

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

UYKU YOKSUNLUĞUNDA SIÇAN BEYİNİ
NİTRİK OKSİT DÜZEYİNDEKİ
DEĞİŞİKLİKLER

Dr. Birhan ALTAY

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI : Prof.Dr. LAMİA PINAR

ANKARA- 1999

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Teşekkür.....	II
İçindekiler.....	III
Kısaltmalar.....	IV
Şekiller Dizini.....	V
Tablolar Dizini.....	VI

BÖLÜM I

ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
GİRİŞ ve AMAÇ.....	5

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER.....	7
II . 1 . Uyku ve Uyku Yoksunluğu.....	7
Uygunun Temel Özellikleri.....	7
Uyku ile İlgili Beyin Bölgeleri.....	12
Uyku Yoksunluğu.....	20
II . 2 . Nitrik Oksit	21
Nitrik Oksidin Biyokimyası.....	23
Nitrik Oksidin Uyku Yoksunluğu İle İlişkisi.....	29
Nitrik Oksidin Ölçümü.....	31

BÖLÜM III

GEREÇ ve YÖNTEM.....	39
III . 1 . Araştırma Planı.....	39
Total Uyku Yoksunluğu Düzenegi.....	41
REM Yoksunluğu Düzenegi.....	42
Doku Örneklerinin Hazırlanışı.....	43
No Ölçümü İşlem Basamakları	44
Kemilüminesans Yöntemle Nitrik Oksit Analizi.....	49

BÖLÜM IV

BULGULAR	55
IV . 1 . Ağırlık Değişimi.....	55
IV . 2 . Nitrik Oksit Ölçüm Sonuçları.....	56

BÖLÜM V

TARTIŞMA ve SONUÇ.....	69
KAYNAKLAR.....	75

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimi ile, aynı zamanda zerafeti ile her zaman destek olan, sorunlarımda hep yanımda olup sabırla yol bulmaya çalışan, bu öğrenimin sonuna dek gelmemi sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Lamia Pınar 'a,

Öğrenimim boyunca her türlü olumsuzluğu olumluluğa çeviren, gerek bilimsel gerekse idari konularda hep yanımda olan ve deneyimleriyle yol gösteren Anabilim Dalı Başkanı ve aynı zamanda Temel Bilimler Bölüm Başkanı Prof. Dr. Bilge Gönül Hocam'a,

Öğrenimim sırasında gerekli her türlü desteği veren Prof. Dr. Aydan Babül Hocam'a,

Özellikle tez çalışmam sırasında haftasonu, tatil demeden yanımda olup, karşılaştığımız binbir güçlük karşısında büyük özveri ile bana destek olan, tezin tamamlanmasını sağlayan Prof. Dr. Deniz Erbaş Hocam'a,

Çalışmam sırasında sürekli desteğini aldığım ve aynı zamanda kullandığımız düzeneğin geliştirilmesini sağlayan Yard. Doç Dr. Ethem Gelir'e,

Çalışmam sırasında hiç bir zaman yardım ve desteğini esirgemeyen doktora öğrencisi Hale Sayan ve Ferihan Çetin'e, araştırma görevlisi Dr. Gülzade Dönmez ve Dr. İpek Işık'a

Öğrenimim sırasında her zaman yakın ilgisini gösteren ve yanımda olan Doç Dr. Sibel Dinçer'e,

Laboratuvar çalışma disiplini konusunda çok anlaştığım, ilgisi ve gülüyüzü hiç eksik olmayan Yard.Doç. Dr. Eser Öz'e,

Bölümde güzel bir dayanışma sergileyen tüm arkadaşlara,

İşyeri arkadaşım Dr. Nilgün Şafak'a ve özveri ile sorunları paylaşarak yanımda olan eşim Figen Altay'a,

Ayrıca laboratuvar olanaklarından yararlanmamızı sağlayan Biyokimya , İmmunoloji ve Metabolizma laboratuvarı yöneticilerine çok teşekkür ederim.

Dr. Birhan Altay

KISALTMALAR

- Bs :Beyin Sapi
Cer :Serebellum
Hk :Hipokampüs
K :Kontrol
Kort :Korteks
LTD : Long Term Depression
LTP :Long Term Potensiasyon
L-Arg :L-Arjinin
NO : Nitrik oksit
T :Total
RAS .Retikuler Aktive Edici Sistem
R :Rem
RK :Rem Kontrol

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.	Uyku Evreleri.....	8
2.	Uyku Evreleri ve Uyku Dalgaları.....	10
3.	Kortikal Yapı.....	13
4.	Uyku Evrelerinde Kas Aktivitesi.....	15
5.	Sinapsta NO.....	22
6.	Nikrit Oksit Sentezi.....	27
7.	Nikrit Oksit sentezi.....	27
8.	Çalışmada Kullanılan Sievers 280 Model No Analizörü.....	36

TABLULAR GRAFİKLER DİZİNİ

1. Tablo I: Gruplara Göre Beyin Alanları NO₃ Ortalamaları.....57
2. Grafik I-IV: Gruplara Göre Beyin Alanları NO₃ Dağılımları.....58-60
3. Grafik V-VII: Beyin Alanlarında Gruplararası NO₃ Dağılımları.....60-62
4. Tablo II: NO₂ Bakımından Beyin Alanlarına Göre Grup Ortalamaları..62
5. Grafik IX-XII: Gruplara Göre Beyin Alanları NO₂ Dağılımları.....63-67

BÖLÜM I

ÖZET

Bu çalışmada beş gün süreyle total uyku yoksunluğu ve REM uyku yoksunluğu uygulanan sıçanlarda beyin nitrik oksit düzeylerinde, kontrollara göre ortaya çıkabilecek değişiklikler incelenmiştir.

Bu amaçla, iki ayrı araç kullanılmıştır. Bunlardan ilki, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji laboratuvarında geliştirilen, deneklerin sürekli uyanık kalmasını sağlayan fakat bir egzersiz etkisi oluşturmayan bir “modifiye yürüme bandı düzeneği” ile diğeri literatürde klasik REM uyku yoksunluğu araştırmalarında kullanıldığı belirlenen bir “tabla düzeneği” dir.

Total uyku yoksunluğuna uğratılan deneklerin beyinlerinin beyin sapı, serebellum, hipokampus ve korteks bölgelerinden alınan doku homojenatlarında Sievers 280 model analizör ile yapılan NO₂ ve NO₃ ölçümleri, normal fizyolojik uykusunu uyuyan deneklerin aynı bölgelerinden alınan örneklerle karşılaştırılmıştır. REM uyku fazına girmeleri engellenen deneklerin aynı bölgelerine ait beyin dokusu örnekleri ise, standart koşulları sağlamak amacı ile aynı düzeneğin diğeri platformunda tutulan ve REM fazını uyumasına izin verilen REM kontrol grubu beyin örnekleri ile karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, nitrik oksit aktivitesinin ya da düzeyinin düzeyinin en fazla hipokampüste bulunduğunu ve beyin alanları içinde düzeylerin farklılık gösterdiği, uyku yoksunluğu ile de bu farklılığın korunduğunu göstermektedir. Numune alınan beyin alanları itibariyle beyin sapı, serebelum, hipokampüs, hipotalamus, kortekste NO₃ ve NO₂ düzeyleri bakımından farklılık olduğu ve NO₃ ve NO₂ düzeyleri bakımından farklılık olduğu ve yapılan istatistiksel analizlere dayalı olarak, alanlara göre farklılık olduğu saptanmıştır. Bu durum Benedetti ve arkadaşları (9), Williams ve arkadaşları (72) ve Förstermann ve arkadaşlarının (22) çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada uyku ve uyku yoksunluğunun beynin NO düzeylerini etkilediği saptanarak; uyku yoksunluğunun öğrenme, hafıza gibi temelde NO'nun nöral plastisite mekanizmaları ile işlerlik kazanan diğer fonksiyonlarına olan etkilerini araştırma gereği vurgulanmıştır.

ABSTRACT

In this study, we examined the changes at the level of nitric oxide in rat brain which was exposed to total and REM sleep deprivation for 5 days, and compared the results control groups.

For this purpose, we used two different apparatus. The first apparatus was specially developed in physiology laboratory of medical school of Gazi University. It is a “ modified treadmill” keeping the rats continuously awake but not causing an exercise affect on them. The other mechanism is a “ plate apparatus” known to be classically used in REM sleep deprivation researches.

Tissue homogenates are prepared from medulla oblongata, cerebellum, hippocampus and cortex of brain of rats that were exposed to total sleep deprivation.

NO₃ and NO₂ values of this homogenates are measured by using a “ Sievers Model 280 Analyser”. The results are compared to control group results. Brain tissue measurement of the rats exposed to REM sleep deprivation are compared to the measurements of the rats kept in the other plate of apparatus to provide standart condition and permitted to REM sleep.

The results indicate that ;

The maximum activation of NO or NO₃ and NO₂ levels is found in hippocampus.

NO₃ & NO₂ levels are different in the medulla oblongata, cerebellum, hippocampus and cortex .

This difference between the specific brain regions is also found statistically different.

This results is similar to study results of Benedetti et al (9), Williams et al (72) and Förstermann et al (22).

However sleep deprivation does not cause a significant difference at NO_3 levels but cause a significant difference at NO_2 levels and total sleep deprivation group showed a statistically significant increase at NO_2 level.

In this study, we determined that sleep and sleep deprivation affect NO level of brain. These data suggests for further investigations about effects of sleep deprivation on the other functions of brain which functions by neural plasticity mechanisms such as learning and memory.

GİRİŞ ve AMAÇ

Uyku REM ve nonREM adı verilen iki fazı olan fizyolojik bir süreçtir. Bir felsefi görüşe göre uyku, mental aktivitelerin durduğu, beynin dinlendiği pasif bir süreçtir, komanın benzeri bir tablodur. Bu görüşün hakim olduğu dönemde HESİOD uykuyu "uyku ölümünün kardeşidir" şeklinde tanımlamıştır. Bugün de geçerli ve fizyolojik olarak kabul edilen diğer bir görüşe göre ise uyku, uyanıklık gibi, mental aktivitelerin özel ve değişik bir formudur ve aktif bir süreçtir. Kişinin duysal veya diğer uyaranlarla uyanabileceği bilinçsizlik durumu olarak tanımlanmaktadır. Çok hafiften, çok derine kadar değişen farklı düzeyleri vardır.

Uyku sırasında, uyanırken oluşan hasarların onarıldığı, uyanıklık ile bozulan homeostazisin düzenlendiği varsayılmaktadır. Uyku yoksunluğu ise özellikle mental fonksiyonları etkilemektedir.

Nitrik oksit (NO) , gaz karakterli, küçük paramagnetik radikaldir (3). Merkezi sinir sisteminde geniş bir şekilde dağılmakta ve genellikle uzun süreli davranış ve bellekten sorumlu beyin alanlarında görülmektedir. Vasomotor düzenlemede vasküler endotel üzerinde etkisi; nonkolinerjik nonadrenerjik sinir liflerinde bir nörotransmitter olarak etkisi; merkezi sinir sisteminde postsinaptik olarak salınarak, glutamat reseptörleri üzerinden, presinaptik uçtaki guanilat siklazı ve çevredeki glial ve sinirsel elementleri aktive etmektedir (35). Öğrenme, hafıza gibi kongnitif süreçlerin oluşmasında, long term potansiyasyon (LTP) mekanizmasını işleterek rol oynar.

NO'nun aynı zamanda uyku ile ilişkisinin olduğu saptanmıştır. Beynin uyku doğuran bölgelerinde Ach salınımını indükleyerek, uyku oluşumunda rol oynamaktadır. NO sentaz (NOS) inhibitörleri kullanılması halinde uykunun deneysel olarak inhibe edilebildiği bilinmektedir (35).

Nitrik Oksitin uykuya etkileri bilinmekle birlikte, literatürde uykunun ve yoksunluğunun NO düzeylerine olan etkileri ile ilgili çalışma azdır. Yapılan bazı çalışmalarda oluşturulan 115 ila 120 saatlik uyku yoksunluğu, uzun süreli yoksunluk kriteri olarak kabul edilmektedir (49, 63). Bu verilerden yola çıkarak, çalışmamızda özellikle insanlar için de makul kabul edilebilecek bir süre olan 5 günlük bir total uyku yoksunluğu ve REM uyku yoksunluğunda beynin, özellikle uyku ile ilgili, beyin sapı, hipokampus, hipotalamus, korteks ve serebellum gibi çeşitli bölgelerinde kontrollere göre NO düzeylerinde bir değişim olup, olmayacağını araştırmak istedik.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. UYKU VE UYKU YOKSUNLUĞU

UYKUNUN TEMEL ÖZELLİKLER İ

Uyku, canlıların çeşitli uyanıklarla uyandırılabilceği bir bilinçsizlik halidir. En yalın tanımıyla da canlıların istemli olarak çevreden ilgilerini kestikleri, tersine çevrilebilir bir tepkisizlik halidir (58,59). Uyku - uyanıklık döngüsü vücudun, gece gündüz arasında oluşan, en önemli ritmidir. Bu ritim yenidoğanda polifazik bir karakter gösterirken, çocuklarda öğlen saatlerindeki kestirmeler ile birlikte bifazik, erişkinlerde ise sirkadiyen ritim şeklinde monofazik karakter göstermektedir (37).

Eğer kişiler diurnal ışık ve ısı değişikliklerinden, sosyal çevre ve uyanıklardan tamamen izole edilir ve bilhassa zamanla ilgili bilgilerden yoksun bırakılırsa, insanların 3/4 'ünde bu ritim 25 saate; 1/4 ünde ise 33 saate kadar çıkmaktadır (37). Bu uyku uyanıklık ritminin, hipotalamusta suprakiazmatik nükleusta ayarlandığı düşünülmektedir. Uykunun en derin fazında bile periferden veya visseradan gelen bazı duyusal uyanıklar kortekse kadar ulaşmakta, buradan da motor cevaplar medulla spinalise taşınmaktadır. Ancak medulla spinalis motor noronları ileri derecede inhibe edildiği için bir motor hareket ortaya çıkmamaktadır (37).

EEG traselerine göre uykuda ard arda iki farklı dönem ortaya çıkar

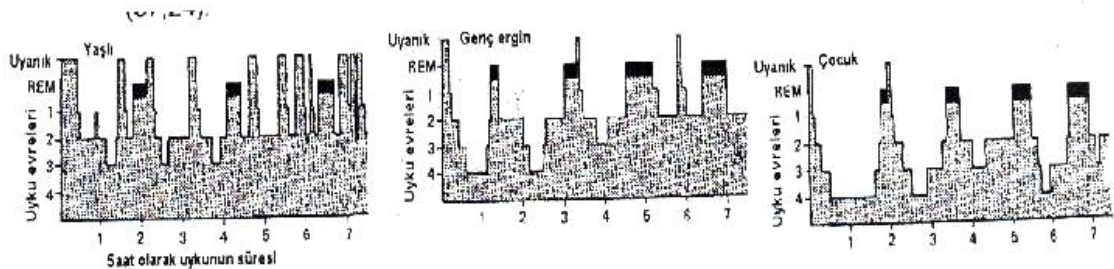
a) Beyin dalgalarının çok yavaşladığı “*Yavaş Dalga Uykusu*”,

b) Uykuda gözlerde hızlı hareketlerin yaşandığı “*Rem Uykusu*”.

Gözler kapalı, sakin bir şekilde yatar pozisyonda, uyanıklıkta alınan EEG’de alfa (α) ritmi alınır. Bu ritimde frekansı 8-12/sn ve genliği 50 μ V olan dalgalar gözlenmektedir. Gözler açıldığında α ritmi yerini hızlı, düzensiz, düşük voltajlı bir aktiviteye bırakmaktadır. Buna desenkronizasyon adı verilirken bir başka deyişle uyanma ya da dikkat etme yanıtı da denilmektedir. Bu durumun bir duysal uyarı veya bir aritmetik problemi çözme gibi mental yoğunlaşma ile ortaya çıktığı saptanmıştır (37,24). Derin elektrotlarla yapılan EEG kayıtlarında kortikal aktivite de desenkronizasyon görülmesine karşın, hipokampusta 4-10 Hz de, yüksek düzeyde senkronizasyon gösterilmiştir (37).

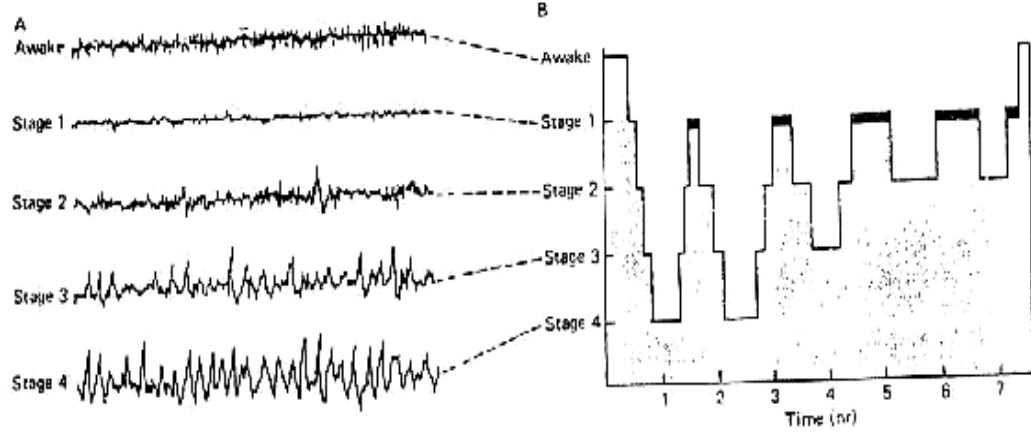
Sağlıklı normal yetişkinlerde elektroensefalografi (EEG)’ de 4 tipik dalga söz konusudur. Bunların frekansları 0-30 Hz, hatta bazen çok ileri aktivitelere 50 Hz’ e kadar çıkmakta; voltajları ise 20-100 μ V arasında değişmektedir. Sakin uyanıklıkta α (alfa), dikkatli uyanıklıkta β (beta), çocuklarda mental psikozlarda ve yetişkinlerde hayal kırıklıklarında θ (teta), uykuda kortekste α aktivasyonu varken hipokampus CA1 nöronlarında ve piramidal bölgede θ , derin uyku ve komada, yeni doğanda δ (delta) dalgaları ortaya çıkmaktadır (37,24).

Şekil 1. Uyku Evreleri (Kales,A.M.,N.Eng.J.Med.1974)



Uyku Kalıpları

Uyku, yukarıda söz edildiği gibi ard arda 2 ayrı fazdan oluşmaktadır. Hızlı göz hareketlerinin (rapid eye movement) olduğu REM fazı ve yavaş dalgalı uyku veya derin uyku denilen non REM (nREM) fazı. Normalde kişi uykuya daldığında, yavaş dalga uykusuna geçer. nREM uyku 4 evreden oluşur. Kişi uyumaya başladığında, EEG'de düşük genlikli, yüksek frekanslı bir aktivite olan, 1. evre izlenir. Bu evre tam uyku ile uyanıklık arasında bir geçiş dönemi olup; 0.5 ila 7 dakika arasında sürmektedir. Evre1'de gözler kapalıdır, ancak gözler açılıp, resim v.b. objeler gösterildiğinde göremezler ya da gördüğünü anımsayamazlar (32,27). Ardından uyku dikenlerinin gözlendiği 2. Evre başlar. Bu evrede α ritmine benzer 10-14/sn frekanslı, genliği 50 μ V olan dalga patlamaları oluşmaktadır. Sonra düşük frekanslı, yüksek genlikli dalgaların gözlendiği 3. evreye girilir. Bu evreye, EEG'de $\frac{1}{2}$ -2 Hz frekanslı, 75 μ V'u geçen geniş ve yüksek dalgalar olan, delta dalgaları görülmesi nedeniyle "delta uykusu" da denilmektedir. Ardından genliği yüksek, geniş dalgaların ortaya çıktığı 4. evreye gelir. 3 ve 4. evreler 70-100 dakika kadar sürer. Uyku daha sonra hafifleyerek, kişi REM evresine geçer. Bu döngü gece uykusunda 90 dakikalık aralıklarla tekrarlanır. Sabaha doğru nREM' in 3. ve 4. evreleri kısalırken; REM süresi uzamaktadır (24).



Şekil 2. Uyku Evreleri ve Uyku Dalgaları (37).

NREM uykusu senkronizasyon gösteren bir ritmik, yavaş dalga kalıbıdır. Uykunun büyük bölümü yavaş dalga uykusu şeklinde geçer, bütün bir uyku periyodunun ilk yarısı derin ve dinlendirici bölümdür. Uyku dönemleri art arda olarak ortaya çıkar ve 90 dakikada bir tekrarlanır. Yavaş dalga uykusu son derece sakin olup, hem periferik damar tonusunda hem de birçok vegetatif vücut fonksiyonunda azalma, ek olarak kan basıncı, solunum hızı ve metabolizma hızında azalma ve buna bağlı olarak vücut ısısında düşme ile karakterizedir. Düşsüz uyku olarak ta adlandırılmakta olmasına karşın, bu dönemde düşler hatta kabuslar görülebilmekte, fakat çok daha güç hatırlanabilmekte, yani beyinde konsolide olmamaktadır (56).

REM uykusu ise 90 dakikada bir ortaya çıkan ve 5 ile 30 dak. kadar devam eden, rüya görme ile karakterize bir süreçtir. Normal bir gece uykusu döneminde 4 ile 6 kez REM fazı yaşanmaktadır. Genelde tüm REM uykusu süresi, tüm uyku zamanının %20-25'ini kapsar. REM uykusunda EEG'de düşük genlikli, hızlı ve düzensiz dalga aktivitesi ortaya çıkar. Bu, dikkat halindeki β dalgalarına benzemesine karşın, bu dönemde uyandırma eşiği

yükselmiş olduğundan uyanma olmamaktadır. REM sırasında ponstan kaynaklanarak hızla lataral genikulat cisme, buradan da oksipital kortekse ulaşan 3-5'li geniş fazik potansiyeller ortaya çıkmaktadır. Bunlara pontin genikulo oksipital (PGO) dikenler denilmektedir. Bu dikensi dalgalar bir yandan hızlı göz hareketlerine yol açarken, diğer yandan retiküler inhibe edici alanı aktive ederek aynı zamanda pre ve postsinaptik inhibisyon ile, gerilme ve polisınaptik reflekslerde azalma ve iskelet kaslarında hipotonusa neden olmaktadır (37,53). Dolayısı ile REM uykusu sırasında bir grup kasta aktivasyon ortaya çıkarken, diğer gurup kaslarda inhibisyonların görülmesi nedeni ile bu uykuya paradoksikal uyku da denilmektedir.

