

**SIÇANLARDA REM UYKU YOKSUNLUĞU YARATMA
MODELİ GELİŞTİRİLMESİ***
Designing a Model of REM Sleep Deprivation in Rats

Ahmet AYTEKİN¹, Gül ERDAL¹

Özet : Uyku yoksunluğu oluşturulan çalışmalarda tercihen kullanılan Su Tankı yönteminde, su tankına yerleştirilen sabit platformlarla birden fazla deney hayvanında uyku yoksunluğu oluşturulabilmektedir. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda deney sonunda hayvanların genel fizyolojik durumu diğer yöntemlerle yapılan çalışmalardaki kadar olumsuz etkilenmemektedir. Amacımız, Su Tankı yöntemini daha az stresle uyku yoksunluğu oluşturacak şekilde modifiye etmek ve yöntemimizin uygunluğunu ağırlık değişimiyle değerlendirmektir. Uyku Yoksunluğu Düzenegi: Tankın boyutları 145cmx44cmx45cm ve su yüksekliği 15 cm olarak ayarlanmıştır. Su seviyesinin 1cm üzerinde kalacak şekilde 16 cm'lik ayak üzerinde 6.5 cm çapında 14 adet platform yerleştirilmiştir. Ortam Kontrol Düzenegi: Yukarıda açıklanan düzeneden farklı olarak tanka 13 cm çapında 12 adet platform konulmuş ve platformlar arası alan tel ızgara ile kapatılmıştır. Çalışmada, 13-14 aylık, 31 adet Wistar cinsi erkek sıçan, Grup I: 72 saatlik uyku yoksunluğu oluşturulan grup, Grup II: uyku yoksunluğu ortamının kontrol grubu, Grup III: kafes kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Deney öncesinde ve sonrasında ağırlıklar ölçülmüştür. Veriler Kruskal-Wallis Varyans Analizi ve Wilcoxon İşaret Testi ile değerlendirilmiştir. İleri analiz için Dunn's metodu kullanılmıştır. Grupların ağırlık değişimleri karşılaştırılmış, deney sonrası ağırlık azalması Grup I'de anlamlıyken ($p<0.05$), Grup II ve III'de anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Grup I'deki ağırlık azalması uyku yoksunluğunun oluştuğunu, Grup II'nin ağırlığındaki azalmanın anlamsız olması sıçanların uyuyabildiğini göstermiştir. Bu sonuçlar geliştirdiğimiz düzeneğin uygunluğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: REM uyku yoksunluğu, sıçan, modifiye platform tekniği

Summary : In the method of Water Tank, which is used preferably in the studies of sleep deprivation, it is possible to produce sleep deprivation in more than one experimental animal with platforms placed in a stable Water Tank. When compared with other methods, the general physiological condition of the animals at the end of experiment is not affected so negatively in this method. Our aim is to modify the method in a way to design a sleep deprivation with less stress, and to assess the suitability of our method with weight change. Experimental Group : The dimensions of the tank are 145 cmx44cmx45cm, and the height of water is at 15 cm. Fourteen platforms, 6.5 cm in diameters, are placed at 1 cm above the level of water. Environmental Control Group: 12 platforms, 13 cm in diameters, are used differently compared with the ones above. A grid is placed between the platforms. In order to assess weight change, 31 Wistar male rats aged 13-14 months are divided into three groups: Group I: A group in which a 72 hours' sleep deprivation is designed. Group II: Control group of the environment of sleep deprivation. Group III: Home cage control group. The pre- and post- experimental weights are measured. The data is assessed using Kruskal-Wallis tests and Wilcoxon signed ranks tests. For a further analysis, the Dunn's method is used. The weight changes in the groups are compared with each others, and they are found significant ($p<0.05$). Though the decrease of weight is significant for Group I ($p<0.05$), it is not meaningful for Group II and III ($p>0.05$). While the decrease of weight in Group I shows that the sleep deprivation occurs, negligible decrease of weight in Group II indicates that the rats can sleep. These results point out the appropriateness of the model developed.

Key words: REM sleep deprivation, rat, modified platform technique.

¹ Erciyes Ün.Tıp Fak. Dönem IV. öğrencileri, Kayseri

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (07-04/234)

* Bu çalışmanın bir kısmı 31.Ulusal Fizyoloji Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Uyku çalışmaları, belirli bir uyku dönemi içindeki değişimlerin insan ve deney hayvanlarında fizyolojik ve elektrofizyolojik koşullarda araştırılması şeklinde yada uyku yoksunluğu yaratılmış deney hayvanı modellerinde yürütülmektedir (1).

