlerde NMDA reseptörlerini alt tipleri (NR1, NR2A ve NR2b), galectin-1 ekspresyon düzeyleri ve BrdU ile etiketlenen genç hücreler uygun antikorlar kullanılarak belirlendi. Bu işlemler ErU Veteriner Fakültesi Histoloji laboratuvarında yapıldı ve rakamsal analiz yapabilmek için, ilgili antikorla boyanan hücreleri otomatik olarak sayabilen bir görüntüleme sistemi kullanıldı.

Veri analizi:

a.Hormon düzeylerinin istatistiki analizi bir faktörlü ANOVA ile test edildi. Post-Hoc karşılaştırmalar için Bonferroni testi kullanıldı.

b.Öğrenme performansı değişkenleri: Morris su tankı öğrenme denemeleri boyunca ölçülecek olan tüm parametrelerin istatistiki analizi tekrarlayan ölçümler ile ANOVA (grup içi değişken:

ölçüt; gruplar arası değişken: uygulama) ile test edildi. Post-Hoc karşılaştırmalar için Bonferroni testi kullanıldı. Probe testinden elde edilen parametrelerin karşılaştırması ise bir faktörlü ANOVA testi ile test edildi.

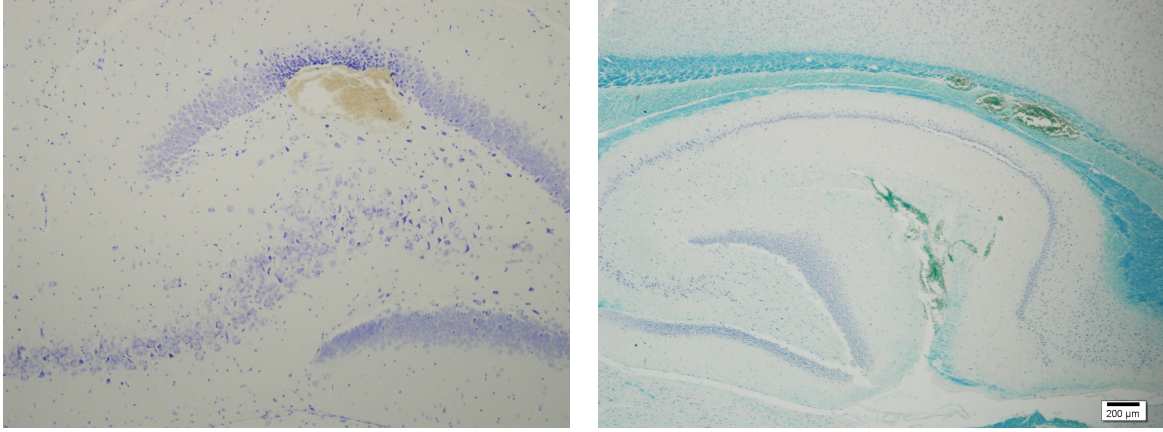
c.UDG ölçümleri: Her elektriksel uyarımla elde edilen bileşik yanıtta eksitator postsinaptik potansiyel eğimi ve popülasyon spike'nın genliği, baz değerinin yüzdesi olarak hesaplandı ve elde edilen ortalama değerler, bir faktörlü ANOVA testi kullanılarak analiz edildi.

d. İmmunhistokimyasal parameteler: Uygun antikorlar ve marker'lar ile boyanan hücrelerin sayısı ve boyanma yoğunluğunun gruplar arasındaki karşılaştırması bir faktörlü ANOVA kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, sıçanların özel su tankında uyku yoksunluğuna maruz bırakılmaları plazma ACTH seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselmeye neden olmuştur ($P<0.001$). Benzer bir artışın ortam kontrol grubu sıçanlarda da olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle su tankı uygulamasının sıçanlarda stres cevabın bir göstergesi olarak ACTH düzeyini anlamlı bir şekilde yükselttiği gözlenmiştir.

Elektrot verifikasyonu. Aşağıda verilen elektrofizyolojik deneylere ait bulgular, stereotaksik çatıya yerleştirilen anestezi altındaki sıçanlarda perforan yolun uyarılmasına yanıt olarak dentat giristan elde edilmiştir. Uyarı ve kayıt yerinin amaçlanan yerler olduğu hem tüm kayıtlarda tipik yanıtların elde edilmesi hem de histolojik olarak doğrulanmıştır. Histolojik doğrulama her gruptan seçilen bir örnek sıçanda yapılmış ve bunun bir örneği şekilde verilmiştir.