İlk REM periyodundan sonra bu periyotlarda kalma süreleri uzuyor iken; REM ler arası süreler ise giderek kısalmaktadır. İlk 1 saatlik dönemde 5-10 dakika kadar süren kısa REM ve yavaş dalga uykusu birbirini izlemekte, ikinci dönemde total uyku zamanının yarısını, 3 ve 4. dönemlerde yaklaşık %15'ini kapsamaktadır. Uykunun ilk yarısında en derin 3. ve 4. fazlar ortaya çıkar, ikinci yarıda bu derinlik kaybolur ve kalp hızı düşer, kan basıncı %10-30 kadar düşer, bazal metabolizma düşer, ısı regülasyonu zayıflar, kas tonusu azalır. Parasempatik sistem hakim ve kişi çok uykulu ise REM dilimleri kısalırken, uykunun ilk yarısındaki dinlenme dönemini takiben REM süreleri giderek uzamaktadır.

Rem uykusu beynin, kişinin çevresindekilerden haberdar olmasını ve uyanmasını sağlamaya yönelik olmayan, bir aktivasyon gösterdiği uyku tipidir. Genellikle aktif düş görme ile birlikte. Düş görme karakteristiği olarak kalp

ve solunum hızı düzensizleşmektedir. Perifer kasların aşırı inhibisyonuna karşın, özellikle göz kaslarında ve orta kulak kaslarında düzensiz kasılmalar ortaya çıkar (53). Rüya fazında beyin ileri derecede hiperaktiftir. O₂ ve glukoz kullanımı artmaktadır (37). Rem döneminde toplam beyin metabolizmasının %20 kadar artış göstermesi, bu dönemde beyinde ileri derecede bir aktivasyon olduğunun diğer bir kanıtıdır. EEG de dikkatli uyanıklığa benzer β tipi dalgalar gözlenmektedir. Bu uyku döneminin kabaca serebral miyelinizasyona paralel olarak, sinir sistemi gelişiminde önemli bir role sahip olduğu iddia edilmektedir.

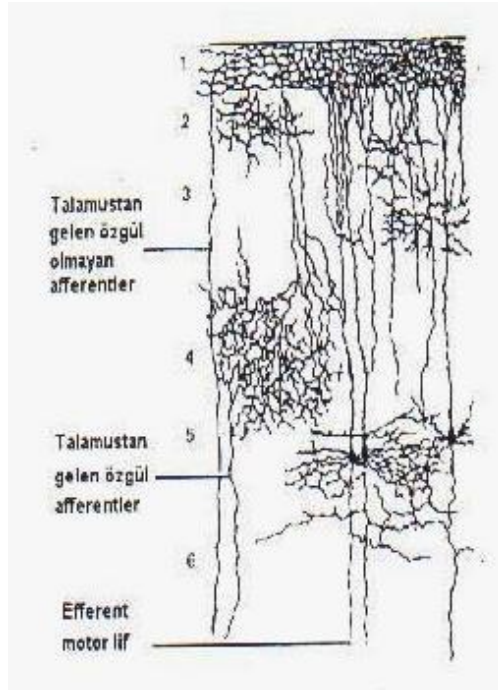
UYKU İLE İLGİLİ BEYİN BÖLGELERİ

Serebral korteksin özgül bazı noktalarına çeşitli duyuşal yolların durak yapan uyarıları gelmektedir. Bunlar, tek tek duyuların algılanması ve lokalizasyonlarından sorumlu, 3-4 nörondan oluşan zincirler üzerinden geçen uyarılardır. Bu uyarılar kollataraller yoluyla beyin sapı retikuler formasyonundaki retiküler aktive edici sistem (RAS)'e de giderek, algılama, bilinç, dikkat durumlarını oluştururlar. Beyinde bunların dışındaki sistemler ise uyuklama ve uykudan sorumludurlar (24).

Retiküler formasyon, karmaşık ve birbiri içine geçmiş ağlar halinde düzenlenmiş kümelerden oluşan medulla ve orta beyin orta iç bölümündeki küçük nöron guruplarını kapsar. Bu bölgede RAS dışında serotoninerjik, noradrenerjik ve adrenerjik sinirlerin gövde ve lifleri bulunmaktadır. Buna bağlı olarak kan basıncı, kalp hızı ve solunum düzenlenmesi ile ilgili alanlar buradadır. Bazı inen lifler omurilikte duyuşal yollarda iletimi inhibe etmektedir.

Bazı retiküler alanlardan çıkan lifler gerilme refleks ayarlanması ile ilgilidir. RAS'a çıkan duyuşal traktuslardan gelen uzun kollatarallerin yanısıra, trigeminal, işitme, görme ve koku algı sistemlerinden kollataraller gelmektedir. RAS'ın bir parçası intralaminar ve bununla ilgili talamik çekirdeklerde sonlanıp, buradan neokorteksin tamamına yansımaktadır (24) .

Talamus, epitalamus, ventral talamus ve dorsal talamustan olmak üzere üç bölüme ayrılır. Ventral talamusun yansıma işlevleri bilinmez iken, epitalamus olfaktor sistem ile ilişkilidir. Dorsal talamus ise neokorteksin tümüne yansıyan orta hat ve intralaminar çekirdekler içermekte ve bunlara RAS üzerinden uyarılar gelmektedir. Burada retikuler aktivasyonun dikkatli hale getirici etkisinden sorumlu uyarılar durak yapmaktadır.



Şekil 3. Kortikal Yapı (24).

Neokorteks, 6 katman halinde olup, buradaki nöronlar kortikal yüzeye ulaşabilen ve dikey dendrit ağaçları bulunan piramidal hücrelerden oluşmaktadır. Aksonları, geri dönen ve dendrit ağaçlarının yüzeyel bölümleri ile sinaps yapan rekürren kollataraller verir. RAS'tan gelen afferentler 1-4. katlara dağılmaktadırlar.

Yavaş dalga uykusu, yukarı tırmanan retiküler sistem ile iletilen desenkronizasyon aktivitesinin senkronize edici alanlar tarafından aktif olarak ortadan kaldırılması ile oluşmaktadır.

Beyinde yavaş dalga oluşturan, üç senkronize alan bulunur (24).

1. **Diensefalik Alan** : Posterior hipotalamus ve anterior talamik nukleuslar düşük frekansla uyarıldığında (8 Hz) uyku oluşmakta, yüksek frekansta uykudan uyanılmaktadır. Özellikle hipotalamik alanlarda suprakiazmatik nukleusun çevreden gelen sirkadiyen uyarılar olmasa bile, uyku-uyanıklık dahil tüm ritimleri kontrol ettiği kabul edilmektedir. Lezyonları ritmi bozmaktadır (34, 48, 67).

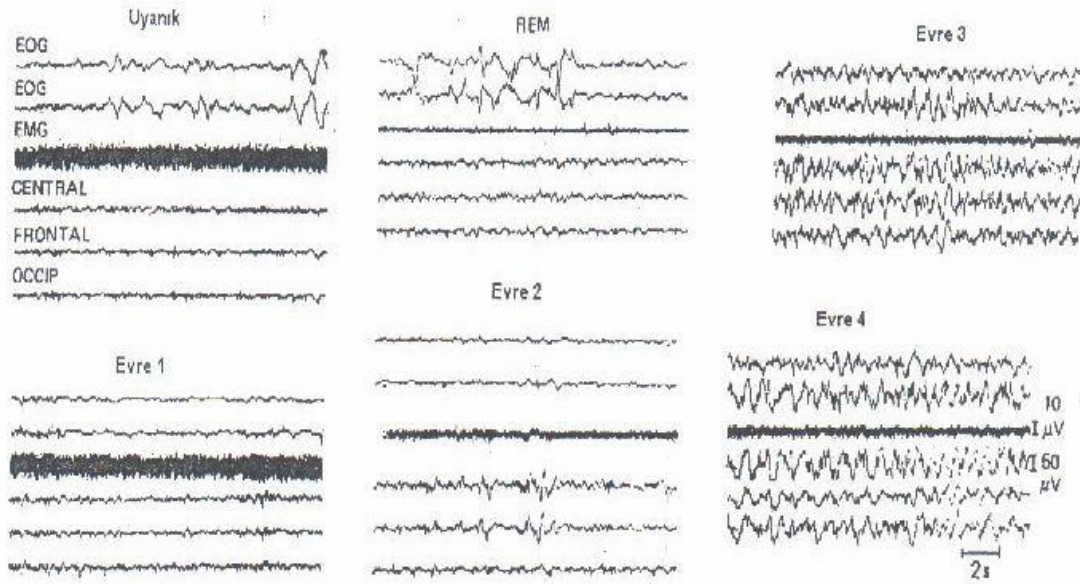
2. **Meduller Alan** : Traktus Solitarius nukleusunun düşük frekanslı uyarılması uyku oluşturmaktadır. Bu alanın anestezisi veya soğutulması uyuyan kedilerin aniden uyanmasına yol açmaktadır (58,59).

3. **Bazal Ön Beyin Alanı**: Preoptik alan ve Brokanın diagonal alanını kapsamaktadır. Normal uyku oluşumunda bazal ön beyin alanının uykudaki etkinliği tam olarak bilinmemesine rağmen, önemli rol oynamakta olduğu düşünülmektedir (37,24).

Adrenerjik ve serotonerjik nöronların uyanıklığa katkıda bulunduğu, serotonin agonistlerinin uykuyu baskıladığı; antagonistlerinin ise yavaş dalga uykusunu arttırdığı bilinmektedir. Serotonin ve katekolamin depolarını boşaltan reserpin'in yavaş dalga uykusu ve REM'de oluşan hipotoniyi ve PGO diken aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (37,24).

Hipotalamus'un medial optik alanında PG D₂ salınımı yavaş dalga ve REM uykusunu artırırken; PG E₂ salınımı uyanıklığa yol açmaktadır. Bunlarla birlikte birçok araştırmacı uyku ile ilgili özel bir peptidin varlığından söz etmektedirler (24).

REM uykusunun oluşumunda uykuyu oluşturan uyarılar, ponsun lateral tegmentumundan kaynaklanır. Bu dikensi uyarılar, kolinerjik deşarjlara bağlıdır (37,73).



Şekil 4. Uyku Evrelerinde Kas Aktivitesi (24).

Burada bulunan trigeminal fasial ve vestibulokohlear sinirlerin nükleuslarından başlayan kolinerjik deşajlar talamusta korpus genikulatum lateraleye, buradan oksipital ve temporal kortekslere gitmektedir. Bu yola pontin-genikulo-oksipital yol (PGO) denilir.

Patlamalar tarzındaki deşajlar, rüya görmeyi oluştururken; bir yandan da retiküler formasyonda bulbo retiküler inhibitorik alanı aktive ederek, buranın medulla spinalis motor noronları üzerine inhibisyon yapmasını sağlar. Böylece REM de kas tonusu ileri derecede azalır (37,29, 41,60,64).

Uykuda REM ve nREM dönemleri birbirinden ayrı evreler gibi görünmesine karşın, REM'e ait bazı bulguların zaman zaman REM dışı zamanlarda görülmesi örneğin; penil ereksiyonların REM yoksunluğunda yavaş dalga uykusunda da görülmesi (58,59) , her iki evrenin de çeşitli mekanizmaları etkisiyle, tek bir mekanizma ile kontrol edilmediğini gösterir (11).

Bremer, 1930 larda Mezensefalonun inferior ve superior kollikulusları arasından bir kesi yapmış ve izole ön beyni uyaracak bir duyusal impuls kalmadığı için, hayvanın sürekli uyuduğunu göstermiş, sonradan bu kesiyi bulbus ile medulla spinalis arasından yaptığında hayvanın normal uyku ve uyanıklık fazlarını yaşadığını göstermiştir. Yine Maruzzi ve Magoun 1950' lerde, beyin kesisinin ponsun orta seviyesinden yapılması halinde alt seviyelerden retikuler aktive edici sistemi (RAS) inhibe edici uyarılar gelmediği için, deney hayvanlarının uykuya dalamadığını göstermişlerdir (37).

Sonraki yıllarda yapılan diğer bazı çalışmalarda, beynin midpontil düzeyinin altında, beynin diğer alanlarını inhibe ederek uykuya yol açan bazı inhibitör merkez yada merkezlerin varlığının saptanması üzerine, uykunun olasılıkla inhibitör süreçlerin aktivasyonu sonucu ortaya çıktığı görüşü ağırlık kazanmıştır (24).

Uyku oluşumuna yol açan en belirgin uyarı alanı; ponsun alt yarısı ve medullada yer alan rafe çekirdekleri olup; serotonin salgılayan bu nöronlar retiküler formasyon, talamus, neokorteks, hipotalamus ve limbik sistemin bir çok alanına yansımaktadır. Bu çekirdeklerin tamamen tahrip edilmesi kedilerde 3-4 gün süren tam bir uykusuzluk yaratmakta ve bunu tamamı yavaş dalga uykusundan oluşan bir uyku izlemektedir (58,59) . Buna göre retikuler formasyonda ponsun orta seviyesinin üstünde kalan pons ve mezensefalon alanlarının uyarılması ile hayvanın uyandığı, mid pontil seviyenin altında kalan alanın uyarılması ile uykunun oluştuğu pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (37). Rafe çekirdekleri serotonerjik nöronları ve lokus seroleus noradrenerjik nöronları nREM'de aktif olup REM'i inhibe ederken; REM'de tamamen inaktiftir. REM-nREM döngüsünde inhibitörük adrenerjik ve serotonerjik lifler ile eksitatorik kolinerjik nöronlar arası resiprokal bir etkileşimin kontrolü gerçekleştirdiği düşünülmektedir (49).

Optik kiyazmadan ayrılan ve suprakiyazmatik nukleuslara gelen nöronların, buradan retiküler formasyonun uyku ile ilgili devrelerini etkilediği düşünülmekte, fakat bunun nasıl olduğu kesin bilinmemektedir. Bu arada bulboretikuler inhibitorik alan aktive olarak RAS'ı inhibe etmekle birlikte, aynı

zamanda medulla spinalis motor noronlarına inen retikulo spinal yollarla kas tonusunu da ileri derecede inhibe etmektedir (24).

Uyku oluşturan diğer bir yol; N.Vagus ve N. Glossofaringeus yoluyla beyine ulaşan visseral duysal uyarıların medulla ve ponsun duysal alanı olan nukleus traktus solitarius'taki bazı alanları uyarmaları, daha sonra ise serotoninerjik rafe çekirdeklerini etkinleştirmeleridir.

Serotonin uyku doğurucu bir madde olarak düşünölmekle birlikte, serotonin konsantrasyonunun uyanıklıkta uykuya göre daha yüksek olması, serotonin agonistlerinin uykuyu kaçırdığının saptanması, ritanserin (para kloro fenil alanin) gibi antagonistlerin ise uykusuzluk yerine uykuya yol açtığıının gösterilmesi, uyku oluşumunda serotonin dışında başka mekanizmaların da etkin olabileceğini ortaya koymuştur (24,31,37) . Deney hayvanlarının beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunan "muramil peptitler" (birkaç mikrogramı ile), PG D2, "δ- sleep inducing factor" ile, IL-1, interferonlar, "tumor necrosing factor", lipopolisakkaridler ve VIP gibi maddeler ile uyuyan hayvanların kanından elde edilen "nonapeptid" gibi faktörlerin uyku üzerinde etkin oldukları belirlenmiştir (24,31,37).

Rafe çekirdekleri, hipotalamusun suprakiazmatik bölümü, ön hipotalamus gibi uyku oluşturan merkezlerin inhibisyonları ya da lezyonlarında ise aşırı uykusuzluklar ya da uzun süreli uyanıklık halleri ortaya çıkmaktadır. Uyku merkezlerini aktive eden, yukarıda sayılan somnojenik maddelerin çoğu pirojenik ve immunoaktif olduğundan, uykunun enfeksiyonlarda restoratif bir etkisinin de olabileceği düşünölmektedir.

Uyanma periferden gelen uyarılarla olabildiği gibi, superior temporal ganglion, orbitofrontal korteks, RAS'e inen eksitatör kortikofugal yollarla interkortikal olarak da uyanıldığı saptanmıştır (37). Çoğunlukla normal uyanma REM döneminde gerçekleşirken, duyuusal uyarılarla uyanma REM'de yavaş dalga uykusuna göre daha zor olmaktadır (24,31).

Uykunun Fizyolojik Etkileri

Uyku başlıca iki tipte fizyolojik etkiye sahiptir. a) Sinir sisteminin kendisi üzerine etkiler. b) Vücudun diğer yapıları üzerine olan etkiler. Uyku-uyanıklık döngüsünün ortadan kalkması (uykusuz kalma) , beynin altındaki herhangi bir seviyede ne organik bir zarara, ne de işlevsel bir bozukluğa yol açmaz iken, santral sinir sistemi işlevlerini kesin bir biçimde etkilemektedir. Uzun süren uykusuzluklarda zihinde ilerleyici işlev bozukluğu, irritabilite, anormal davranış özellikleri ortaya çıkar. Uyanıklıkta sempatik sistem aktivasyonu artar. İskelet kaslarına ulaşan sinirsel uyarıların sayısı kas tonusunu şiddetlendirir, yavaş dalga uykusunda ise sempatik aktivite azalır ve parasempatik aktivite artışı ile sakin bir uyku ortaya çıkar. Kan basıncı düşer, nabız sayısı azalır, cilt damarları gevşer, kaslar gevşer, gastroentestinal etkinlik artar, bazal metabolizma hızı ~%10-30 azalır. Bu nedenle uyku santral sinir sistemi için restoratif bir süreç oluşturur ve beyni normal etkinlik düzeyine hazırlar (24,31).

UYKU YOKSUNLUĞU

Uykudan yoksun kalma durumunda nörolojik, otonomik, biyokimyasal, immunolojik bazı değişiklikleri araştıran çeşitli araştırmalar yapılmış bulunmaktadış.

Uykudan yoksun kalındığında oluşan nörolojik değişikliklerin, çok az ve yeterli uyku alındığında hemen geri döndüğü gösterilmiştir. Çok uzun süre (~205 saat) uykusuz bırakılma durumunda hafif nistagmus, elde tremor, konuşmada intermittant bozulma ve pitozis saptanmış (40,27), daha uzun süreli yoksunluk çalışmalarında kornea refleksinin yavaşladığı, öğürme ve derin tendon reflekslerinin hiperaktifleştiği ve ağrıya duyarlılığın arttığı belirlenmiş, ancak sözü edilen değişikliklerin dinlendirici bir uyku ile normale döndüğü saptanmıştır (66).

Uyku yoksunluğu ile ilgili çeşitli çalışmalarda karakteristik EEG dalgalarında değişiklikler saptanmış ve uykuda normalde görülen alfa dalgalarında doğrusal bir şekilde azalma gözlenmiştir. Alfa dalgaları 24 saatlik uyku yoksunluğundan sonra 10 sn kadar gözlenebilirken, 72 saatlik yoksunluktan sonra 4-6 sn.,120 saatlik yoksunluktan sonra ise 1-3 sn. gözlenebilmiştir (65). Bir başka çalışmada ise 115 saat kadar yoksun kalındıktan sonra hiç alfa aktivitesi gösterilememiştir (51).

Uyku yoksunluğunda otonomik değişiklik çok az oluşmaktadır. Bazı çalışmalarda ise hiç değişiklik meydana gelmediği bildirilmiştir. Diğer çalışmalarda ise, sistolik ve diastolik kan basınçlarında artma veya azalma, kalp ritminde, solunum ritminde ve tonik ve fazik deri direncinde azalmalar

bildirilmiştir (50). Araştırmacılar insanlarda uyku yoksunluğu sırasında vücut sıcaklığında 0.3 ile 0.4 °C lik düşüşler saptamışlardır (51), aynı şekilde ratlarda da uyku yoksunluğundan sonra metabolik düzeyde artma, buna karşın kilo kaybı ve termoregülasyonda bozulmalar görülmektedir (22). Beyin metabolik düzeyinde ise önemli bir değişiklik saptanmamıştır (24).

Yapılan biyokimyasal çalışmalarda uzun süreli uyku yoksunluğunda melatonin hormonunda artış, sürekli uyanık kalmaya bağlı artan enerji gereksinimi nedeniyle tiroid hormonunda artış, buna karşın sirkadien ritimleri uykuya bağlı olan noradrenalin, prolaktin ve büyüme hormonlarında periyodik salınma bozuklukları gösterilmiştir (1, 8, 54).

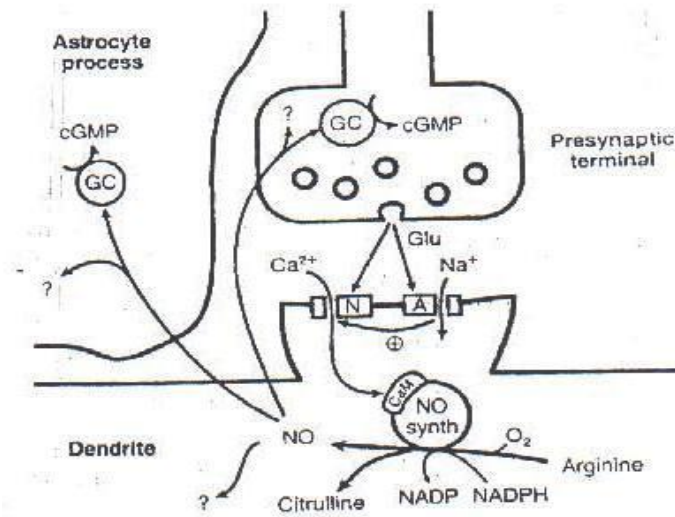
İmmunite konusunda yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda önceden immunize edilmiş hayvanların uyku yoksunluğu sırasında hiç immunize edilmemiş gibi davrandıkları, yine yoksunluk sonrası “Naturel Killer Hücre Aktivitesinin” azaldığını düşündürecek bulgular saptanmıştır (14,66). Farelerde yapılan bir çalışmada 5 günlük uyku yoksunluğunun yara direncini azalttığı ve yara iyileşmesini geciktirdiği gösterilmiştir (27).

II . 2 . NİTRİK OKSİT (NO)

Nitrik oksit (NO), guanilat siklaz ve hemoglobin gibi demirli kan proteinleri (ferröz hemoproteinler) ile reaksiyona yönelik yüksek affinite gösteren, gaz karakterli ve küçük bir paramagnetik radikaldir (3) . Daha önceleri çevre kirletici olarak bilinen, kanserojen olduğundan kuşku edilen, asit yağmurlarının bir habercisi olarak düşünülen NO'nun son zamanlarda yapılan çalışmalar ile

vücutta norolojik, fizyolojik, immunolojik birçok role sahip olduğu ve vücudun aynı anda birçok yerinde (örneğin; kardiyovasküler sistemde endotelial dokuda ve santral sinir sistemi v.b.) bulunduğu öğrenilmesi sonucu önemi artmıştır (28,42) .

Nitrik oksitin, NO sentetaz aracılığı ile L-Argininden sentezlenen bir hücre içi haberci olup, birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu invivo olarak gösterilmiştir. Bu çalışmalar ile; vasomotor düzenlemede vasküler endotel tarafından kullanıldığı, nonkolinerjik nonadrenerjik sinir liflerinde bir nörotransmitter olduğu, merkezi sinir sisteminde postsinaptik olarak salınarak; glutamat reseptörlerini aktive ettiği, post sinaptik uçtan uzaktaki alanlara diffüze olarak, presinaptik uçtaki guanilat siklazı ve çevreleyen glial ve sinirsel elementleri aktive ettiği, retrograd olarak transmisyonu ile uzun süreli potansiyasyon (LTP) ve uzun süreli depresyon (LTD) mekanizmaları ile sinaptik plastisitede rol aldığı gösterilmiştir (35) .