İnsanlarda görülen insomnia, obstruktif uyku apnesi, huzursuz bacak sendromu gibi uyku bozukluklarının belirgin bir özelliği hastalarda REM (paradoksal uyku) uykusu yoksunluğu oluşmasıdır (2). Bu da bize REM uykusu yoksunluğunda oluşan değişimleri anlayabilmemiz için hayvanlarda REM uykusu yoksunluğu oluşturulan modellerin geliştirilmesinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Kedilerde paradoksal uyku yoksunluğu oluşturan bir yöntem ilk kez 1964'te Jouvett ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Flower pot (su tankı, Platform tekniği) olarak da bilinen bu yöntemin temeli REM uykusunda oluşan kas tonusu azalmasına bağlıdır (2-5). Kedilerde manüplasyon zorluğu ve tek hayvanla çalışılması nedeni ile kısa süre sonra bu yöntem sıçanlara uyarlanmıştır (2-4). Sıçanlara uyarlanan bu yöntemde, küçük platformlar bulunduran bir su tankı kullanılır. Bu yöntem etkin, ekonomik ve her hangi bir invaziv işlem gerektirmemesi gibi avantajları nedeni ile oldukça geniş kullanım alanına sahiptir (2-5). Bununla beraber su tankı yöntemiyle deney hayvanlarında stres oluştuğu bilinmektedir. Beynin çeşitli bölgelerinde kortikotropin-serbestleştirici faktör (CRF)'ün reseptör sayısındaki artma, hipotalamusun CRF içeriğinde azalma, vücut ve timus ağırlığında azalma, adrenal bezin ağırlığında artma ve ACTH seviyesindeki artma gibi faktörler stres oluştuğunun bir göstergesidir (2,3,6,7). Bu etkilerin nedenleri şöyle sıralanabilir:

- 1) Sosyal izolasyon
- 2) İmmobilizasyon
- 3) REM uykusu yoksunluğu

Bu konuyla ilgili yapılan bir çok çalışma göstermiştir ki stresi en aza indirmek için aynı tankta birden fazla hayvanla çalışılması ve tankın hayvan sayısından daha fazla sayıda platform içermesi gerekmektedir. Ayrıca ortam farklılığından kaynaklanan stresi de en aza indirmek için çalışmalar-

da uyku yoksunluğu oluşturulan grupla aynı şartlara sahip ancak, normal uykularını uyuyabilecekleri kadar büyüklükte platformlara sahip ortam kontrol grubuyla çalışılması gerekmektedir (2,3,5,7). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise ortam kontrol gruplarının direk suyla temasını engellemek ve rahat hareket etmelerini sağlamak için platformlar arası boşluklara tel ızgara döşenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (2,3).

Amacımız, su tankı yöntemini daha az stresle uyku yoksunluğu oluşturacak şekilde modifiye etmek ve geliştirilen yöntemin uygunluğunu ağırlık değişimiyle değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'dan sağlanan 13-14 aylık 31 adet Wistar cinsi erkek sıçan kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirildi. Hayvanlar için 12 saatlik (07:00-19:00) aydınlık-karanlık döngüsü uygulanıp, deney süresince ortam sıcaklığı $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sabit tutuldu. Standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ortamda sürekli bulundurulup, beslenmede herhangi sınırlandırma uygulanmadı. Sıçanlar;

Grup I: 72 saatlik uyku yoksunluğu oluşturulan grup (n=11)

Grup II: Uyku yoksunluğu ortamının kontrol grubu (n=10)

Grup III: Kafes kontrol grubu (n=10) olmak üzere üç gruba ayrıldı.

Birinci ve ikinci gruptaki sıçanlar çalışma başlamadan önce bir hafta boyunca günde bir saat platformda durmaya ve düzeneğe alıştırdı. Deney öncesinde ve sonrasında ağırlıklar dijital tartı aleti ile ölçüldü.

Uyku yoksunluğu, uzunluğu 145 cm, eni 44 cm ve yüksekliği 45 cm olan pleksiglas su tankında gerçekleştirildi. Havuz sistemine dayanarak oluşturulan su tankı düzeneği pleksiglasdan yapılarak daha ekonomik ve taşınabilir hale getirildi.