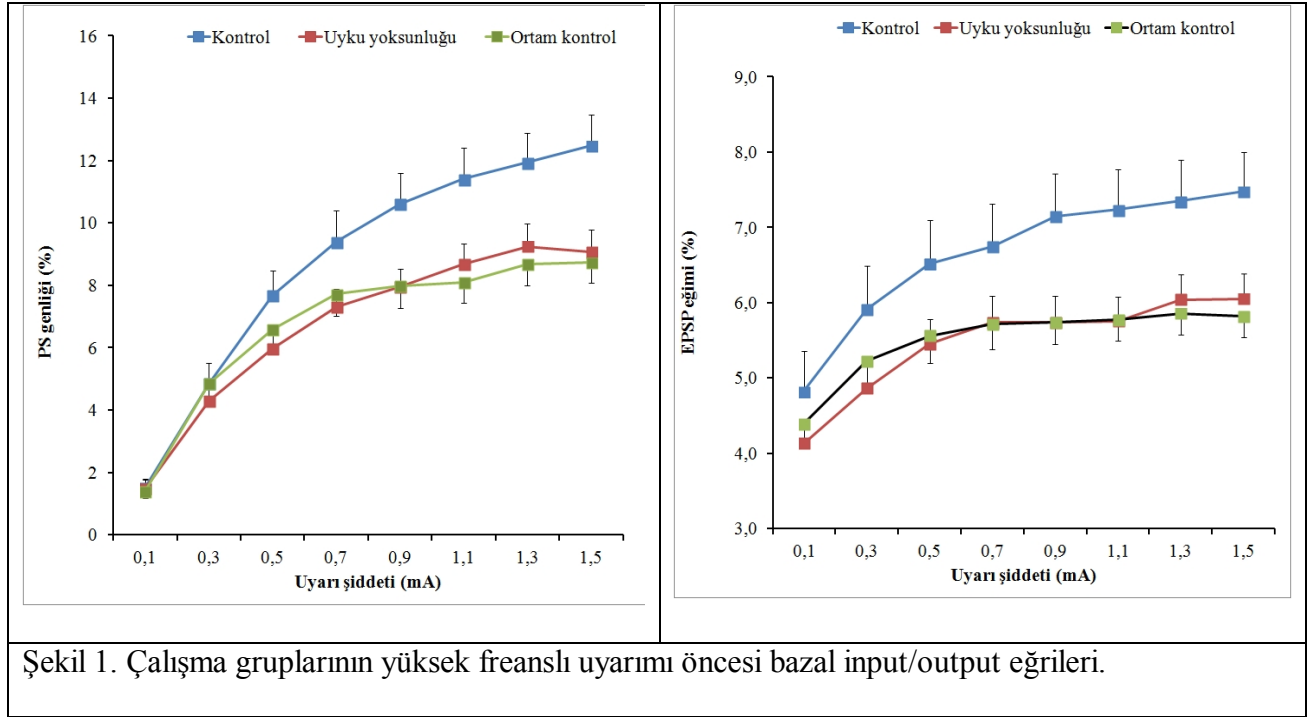


Şekil 1. Uyarı ve kayıt elektrotlarının beyin içindeki yerleri. Elektrot yerleşiminin histolojik doğrulanması için alınan hipokampus kesitlerinden bir örnek. Solda Kayıt elektrodunun Dentat girus bölgesine; sağda ise uyarıcı elektrodun perforant yolda bulunduğu oluşturduğu kanama alanlarından görülüyor.

Elektrofizyoloji bulguları

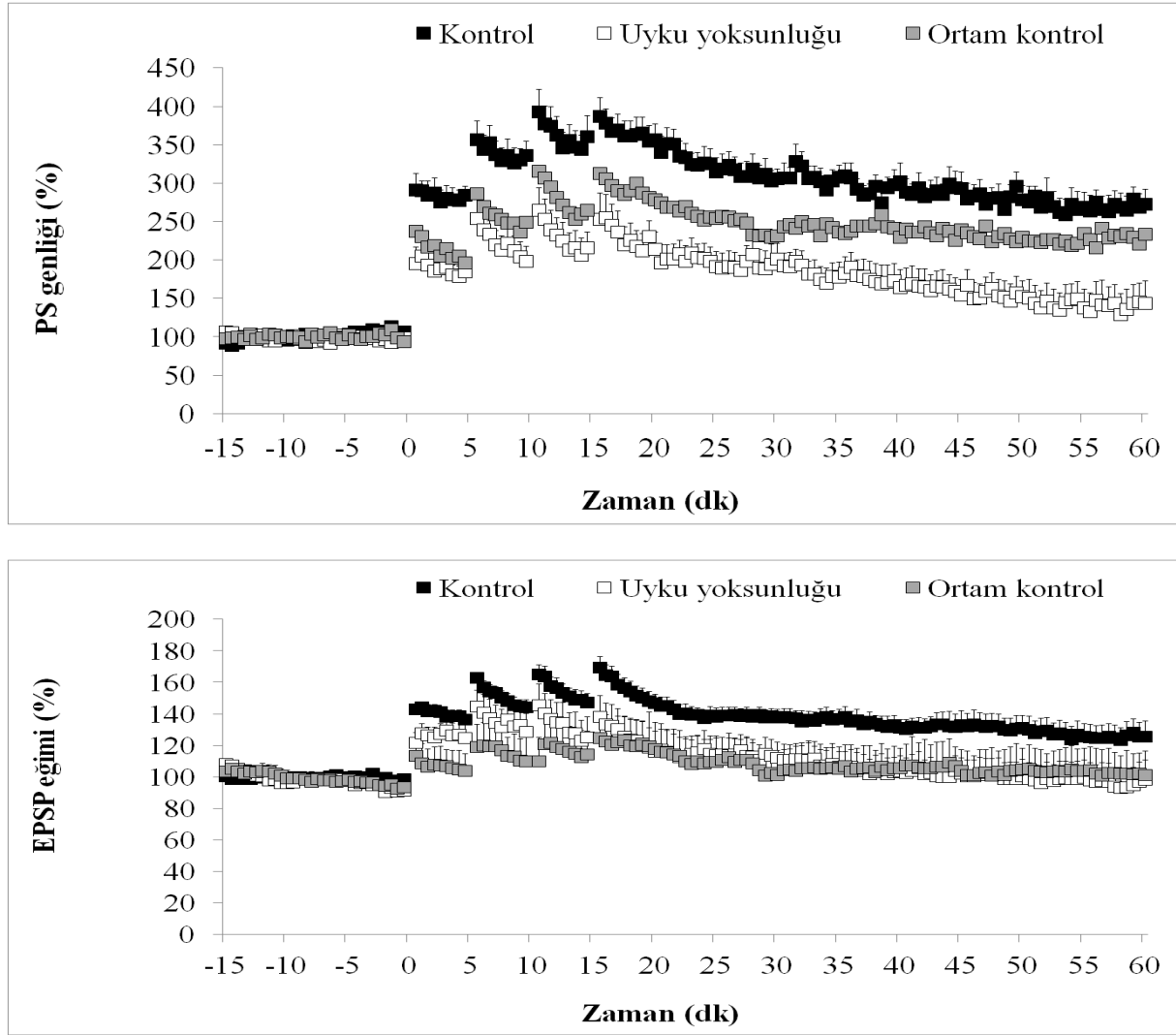
Input-Output eğrileri:

Çalışma gruplarında dentat girus yüksek frekanslı uyarım ile uyarılmadan önce 0,1-1,5 mA akım şiddetinde uygulanan puls uyarılara karşı elde edilen EPSP eğimleri ve PS genlikleri elde edilip hesaplanmıştır. Grup ortalamaları ve standart hataları Şekil 2 'de görülmektedir. Tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi analiz sonuçları hem uyku yoksunluğu hem de ortam kontrol grubundaki sıçanların kontrol grubuna göre daha basık input-ourput eğrilerine sahip olduğunu göstermektedir ($P < 0,002$). Ayrıca uyku yoksunluğu ve ortam kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P > 0,05$). Bu bulgular, uyku yoksunluğu ile dentat girus sinaptik bağlantılarının bazal gücünde bir azalma meydana geldiğini; ama bu azalmanın yoksunluktan çok ortam stresine bağlı olduğunu göstermektedir.



Uzun dönemli güçlenme

Tüm deneylerde input output deneyleri ile belirlenen test uyarın şiddetinde perforan yol uyarılarak 0-15 nci dakikalar arasında bazal kayıt alındı. Daha sonra 15 dk süre içinde, 5'er dakika ara ile 100 Hz frekansta tetanik uyarın ile potansiyalizasyon sağlandı. PS genliklerinin ve EPSP eğiminin potansiyalizasyonu, gruplara göre Şekil 3'de verilmiştir. Uyku yoksunluğu grubunda, hem EPSP genliğindeki artış hem de PS genliğindeki artış, kontrol grubuna göre daha azdır ve ortam kontrol grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu nedenle dentat girus sinaptik plastsitesinin uyku yoksunluğundan olumsuz etkilendiğini ve bu azalmanın ortam kontrol grubunda görülmemesi nedeni ile, yoksunluğa bağlı olarak oluştuğu kanaatindeyiz.

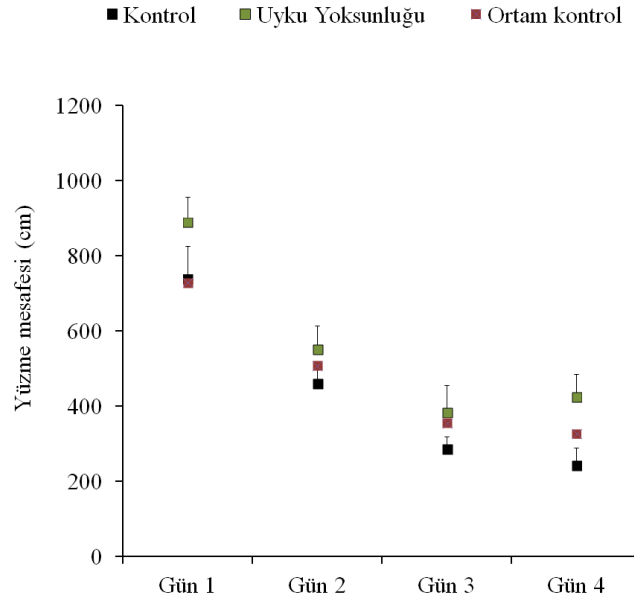


Şekil 3. Çalışma gruplarında PS genliklerinde ve EPSP eğimlerinde yüksek frekanslı uyarım ile indüklenen potansiyalizasyonun zaman alanındaki değişimi.