Şekil 5. Sinapta NO (25).

1980'li yılların sonlarında araştırmacılar önce, NO'nun mikroorganizmalara ve kanser hücrelerine karşı makrofajlarda beliren sitotoksik aktiviteye yardım ettiğini göstermişlerdir (28,31) . Benzer çalışmalar sonunda makrofajların sitokinler ya da endotoksinler ile tetiklenen aktivitesinin NO sentaz (NOs) adı verilmiş olan dioksijenaz enziminin aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir (28) . NOs, L-argininin L-sitrüline dönüşmesi ile NO sentezlenmesini sağlayan enzimdir. Bu reaksiyon sırasında L-argininin ortamdan uzaklaştırılması veya ortama N-monometil-L-arginin (L-NMMA) eklenmesi ile NOs inhibe edilir. Bu inhibisyon ile NO sentezi inhibitörlerinin, makrofajların sitotoksik aktivitesini bloke ettiği gösterilmiştir (28,57) . Bu nitelikler ile birlikte, çok kısa bir sürede oksijen ile reaksiyona girerek, yıkılması ve bu nedenle yarılanma ömrünün birkaç saniye kadar çok kısa olmasından ötürü NO, küçük molekülü ve hızlı etkili nörotransmitterler içinde yeni bir grup olarak kabul edilmektedir (31) .

NİTRİK OKSİT BİYOKİMYASI (İnorganik Kimyası)

NO, diğer substanslarla seçici olmayan bir reaktifliği olan, eşlenmemiş elektrona sahip bir radikaldir. NO diğer birçok radikal gibi anstabil değildir (3,12) . Kolayca oksijen, süperoksit radikali, hidrojen peroksit, peroksinitrit (ONOO^-) ve NO_2/NO_3 ile reaksiyona girmektedir (3,33) . Partisyon katsayısının yüksek oluşu ile anlaşıldığı gibi suda çok zayıf solubl halde bulunur ve gaz halde olmaya yöneliktir. Biyolojik haberci (mesenger) olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Boyutunun küçük oluşu hücreye girişini kolaylaştırmaktadır. Hücreye girerken

önce, birçok sitokrom ve oksidaz fonksiyonları için çok önemli olan kararsız metallere Fe, Cu, Co ve Mn ile çabucak bağlanır (3,33) .

NO, redoks çevresine bağlı olarak ,

nitrozoksit oluşumunda (NO \longrightarrow N₂O) bir oksidan iken;

NO₂ \longrightarrow NO reaksiyonunda ise indirgeyici ajan olarak fonksiyon görmektedir.

NO'nun da içinde yer aldığı küçük moleküllü, hızlı etkili nörotransmitterler genelde 4 ayrı grupta ele alınmaktadır (31) .

I.Grup : Asetilkolin.

II.Grup : Aminler ; Norepinefrin, Epinefrin, Dopamin, Histamin, Serotonin.

III.Grup : Amino Asitler ; GABA, Glisin, Glutamat, Aspartat.

IV.Grup : Nitrik Oksit (NO) (31).

Bu transmitterlerden ilk üç grup presinaptik sinir son ucu sitozolünde sürekli olarak sentezlenip, veziküllerde depolanırlar. Veziküller, her sinaps aralığına boşalımdan sonra implante oldukları yerden hücre içine çekilerek ya da koparak ayrılmakta ve yeniden vezikül oluşturmaktadır. Buna karşın nitrik oksit ise, presinaptik uçtaki veziküllerde önceden sentezlenmiş olarak bulunmaz. Veziküllerden serbestlenmeyip, gerek olduğunda glutamat reseptörlerini aktive etmek üzere, postsinaptik uçta sentezlenerek, birkaç saniye içinde postsinaptik uçtan dışarı salınır. Boşalım sonrası komşu post sinaptik uca olduğu gibi diğer postsinaptik sinir uçlarına da diffüze olmaktadır. Bu nedenle de diğer küçük moleküllü nörotransmitterlerden farklıdır.

Postsinaptik uçlarda membran potansiyelini fazla değiştirmeden, sinir uyarılabilirliğini saniyeler, dakikalar hatta daha uzun süre için sürdüren hücre içi metabolik fonksiyonları değiştirmektedir. Bu retrograt tip transmisyon, long term potansiyasyon (LTP) ve long term depresyon (LTD) mekanizmaları aracılığı ile sinaptik plastisiteye katkıda bulunmakta, postsinaptik sinir uçlarının presinaptik uçlarla uzun süreli etkileşimini sağlamaktadır (36,25,70,71) .

NO, genellikle uzun süreli davranış ve bellekten sorumlu beyin alanlarında görölmektedir. Normal koşullar altında beyinde NO sentaz tarafından oluşturulur. NO sentaz, kolin asetil transferaz ile brokanın diagonal bandında kolokalizedir (36, 5) .

NO, sinir hücresi dışında değişik tipte biręok hücrede sentezlenmektedir. NO ile kontrol edilen başlıca biyolojik reaksiyonlar; Vazodilatasyon ve normal vasküler tonusun düzenlenmesi, platelet agregasyonunun inhibe edilmesi, düz kas proliferasyonu, nöral transmisyon, sitostazis olarak sayılabilir (3,52,17,35,72,28,36) . Çok yüksek düzeyde NO nun endotoksik çok ile ilişkili hipotansiyon oluşturduğu, doku hasarında inflamatuvar yanıtı oluşturduğu; eksikliğinde pulmoner hipertansiyon gelişmesine neden olabildiği ve bu tip hipertansiyonda tedavide yararlı olduğu gösterilmiştir (42) .

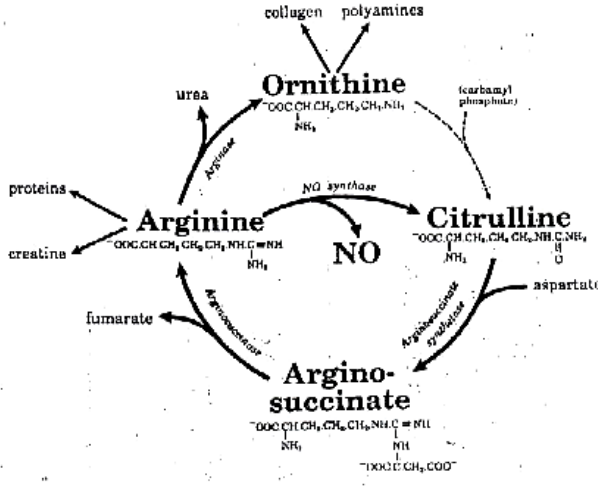
Memeli hücrelerinde, NO sentezini sağlayan NO sentaz'ın iki temel tipi vardır. Bunlar ;

a. Konstitütif form "Constitutive Form" : (Ca^{++} ve kalmodulin ile regüle edilebilen şekil) NO ya da "endotelial deriveting releasing factor (EDRF)" nin, Ca^{++} bağımlı olarak hızlı ve geçici üretiminden sorumludur.

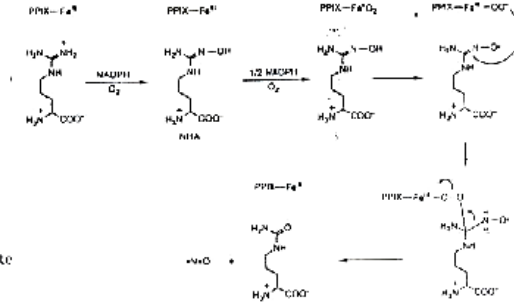
b. İndusibl form "Inducible Form": İtihap hücrelerinde sitokin veya lipopolisakkarit uyarımından sonra Ca^{++} 'dan bağımsız, yavaş üretimden sorumludur.

Konstitutif (yapısal) tip NOs, kalmodulin ile gevşek olarak bağlanmakta ve sitozolik Ca^{++} 'un geçici yükselmesi, kalmodulin ve NOs arasında sıkı ilişkiyi uyararak NO oluşmasını sağlamaktadır. İndusibl tipte ise, enzim aktivitesi Ca^{++} ile modülasyona uygun olmadığı için, normal koşullarda kalmodulin ile sıkı çiftler oluşturmaktadır (3,52) . NADPH bir kosubstrat iken, FMN, FAD, hem ve tetrahidrobiopterin birer kofaktördür (3,52) . NOs, serebellum, endotel ve makrofajlardan 1994'lerde klonlanmış ve aminoasit diziliş sırası doğrulanmıştır (75) .

Hem konstitutif hem de indusibl NOs, etkin olabilmek için, yardımcı olarak NADPH+ ve O_2 ' ye gereksinim duymaktadır. 1eq NADPH ve O_2 varlığında L-Arginin, elektron (e^-) sağlamak üzere, sitokrom P-450 katalizörlüğünde N-hidroksilasyona uğrar. Sonuçta reaksiyon sitrulin + NO şeklinde sonlanmaktadır. NO sentetaz, merkezi sinir sisteminde Glutamat ve glutamat reseptör alt tipi olan n-metil d- aspartat tarafından düzenlenen post sinaptik hücre içi Ca^{++} artışı ile aktif olmaktadır. İnhibisyonunda n-metil arginin ya da n- hidroksil l- arginin geri dönüşsüz inhibisyona yol açmaktadır.



Şekil 6. Nitrik Oksit sentezi (26).



Şekil 7. Nitrik Oksit sentezi (42).

No Toksikolojisi

NO ile çalışılırken çok dikkatli olunması gerekmektedir. Hava ile temasında O₂ ile karşılıklı reaksiyona girmekte ve kızıl-kahverengi bir gaz oluşmaktadır. Bu gaz, azot dioksidin bir dimerik formu olup, Merck İndeks' te " fırsatçı ve çok tehlikeli bir gaz" olarak tanımlanmaktadır (3, 52) . NO karışımının 25 ppm inhalasyonu pulmoner irritasyon için bir eşik sayılmaktadır (3,12,15). NO₂ 'nin yüksek dozu minimal irritasyon yaparken, birkaç gün sonra hemorajik pulmoner ödem ile sonuçlanabilir. 200 ppm'lik bir dozu ölüme neden olabilmektedir. Kişiler O₂ tedavisi, morfin veya steroid tedavisi sırasında destek tedavisi olarak nitrojen oksite maruz kalabilirler. Bu durumda dikkatli monitorize edilmelidirler (3, 12) . NO gaz tankları ile çalışılan yerlerin iyi havalanması, hatta gaz maskesi kullanımı önerilmektedir. Gaz kaçağını önlemek için NO'nun, potasyum permanganat içinden geçirilerek, köpürtülmesi gerekmektedir (3) .

L-Arginin, NO sentezinde öncül maddedir ancak, L-Argininin eksojen olarak eklenmesi NO sentezini uyarmamaktadır fakat, aşırı miktar (30 ila 300 kat) L-Arginin, L-NAME' in NO sentezi üzerindeki baskılayıcı etkisini tersine çevirmekte olmasına karşın, bu yüksek doz L-Argininin toksik etkisi ortaya çıkabilmektedir (3).

Uzun Süreli Potansiyasyon (LTP) “long term potentiation”

Kısa, birbiri ardına tekrarlayan presinaptik nöron aktivasyonu ile oluşmuş sinaptik iletme verilen yanıtın hızlı ve uzun süre kalıcı bir şekilde güçlendirilmesidir. Posttetanik potansiyasyona bezir, ancak ondan daha uzun sürer. Saatler hatta günlerce devam edebilir. Bu durum ise presinaptik uç yerine postsinaptik uçta hücre içi Ca^{2+} artışına bağlıdır. Bu sonuç, hippocampusta presinaptik uçtan salınan glutamat'ın, AMPA ve kainat reseptörleri ile etkileşimi sonucu gerçekleşmektedir. NMDA reseptörü hem transmitter hem de voltaj kanalı içeren çift kapılı bir kanaldır. Normalde NMDA reseptör kanalları Mg^{++} tarafından bloke edilir haldedir. Bu olayda glutamat reseptöre bağlanıp, membran depolarize olduğunda, NMDA reseptörünün Mg^{++} bloğu çözülmekte ve Ca^{++} , Na^{+} ile birlikte postsinaptik uca girmektedir. Bu blokaj birçok presinaptik ateşleme ile kuvvetli postsinaptik depolarizasyon ile çözülmektedir. Ca^{++} burada hem kalmodulin kinaz II hem de protein kinaz C yoluyla etki ederek, NO'ı aktive eder. Nitrik oksit ise hücre içi proteinlerin fosforilasyonunu değiştirir. Bunun sonucu olarak daha büyük EPSP lerin oluşmasına neden olur (31,24).

Uzun Süreli Depresyon (LTD) “long term depression”

Sinir son uçları 20 mV'dan daha küçük bir uyarı ile kısmen depolarize edildiğinde oluşmaktadır. Bu voltaj, NMDA reseptörlerini açan ve Ca^{++} 'un hücre içine girişine yol açan eşik değerdir. Fakat sinirlerin dinlenim potansiyeli yakınında veya altında kalmış sinaps etkinliğinin sinaps gücüne bir katkısı olmamaktadır. Böylece LTD'nin 20 mV'a kadar olan depolarizasyonlarda ortaya çıktığı düşünülmektedir (31,24) .

NİTRİK OKSİDİN UYKU YOKSUNLUĞU İLE İLİŞKİSİ

NO, merkezi sinir sisteminde geniş bir şekilde dağılmıştır. NO sentaz yoğunluğu, olfaktor bulbus ve hipotalamus da NREM uykusu düzenlenmesi sırasında; mezensefalik ve pontin tegmental alanlarında REM uykusu sırasında belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. NO sentetazın inhibisyonu bazal önbeyinden Ach salınımını azaltmaktadır. Bu bulgu ise, nitrik oksitin bazal önbeyinde kolinerjik yapıların uyku düzenlenmesindeki rolünü etkileyebildiğini göstermektedir. NO yapımı, başlıca IL-1, tümör nekrozing faktör gibi immuno aktif ve endojen uyku geliştirici (somnojenik) maddeleri de uyarmaktadır. Böylelikle uyku düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Spontan uyku sırasında I.V. olarak düşük doz L-nitro arginin metil esteri (L-NAME) uygulamasının uykuyu çok hafif derecelerde azaltıcı etki ettiği, buna karşın yüksek doz uygulamanın REM ve n-REM uykuyu önemli ölçüde azalttığı 6 saatlik kayıtlı takiple saptanmıştır. nREM süresi L-NAME enjeksiyonundan 1 saat sonra kontrol grubunun yarısı kadar bir değere

düşmüş ve sonra hızla geri dönerek 6 saatlik kayıt sonrasında eski değerine dönmüştür (36) . REM uykusu ise, çoğunlukla enjeksiyondan sonraki ilk 4 saatte tamamen ortadan kalkmış iken, intra serebroventriküler uygulama sonrası doz miktarına bağlı olarak artan bir şekilde REM ve N-REM uykunun baskılandığı ve bu arada beyin sıcaklığının 0.3 ila 0.5 °C artış gösterdiği saptanmıştır. Bu baskılanmada özellikle REM uykunun daha kısa süre içinde etkilendiği, hatta ortadan kalkabildiği saptanmıştır.

Somnojenik bir madde olan IL-1 ile oluşturulan uykuda enjeksiyon sonrası n-REM de artma, REM uykuda ise azalma ortaya çıkmış, beyin sıcaklığında ~1.2°C artış saptanmasına karşın, kombine olarak IL-1 ve ardından L-NAME uygulaması sonrasında n-REM de anlamlı bir azalma olmazken, REM de 6 saatlik deney boyunca süren anlamlı bir şekilde azalma saptanmıştır. Beyin sıcaklığında ise 0.2-0.3 °C artış meydana gelmiştir (36) . Deney sırasında kan basıncında enjeksiyondan 3-5 dakika sonra küçük ama anlamlı sayılan ~8-9 mmHg kadar sistolik ve diastolik basınç artışları meydana gelmiş, bu artışlar eski değerlerine 7-8 dk. da dönmüştür. Sonuçta, bir NO sentetaz inhibitörü olan L-NAME ile endojen NO yapımının bloke edilmesinin NREM ve REM uykularını baskıladığı ortaya konmuştur. L-NAME ancak yüksek dozlarda sistemik olarak merkezi sinir sistemine girebilmekte ve NO sentetazı geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir (36). İnhibisyondan 5-6 saat sonra uyku tekrar normale dönebilmektedir.

Normal koşullarda NO, nöronlarda ve endotelial hücrelerde bulunan NO sentetaz enzimi ile beyinde oluşturulmaktadır. L-NAME' in uyku regülasyonu

üzerine olan etkisi, başlıca NO sentetaz yoğunluğu gösteren yerler olan bazal önbeyin, mezensefalik ve pontin tegmental alanlardır. Ayrıca “Broca alanı” da NO sentaz ile birlikte kolin asetil transferaz içerir. NO, bazal önbeyinden Ach salınımını uyarmakta, buradaki kolinerjik mekanizmalar ise nREM ve REM uykunun meydana gelmesinde jeneratör işlevi görmektedirler. Bu yapıda NO anahtar rol üstlenmekte ve NO nun bloke edilmesi beynin sözü edilen somnojenik alanlarının normal fonksiyonunu bozarak, uyku yoksunluğuna yol açmaktadır.

NİTRİK OKSİDİN ÖLÇÜMÜ

Biyolojik ürünlerde NO'nun saptanması, çoğunlukla nanomolar dan daha küçük (\leq nmol) değerlerde bulunması ve labilitesinin O₂ varlığında değişmesi nedenleriyle, oldukça güçtür. Bu değişkenlik medyuma süperoksit dismutaz eklenerek düzeltilebilmektedir (3). NO çeşitli yöntemler ile ölçümlenebilmektedir. Kemilüminesans reaksiyonu yöntemiyle, asidifikasyonlu olarak (3,55,61,18) veya asidifikasyonsuz olarak ölçülebilir (3,46). Sülfanilik asid assayinde diazotizasyon ile ölçülebilir (3,35,74,43,68). Elektron paramagnetik rezonans ile nitrozo veya hemoglobin tuzakları ile ölçülebilir (3,30) ya da spektrofotometrik olarak methemoglobine indirgenmesinin dönüşümünün saptanması ile ölçümlenebilmektedir (3,35,38).

Tüm bu yöntemlerde daha önce de sayılan 3 belirleme stratejisinden biri kullanılmaktadır. Bunlar; kimyasal NO tuzakları ve nitrozil hemglobin (NO-Hb) ölçümü, ya methemoglobine indirgenmesinin değişiminin ölçümü ya da

kemilüminesans ile ozonun NO ile karşılıklı etkileşimi ile ortaya çıkan ışığın emisyonunun saptanması (3).

NO belirlenmesini arttırmaya yönelik olarak sodyum ya da potasyum iyodid (KI,Nal), azaltıcı ajan olarak kullanılır. Aoki ve arkadaşları kemilüminesansta kullanılan KI' ün değişen konsantrasyonlarının nitritten NO oluşumunun gösterilmesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında; güçlü azaltıcı koşullar altında alınan örneklerde kemilüminesansın yüksek NO düzeyleri ile sonuçlandığını, nitritten NO oluşumunun kullanılan KI dozu ile doğru orantılı olduğunu; plato seviyesine 1M.lık KI konsantrasyonunda ulaşıldığını göstermişlerdir (3,2). Sonuçta nitrit NO dönüşümünün derecesinde değişkenliği azaltmak için KI'ün 1 M. dozda kullanılmasını salık vermektedirler.

Kemilüminesans yöntemi, bir atmosferik kirletici olan NO'nun ölçülmesi için geliştirilmiştir (3,76). Bu yöntemde NO'nun belirlenmesi, ozonun NO ile karşılıklı etkileşiminin ortaya çıkardığı ışığın gözlenmesine dayalıdır. Lüminesans, NO düzeyi ile doğru orantılı bir duyarlı fotomultiplayer tüp (PMT) ile ölçülmektedir. NO'nun sıvı fazda ölçümüne göre gaz fazda ölçümünün avantajlı olması nedeniyle, eğer örnek sıvı ise NO köpürtülerek ya da kabarcık oluşturularak gaz faza dönüştürülmekte ve gaz fazda ölçülmektedir (4). Bu dönüşüm vakum altında inert bir gaz ile gerçekleştirilmektedir. Sıvının üzerinde bulunan gaz kafa boşluğu "head space" adını alır. Chung ve Fung (1990) 'ın çalışmalarında NO'nun gaz halde varlığını sürdürmeye yatkın olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada fizyolojik buffer içine enjekte edilen NO'nun %83 oranında çok kısa süre içinde kafa boşluğunda ortaya çıkmakta olduğu

gösterilmiştir. Gaz ya da sıvı örnek, önceden 3 mmHg ile O₂'i boşaltılmış olan bir cam arındırma bölümü ya da odacığına enjekte edilmekte ve NO burada stabilize edilmektedir (4,46). Kemilüminesansta NO ölçümü için bazı parçalara gereksinim bulunmaktadır. PMT ve ozon jeneratöründen başka NO elde edilmesi için örnek odacığı gerekmektedir. Üç firma (Sievers, Boulder ve Colo) tarafından üretilmekte olan cam arındırıcı (Purge vessel), sıvı örneklerin arındırılmasını sağlar. Bu arındırıcı bölüm bir inert gazın örneğe dağılmasını sağlamak için bir adet giriş hattına, gazı kafa boşluğundaki reaksiyon bölümüne taşımak için çıkış hattına sahiptir. Helyum gibi bir inert gaz ile (12 m/dak*60 s) örnek köpürtülerek NO sıvıdan gaz faza döndürülmüş olur. Aoki, sıvı örnekten arındırma değerinin NO ölçümünde önemli bir saptama olduğunu göstermiştir (2,3) . Dakikada 8 ml' den daha düşük değerde bir akış, NO'nun arındırılmasının tamamlanamaması sonucu, eksik değerlendirmeye neden olmaktadır. Önce arındırma ya da temizleme tamamlanır, gaz örnek bir iğne valf üzerinden reaksiyon bölümüne gönderilir. İğne (needle) valf açılış değeri, küçük bir tepe (spike) gibi oluşacak NO sinyaline ayarlanır. Ozon reaksiyon bölümünde soğutulmuş ve kırmızıya duyarlı fotomultiplayer tüp (PMT) önünde karıştırılır. Bu sırada köpüğün ya da kabarcıkların reaksiyon odacığına kaçmamasına dikkat edilir. Kaçan köpük veya kabarcıklar PMT duyarlılığını azaltmaktadır. Arındırma işlemi sırasında proteinli materyaller köpürmektedir. Bu nedenle albümin ya da kan içeren örnekler yöntemden yararlanımı sınırlamaktadır (3) .