Morris Su Tankı test sonuçları

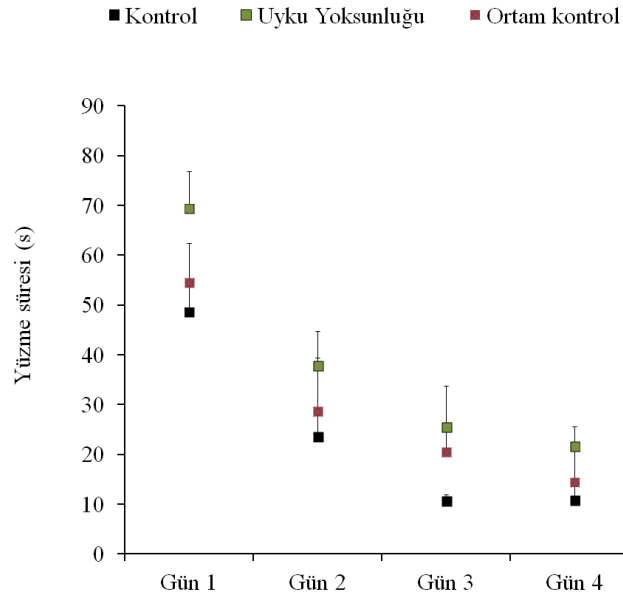
1. Yüzme mesafesi. Dört ardıl gün, günde dört kez olmak üzere Morris su tankında sabit gizli bir platformun yerini öğretme denemeleri sırasında, sıçanların platformu bulmak için kat ettikleri mesafe, video izleme-ölçme sistemi kullanılarak bulunmuştur. Yüzme mesafesi değerlerinin her gün elde edilen ortalama ve standart hatası Şekil 4'te verilmiştir. Tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, grupların ilk üç günkü değerleri arasında anlamlı bir farklılık

olmadığını; ancak 4ncü gün uyku yoksunluğu grubu sıçanların, ortam kontrol ve kafes kontrol gruplarına göre daha uzun mesafe yüzerek platforma ulaştıklarını göstermiştir ($p<0.05$).



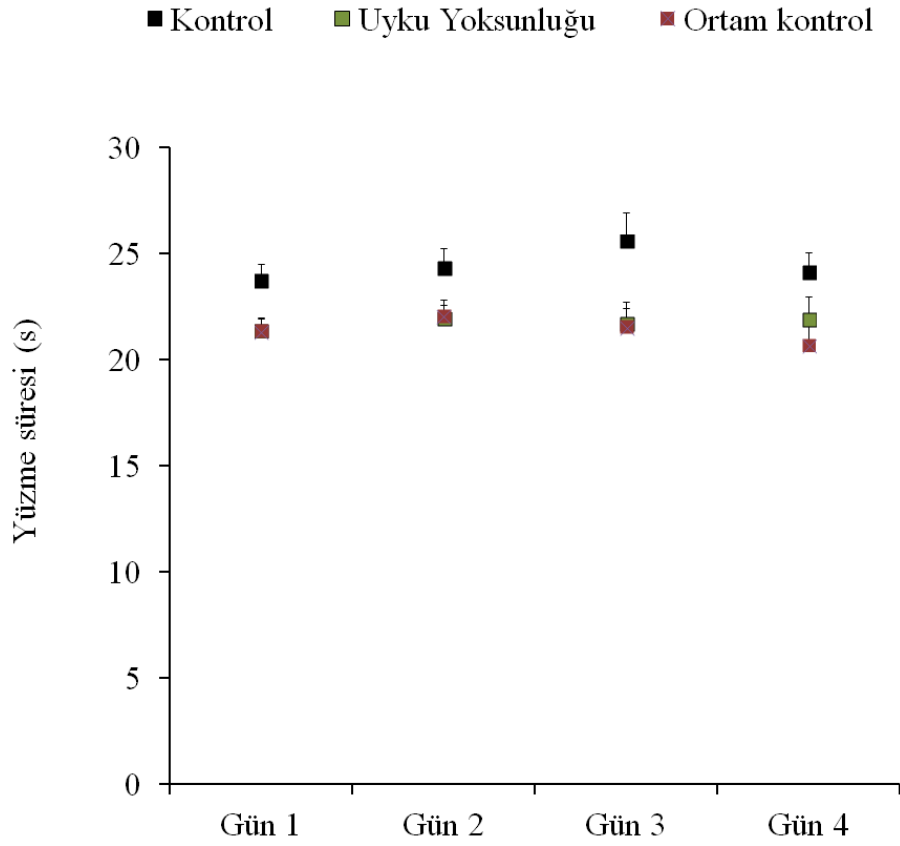
Şekil 4. Uyku yoksunluğunun, Morris su tankında gizlenen platformun yerinin bulunması için kat edilen mesafe değerleri üzerine etkisi

2. Yüzme süresi. Dört ardıl gün, günde dört kez olmak üzere Morris su tankında sabit gizli bir platformun yerini öğretme denemeleri sırasında, sıçanların platformu bulmak için yüzdükleri süre, video izleme-ölçme sistemi kullanılarak bulunmuştur. Yüzme süresi değerlerinin her gün elde edilen ortalama ve standart hatası Şekil 4'de verilmiştir. Tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, grupların ilk üç günlük değerleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığını; ancak 4ncü gün uyku yoksunluğu grubu sıçanların, ortam kontrol ve kafes kontrol gruplarına göre daha uzun süre yüzerek platforma ulaştıklarını göstermiştir ($p<0.05$).



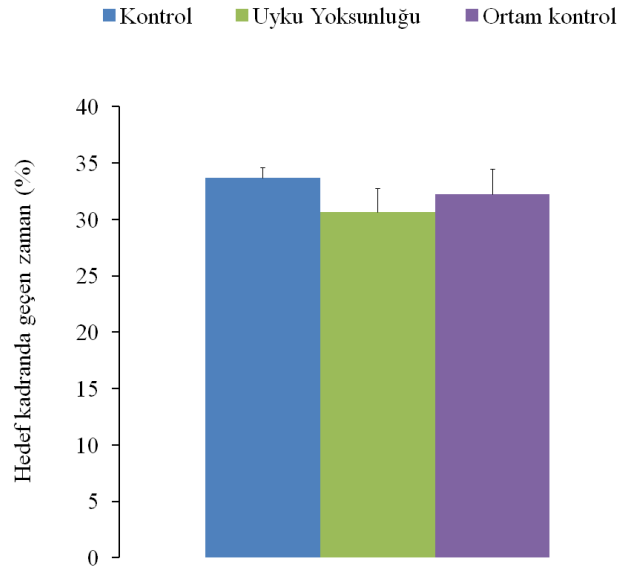
Şekil 5. Uykü yoksunluğunun, Morris su tankında gizlenen platformun yerinin bulunması için geçen süre değerleri üzerine etkisi

3. Yüzme Hızı. Dört ardıl gün, günde dört kez olmak üzere Morris su tankında sabit gizli bir platformun yerini öğretme denemeleri sırasında, sıçanların platformu bulmak için yüzerkenki ortalama yüzme hızları video izleme-ölçme sistemi kullanılarak bulunmuştur. Yüzme hızı değerlerinin her gün elde edilen ortalama ve standart hatası Şekil 5'te verilmiştir. Tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, grupların dört gün boyunca gösterdikleri hız performansının günler arasında farklı olmadığını; ancak üçüncü uykü yoksunluğu grubu ve ortam kontrol grubunun, kontrol grubuna göre daha yavaş yüzerek platforma ulaştıklarını göstermiştir ($p<0.05$).



Şekil 6. Uyku yoksunluğunun, Morris su tankında gizlenen platformun yerini bulma deneleri sırasındaki ortalama yüzme hızı değerleri üzerine etkisi

4. Hedef kadranda geçirilen zaman. Dört ardıl gün süren ter bulma denelerinden sonra sıçanlar, hedef platformun bulunmadığı bir koşulda, son denemelerinden 24 saat sonra 1 dakika süreyle su havuzu içinde serbest yüzmeye bırakılmıştır. Bu probe denemesi sırasında, sıçanın platformun bulunduğu kadranda geçirdiği sürenin tüm süreye oranı, sıçanların bellek performansı olarak değerlendirilmiştir. İstatistik analiz sonuçları, uyku yoksunluğu grubundaki sıçanların, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p < 0,05$) daha az oranda hedef kadranda bulunduklarını göstermiştir. Bu teste ait veriler, Şekil 7’de sunulmuştur.



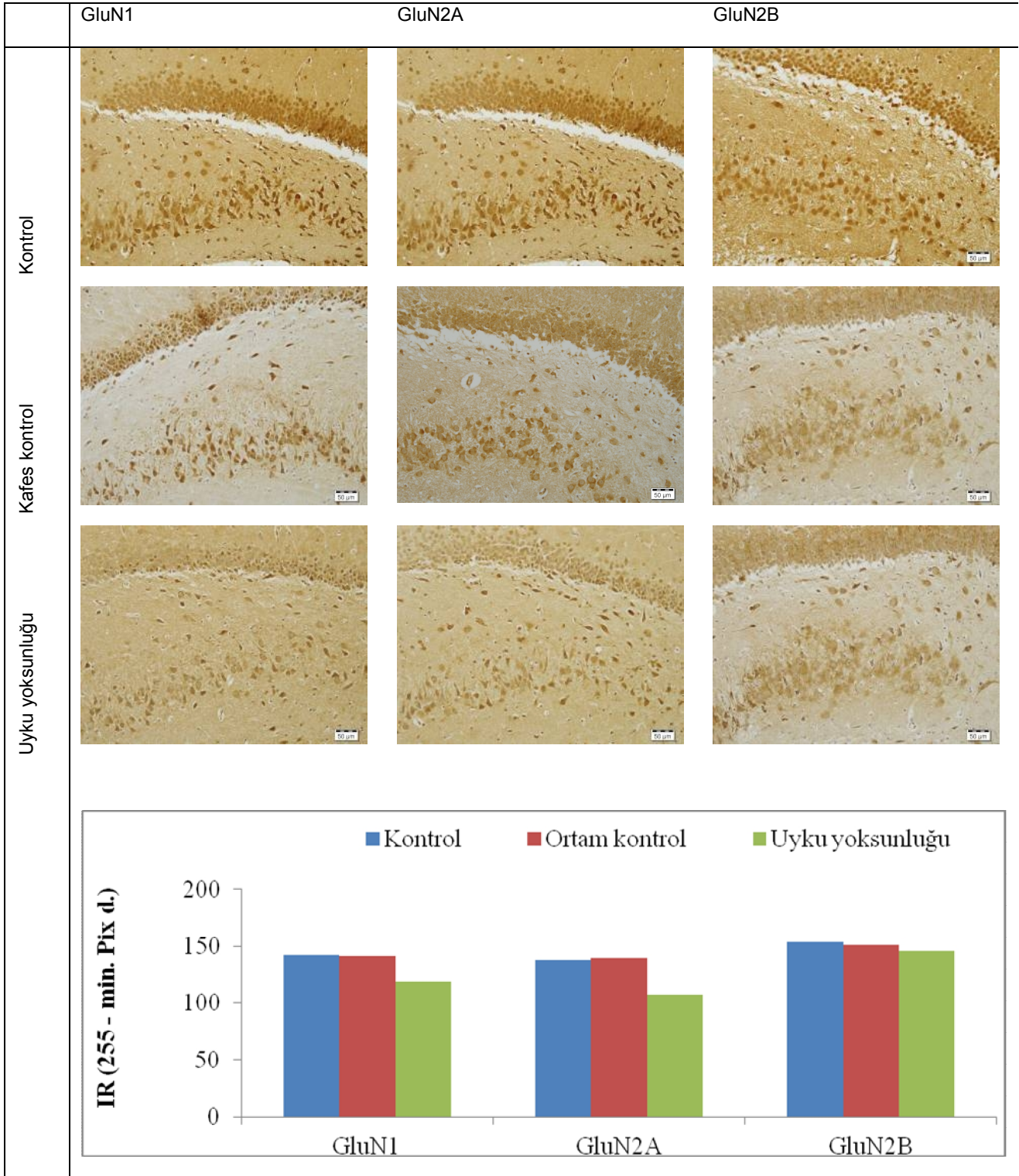
Şekil 7. Uyku yoksunluğunun, probe denemesi sırasında hedef kadranda geçirilen zaman değerleri üzerine etkisi.