Kalibrasyon

Fotomultiplier tüpün (PMT) kalibrasyonunda gaz fazda NO veya 20 ila 1000 pmol arasında çeşitli değerlerdeki sıvı solusyonları kullanılmaktadır. PMT'den alınan sinyalin çizdirilmesi ile NO dozu olarak bilinen bir kalibrasyon eğrisi elde edilmektedir. Bu eğri biyolojik örnekteki NO değerinin tahmin edilmesinde kullanılmaktadır.

Duyarlık Eşiti

Zafiriou ve Mc Farland, kemilüminesans yönteminin 10 -13 M NO'e duyarlı olduğunu göstermelerine karşın pek çok araştırıcı NO'nun belirlenmesi için duyarlılık eşitinin 20-50 pmol arasında olduğunu bulmuşlardır (4,55,76,13). Bazı yazarlar ise kemilüminesans ile NO eğrisinin 300 ila 3000 pmol arasındaki NO dozları ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir (3,46,30). Archer, NO konsantrasyonu ile kemil minesansa 20 ila 200 pmol arasında doğru orantılı ilişki bulunduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda ise doğru orantının görülmediğini saptamıştır.

 zg nl k

Kemil minesansın  zg nl ğ , ölçüm öncesi örneğin asitlendirilmesi veya KI veya NaI ile güçlü arındırıcılı koşullarda geri çekilmesine bağlıdır. Asidifikasyon ya da NaI'söz denendiğinde alınan sinyaller daha küçük olmaktadır. H₂S gibi bazı substanslar da kemil minesansa yol açabilir ancak bunlar ya kolayca gaz hale geçmemekte ya da biyolojik modellerde oluşmamaktadırlar. Detekte edilmesi için

molekölün ilkin cihazın kafa boşluğu bölümüne girmesi gerekmektedir. NO' nun yüksek düzeyde kafa boşluğuna girmeye eğilimi vardır. Oysa nitrit ya da nitrozotiyoller solusyon içinde kalabilirler.

Soğutulmuş Potomultiplayer Tüp (PMT)

PMT kırmızıya duyarlı ve ozon ile NO'nun karşılıklı etkileşiminden çıkan ışık emisyonunun 660 ila 900 nm' si arasında oluşmalıdır. Soğutma sinyalin ya da sesin oldukça yüksek olmasını sağlamaktadır.

Vakumlama

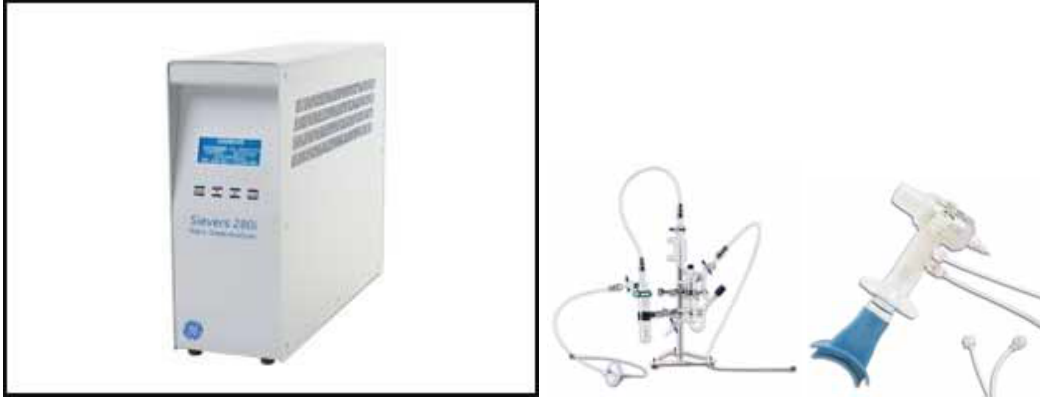
Oksijensiz solusyonlarda NO günlerce stabil kalabilirken, oksijen ile küçük kontaminasyonlar ya da termodinamik oransızlıklar ile büyük çapta bozulmalar başlamaktadır. Oksijen varlığında NO'nun geri alınmasında 8-20 dakikada kabaca %50 kadar azalma oluşmaktadır (3,76) . Bu nedenlerle örneklerin mutlaka O₂'den uzak tutulması gerekmektedir. Sıvı veya gaz örnekler “purge vessel” e enjekte edilirken, 3mmHg'lık PO₂'lık vakum nitrit veya nitrojen dioksite dönüşümü durdurmakta ya da yavaşlatmaktadır.

Nemin Etkisi

%100 nemli ortamda yapılan ölçümlerde NO ölçüm değeri %10-15 düşmektedir. Gaz örneklerin kuruluğu NO₂' i uzaklaştırılmış su buharı çıkışına yol açar.

Sievers 280 Model NO Analizörü (Sievers kullanım kitapçığı)

Ozon ile NO'nun kemilüminesans reaksiyonuna dayalı olarak ölçüm yapan en duyarlı ve en doğru sonucu veren bir cihazdır. Sievers Instruments tarafından ABD'de üretilmektedir. Cihaz gaz ve sıvı örneklerde NO ölçümü yapabilmektedir. Ekshalasyon havasında 200 milisaniye gibi kısa süre içinde, < 1 ppb düzeyinde duyarlı sonuç verebilmektedir.



Purge Vessel

Soluk Havası Kiti

Şekil 8. Çalışmada Kullanılan Sievers 280 Model NO Analizörü.

Sıvı örnek olarak plazma, perfüzyatlar, bronşial-alveoler lavaj materyalleri, BOS, ya da doku homojenatları analiz edilebilmektedir. Ekshalasyon havasında ölçüm sonuçlarını doğrudan NO düzeyi şeklinde verirken; sıvı örneklerde nitrit ya da nitrat şeklinde vermektedir. Sıvı örnek olarak birkaç ml. kullanılabileceği gibi birkaç mikrolitre de kullanılabilmekte ve duyarlığı 1 pikomol düzeyinde gerçekleşmektedir. Analizörde 10 μ M standart solusyonun 1 μ l' sinin enjeksiyonu ile 0.1 μ M standart solusyonunun 100 μ l'sinin enjeksiyonu ile elde edilen sonuçlar aynı duyarlılıkta olmaktadır. Cihaz aynı zamanda inhalasyon tedavisinde de kullanılmaktadır.

Analizörde Ölçümler

NO biyolojik sistemlerde oksijen, oksihemoglobin ya da superoksit tarafından oksidasyona uğratılarak, nitrit veya nitrata oksidize edilmektedir. Bu cihazda da aynı yoldan yararlanılarak, radikal purger denilen odacıkta, kimyasal indükleyici (azaltıcı) ajanlar kullanılmak suretiyle, NO düzeyi sıvı örneklerde nitrit ya da nitrat olarak ölçülür.

Literatüre göre, NO ve bunun oksidasyon ürünleri, radikal purger kullanılarak 3 ayrı teknikle ölçülür. Bunlar;

1. İyodid ya da asetik asit kullanılarak NO indirgenmesi,
2. Vanadyum ve 90°C deki hidroklorik asit kullanılarak nitrat ve nitritin indirgenmesi,
3. azaltıcı ajan olsun olmasın "Head space" analizi.

Her üç teknikte de sıvı örnekten NO'in arındırılması için bir inert gaz kullanılmakta ve kemiluminesans ile NO'in keskin pik yaptığı azalma saptanmaktadır. Nitriti indüklemeye oda sıcaklığında ve purgerdeki asetik asitli ortamda numunenin %1 'i kadar KI veya NaI dan yararlanılırken; aynı ortamda numunenin 90 °C de 1 M HCL deki 0.1 M VCL nitrat ya da nitriti NO'e indüklemekte kullanılmaktadır. Bu çalışmada birinci sırada sözü edilen yöntem kullanılmış bulunmaktadır.

Her seferinde doğru ölçüm yapılabilmesi için, cihazın her kullanım öncesi standartlar ile kaibrasyonu ve her kullanım sonrası da purgerin çok iyi temizlenmesine özellikle önem verilmesi gerekmektedir. Laboratuvarda cam kaplar, plastik kaplar ve laboratuvar su sistemleri sıklıkla nitrit ve nitrat ile

kontamine olduğundan, düşük düzey NO₂ ve NO₃ ölçümünde nitrit/nitrat "0" deiyonize su kullanılmalı ve kaplar kullanılmadan önce deiyonize sudan geçirilmelidir.

Sıvı örnekteki protein içeriğinin köpürmesini minimize etmek için "antifoaming" köpük önleyici ajan eklenir. Örnekteki yüksek protein içeriği, Purge Vessel'e enjekte edilmeden önce deproteinize edilmiş olmalıdır. Köpürmeyi önleyici ajan eklenmiş radikal purger, eklenmeden önce, deiyonize su ile 1/30 oranında seyreltilmelidir.

BÖLÜM III

GEREÇ ve YÖNTEM

III . 1 . ARAŞTIRMA PLANI

Bu araştırmada 5 günlük total uyku ve REM uykusu yoksunluğuna maruz bırakılan sıçanlarda ilgili beyin bölgelerinin NO düzeyleri incelenmiştir. Ağırlığı 200-300g arasında değişen, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi hayvan çiftliğinden temin edilen 50 adet erkek rat kullanılmıştır. Hayvanların bir bölümü 5 gün süre ile uykusuz bırakılırken, diğer grupta REM uykusu engellenmiş, diğer guruplar ise REM kontrolleri ve normal kontrolleri oluşturmuştur. Araştırma 4 deney grubu üzerinde yürütülmüştür. Bunlar;

Total uyku yoksunluğu oluşturulan gurup (T), n = 48,
REM yoksunluğu oluşturulan gurup (R), n = 48,
REM kontrolü gurubu (RK), n = 48 ve
Kontrol (K) , n = 48 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma hayvanların uykudan yoksun bırakılması, bunlardan doku numunelerinin hazırlanması, numunelerden doku homojenatları hazırlanması ve analizlerde son ürünlerin ölçümlenmesi gibi aşamaları içermektedir. Düzenlenmesi gereği birkaç aşamadan oluştuğu ve bu sırada pek çok çevresel etkenden etkilenebileceği için standardizasyonun sağlanması ve olumsuz koşulların asgariye indirilmesi gerekmektedir. Her bir aşama bir sonraki aşamayı olumsuz etkileyebileceğinden, bu konuya azami duyarlılık gösterilmiştir.

Sıçanlardan kaynaklanacak olumsuzlukları önlemek için, sadece tek bir kaynak üreticiden alınmışlar ve aynı gelişmişlik düzeyinde alınımına dikkat

edilmiştir. Uyku yoksunluğu oluşturmak için 2 ayrı düzenek kullanılmıştır. Deneyde kullanılan düzeneklerden “total uyku yoksunluğu düzeneği” yürüme bandı şeklinde bir düzenek olup, bölümümüzde geliştirilmiştir. Çalışma öncesi kullanılmamış olduğu için tüm hayvanların aynı şekilde standart koşullarda tutulabilmesi için gayret gösterilmiştir. İlk birkaç deneyden sonra standart koşullar belirlenerek, tüm hayvanların aynı şekilde yoksunluğa maruz bırakılması sağlanmıştır.

REM yoksunluğu için kullanılan “saksı düzeneği” ise bölümümüzde geliştirilmekle birlikte yine yerli üretim olmasına karşın, daha önce araştırmalarda kullanılış özellikleri ve etkileri bilinen bir düzenektir.

Her deney serisi başlangıcında hayvanların ağırlıkları ölçülmüş ve deney hayvanlarının birincisi total uyku yoksunluğu düzeneğine, diğeri Rem yoksunluğu düzeneğinde deney bölümüne, üçüncü hayvan Rem yoksunluğu düzeneğinde kontrol bölümüne, son hayvan da kafese konularak, 5 gün (105 saat) boyunca izlenmişlerdir. Günde 2 kez düzenek temizliği ve beslenme amacıyla hayvanlar düzeneklerden çıkarılarak, 1'er saat kadar beslenmişlerdir. Her 5 günün sonunda hayvanlar tekrar tartılarak ağırlık değişiklikleri saptandıktan sonra eter anestezisi ile uyutulduktan sonra, kafatası açılarak, beyinleri zedelenmeden çıkarılmıştır. Beyin bölgeleri buz üstünde hipokampus, korteks, beyin sapı ve serebellum olmak üzere ayrılmıştır. Parçalar derhal sıvı azot tankı içinde dondurularak, nitrit ve nitrat tayinlerinin yapılacağı güne kadar saklanmıştır.

TOTAL UYKU YOKSUNLUĞU DÜZENEĞİ

Boyutları 12x40x29 cm. olan bir pleksiglas kap olan düzenek bölümümüzde geliştirilmiştir. Duvar yüksekliği 21 cm. olan bölüm içinde 32 cm. uzunluğunda 10 cm genişliğinde, eğimi 0 ° olan bir yürüme bandı ve bandın bitiminde, 2.5 cm. derinliğinde ve 15 x 10 cm boyutlarında su havuzu bulunmaktadır.



Şekil 9. Total Uyku Yoksunluğu Düzeneği

Bandın 1 devir süresi 50 sn. ve 1.2 devir /dak hızında olup, dönüş hızı 0.0064 m/sn (0,4 m/dak) olarak hesaplanmıştır. Bu düşük hız nedeniyle hayvanın gün boyu harcayacağı enerji ya da göstereceği eforun önemsenmeyecek kadar düşük olduğu düşünölmektedir. Bir anda 1 adet hayvanı alabilen düzenekte, uyarıcı olarak su kullanılmaktadır. Bu düzenekte yapılan iş ve harcanan güç aşağıda hesaplanmıştır.

$$\text{İş} = \text{Güç} \times \text{Zaman}$$

$$\text{Güç} = \text{Kuvvet} \times \text{Yol} / \text{Zaman} = \text{İş} / \text{Zaman} = \text{Kuvvet} \times \text{Hız (kg.m/sn)}$$

$$D = 0.32 \text{ m.}$$

$$T = 50 \text{ sn.}$$

$$V1 = \frac{0.32}{50} = 0.0064 \text{ m/sn} = 0.38 (\sim 0.4) \text{ m/dak}$$

$$G = \frac{0.300 \times 0.32}{50} = 0.00192 \text{ kg.m/sn} \quad (6.118 \text{ kg.m/dak} = 1 \text{ Watt})$$

$$G = \frac{0.300 \times 0.32}{0.83} = 0.116 \text{ Watt}$$

$$\begin{aligned} \text{İş} &= G \times t = 0.116 \times 0.32 = 0.037 \text{ kg.m} \quad (426.4 \text{ kg.m} = 1 \text{ Kcal}) \\ &= 0.000087 \text{ Kcal/dak} \end{aligned}$$

$$\text{İş} = 0.000087 \times 22 = 0.0019 \text{ Kcal/gün olarak bulunmuştur.}$$

REM YOKSUNLUĞU (Deprivasyonu) DÜZENEGİ

Pleksiglastan üretilmiş, 33x34x32 cm. boyutlarında iki ayrı bölümü bulunan, kapaklı bir kaptır. REM uyku yoksunluğu araştırmalarında standart bir model olarak kullanılan bu düzenekte, bölmelerin ortalarında hayvanların konulacağı tablalar ve yemlikler bulunmaktadır. REM yoksunluğu bölümünde yer alan tabla tabandan 5 cm. yüksekte ve 6,5 x 6,5 cm. boyutlarındadır. Hayvanın hareketine ve derin uykuda uyumasına izin vermekte fakat hayvanın REM uykusuna geçmesi halinde kas tonusunun azalmasına bağlı olarak bulunduğu tabladan suya düşmesine yol açmakta, dolayısı ile REM fazını uyumasına izin vermemektedir. Rem kontrol bölümünde yer alan tabla yine 5 cm. yüksekte fakat 10,5 x 10,5 boyutlarda olup, hayvanın hem hareketine hem de istediği gibi uyumasına izin vermektedir. Yemlikler ise 4x4 cm. boyutlarında, tablalar üzerine yerleştirilmiştir.

Her iki bölmenin tabanına 2.5 cm. yüksekliğinde su konularak tabladan



Şekil 10. REM Yoksunluğu Düzeneği.

inen ya da düşen hayvanların uyarılması ve tekrar tablaya çıkması sağlanmıştır. Bölmelerdeki su, yemleme sırasında günde iki kez temizlenip, yenilenmiştir.



Şekil 11. Total ve REM Uyku Yoksunluk Düzenekleri.

DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANIŞI

Doku numune hazırlama yöntemi dokuların Ege Ü. Tıp Fakültesi kullanılan ve yayınlanarak geçerlilik kazanmış olan bir yöntemdir. Ancak numunelerin hazırlığı aşamasında çevreden çok fazla kontaminasyon riski olması nedeniyle homojenizasyon ve homojenattan son ürün elde edilmesi

işlemleri oldukça seri bir şekilde çalışılmıştır. Bu arada kullanılan tüm araç ve gereçler standart bir şekilde önce distile su ile yıkanıp, ardından bol deiyonize sudan geçirildikten sonra kullanılmıştır.

Doku homojenatı hazırlama yöntemi literatürde yer alan başka yöntemler ile benzerdir. Benedetti ve arkadaşları tarafından yaşlılığın doku aminoasitlerine etkisi ve NO ile ilişkisinin araştırılmasında kullanılan yöntem (9), Förstermann ve arkadaşları tarafından NO sentezleyen enzimlerin rat beyinlerinde dağılımının araştırıldığı çalışmada kullanılan yöntem (23) ile benzerdir.

Doku Örneklerinin Hazırlanması

Eter anestezinin hemen ardından elle yoklanılarak, baş gövdeden ayrılmaksızın, sisterna magradan itibaren kafada sagittal ,ardından lateral kesi ile saçlı deri ve deri altı doku kafatasından ayrılmıştır. Kafatası kemikleri, beyin dokusu travmatize edilmeyecek şekilde, oksipitalden başlanılarak, frontale doğru parçalayıcı bir pens yardımıyla kırılarak, beyinleri tek parça halinde çıkarılmıştır.

Çıkarılan total beyin, beyin sapı ve serebellum örnekleri buz üstünde soğutulduktan sonra doku örnekleri; beyin sapı, serebellum, her iki hemisferin serebral korteks, hipokampus bölgelerinden alınmıştır. Örnekler kodlandıktan sonra dondurularak saklanmak üzere sıvı azot tankına konulmuştur.

NO ÖLÇÜMÜ İŞLEM BASAMAKLARI

A. Hazırlık Aşaması

1. Fosfat Tamponu Hazırlığı,
2. Tampon Kalibrasyonu için NaOH ve HCl hazırlığı.

B. Numunelerin Homojenleştirilmesi.

C. Homojenatların Proteinsizleştirilmesi.

1. 0.3 M NaOH kullanımı,
2. %5 ZnSO₄ kullanımı,
3. Etanol uygulanması.

D. Ölçüm Aşaması

1. Standart Solüsyon Hazırlığı
NaNO₂ den nitrit standardı hazırlığı,
NaNO₃ tan nitrat standardı hazırlığı.
2. İndirgeyici reaktif (reagent) Hazırlığı
Nitrit indirgenmesi için Nal hazırlığı,
Nitrat indirgenmesi için VCl₃ ve NaOH hazırlığı.
3. Analizörde NO₂ ve NO₃ düzeyi ölçümü

İşleme fosfat tamponu hazırlanması ve doku örneklerinin homojenize edilmesi ile başlanır. Ardından %5 lik ZnSO₄ ile deproteinizasyon ve etanol presipitasyonu uygulanır.

Fosfat Tamponu Hazırlanması

Doku örneklerinin homojenizasyonu için pH'sı 7,5 olan fosfat tamponu kullanılmaktadır. Kullanılacak olan tampon, 8 g. NaCl, 2 g. KCl, 0.92 g. Na₂HPO₄ 1 lt distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Daha sonra kalibratörde pH'sı 7,5 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Fosfat Tamponu Kalibrasyonu: Bunun için bölümümüzde yer alan Codee-Palmer model 05669-20 pH ayarlayıcısı kullanılmıştır. PH ayarlanmasında pH 4,1 ve pH 7 olan standartlar ile 6 N NaOH ve HCl kullanılmıştır. İşleme başlanmadan önce probu distile ya da deiyonize su ile yıkanır ve standartların oda sıcaklığına gelmeleri beklenir. Kalibratör açıldığında ATC lambası yanmaktadır. Ekran pH göstermiyorsa, autlock yanana dek MODE'a basılır. Sonra prob distile su ile yıkanır ve pH 7 standardına daldırılır. Ekranda tamponun ısı görür. Bu sırada stand lambası yanıp sönmektedir. Stand'a sürekli basılır ve sürekli yanması sağlanır. Bu sırada wait yanıp sönmeye başlar. Optik okuyucuda okuma tamamlanınca wait lambası söner ve slope lambası yanıp sönmeye başlar. Prob distile su ile yıkanıp, pH 4,1 standardına daldırılır ve slope'a basılır. Slope sürekli yanar hale gelir ve wait yanıp sönmeye başlar. Bu sırada ekranda 4.1 okunduğunda wait söner. Artık cihaz kalibrasyona hazır hale gelmiştir. Prob, distile su ile yıkandıktan sonra, hazırlanmış olan fosfat tamponuna daldırılır.

Mode'a basılarak ekranda değer okunur. pH 7,5'e ayarlanmamışsa, çıkan değere göre, 1 ml.lik enjektör iğne ucu ile HCl veya NaOH damlatılır. Bu işleme pH 7,5 olana dek devam edilir.

0.3 M NaOH Hazırlanması

1.2 g. NaOH 'e 100 ml. distile su eklenerek elde edilmiştir.

%5'lik ZnSO4 hazırlanması

Proteinsizleştirme

Proteinsizleştirme 2 yolla yapılabilmektedir.

a. Soğuk Etanol Presipitasyonu

Tüm kaplar deiyonize sudan geçirilmiş ve kurutulmuştur. Etanol 0°C de tutulur. 0,5 ml numune 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınıp, 1 ml soğuk etanol eklendikten sonra vortekslenmiştir. 0°C de 30 dak. tutulduktan sonra ~14 000 devirde 5 dak. santrifüj edilerek, üstteki supernatant ölüm için alınmıştır.

b. Çinko Sülfat / Sodyum Hidroksit

Aynı şekilde kaplar deiyonize sudan geçirilmiştir. 200 l numune mikrosantrifüj tüpüne alınarak, üzerine 400 l 0,5 N NaOH ve 400 l %10'luk sıvı ZnSO4 eklenmiştir. 30 sn vortekslenildikten sonra 15-20 dak oda sıcaklığında tutulmuştur. Daha sonra 5 dak santrifüjlenmiştir.

Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Homojenatlar, pH = 7.5 olan 5 hacimlik fosfat tamponu ile homojenize edilerek hazırlanmıştır. Ölçüm yapılacak doku parçalarının planlaması yapıldıktan sonra dondurucudan alınarak, hassas terazide hepsi yakın ağırlıkta olacak şekilde tartılarak ayrılmış ve kodlanarak buz üzerine konmuştur. Bu ağırlıkların 5 katı kadar fosfat tamponu eklenerek, homojenizatörde ~10 sn kadar sürede homojenize edilerek, deiyonize su ile yıkanmış, tüplere alınmıştır. Her örnek homojenize edildikten sonra ağız parafilm ile kapatılarak, buzdolabına konulmuştur.

Homojenatlar 2000* g' de (5000 devir/dak) 5 dak. boyunca santrifüj edilmiştir. 0.5 ml.'lik üst faz alınarak, üzerine 0.25 ml, 0.3 M NaOH eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyondan sonra deproteinizasyon için karışıma %5'lik ZnSO₄ 'ten (w/v) 0.25 ml. konulmuştur. Bu karışım 3000* g' de (6200 devir/dak) 20 dak. santrifüjlenmiştir. Ölçüm için üst faz alınmıştır. Üst fazın 0.5 ml.'sine 0°C'lik 1 ml. etanol eklenmiş ve 30 dak. buzdolabında 0°C'de bekletilmiştir. Soğutmalı santrifüjde 14000 RPM'de 5 dakikalık santrifüj sonrası yine üst faz alınarak, NO analizöründe nitrit tayini saklanmak üzere dondurucuya konulmuştur.

Standart Solusyonların Hazırlanması

Bunun için ±0.1 ml duyarlı tartı, sodyum ve potasyum nitrit, nitritsiz deiyonize su, dereceli cam balon ve pipetler gerekmektedir. Standart solüsyon hazırlamak için NaNO₂ ve NaNO₃ kullanılmaktadır.

Nitrit tayini için 100 mM NaNO_2 hazırlanır. 10 ml 100 mM lik NO_2^- için 69 mg NaNO_2 veya 85 mg KNO_2 gereklidir. Sonra bu tuz 10 ml'lik cam balona konup, nitritsiz deiyonize su ile seyreltilmiştir. 100 ml 100mM lik NO_2^- için 690 mg NaNO_2 veya 850 mg KNO_2 tartılır. Bu bileşikler 100 ml lik cam balona konup, deiyonize su ile seyreltilmiştir. Standart hazırlığında bu 100 mM lik stok standarttan yararlanılmıştır. Daha sonra örneklerden daha fazla veya daha az ya da eşit konsantrasyon değerlerine uygun NO_2^- içeren solusyonlar hazırlanmıştır. Bu şekilde 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM lik solusyonlar hazırlanmıştır. 100 μM lik standart buzdolabında, karanlık ve hava sızdırmaz kapta birkaç hafta dayanabilirken, dilue edilmiş standartlar her ölçüm günü taze hazırlanmıştır.

Nitrat tayini için 100 mM NaNO_3 Hazırlanır. Önce 85 mg NaNO_3 alınır ve 10 ml deiyonize su eklenir. Işık görmemesi gerektiğinden, ışıktan korunacak şekilde kaplandıktan sonra buzdolabında saklanır.

Nitrit ve Nitrat Tayini Gerekli İndirgeyici Çözeltiler

Nal Hazırlanması

150 mg Nal, nitrit tayininde kullanılmak üzere 3 ml deiyonize su ile karıştırılarak hazırlanır.

1M NaOH Hazırlanması

Sıvı NaOH, nitrat tayininde, HCl buharının koroziv etkisinden korumak için kullanılmaktadır. Ya solid NaOH (4 g./100 ml.) alınıp, manyetik karıştırıcı ile

kariştirilerek ya da %50 NaOH (5 ml/100 ml) ile hazırlanabilir. Analiz için 150 ml. hazırlanması yeterli olmaktadır.

100 ml Vanadyum Klorür Çözeltisi Hazırlanması

Nitrat tayininde kullanılır. 0,8 g. vanadyum klorür (VCl_3) 100 ml.lik temizlenmiş dereceli kaba alınır. (VCl_3 'e deiyonize su eklenmesi sırasında ısı ortaya çıktığından, kabın ısınmasına dikkat edilmelidir). Üzerine 8.3 ml konsantre (1M) HCl eklenir. Dereceli kapta 100 ml düzeyine kadar deiyonize su tamamlanır (bu bir sature solusyon olduğundan tamamen dilue olmayabilir ve sıvının üst yüzeyinde küçük VCl_3 partiküllerinin yüzdüğü görülebilir). Dereceli kabın kapağı kapatılıp, bir kaç kez ters yüz edilmek şeklinde çevrilmiştir. Tümü çözülmese bile solusyonun rengi maviye dönmüş olmalıdır.

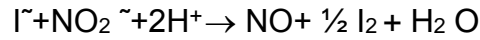
KEMİLÜMINESANS YÖNTEMİ İLE NİTRİK OKSİT ANALİZİ (3,76, 72)

a) Nitrit İndirgenmesi

Örneklerin ölçümleri öncesinde daha önceden hazırlanmış olan standart solüsyonlar ile kalibrasyon yapılmıştır. Kalibrasyon sırasında NO nun pik değeri ve değişik konsantrasyonlardaki NO eğrisi bir yazdırıcı ya da monitörde kaydedilmiştir. Kalibrasyona başlamadan önce vakum pompası basıncı <200 torr olmalı (~100) ve ozon basıncı 2 ila 10 psi arasında (~5 psi) tutulmuştur. Seyreltik solusyonlar hazırlandıktan sonra, en seyreltik solusyondan başlanmak üzere, standartlar “purge vessel” e enjekte edilerek, düzeyler kaydedilmiştir. Enjeksiyonlar arası kontaminasyonu önlemek için, kullanılan şırınga her seferinde deiyonize su ile yıkanmıştır. Bir sonra gelen

konsantrasyondaki standardın enjeksiyonu şeklinde işleme devam edilerek tüm standart solusyonlar ölçümlenmiştir. NOA 280 in bir kez kalibrasyonu birkaç hafta korunabilir, her gün tekrarlanması gerekmemektedir. Fakat kalibrasyon değişmesine karşı güne başlarken bir ya da iki standart analizi ile başlanması veya kalibrasyon değişmeden periyodik olarak standart enjeksiyonu uygun olmaktadır.

NO, NO₂ oluşturmak için erimiş O₂ ile reaksiyona girmektedir. Oksihemoglobin ya da süperoksit anyonu (O₂⁻) yokluğunda Nitrit, NO'in majör oksidasyon ürünüdür. Nitritin ölçümünde, nitriti NO'e dönüştürmek için, purge vessel'a indirgeyici ajan olarak NaI ya da KI'ün %1'lik asetik asitteki solusyonu kullanılmıştır.



İndirgeyici ajan 5 ml hazırlanarak, purge vessel'e (anaizörün radikal purger bölümü, bölüm 1, s37-38' de açıklandığı gibi) konmuştur (bu hacim 20-30 örneğin ölçümü için yeterlidir). Çözeltinin azalması halinde, I₃⁻ şekillenmesine bağlı olarak sıvının rengi sarıya dönmektedir.

Analizörde ölçümlerde standart sonuçlar elde edilebilmesi için hazırlanması gereken NO₃ ve NO₂ standart solusyonları taze olarak hazırlanmıştır.

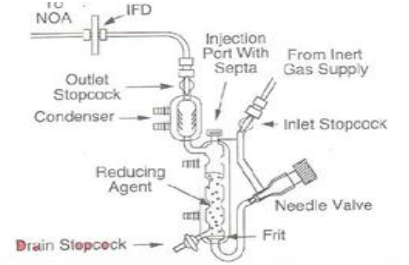
Nitrit Azaltıcı Solüsyonun Hazırlanışı

Atmosferik Oksijen ile reaksiyon oluşumunu minimize edebilmek için sıvı purge vessel de hazırlanmalıdır. Purge vessel in giriş ve çıkış muslukları kapatılır ve tepesindeki kapak ve septum çıkarılır. Sonra purge vessel'e gaz

geçişini durdurmak için "needle valv " çevrilir. Purge vessel'e 4 ml glasiyal asetik asit ya da asetik asit konulur. Bu miktar purge vesselin ilk boğumunu doldurmaya yetecek kadardır. Bu anda septum ya da kapak açılmaz. İnert gaz tankının çıkış basıncı 1-2 psi'a ayarlanır. Needle valv tamamen kapalı iken, inert gaz regülatöründeki "shuoff valvi" ve purge vessel üzerindeki gaz giriş musluğu açılır. Yavaşça needle valv açılarak asetik asit asit içinden küçük baloncuklar halinde gaz geçişi sağlanır. Yaklaşık 50 mg Nal ya da KI 1 ml kadar deiyonize suda çözülerek, iyodid solusyonu hazırlanır. Bu solusyon içinde asit bulunan purge vessel'e aktarılır ve 1-2 dakika karışımdan gaz geçişine devam edilir. Sonra purge vessel'e 100 µl dilue edilmiş sabunlaşmayı önleyici ajan eklenir. Purge vessel tepesine kapak ve septum, teflon kısmı üste gelecek şekilde, yerleştirilmiştir. Purge vessel çıkış musluğu açılır ve tepesini kapayacak şekilde sıvı seviyesi yükselmesini sağlayacak kadar gaz geçişine izin verilir.

Çalışma sırasında karşılaşılabilecek en önemli sorun Nitrit kontaminasyonudur. En ufak bulaşıda standartlardaki NO₂ düzeyi beklenenden yüksek bulunacaktır. Bu nedenle de kullanım öncesi tüm ekipman deiyonize sudan geçirilmelidir. Bu arada dikkat edilmesi gereken bir konu da çoğu laboratuvar su sistemlerinin Nitrit ile kontamine olmasıdır. Ayrıca Nitrit ile çevrili atmosferik havadan NO suya absorbe olabilmektedir. Bu nedenle de çalışma da dikkatli olunması gerekmektedir. Bu durumlarda tarif edilen şekilde purge vessel boşaltılmalı ve yeniden indirgeyici ajan konularak analiz yapılmalıdır. Bunda 4 ml asetik asit giriş musluğundan konulup, birkaç

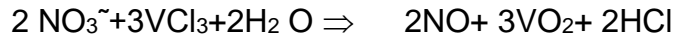
dakika arındırmaya devam edilir. 50 mg NaI veya KI 1ml deiyonize suda çözümlenerek, purge vessele konur. Sonra çıkış musluğu açılarak birkaç dakika örnek analiz edilir.



Şekil 11. NO Analizöründe “ Purge Vessel.

b) Nitrat İndirgenmesi (Azaltımı)

NO, Nitrat oluşumu için oksihemoglobin ve superoksit anyonu ile reaksiyona girmektedir. Hayvan ve insan hücre kültürü sistem örneklerinde Nitrat en önemli oksidasyon ürünüdür. Nitrat ölçümünde, Nitratı NO'ye çevirmek için, Hidroklorik asitte Vanadyum klorür kullanılmaktadır.



Bu indirgenme 90 °C de geliştirilebilmektedir. NaOH hazırlandıktan sonra Nitrat azaltımı işlemine başlanılabilmektedir.

Hidroklorik asit buharının purge vessel' e zarar vermemesi için gaz musluğundan analizör ile purge vessel arası NaOH ile doldurulmalıdır. Hidroklorik asit ve Vanadyum klorür korroziv olduklarından, solüsyonlar hazırlanırken, asit eldivenleri, koruyucu elbiseler ve güvenlik gözlüğü ya da yüz maskesi kullanılmalıdır.

Numunelerin analizine başlanılmadan önce hazırlanacak standart solüsyonlarla kalibrasyon yapmış ve eğrisi çizdirilmiştir. Standart hazırlığına

100 mM NO₃⁻ ile başlanmıştır. Bunun için, 10 ml 100 mM NO₃ için, 85 mg NaNO₃ veya 101 mg KNO₃, 10 ml'lik deiyonize su ile seyreltilmiştir. 100 ml 100 mM NO₃ için 850 mg NaNO₃ veya 1.01 g. KNO₃ kullanılır ve aynı şekilde seyreltilir. Standart solusyonlar 10 nM, 50nM, 100 nM, 1 µM, 5µM, 10 µM, 50 µM ve 100 µM olmalı ve bunların kalibrasyon eğrisi çizdirilmelidir (idrar numuneleri için 100 µM dan daha fazla konsantrasyonda standart gerekmektedir). Başlangıç standart solüsyon birkaç hafta saklanabilirken, seyreltilmiş olanlar gününde tüketilmelidir.

Ölçümler Nitrit ölçümlerine benzer aynı şekilde yapılmıştır. Bunda purge vessel'in sıcak olmasına dikkat edilmelidir. Pik düzeyi 30 sn içinde ortaya çıkmaktadır.

Önce gaz musluğundan ~ 20 ml 1 M NaOH konur ve teflon koruyucu kapatılır. (Teflon koruyucu kenarından sızıntı yapabilecek aralık bulunmadığından emin olunmalı). Bu musluğun tepesi yeşil, plastik mandal ile sıkılanmıştır. Purge vessel deki drenaj musluğu kapatılır. Purge vessel üstündeki vidalı kapak açılarak, üzerine 4-5 ml filtre edilmiş VCl₃/HCl eklenir. Purge vessel'e 100 µl köpürme önleyici konur ve buraya gaz geçişi sağlanıncaya kadar vidalı kapak açılır. Purge vessel gaz giriş musluğu kapatılarak, tüm girişleri kapatılır. İnert gaz tüpüne bağlı valv açılarak, regülatör 1-5 psi'a ayarlanarak açılır. Puge vesselin gaz giriş musluğu ve yavaşça iğne valv açılır. Çok küçük ve az kabarcık oluşturacak şekilde gaz geçişi sağlanır. Bu sırada vidalı kapak ayrılarak, purge vessel gaz çıkış

musluğu açılır. Soğuk suyun kondensöre geçişine izin verilir. Su sızıntısı olduğu taktirde klamp sıkılarak geçiş engellenir.

Bundan sonraki aşama sıcak su dolanımı safhası olup, tüpler,hortumlar ve purge vessel aşırı sıcak olacağından çok dikkatli davranmak gerekmektedir.

Su banyosunun ayarı 95°C'ye ayarlanır. su sızıntısı olmayacak şekilde dolaşım pompası açılır.

Gaz Basıncı Ayarı

Normalde purge vessel bir vakum etkisi altındadır. İğne valv kapatılıp, gaz geçişi durdurulur. Purge vessel içinde vakum basıncı artarsa VCl_3 büyük baloncuklarla birlikte hızla boşalabilir. Bu durumda iğne valv yavaşça açılarak purge vessel için basınç artırılır. Çok fazla gaz eklenirse aniden reaktif boşalabilir.

BÖLÜM IV

BULGULAR

IV. I. Ağırlık Değişimi

Sıçanlar günde 2 kez 60'ar dakika kadar beslenmeye alınırken, sabah ve akşamları ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Deneyde kullanılan yaylı terazi ile 12 seri halindeki 4 ayrı grup sıçandan ölçümü yapılabilen 9 serinin sonuçları değerlendirilmiştir. Değerlendirmenin sonucunda ortaya çıkan ağırlık değişimleri şöyledir. Total Uyku Yoksunluğu oluşturulan grupta ağırlık değişimi -13.04 ± 5.21 g., REM Yoksunluğu oluşturulan grupta -10.45 ± 3.92 g., REM Kontrol grubunda -7.21 ± 3.92 g., Total Yoksunluk Kontrol grubunda ise $+11.25 \pm 4.03$ g. olarak belirlenmiştir. Buna göre gruplar arasında deneyler süresince sadece normal yaşamını sürdüren, kontrol grubunda ağırlık artımı meydana gelirken, diğer üç grupta anlamlı ağırlık kaybı oluşmuştur.

Ağırlık değişim durumlarına göre gruplar arası farklılık istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan "Student t" testi ile gruplar arasında ağırlık değişimi bakımından farklılık olup, olmadığı incelenmiştir. Sonuçta;

1. Total uyku yoksunluğu grubu ile REM yoksunluğu grupları arasında farklılığın anlamlı olmadığı ($p > 0.05$),
2. REM yoksunluğu grubu ile REM kontrol grupları arasında farklılığın anlamlı olmadığı ($p > 0.05$),
3. Total uyku yoksunluğu grubu ile kontrol grupları arasında ve yine aynı şekilde REM yoksunluğu grubu ile kontrol grupları arasında farklılığın anlamlı olduğu ($p < 0.05$) belirlenmiştir.

Düzeneklere konulan deneklerin tümünde ağırlık kaybı meydana gelmiştir. Ancak oluşan ağırlık kaybı total uyku yoksunluğu grubunda daha yüksek gibi görülüyor ise de standart sapmaların büyüklüğü dolayısı ile istatistiksel olarak bu farklılık gösterilememiştir.

IV. II. Nitrik Oksit için Nitrat ve Nitrit Ölçüm Sonuçları

Uyku yoksunluğu oluşturularak, sıçan beyin dokusunda nitrik oksit düzeyinde meydana gelen değişiklikler, Sievers model 280 nitrik oksit analizörü ile beyin doku homojenatlarında ölçümlenen NO_3 ve NO_2 düzeylerine göre değerlendirilmiştir. Nitrit ve Nitrat NO'nin oksidasyon ürünleridir. NO'nin oksihemoglobin veya süperoksit ile reaksiyona girmesi sonucu oluşmaktadır. NO, Nitrit oluşturmak için erimiş O_2 ile reaksiyona girmektedir. Oksihemoglobin ya da süperoksit anyonu (O_2^-) yokluğunda Nitrit, NO'nin majör oksidasyon ürünüdür.

Çalışmada sıçanlar 4 ayrı grupta izlenmiştir. Bunlar; total uyku yoksunluğu (T) oluşturulan, sadece REM yoksunluğu (R) oluşturulan, sadece REM kontrolü grubu (RK) ve tüm grupların kontrolü (K) şeklinde gruplar oluşturulmuştur.

Her bir gruptaki sıçanların beyinlerinin 4 farklı bölgesinden alınan örnekler incelemeye alınmıştır. Numuneler, beyin sapı (bs), serebellum (cer), hipokampus (hk) ve korteks (kort) ten alınmıştır. Böylece 12 seri hayvanda 4 ayrı grupta ve her bir grupta da 5 ayrı beyin alanından alınan numunelerde NO_3 ve NO_2 düzeyi değişiklikleri incelenmiştir.

Ölçümlerden elde edilen değerler tablo ve grafikler halinde sunulmaktadır.

Değerlendirmeler,

a) Her bir beyin alanında 4 ayrı gruba ait tüm NO₃ ve NO₂ verilerinin dağılım düzeyinin belirlenmesi,

b) Her bir grupta beş ayrı alandaki tüm NO₃ ve NO₂ verilerinin dağılım düzeyleri belirlenmesi sonrası istatistiksel analiz yapılmıştır.

Tablo I : REM veya Total Uyku Yoksunluğunun Değişik Beyin Alanlarında NO₃ Düzeyine Etkilerinin Kontrolları İle Karşılaştırması.

NO ₃ ÖLÇÜLEN ALANLAR	GRUPLAR							
	TOTAL UYKU YOKSUNLUĞU		TOTAL YOKSUNLUK KONTROL		REM UYKU YOKSUNLUĞU		REM YOKSUNLUK KONTROL	
	Denek Sayısı (N)	Ortalama NO ₃ Miktarı (Mm/Gr±Sd)	Denek Sayısı (N)	Ortalama NO ₃ Miktarı (Mm/Gr±Sd)	Denek Sayısı (N)	Ortalama NO ₃ Miktarı (Mm/Gr±Sd)	Denek Sayısı (N)	Ortalama NO ₃ Miktarı (Mm/Gr±Sd)
BEYİN SAPI	6	0.64 ± 0.01*	6	0.40 ± 0.17	6	0.42 ± 0.11**	7	1.55 ± 0.12
SEREBELLUM	8	0.65 ± 0.12 *	6	0.42 ± 0.12	6	0.32 ± 0.07**	7	0.41 ± 0.17
HİPOKAMPUS	8	0.66 ± 0.11 *	6	0.72 ± 0.13	9	0.62 ± 0.14**	10	0.75 ± 0.13
KORTEKS	8	0.58 ± 0.21 *	7	0.50 ± 0.15	7	0.70 ± 0.18**	7	0.71 ± 0.18

Tablo değerleri aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde belirtilmiştir.

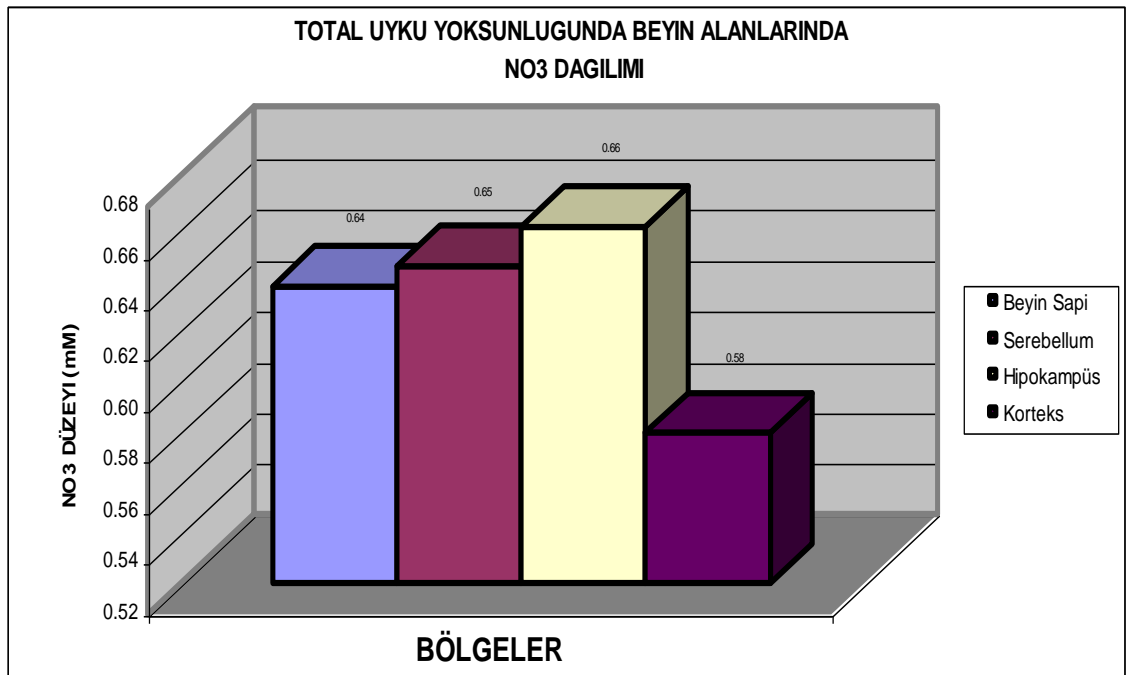
* p<0,05, Total Kontroluna göre farklı.