İmmunohistokimyasal çalışmalar

NMDA alt birim anlatımı.

NMDA reseptörlerinin alt tipleri (NR1, NR2A ve NR2b) ekspresyon düzeyleri ve BrdU ile etiketlenen genç hücrelerin belirlenmesi amacıyla UDG kayıtları yapılmış sıçanların beyini transkardiyak olarak %10 formalin ile perfüze edildikten sonra çıkartılmıştır. Çıkartılan beyinler trimlenerek 5 gün süreyle aynı tespit solüsyonunda tutulduktan sonra 24 saat süreyle akarsu altında yıkanmışlardır. Takiben dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek paraflostta bloklanmışlardır. Hazırlanan bloklardan kesitler alınmış ve ardıl kesitler sırasıyla GluN1, GluN2A ve GluN2B alt birimlerine (ve galectin-1'e) özgül antikorlar ile boyanmıştır. Özgül antikorla boyanan, dentat girusa uyan 20.000 μm^2 'lik bir alanın optik dansitesi, uygun program kullanılarak piksel yoğunluğu olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik değerlendirmelere göre, GluN1 ve GluN2A antikorları ile boyanma şiddeti, uyku yoksunluğu grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olarak bulunmuştur ($P<0.05$). Ortam kontrol grubunda her üç antikor ile

boyanma şiddeti, diğer iki gruptan farklı değildir ($P > 0.05$). Her gruptan birer örnek sıçandan elde edilen histolojik görüntüler ve grup ortalama değerleri aşağıdaki şekilde sunulmuştur.



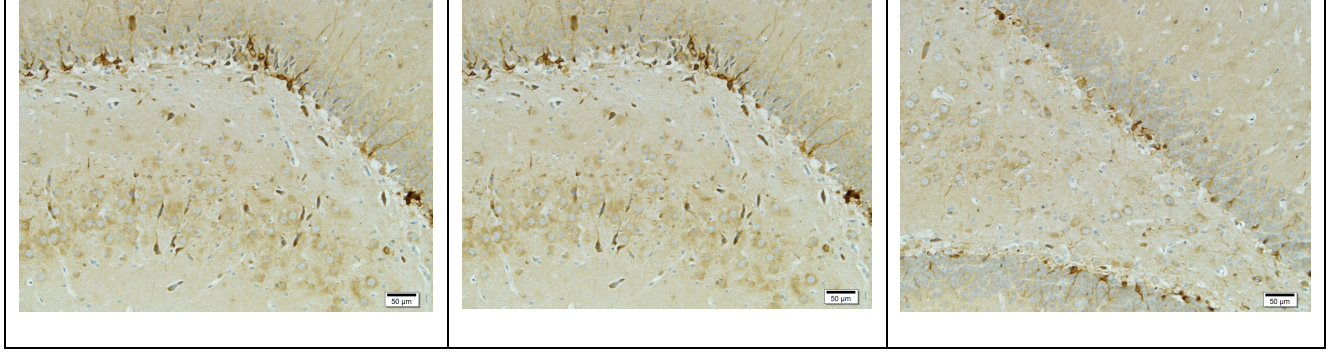
Şekil 8. Uyku yoksunluğunun hipokampüsün dentat girus bölgesindeki NMDA reseptör alt birimlerinin anlatımı üzerine etkisi.

Galektin-1 anlatımı. Yukarıda NMDA reseptör anlatımının incelenmesi için takip edilen prosedür, özgül Galektin-1 antikoru kullanılarak da gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, hiçbir grupta dentat girusta Galektin-1 proteini için özgül bir boyamaya rastlanılmamıştır. Buna rağmen, galektin pozitif boyamaya elektrot izi boyunca, elektrodun geçtiği yerlerde oluşan hasar bölgelerinde rastlanılmıştır. Bu nedenle galektin-1 ekspresyonunun hücre hasarına cevap olarak oluşulabileceği, uyku yoksunluğunda isehipokampal hücrelerde oluşan olumsuz sürecin, hücre hasarına kadar giden bir süreç olmadığı düşünülmüştür. Galektin-1 boyamalarına ait histolojik görüntüler, dentat girusa ait özgül bir boyanmayı yansıtmadığından sunulmamış ve analiz edilmemiştir.