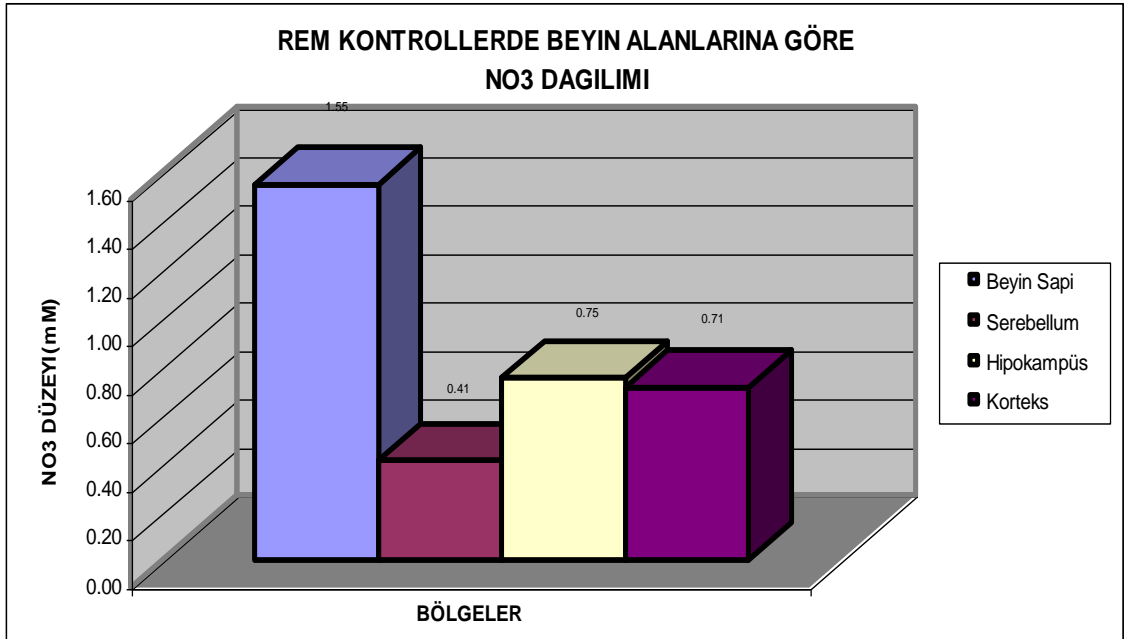
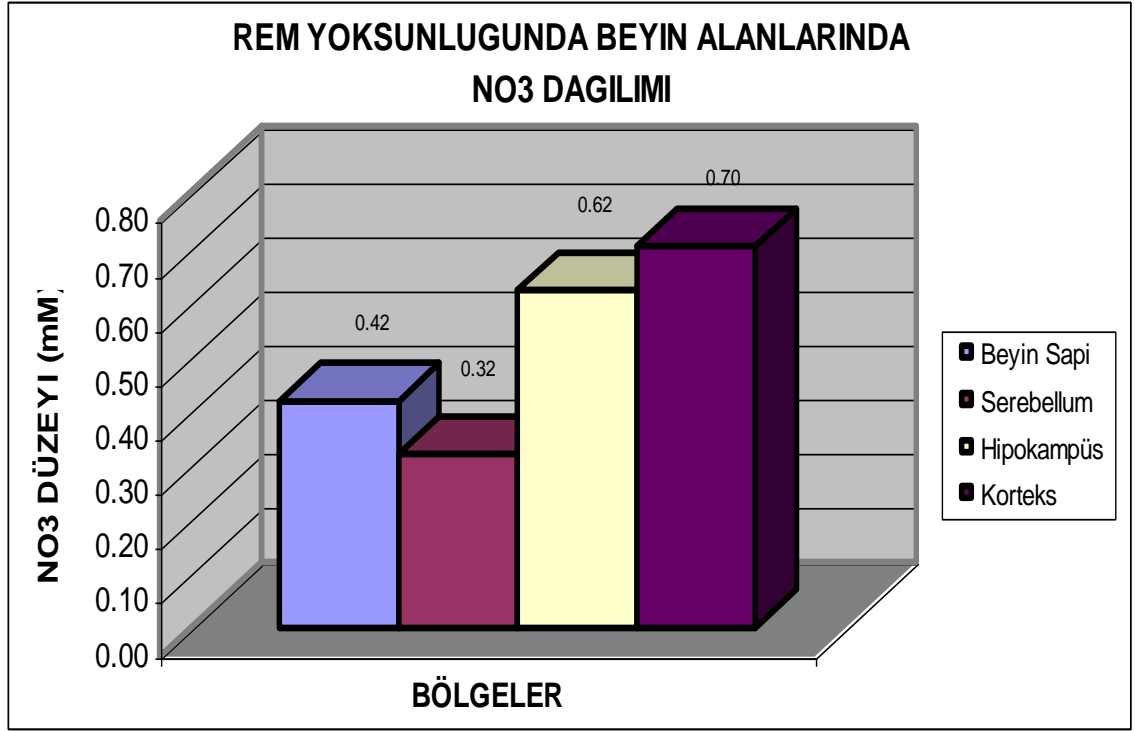
** p<0,05, REM Kontroluna göre farklı.

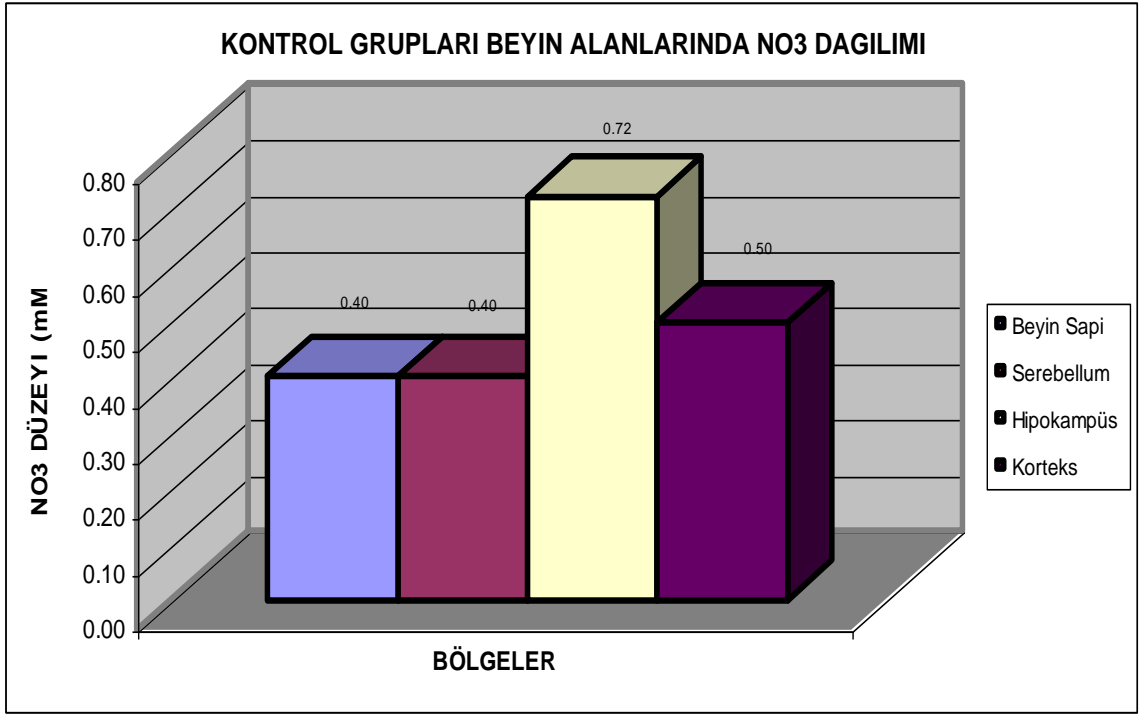
Tablo I' de beyin alanları arasında nitrat (NO_3) düzeyindeki ortalama değişikliklere ait ölçüm değerleri incelendiğinde; NO_3 ortalamalarının her alanda farklı düzeylerde olduğu ancak, hipokampüste diğer grup ortalamalarına göre daha yüksek seviyelerde olduğu görülmektedir. Beyin sapı ve serebellum gruplarında diğer gruplara göre daha düşük seviyelerde ölçümlenmiştir.

Sonuçlar içinde REM kontrol grubunda beyin sapından yapılan ölçümler diğer ölçümlenen değerlerden oldukça farklılık göstermektedir. Total uyku yoksunluğu oluşturulan gruplarda NO_3 düzeyi genel olarak kontrol gruplarına göre daha yüksek, REM yoksunluğu oluşturulan gruplarda ise kontrollara göre belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur.

Grafik I - IV: GRUPLARA GÖRE BEYİN ALANLARINDA NO_3 DAĞILIMI

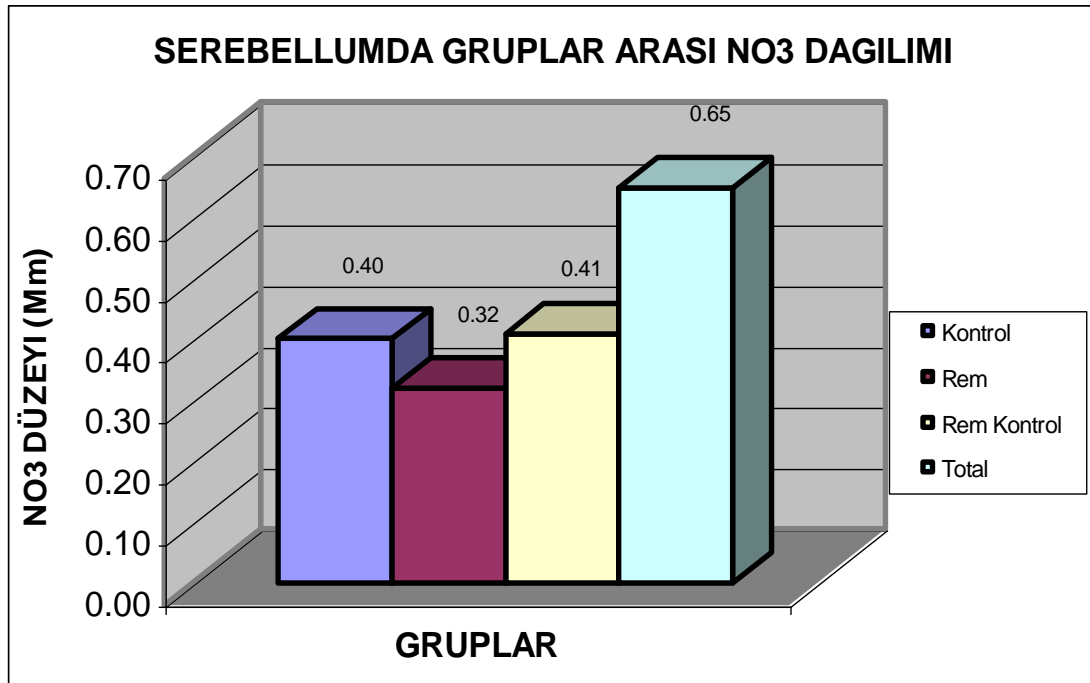


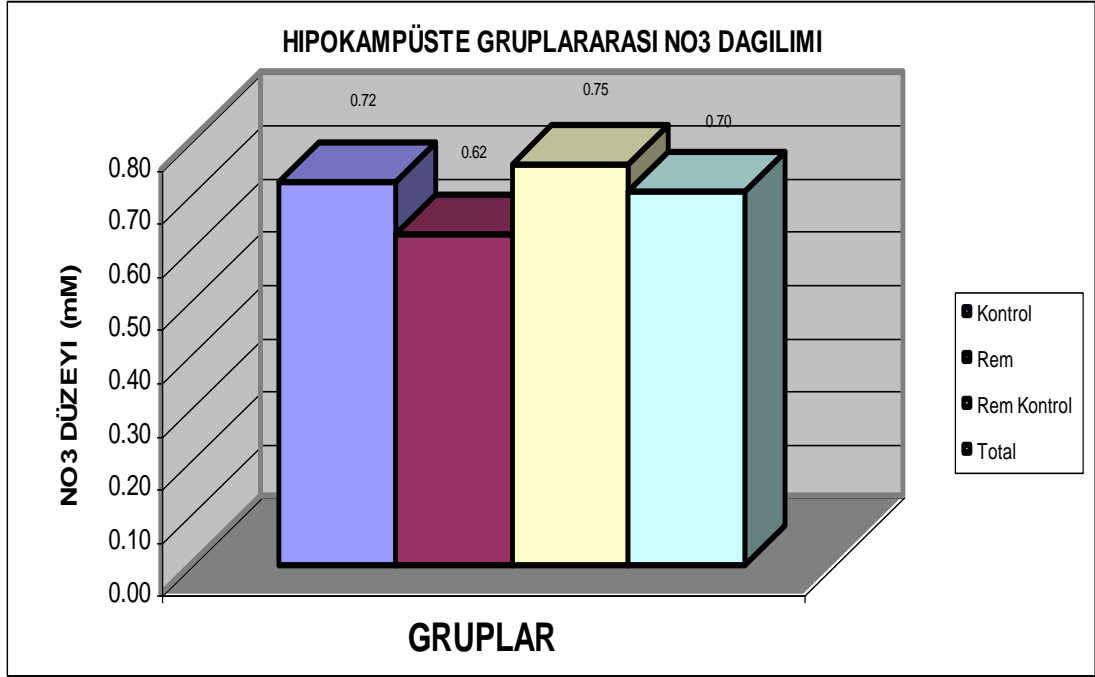
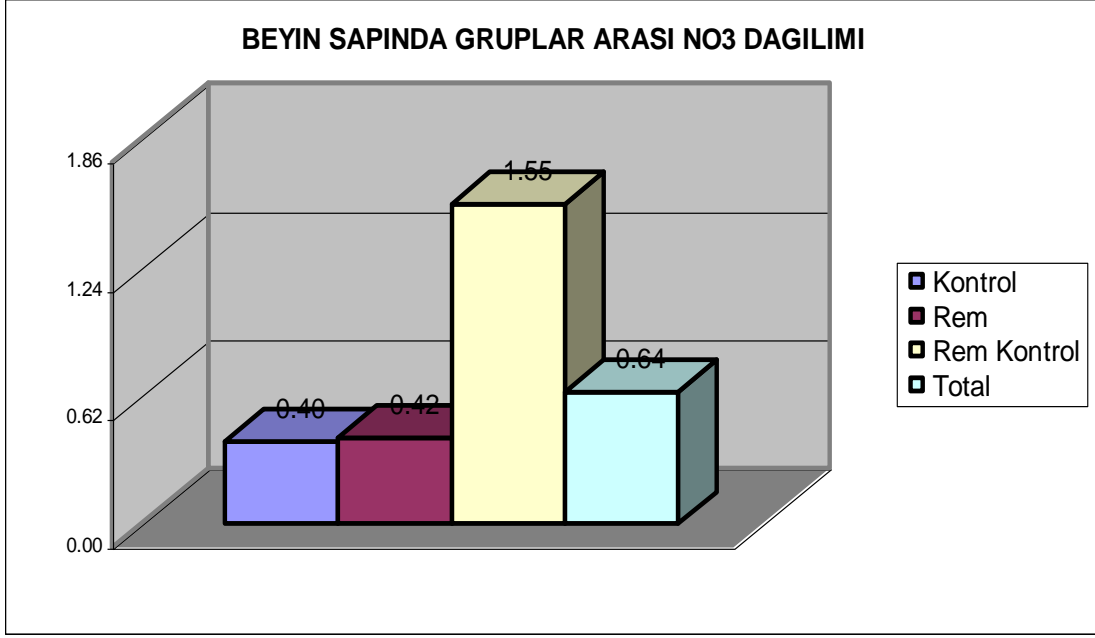


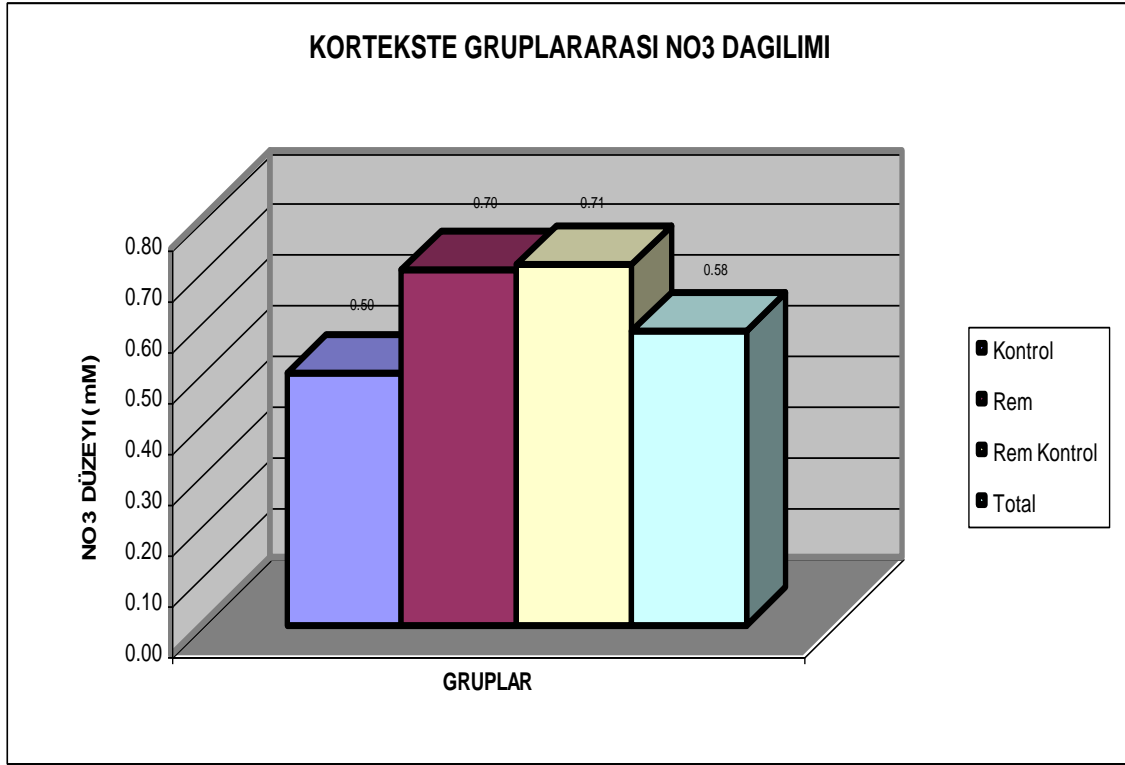


Bu grafiklerde her bir beyin alanında gruplar arasındaki nitrat (NO₃) ortalamalarının dağılımları izlenmektedir.

Grafik V – VIII : BEYİN ALANLARINDA GRUPLARARASI NO₃ DAĞILIMI







**Tablo II : NO2 BAKIMINDAN BEYİN ALANLARINA GÖRE
GRUP ORTALAMALARI**

Gruplar	BEYİN SAPI		SEREBELLUM		HİPOKAMPÜS		KORTEKS	
	n	mM/gr± Sd	n	mM/gr ±sd	n	mM/gr±sd	n	mM/gr ±sd
Total Yoksunluk	6	0.22 ± 0.14	9	0.23 ± 0.12	8	0.30 ± 0.08	7	0.29 ± 0.09
Rem Yoksunluk	6	0.17 ± 0.15	11	0.07 ± 0.03	12	0.29 ± 0.14	6	0.27 ± 0.09
Rem Kontrol	6	0.22 ± 0.25	11	0.13 ± 0.10	9	0.28 ± 0.05	9	0.32 ± 0.08
Kontrol	6	0.35 ± 0.10	6	0.11 ± 0.04	8	0.32 ± 0.08	8	0.26 ± 0.06

Tablo değerleri aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde belirtilmiştir.

* p > 0,05, Kontrola göre fark yoktur.

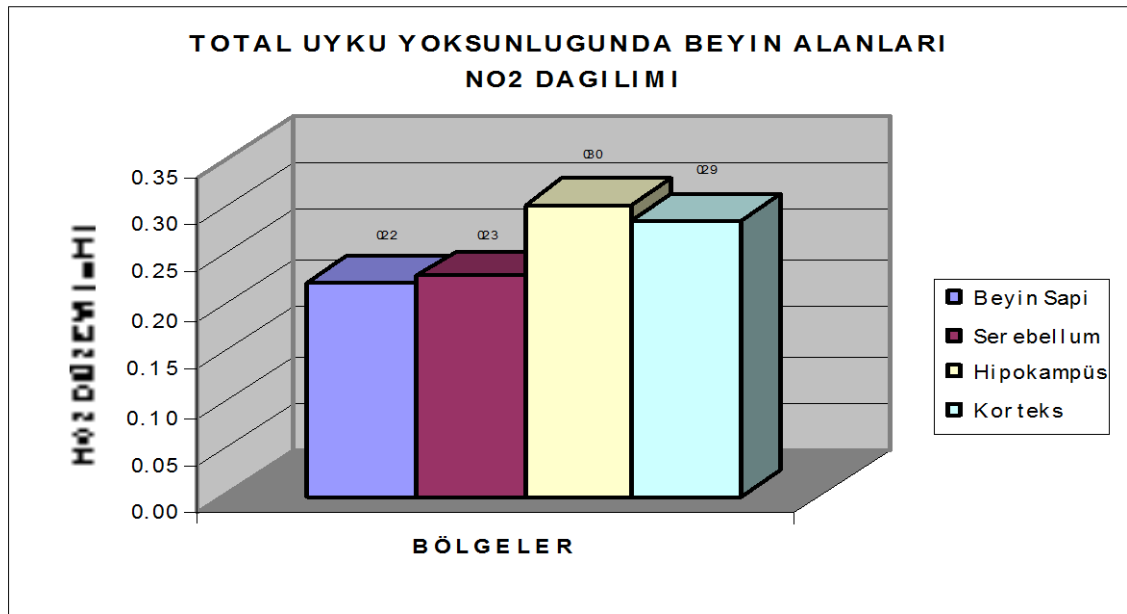
** p > 0,05, REM Kontroluna göre fark yoktur.