Hipokampal Nörogenезisin belirlenmesi:

Bu amaç için BrdU (ip; 100 mg/kg) tüm sıçanlara doğum sonrası 78nci günde, öğrenme denemelerine başlamadan önce bir kez yapılmıştır. BrdU ile etiketlenen genç hücrelerin belirlenmesi için strep-avidin peroksidaz immunohistokimya yöntemi kullanılarak boyanmıştır. Boyama işlemi sonrası ilgili antikorlarla boyanan hücreleri otomatik olarak sayabilen bir görüntüleme sistemi kullanılarak sayım işlemi yapılmıştır. Aşağıda verilen birer örnek görüntüde olduğu gibi, uyku yoksunluğu grubunda BrdU ile işaretlenmiş hücre sayısı, kontrol ve ortam kontrol gruplarına göre daha az olarak bulunmuştur. Bu bulgu, kronik uyku yoksunluğunun, dentat girusta yetişkin nörogenезi azalttığını göstermektedir.

Kontrol grubu	Ortam kontrol grubu	Uyku yoksunluğu grubu
---------------	---------------------	-----------------------



4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından sağlanan 39.989,60 TL’lik maddi destek ile yürütülen bu çalışmanın sonuçları, kronik uyku yoksunluğunun neden olduğu öğrenme ve bellek bozukluklarının açıklanmasına ışık tutabilecek niteliktedir. Araştırma bulgularımız kronik uyku yoksunluğunun sağlam bir hipokampusün varlığını gerektiren işlerin öğrenilmesinde ve öğrenilen bilginin geri çağırılarak hatırlanmasında gösterilen performansın, normal süre uyuyan kişilere göre daha kötü olabileceğine işaret etmektedir. Bu, çalışmamızda 21 gün süreyle REM döneminde, içinde bulundukları tankın suyu içine düşen ve böylece uyanık kalmaya zorlanan sıçanların, Morris su tankı denemeleri sırasında gizli platformun yerini daha uzun mesafe ve süre harcayarak bulmaları ve ayrıca hatırlama denemeleri sırasında platformun yerinde daha az süre geçirmeleri bulguları ile desteklenmiştir. Kronik uyku yoksunluğuna maruz bırakılmış sıçanların performanslarının, aynı ortamda tutulmuş ama geniş yüzeyleri nedeni ile suya düşmeleri böylece uyanmaları önlenmiş olan sıçanlardan da bozuk olması nedeni ile, söz konusu bozuklukların tankta bulunmaktan kaynaklanmadığı söylenebilir.

Hipokampal öğrenme ve bellek bozukluklarının temelinde yatan hücresel mekanizma, uygun yönde sinaptik plastisite gösterilememiş olmasıdır. Yani öğrenme denemelerine maruz bırakılan sıçanların nöral devreleri, amaca uygun plastik değişiklikler gösterememiş ise, öğrenme ve bellek performansı azalır. Gerçekten, elektrofizyolojik deneylerimizin sonucu bu düşüncüyü

destekler niteliktedir. Çalışmamızda uyku yoksunluğuna maruz bırakılan sıçanlarda, tetanik uyarım kontrol gruplarına göre daha az bir güçlenme oluşturmuş; input-output ilişkisinin bozulmasına neden olmuştur.

Uzun dönemli güçlenme fenomeni, postsinaptik hücre içine giren Ca akımının tetiklediği pek çok hücrel biyokimyasal tepkimenin bir sonucu olarak gelişir. Gerek bu süreçlerin oluşması gerekse kalıcı hale gelmesinde iyonotropik glutamat reseptörleri önemli rol oynar. NMDA reseptörleri esas olarak GluN1 alt birime bağlanmış 2 adet GluN2A ve/veya GluN2B alt biriminden oluşur. Bu alt birim komplekslerinin GluN2A ağırlıklı olması UDG'nin daha kolay ve uzun süreli olmasına; GluN2B ağırlık olması ise daha kısa ve az süreli olmasına yol açar. Çalışmamızda, kronik uyku yoksunluğuna maruz bırakılan sıçanlarda, GluN1 alt birimi ile beraber GluN2A alt biriminin anlatımının azaldığı bulunmuştur. Böylece bu sıçanlarda gözlenen UDG'deki azalma, reseptör alt birimlerinin anlatımındaki azalma ile desteklenmiştir.

Dentat girus, yetişkin dönemde yeni nöron oluşuma devam eden sayılı beyin bölgelerinden biridir. Yeni hücre yapımı, yeni sinaptik bağlantıların kurulması açısından önemlidir ve nörogenezdeki bozulmaların hem öğrenme performansını bozduğu hem de sinaptik plastisitenin elektrofizyolojik göstergelerini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle uyku yoksunluğuna maruz bırakılan sıçanlarda nörogenez sürecinin etkilenmesi beklenebilir. Gerçekten BrdU ile işaretlenen hücre sayısının, kronik uyku yoksunluğuna maruz bırakılan sıçanlarda azalmış olması bu görüşü destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, öğrenilen bilgilerin pekiştirilme sürecinde önemli bir rol oynayan fizyolojik uyku düzenin bozulmasının hipokampal işlevleri moleküler, elektrofizyolojik ve davranış temelinde bozabileceğini, bu çalışma ile gösteriyoruz. Bu bulgulardan hareket ile uykunun, öğrenme ve