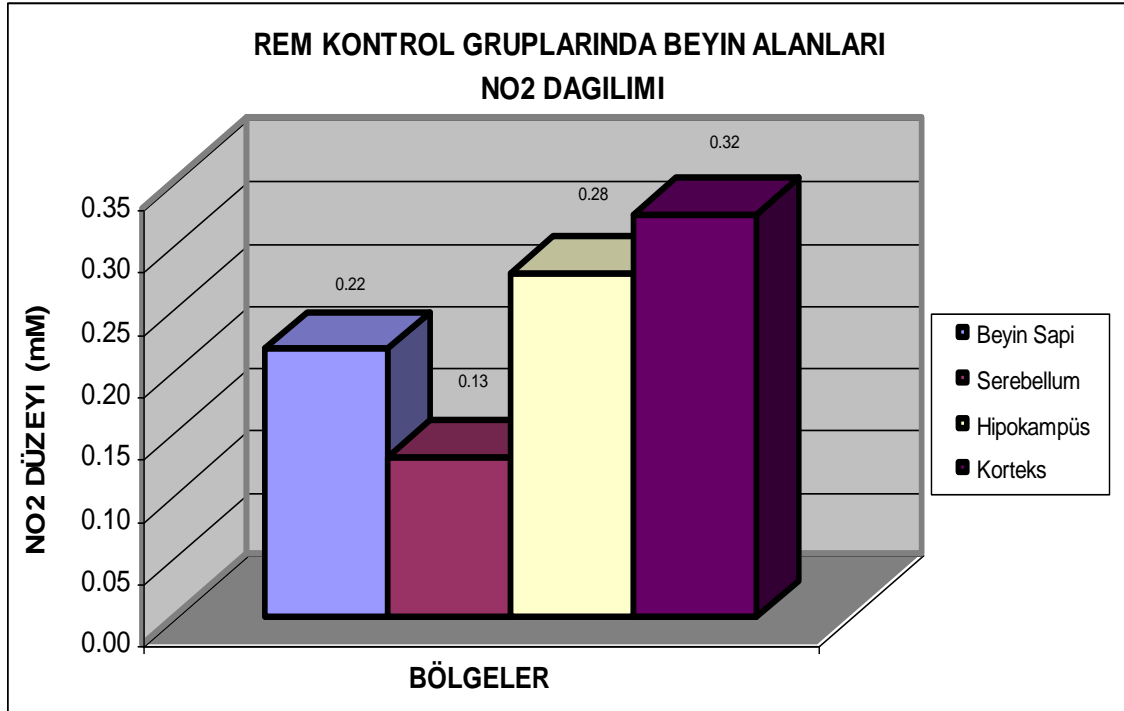
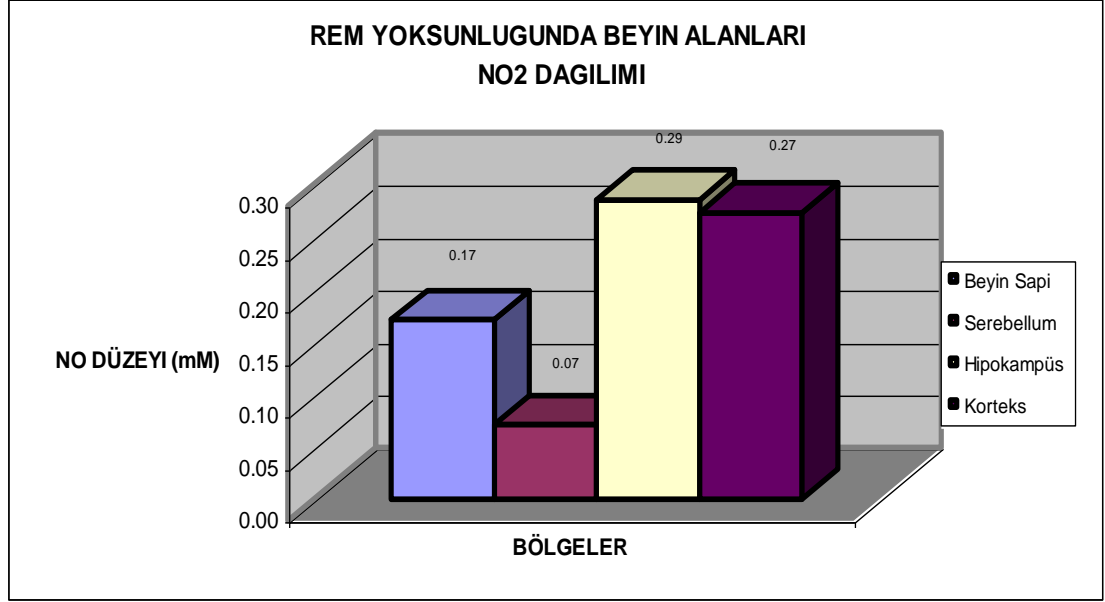
Ölçüm değerleri incelendiğinde; NO₂ ortalamalarının da her bir grupta, beyin alanları arasında farklı düzeylerde olduğu görülmektedir. Buna karşın genel olarak her bir grubun hipokampus ve korteks alanları ölçüm sonuçları yine diğer grup ortalamalarından daha yüksek olarak bulunmuş olsa bile NO₂ düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır.

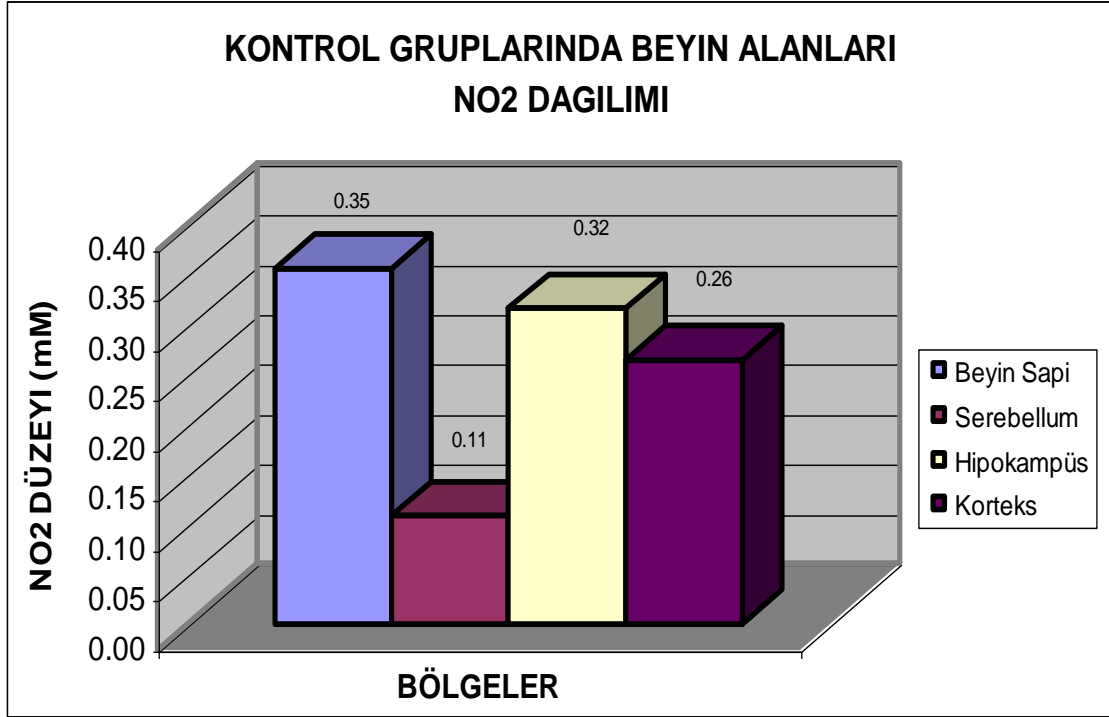
REM yoksunluğunda kontrollere göre NO₂ düzeylerinin düşme gösterdiği, buna karşın total yoksunluk gruplarında bu tür bir değişikliğin belirlenemediği ve bir düşmenin olmadığı görülmektedir.

Tablo II'de beyin alanları arasında nitrit (NO₂) düzeyindeki ortalama değişiklikler mM/g cinsinden ve standart sapmaları izlenmektedir. Ölçüm değerleri incelendiğinde; NO₂ ortalamalarının alanlar arasında farklılık göstermediği görülmektedir. Her bir grupta alınan hipokampus ve korteks örneklerinde diğer alanlara göre, daha yüksek miktarda NO₂ saptanmıştır. Serebellumda ise nitrit daha düşük miktarda saptanmıştır.

Grafik IX -XII: GRUPLARA GÖRE BEYİN ALANLARI NO₂ DAĞILIMI

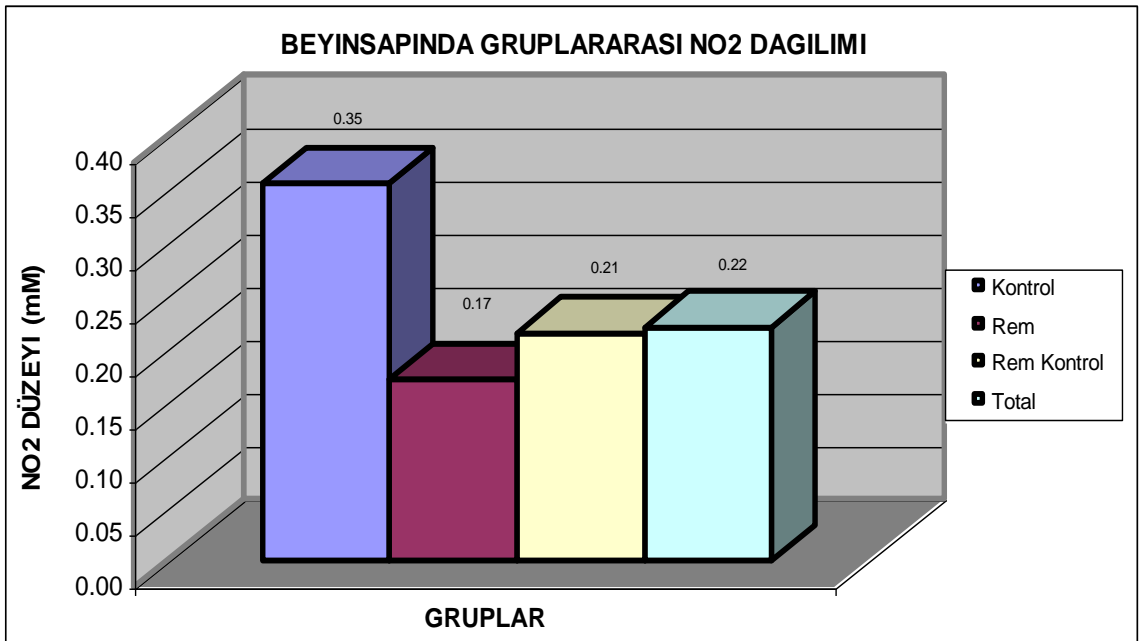


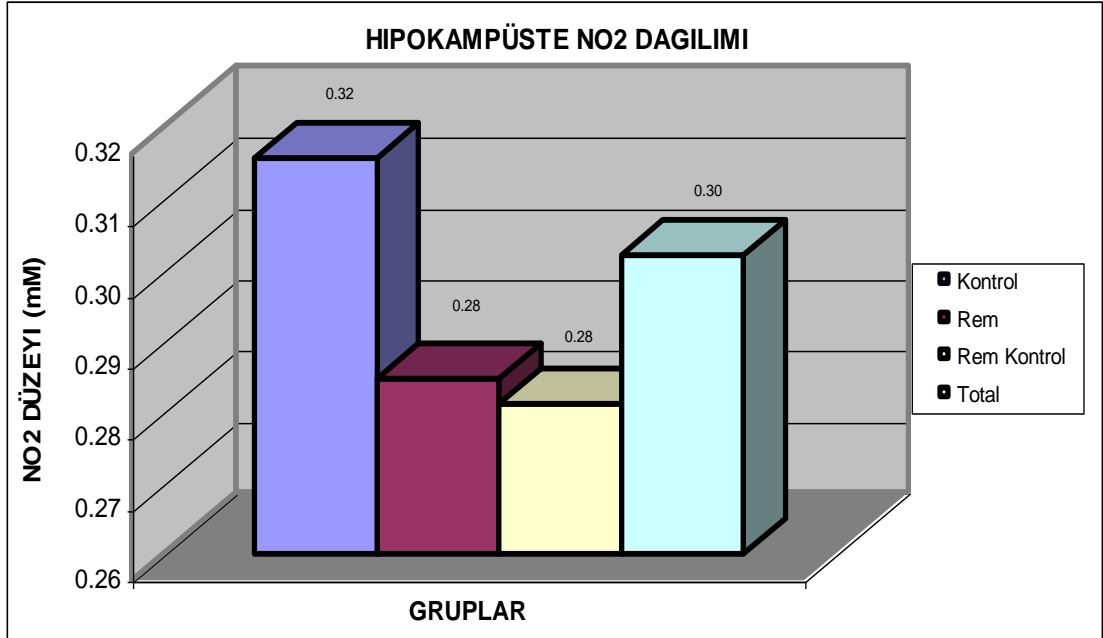
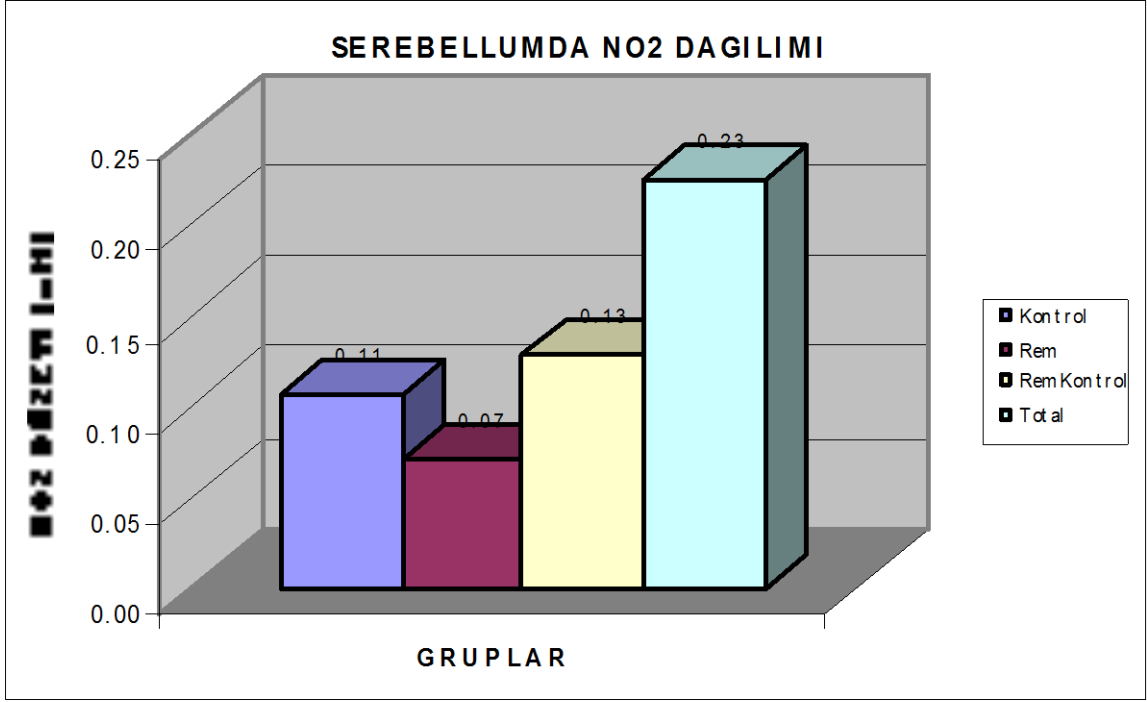


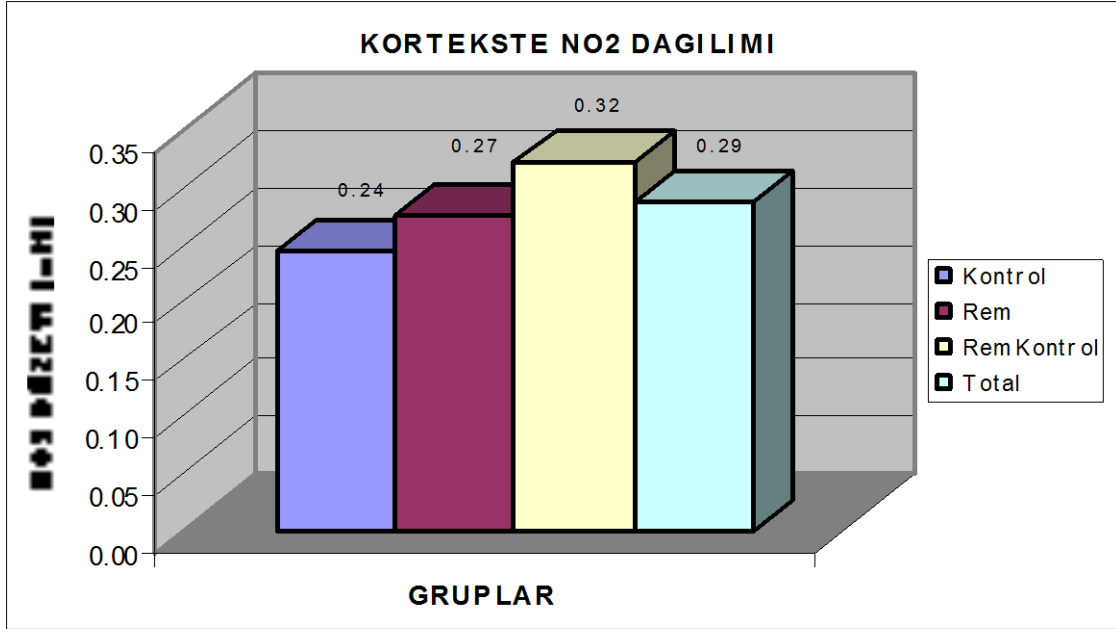


İkinci aşamada her grubun beyin alanlarında gösterdiği düzeyler incelenmiştir.

Grafik XIII – XVI: BEYİN ALANLARINDA GRUPLARARASI NO₂ DAĞILIMI







Tüm bu sonuçlara dayalı olarak, istatistiksel analiz için denek sayıları farklı (ikiden çoklu) gruplarda uygulanan varyans analizi uygulanmıştır. Analiz için bilgisayarda microsoft windows\ SPSS istatistik programında yer alan “Multivariate Anova” yöntemi kullanılmıştır. Varyanslar arası farklılığın belirlenmesinde ise Tukey-b testi kullanılmıştır.

4 ayrı beyin alanında (beyin sapı, serebellum, hipokampus ve korteks), 4 grupta (Total, REM, REM Kontrol, Kontrol) NO₃ düzeyleri bakımından farklılıkların anlamlı olduğu ($p < 0.05$), NO₂ düzeyleri bakımından ise anlamlı bir farklılık olmadığı ($p \geq 0.05$) görülmektedir. Total yoksunluk, REM yoksunluk ya da kontrol gruplarının NO₃ düzeylerinde farklılığın oluşmasında etkili olduğu ($p < 0.05$), NO₂ düzeylerinde ise farklılığın oluşunda etkili olmadığı görülmüştür. Buna karşın hem NO₃ hem de NO₂ düzeylerindeki farklılık ta beyin alanlarının etkili olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). NO₃ alanlar içinde en fazla hipokampüste

bulunmuştur. Ayrıca beyin sapı ve hipokampüs gruplarının serebelluma göre farklılık gösterdiği, NO₂ bakımından ise beyin sapı, hipokampüs ve korteksin serebellumdan farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.05$). NO₃ düzeyinde total uyku yoksunluğu, REM yoksunluğu, REM kontrol ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunduğu ($p < 0.05$) ve buna göre REM kontrol grubunun diğer gruplardan farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.05$).

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada uyku yoksunluğunun beyin NO düzeylerinde bir değişikliğe yol açıp açmadığı araştırılmıştır.

Nitrik oksit diğer sistemik etkilerinin yanısıra beynin başlıca olfaktor bulbus, bazal ön beyin alanı, medulla, hipotalamus, striatum, hippokampus, serebellum ve kortekste yaygın olarak sentezlenmekte (77,16,24) ve bu alanlarda bir nörotransmitter olarak görev yaparak, LTP mekanizması ile nöral plastisite, öğrenme, ve uzun süreli hafızanın oluşmasında rol oynamaktadır.

Literatürde, Merkezi Sinir Sisteminde uzun süreli davranış ve bellekten sorumlu olduğu bilinen NO'in uyku ile de yakından ilişkisinin olduğu ve NO inhibisyonlarının kısa süreli REM ve NREM uykusuzluğuna yol açtığı gösterilmiş bulunmaktadır (35).

NO ' in uyku doğuran beyin alanlarında Ach salınımını indükleyerek uyku oluşumunda rol oynadığı ve NO inhibitörleriyle uykunun inhibe edilebildiği ileri sürülmektedir (35).

Beyin NO metabolizmasında meydana gelebilecek değişikliklerin ise öğrenme, hafıza gibi mutlak etkili olduğu fizyolojik süreçlerde değişikliklere yol açacağı ve dolayısıyla olumsuz etkileri olabileceği düşüncesi bulunmaktadır. NO değişikliklerinin uykuya olan etkileri bilinmekle birlikte, uyku yoksunluğunun beyin NO düzeylerine etkileri ile ilgili çalışmalar azdır.

Bu düşünceden hareketle fizyolojik bir süreç olan uyku sırasında beyin NO değişiklikleri ve bu düzenin bozulması yani uykusuzluk periyotlarında NO düzeylerinin etkilenip etkilemediği ve hangi bölgelerin bu durumdan daha fazla etkilendiği araştırılmak istenmiştir.

Bu araştırmada sıçanlarda 5 gün süre ile total ve REM uykusu yoksunluğu uygulanması ve bu süreler sonunda beyin sapı, serebelum, hipokampus, ve kortekste NO düzeyleri, nitrik oksitin metabolitleri olan NO₃ ve NO₂ ölçümleri ile saptanmaya çalışılmıştır.

Doğrudan dokuda NO düzeyinin ölçülmesinin laboratuvarlarımızda mümkün olmamasından dolayı Sievers model analizörde NO₃ veya NO₂ gibi metabolitlerinin ölçümünden yararlanılmıştır.

NO biyolojik sistemlerde oksijen, oksihemoglobin ya da süperoksit tarafından oksidasyona uğratılarak, nitrit ya da nitrata oksidize edilmektedir. Sievers analizöründe aynı prensipten yararlanılarak radikal purger denilen odacıkta kimyasal indükleyici ajanlar kullanılmak suretiyle NO düzeyi, doku homojenatlarından NO₃ ya da NO₂ olarak saptanabilmiştir (72).

Bu çalışma hayvanların uykudan yoksun bırakılması, bunlardan doku numunelerinin ve numunelerden doku homojenatları hazırlanması, analizlerde son ürünlerin ölçülmesi gibi aşamaları içermektedir. Düzenlenmesi gereği birkaç aşamadan oluştuğu ve bu sırada pek çok çevresel etkenden etkilenebileceği için standardizasyonun sağlanması ve olumsuz koşulların aza indirilmesi gerekmektedir. Her bir aşama bir sonraki aşamayı olumsuz etkileyebileceğinden, bu konuya azami duyarlılık gösterilmiştir.

Araştırmamızda gerek total gerek REM uyku yoksunluğunu çalıştığımız düzeneklere ve uykusuzluğun yaratacağı strese bağlı kaygılarımız olmakla birlikte, literatürde stresin beyin NO düzeylerinde anlamlı bir etkiye yol açmadığı, yüksek kortizol düzeylerinde NO'nun değişmediği ve strese bağlı olarak artan noradrenalin deşarjının NO düzeylerini yükselttiğine dair bilgiler vardır. Bu bilgilerin ışığında oluşabilecek stresin gözardı edilebileceğine karar verilmiştir.

Total uyku yoksunluğu düzeneğinin egzersiz etkisi oluşturup oluşturamayacağı tartışılmıştır. Düzenekte yürüme bandı 0.4 m/dak hızla dönmektedir. Bu hız ile deneklerde oluşturabileceği günlük hareket miktarı 505 m/gün, harcatabileceği enerji 0.0019 Kcal/gün olarak belirlenmiştir. Bu değerler literatürdeki günlük yaşam aktiviteleri ile uyumlu düzeylerdir.

Araştırmamızın sonunda, 5 günlük total uyku yoksunluğuna uğratılan sıçanların hipokampüs doku NO₃ düzeyi 0.66 ± 0.11 mM/g, NO₂ düzeyi 0.30 ± 0.08 mM/g olarak bulunmuştur. Bu değerler uykusunu normal uyuyan sıçanların hipokampüsünden elde edilenden daha düşüktür (NO₃ düzeyi 0.72 ± 0.13 mM/g, NO₂ düzeyi 0.32 ± 0.08 mM/g).

REM uyku yoksunluğunda ise hipokampüs NO₃ düzeyi 0.62 ± 0.14 mM/g, NO₂ düzeyi 0.28 ± 0.14 mM/g olarak bulunmuştur. Bu değerler kontrollerine göre NO₃ düzeyinde düşük (NO₃ 0.75 ± 0.13 mM/g), NO₂ düzeyinde yakın düzeylerde (0.28 ± 0.05 mM/g) bulunmuştur.

Serebellum doku NO₃ düzeyi 0.65 ± 0.12 mM/g, NO₂ düzeyi 0.23 ± 0.12 mM/g olarak bulunmuştur. Bu değerler uykusunu normal uyuyan sıçanların

serebellumundan elde edilenden daha yüksektir (NO_3 düzeyi 0.40 ± 0.12 mM/g, NO_2 düzeyi 0.11 ± 0.04 mM/g).

REM uyku yoksunluğunda ise serebellum NO_3 düzeyi 0.32 ± 0.07 mM/g, NO_2 düzeyi 0.07 ± 0.03 mM/g olarak bulunmuştur. Bu değerler kontrollerine göre NO_3 ve NO_2 düzeyinde göre düşük düzeyde bulunmuştur (NO_3 0.41 ± 0.17 mM/g, 0.13 ± 0.10 mM/g).

Korteks doku NO_3 düzeyi 0.58 ± 0.21 mM/g, NO_2 düzeyi 0.29 ± 0.09 mM/g olarak bulunmuştur. Bu değerler uykusunu normal uyuyan sıçanların kortekslerinden elde edilenden daha yüksektir (NO_3 düzeyi 0.50 ± 0.15 mM/g, NO_2 düzeyi 0.24 ± 0.09 mM/g) .

REM uyku yoksunluğunda ise korteks NO_3 düzeyi 0.70 ± 0.18 mM/g, NO_2 düzeyi 0.27 ± 0.09 mM/g olarak bulunmuştur. Bu değerler kontrollerine göre NO_3 ve NO_2 düzeyinde daha düşük düzeyde bulunmuştur (NO_3 0.71 ± 0.19 mM/g, 0.32 ± 0.90 mM/g).

Beyin sapı doku NO_3 düzeyi 0.64 ± 0.02 mM/g, NO_2 düzeyi 0.22 ± 0.14 mM/g olarak bulunmuştur. Bu değerler uykusunu normal uyuyan sıçanların beyin sapından elde edilenden NO_3 bakımından daha yüksek (NO_3 düzeyi 0.40 ± 0.15 mM/g) iken, NO_2 düzeyi bakımından daha düşüktür (NO_2 düzeyi 0.35 ± 0.10 mM/g) .

REM uyku yoksunluğunda ise beyin sapı NO_3 düzeyi 0.42 ± 0.11 mM/g, NO_2 düzeyi 0.17 ± 0.15 mM/g olarak bulunmuştur. Bu değerler kontrollerine

göre NO₃ ve NO₂ düzeyinde daha düşük düzeyde bulunmuştur (NO₃ 1.55 ± 0.11 mM/g, 0.21 ± 0.25 mM/g).

Elde edilen sonuçlar, normal koşullardaki NO düzeylerini gösteren Benedetti (1993), Förstermann (1990), Williams (1996)' in çalışmalarının sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Uyku yoksunluğu oluşturulan durumlarda elde edilen sonuçlar ise, bu konudaki etkilerin düzeyi konusunda fikir verebilecek, daha ileride yapılacak çalışmalar için bir temel teşkil edebilecektir.

Çalışmamızda nitrat aktivitesinin ya da düzeyinin en fazla hipokampüste, nitrit düzeyinin de genel olarak en fazla hipokampüste bulunduğu saptanmıştır.

Nitrat miktarı, uykusu tamamen engellenen sıçanların hipokampüsü dışında diğer beyin alanlarında, normal uykusunu alan sıçanlara göre daha yüksek görülmektedir. REM uykusu engellenen sıçanlarda ise tam tersine tüm alanlarda belirgin azalma ortaya çıkmıştır.

Nitrit bakımından normal uykusunu alan sıçanlara göre uykusu tamamen engellenen sıçanlarda pek fazla değişiklik gözlenmez iken; REM uykusu engellenen sıçanlarda ise yine belirgin şekilde azalma ortaya çıkmıştır.

Sonuçlar üzerinden yapılan çoklu varyans analizi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede şu sonuçlar elde edilmiştir. Numune alınan beyin alanları itibariyle beyin sapı, serebelum, hipokampüs, hipotalamus, kortekste NO₃ ve NO₂ düzeyleri bakımından farklılık olduğu (p<0.05) ve yapılan istatistiksel analizlere dayalı olarak da, alanlara göre değişiklik görüldüğü saptanmıştır.

Bu durum Benedetti ve arkadaşları (9), Williams ve arkadaşları (77) ve Förstermann ve arkadaşlarının (24) çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Çalışmada uyku yoksunluğunun NO₃ düzeyinde anlamlı bir şekilde artışa yol açtığı, bu artışın beyin sapı ve serebellumda daha fazla olduğu, ancak NO₂ düzeyinde anlamlı olacak bir farklılık oluşturmadığı ortaya çıkmıştır (p>0.05). Sadece REM uykusu engellendiğinde ise kontrollerine göre hem nitrat hem de nitrit düzeylerinde yükselme yerine düşüşe yol açtığı görülmüştür.

5 günlük uyku yoksunluğu sonrası NO₃ ve NO₂ değerlerinde düşme olması bu bölgelerin uyku oluşturmada NO sentaz aktivitesi ile daha yakın ilişkide olduğunu göstermektedir. Olası bir şekilde uykusuzluk NO sentaz aktivitesini inhibe etmekte ve bu bölgeler inhibisyona daha duyarlı olmaktadır.

Sınırlı sayılardaki örnekler üzerinden elde edilen sonuçlara göre, uyku yoksunluğunun beyinde nitrik oksit metabolizması ve düzeyleri üzerine etkileri hakkında genelleme yapmak mümkün olamayacaktır. Sonuçlar NO'in beyin alanlarında dağılımları ve tamamen ya da REM uykusu engellenen sıçanlarda ne gibi değişiklikler olabildiği konusunda ileriye dönük yararlı bilgiler vermektedir. Ancak çalışmanın ileride daha geliştirilmesi ve her ölçüm için yeterli standart koşullar sağlanarak, daha geniş serilerle değerlendirmeler yapmak daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. AKERSTEDT,T.,FROBERG.J.E.,FRIBERG,Y.: Melatonin Excretion, Body Temperature And Subjective Arousal During 64 Hours Of Sleepdeprivation. *Psyconeuroendocrinology*,No:4, 219-225. (1979).
2. AOKI,T.: Continious Flow Determination Of Nitrite With Membran Seperation/Chemiluminescence Detection, *Biomed Chromatogr.* NO: 4, 128-130. (1990).
3. ARCHER,S.: Measurement Of Nitric Oxide In Biological Models, *Faseb J.* No:7, 349-360. (1993).
4. ARCHER,S.,COWAN,N.J.: Acetylcoline Causes Endotelium Dependent Vasodilatation But Does Not Stimulate Nitric Oxide Production By Rat Pulmonary Arteries Or Elevate Endotelial Cytosolic Calcium Concentrations, *Circ.Res.*No: 68,1569-1581.(1991).
5. ARMSTRONG,D.M.,C.B.SAPER,A.I.LEVEY,B.H.WAINER,R.D.TERRY.: Distribution Of Cholinergic Neurons In Rat Brain: Demonstrated By The Immunocytochemical Localisation Of Cholineacetyltransferase, *J.Comp.Neurol*, No:216, 53-68. (1983).
6. ARROYO,C.,KOHNO,M.: Difficulties Encountered In The Detection Of NO By Spi Trapping Techniques, *Free Radic.Res.Comm.*No: 14, 145-155. (1991).
7. AWOLESI.M,A,WIDMANN.M,D,SESSA.W,C,SUMPIO.B,E.: Cyclik Strain Increases Endothelial No Synthase Activity, *Surgery*, vol.116,no.2, 449-445.(1994).

8. BECK,U.:Hormonal Secretion During Sleep In Man. Modification Of Growth Hormone And Prolactin Secretion By Interruption And Selective Deprivation Of Sleep, Int.J.Neurol.,No: 15, 17-29. (1981).
9. BENEDETTI,S.,M.,DOSTERT,P.,MARRARI,P.,CINI,M.: Effect Of Ageing On Tissue Levels Of Amino Acids Involved In The Nitric Oxide Pathway In Rat Brain. J.Neur.Transm., No: 94, 21-30. (1993).
- 10.BETTENDORFF.L,SALLANON.M,M,TOURET.M,WINS.P,MARGINEAU.I.: Paradoxical Sleep Deprivation Increases The Content Of Glutamate And Glutamine In Rat Cerebral Cortex, Sleep,vol.19,no.1,65-71. (1996).
- 11.BORBELY,A.A.: A Two Process Model Of Sleep Regulation, Humn.Neurobiol., No: 1,195-204.(1982).
- 12.BRAKER,W.,MOSSMAN,A.L.: The Matheson Unabridged Gas Data Book, 6th Ed. East Matheson,Rutherford,N.J.,(1975).
- 13.BRIEN,J.,MC LAUGHLIN,B.,NAKATSU,K.: Quantitatif Of No Formation From Nitrovasodilatator Drugs By Chemiluminescence Analysis Of Headspace Gas. J.Pharmacol.Methods.,No:25, 19-27.(1991).
- 14.BROWN,R.,PANG,G.,HUSBAND,A.J.: Supression Of Immunity To Influenza Virus Infection In The Respiratory Tract Following Sleep Disturbance, Reg.Immunol. No: 2, 321-325.(1989).
- 15.BUDVARI,S.,O'NEIL,M.J.,SMITH,A.: Merc Index . 11.Ed.,Merc&Co.Inc.
- 16.BRUHWYLER,J,CHLEIDE,E,LIEGEOIS,F,CARREER,F.: Nitric Oxide: A New Messenger In The Brain, Neuroscience and Biobehavioral Reviews,vol.17,337-384. (1993) .

17. BURNETT, A.L., LOWENSTEIN, C.J., BREDT, D.S., CHANK, T.S.K., SYNDER, S.H.: Nitric Oxide: A Physiologic Mediator Of Penile Erection". Science.No:257,401-403.(1992).
18. CHEN, W.Z., PALMER, R.M.J., MONCADA, S.: Release Of No From A Rabbit Aorta, J.Vasc.Med.Biol.No:1,1-6. (1989).
19. CHUNG, S., FUNG, H.: Identification Of Subcellular Site For Nitroglycerin Metabolism To Nitric Oxide In Bovine Coronary Smooth Muscle Cells, J.Pharmacol.Exp.Ther, No: 253, 614-619 . (1990).
20. DAWSON-TM, DAWSON-VL. : Nitric Oxide Synthase: Role As A Transmitter/Mediator In The Brain And Endocrine System, Annu-Rev-Med, No.47, 219-27.(1996).
21. ELPHICK, M.R., GREEN, I.C., O'SHEA, M. BRAIN RESARCH.: Nitric Oxide Synthesis And Action In An Intervertebrate Brain, vol.619, 344-346. (1993).
22. EVERSON, C.A., BERGMANN, B.M., RECHTSCHAFFEN, A.: Sleep deprivation in the rat, III: Total sleep deprivation, Sleep. No: 12, 13-21. (1989).
23. FÖRSTERMANN, U., GORSKY, L., POLLOCK, J.S., SCHMIDT, H., HELLE, M., MURAD, F.: Regional Distribution Of EDRF/ NO Synthesizing Enzyme(S) In Rat Brain, Biochemical and Biophysical Research Communications.Vol. 168-2, 727-732. (1990).
24. GANONG, W.F.: TIBBI FIZYOLOJİ (ÇEVİRİ), XVI.Baskı, Barış Kitabevi, İstanbul,Türkiye, 115-120, 204-250, 640-645, ABD,(1995).

25. GARTHWAITE, J.: Glutamate, Nitric Oxide And Cell-Cell Signaling In The Nervous System, Trends Neurosci.No:14,60-67. (1991).
26. GARTHWAITE.J.,CHARLES,S.L.,CHESS-WILLIAMS,R.: EDRF Release On Activation Of NMDA Receptor, Nature.Vol.336, 385-387(1988).
27. GELIR,E.: Uyku Yoksunluğunun Yara İyileşmesine Etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniv. Sağ.Bilimleri Enstitüsü,Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara (1996).
28. GIBALDI,M.: What Is The NO And Why Are So Many People Study In It ?, J.Clin.Pharmacool. No: 33, 488-496. (1993).
29. GOLDMAN,A,P,MACRAE,D,J.: Nitrogen Dioxide Measurement In Breathing Systems ,vol.343, 850,4. (1994).
30. GREENBERG,S.S.,WILCOX,D.E.,RUBANYI,G.M.: EDRF Released From Canin Femoral Artery By Acetylcholine Cannot Be Identifiedas Free NO By Electronparamagnetic Resonance Spectroscopy, Circ. Res.No:67,1446-1452.(1990).
31. GUYTON,A,C. VE HALL,J,H.: Textbook Of Medical Physiology (Çeviri) 9. Baskı, Bölüm 59,ABD, (1996).
32. HAURI,P.,ORR,W.C.: The Sleep Disorders, Upjogn,Michigan, 6. (1982).
33. HENRY,Y.,DUCROCQ,C.,DRAPIER,J.: Nitric Oxide A Biological Effector Electron Paramagnetic Resonance Detection Of Nitrosyl-Iron-Protein Complexes In Whole Cells, Eur.Biophys.J. No:20, 1-15. (1991).
34. IBUKA,N.,INOUYE,S.T.,KAWAMURA,H.: Analysis Of Sleep-Wakefulness Rhythms In Male Rats After Suprachiasmatic Nucleus Lesions And Ocular Enucleation, Brain Research. No:122, 33-47. (1977).

35. IGNARRO, L.J.: Endothelium-Derived Nitric Oxide :Actions And Properties, *Faseb J.* No:3, 31-36.(1989).
36. KAPAS, L., SHIBATA, M., KIMURA, M., KRUGER, J.M.: Inhibition On Nitric Oxide Synthesis Suppresses Sleep In Rabbits ,*Am. Journal of Physiology*, 266,R151-R157. (1994).
37. KELLY, D.D.: Sleep and Dreaming, "Principle Of Neural Science", Chapter 51, 792-804, USA, (1991).
38. KELM, M., FREELISH, M. SPAHR, R.: Quantitative And Kinetic Characterisation Of NO And EDRF Release From Cultured Endothelial Cells, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* No:154, 237-244.(1988).
39. KNOWLES, R.G., PALACOS, M., PALMER, R., MONCADA, S. : Formation Of NO From L-Arginin In The Central Nerv. Syst, *Proc. Acad. Sci. USA.* Vol.86, 5159-5162 (1989).
40. KOLLAR, E.J., SLATER, G.G., PALMER, J.O.: Stress In Subjects Undergoing Sleep Deprivation, *Psychosom. Med*, No:28.101-113. (1966).
41. KRYGER, M.H., ROTH, T., DEMENT, W.C.: Principles And Practice Of Sleep Medicine, WB Saunders, Philedelphia, 163.(1994).
42. MARLETTA, M.A.: The Journal Of Biological Chemistry, "Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism", vol.265 , 17,12231-12234. (1993).
43. MARTIN, W., SMITH, J., LEWIS, M.J., HENDERSON, A.H.: Evidence The Inhibitory Factor Extracted From Bovine Retractor Penis In Nitrit, whose activited derivative is stabilized NO, *Br.J.Pharmacol.*No: 93, 579-585. (1988).

44. MATSUMOTO,A,HIRATA,Y, MOMOMURA,S, ET ALL. : Increased NO Production During Exercise , vol.343, 849-850,4- (1994).
45. MCDONALD-LJ; MOSS-J.: TI: Nitric Oxide-Independent, Thiol-Associated ADP-Ribosylation Inactivates Aldehyde Dehydrogenase, J-Biol-Chem.vol.25.no 268(24),.17878-82. (1993)
46. MENON,N.,WOLF,A.,ZEHEGTRUBER,M.,BING,R.: An Improved Chemiluminescence Assay Suggests Non NO Mediated Action Of Lysophosphatidylcholine And Aethylcholine, Proc.Soc.Exp.Biol.Med, No:191,316-319. (1989).
47. MONCADA,S.,PALMER,R,M.J.,HIGGS,E.A.: Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, Pharmacology, Pharmacol. Rev. No: 43, 109-141. (1991).
48. MOORE,R.Y.,EICHLER,V.B.: Loss Of Circadian Adrenal Corticosteron Rhythm Following Suprachiasmatic Lesions In The Rat, Brain Res. No: 42, 201-206. (1972).
49. MORRISON,A.R.: Is The Pons The Site Of Rapid Eye Movement Sleep Generation In Normal Individuals? Sleep Res. No: 20A, 57. (1991).
50. NAITOH,P.,PASNAU,R.U.,KOLLAR,E.J.: Psychophysiological Changes After Prolong Deprivation Of Sleep, Biol.Psychiatry. No: 3, 309-320. (1971).
51. NAITOH,P.KALES,A.,KOLLAR,E.J.: Electroencephalographic Activity After Prolonged Sleep Loss, Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.no:27, 2-11. (1969).

52. NATHAN, C.: Nitric Oxide As A Secretory Product Of Mammalian Cells, *Faseb. J.* No: 6, 3051-3064. (1992).
53. OTHMER, E.: Persönlichkeit Und Schlafverhalten, *Psychologia Universalis.* No: 9, 1-128. (1965).
54. PALMBLAD, J., AKERSTEDT, T., FROBERG, J.: Thyroid And Adrenomedullary Reactions During Sleep Deprivation, *Acta Endocrinol.* No: 90, 223-239. (1979).
55. PALMER, R.M.J., FERRIDGE, A.G., MONCADA, S.: Nitric Oxide Release Accounts For The Biological Activity of Endothelium Derivated Relaxing Factor, *Nature (London)*, No: 327, 524-526. (1987).
56. PARMEGGIANI, P.L.: Interaction Between Sleep And Themoregulation: An Aspect Of The Control Of Behavioral States, *Sleep.* No: 10, 426-435. (1987).
57. PETROS, A., BENNETT, D., VALLANCE, P.: Effect Of NO Synthase Inhibitors On Hipotention In Patients With Septic Shock, *Lancet.* No: 338, 1557-1558. (1991).
58. PINEL, J.P.J.: *Biopsychology: "Sleep, Dreaming And Circadian Rhythms"*, Allyn & Bacon. 393. (1993).
59. PINEL, J.P.J.: *Biopsychology: "Sleep, Dreaming And Circadian Rhythms"*, Allyn & Bacon. 405-408. (1993).
60. QUATTROCCI, J.J., MAMELAK, A.N., MADISON, R.D.: Mapping Neuronal Inputs To Rem Sleep Induction Sites With Carbacol-Fluorescent Microspheres, *Science.* No: 245, 984-986. (1989).

61. REES, D.D., PALMER, R.M.J., MONCADA, S.: Role Of Endothelium-Derived Nitric Oxide In Regulation Of Blood Pressure, Proc. Natl. Acad. Sci. No: 86, 3375-3378. (1989).
62. RESCHTSCHAFFEN, A., BEGMANN, B.M.: Sleep Deprivation In The Rat By The Disk-Over-Water Method, Behavioral Brain Res. No: 69, 55-63. (1995).
63. RESCHTSCHAFFEN, A., KALES, A.: A Manual Of Standardized Terminology Techniques And Scoring System For Sleep Stages Of Human Subjects, Ucla, Los Angeles, USA, 1-12. (1968).
64. ROBINSON, T.E.: Behavioral Approaches To Brain Research, Oxford Univ., New York, USA, 69. (1983).
65. RODIN, E.A., LUBY, E.D., GOTTLEIB, J.S.: The Eeg During Prolonged Experimental Sleep Deprivation, Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. No:14, 544-551. (1962).
66. ROSS, J.J.: Neurological Findings After Prolonged Sleep Deprivation, Arch Neurol. No:12. 399-403. (1965).
67. RUSAK, B., GROSS, G.: Suprachiasmatic Stimulation Phase Shifts Rodent Circadian Rhythms, Science. No: 215, 1407-1409. (1982).
68. SCHMIDT, H.W., NAU, H., WITTFORT, W., GERLACH.: Arginine Is A Physiologic Precursor of Endothelium Derived NO, Eur.J.Pharmacol.No:154, 212-216. (1988).

69. SCHMIDT, H., WILKE, P., EVERS, B., BÖHME, E.: Enzymatic Formation Of NO From L- Arginin In Bovine Brain, Biochem and Biophys. Res. Comm. Vol:165, No:1, 284-291. (1989).
70. SCHUMAN, E.M., D.V. MADISON.: A Requirement For The Intercellular Messenger Nitric Oxide In Long Term Potentiation , Science Wash. No: DC 254, 1503-1506. (1991).
71. SHIBUKI, K., D. OKADA.: Endogenous Nitric Oxide Release Required For Long Term Synaptic Depression In The Cerebellum, Nature Lond. No: 349, 326-328. (1991).
72. SIEVERS INSTRUMENTS Model 280 Nitric Oxide Analyzer (NO A) "Kullanım Klavuzu". Sievers Inst. Inc., USA.
73. SITARAM, N., MOORE, A.M., GILLIN, J.C.: Experimental Accelerations And Slowing Of REM Ultradian Rhythm By Cholinergic Agonist And Antagonist, Nature. No: 274, 490-492. (1978).
74. TRACEY, W.R., LINDEN, J., PEACH, M.J., JOHNS, R.A.: Comparision Of Spectrophotometric And Biological Assays For NO And EDRF :Nonspecificity Of The Diazotisation Reaction For NO And Failure To Detect EDRF". J.Pharmacol.Exp.Ther, No:252, 922-928. (1990).
75. TROLIN, G., ANDEN, T., HEDENSTIERNA, G.: NO In The Expired Air At Rest And During Exercise , Acta. Phisiol. Scand., no 151, 159-163. (1994).
76. ZAFIRIOU, O.C., MC.FARLAND, M.: Determination Of Trace Levels Of No In Aqueous Solution , Analyt. Chem. No: 52, 1662-1667. (1980).

77. WILLIAMS, S., A., J., VINCENT, R., S., REINER, B., P.: Nitric Oxide Production In Rat Thalamus Changes With Behavioral State, Local Depolarisation And Brainstem Stimulation, J. Neuroscience, 17 (1), 420-470. (1996).