belleğin sağlıklı bir şekilde oluşmasında önemli bir rol oynadığı ve uyku düzeni bozukluklarının önemli kısıtlıklara yol açabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1.KESNER RP, Goodrich-Hunsaker NJ. Developing an animal model of human amnesia: The role of the hippocampus. *Neuropsychologia*. 2009 Oct 31. [Epub ahead of print].
- 2.LANGUILLE S., Davis S., Richer P., Alcacer C., Laroche S., Hars B. Extracellular signal-regulated kinase activation is required for consolidation and reconsolidation of memory at an early stage of ontogenesis. *Eur J Neurosci*. 30(10):1923-30, (2009).
- 3.ELGERSMA Y., Silva A.J. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 1999 Apr;9(2):209-13.
- 4.NICOLL R.A., Malenka R.C. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Apr 30;868:515-25.
5. REDONDO R.L., Okuno H., Spooner P.A., Frenguelli B.G., Bito H., Morris R.G. Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J Neurosci*. 30(14):4981-9, (2010).
6. SHENG M, Kim M.J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):776-80.
7. JOEL H. Benington Marcos G. Frank. Cellular and molecular connections between sleep and synaptic plasticity *Progress in Neurobiology* Volume 69, Issue 2, February 2003, Pages 71-101
8. FREY U., Morris R. G. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci*. 1998 May;21(5):181-8.
9. COHEN-CORY S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):770-6.

10. McDERMOTT CM, LaHoste GJ, Chen C, Musto A, Bazen NG, and Magee JC. Sleep Deprivation Causes Behavioral, Synaptic, and Membrane Excitability Alterations in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(29):9687-9695
11. CIRELLI C. How sleep deprivation affects gene expression in the brain: a review of recent findings. *J Appl Physiol*. 2002 Jan;92(1):394-400
12. CIRELLI C, Tononi G. Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. *Brain Res*. 2000; 885(2):303-21.
13. TAISHI P, Sanchez C, Wang Y, Fang J, Harding JW, Krueger JM. Conditions that affect sleep alter the expression of molecules associated with synaptic plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281(3): R839-45.
14. RIBERIO S, Mello CV, Velho T, Gardner TJ, Jarvis ED, Pavlides C. Induction of hippocampal longterm potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye movement sleep. *J Neurosci*. 2002 Dec 15;22(24):10914-23.
15. GERENDASY D. Homeostatic tuning of Ca²⁺ signal transduction by members of the calpactin protein family. *J Neurosci Res*. 1999 Oct 1;58(1):107-19.
16. NEUNER-JEHLE M, Denizot JP, Borbély AA, Mallet J. Characterization and sleep deprivation-induced expression modulation of dendrin, a novel dendritic protein in rat brain neurons. *J Neurosci Res*. 1996;46(2):138-51.
17. NEUNER-JEHLE M, Denizot JP, Mallet J. Neurogranin is locally concentrated in rat cortical and hippocampal neurons. *Brain Res*. 1996; 733(1):149-54.
18. YANG RH, Hu SJ, Wang Y, Zhang WB, Luo WJ, Chen JY. Paradoxical sleep deprivation impairs spatial learning and affects membrane excitability and mitochondrial protein in the hippocampus. *Brain Res*. 2008 Sep 16;1230:224-32.

19. BEAULIEU I, Godbout R. Spatial learning on the Morris Water Maze Test after a short-term paradoxical sleep deprivation in the rat. *Brain Cogn.* 2000;43(1-3):27-31.
20. CAMPBELL, I.G., Guinan, M.J., Horowitz, J.M., 2002. Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 88, 1073-1076.
21. DAVIS, C.J., Harding, J.W., Wright, J.W., 2003. REM sleep deprivation-induced deficits in the latency-to-peak induction and maintenance of long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus. *Brain Res.* 973, 293- 297.
22. SÜER C, Dolu N, Artis AS, Sahin L, Yilmaz A, Cetin A. The effects of long-term sleep deprivation on the long term potentiation in the dentate gyrus and brain oxidation status in rats. *Neurosci Res.* 2011;70(1):71-7.
23. CAMBY I., Le Mercier M., Lefranc F., Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 2006;16:137R–157R.
24. RABINOVICH G. A., Toscano M. A., Jackson S. S., Vasta G. R. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 2007;17:513–520.
25. CRAIG S.E., Thummel R., Ahmed H., Vasta G.R, Hyde D.R., Hitchcock P.F. The zebrafish galectin Drgal1-l2 is expressed by proliferating Müller glia and photoreceptor progenitors and regulates the regeneration of rod photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(6):3244-52.
26. PUCHE AC, Poirier F, Mair M, Bartlett PF, Key B, Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system, *Dev Biol* 1996; 179, 274–87.
27. van PRAAG H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH: Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002; 415:1030-1034.
28. LAFENETRE P, Leske O, Wahle P, Heumann R. The beneficial effects of physical activity on impaired adult neurogenesis and cognitive performance. *Front Neurosci.* 2011;5:51.

29. IMAIZUMIY., Sagaguchi M., Morishita T., et al. Galectin-1 is expressed in early-type neural progenitor cells and down-regulates neurogenesis in adult hippocampus. *Molecular Brain*. 2011; 4:7.