Resim 1. Uyku yoksunluğu oluşturma çalışmasından bir görünüm

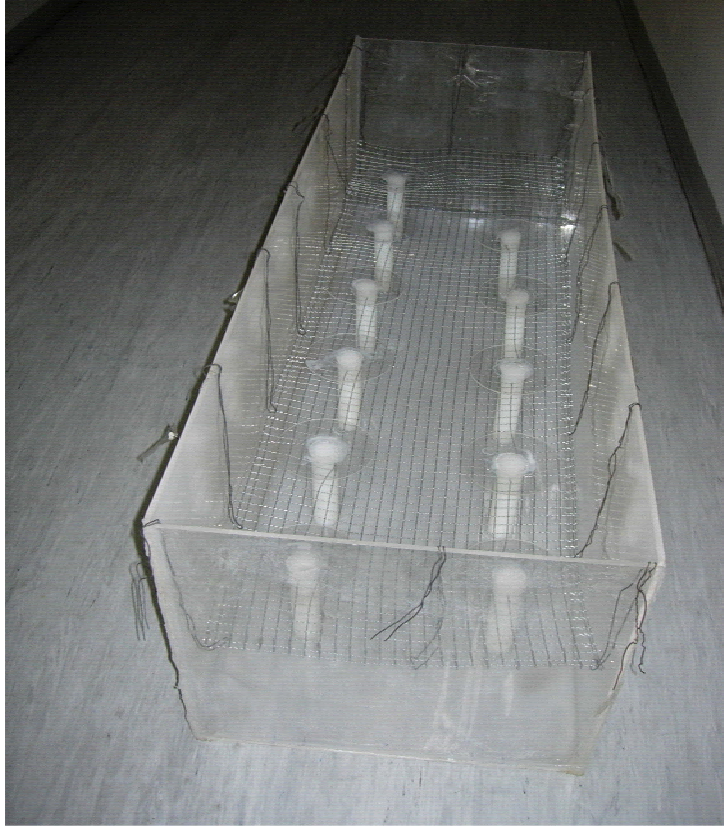
Su tankı 15.0 cm yüksekliğe kadar suyla doldurulduğunda her biri 6.5 cm çapında olan 14 adet platform su tankına 10'ar cm aralıkla ve su seviyesinden 1 cm yukarıda kalacak şekilde sabitlendi. Dört platform boş bırakıldı. Böylece, sıçanlar bir platformdan diğerine sıçrayarak hareket edebildi. Sıçanlar uyku yoksunluğu oluşturmak için su tankındaki platformlara konularak 72 saat süresince su tankı ortamında tutuldular.

Su tankının üzeri sıçan yemi ve su şişeleri içeren tel ızgara ile örtüldü. Böylece, deney süresince sıçanlar besine ve suya serbestçe ulaşabildiler. Deney süresince 12 saatte bir tankın suyu düzenli bir şekilde yenildi (2,3).

Ortam farklılığından kaynaklanan stresin etkisini belirleyip, sadece uyku yoksunluğundan kaynaklanan değişimleri saptayabilmek için uyku yoksunlu-

ğu yaratılan ortamın kontrolü amacı ile aynı ölçülerdeki su tankı, 13 cm çapındaki daha geniş platformlar içerecek şekilde düzenlendi.

Deney grubundan farklı olarak; su tankına tabandan 16 cm yüksekte tankın uzunluğu ve eni ile aynı boyutlarda tel ızgara yerleştirildi. Izgara aralıkları arası 2.3×2.3 cm olarak ayarlandı. 12 adet 13 cm çapında platform aralarında 10'ar cm olacak şekilde tel ızgaranın kesilmesiyle açılan alanlara yerleştirilerek, su tankına sabitlendi. Böylece, ızgara ve platformun üst yüzeyi aynı seviyeye getirildi. Bu seviyenin 1 cm altına kadar tank suyla dolduruldu (2,3). Uyku yoksunluğu yaratılan ortamın kontrolü için bu düzenekte 10 adet sıçanla çalışıldı.



Resim 2. Ortam kontrol grubu için kullanılan su tankından bir görünüm

Çalışma süresince deneyin gerçekleştiği odada kendi kafeslerinde tutularak normal uykularını uyuyan sıçanlar kafes kontrol grubunu oluşturdu- lar.

Her bir grupta sıçanlar deney öncesinde ve deney sonrasında tartılarak vücut ağırlıkları belirlendi. Ağırlık değişimin anlamlılığı Wilcoxon T testi ile analiz edildi. Gruplarda deney öncesi ve sonrası ağırlıklar arasındaki farklarının ortancaları ise Kruskal Wallis Varyans analizi ile incelendi. İleri analiz için Dunn's methodu kullanıldı. İstatistiksel olarak $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Ortam kontrol grubundaki sıçanların deney süresince geniş platformlarda normal uykularını uyuyabildiğini ve tel ızgara üzerinde rahatça hareket edebildiğini, uyku yoksunluğu yaratılan grupta ise sıçanların uyku sürecine girdiğinde vücutlarının bir parçasının özellikle burunlarının suya teması ile, sudan kaçınmak için uyandıklarını gözlemlendi.

Her bir grubun deney öncesi ve sonrası ağırlık ortalamalarının karşılaştırılması Tablo I' de gösterilmiştir. Deney sonrası ağırlık azalması Grup I' de anlamlıyken ($p<0.05$), Grup II ve III' de anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$).

Tablo I. Gruplarda deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarının karşılaştırılması

	N	Deney öncesi VA	Deney sonrası VA	Z	p
		Ortanca (min-max)	Ortanca (min-max)		
Grup I	11	351 (335-378)	320 (300-340)	-2,848	< 0,05
Grup II	10	386 (300-420)	375 (295-400)	- 1,224	> 0,05
Grup III	10	371 (337-393)	371 (337-393)	1,0	> 0,05

VA: Vücut Ağırlığı

Değerler vücut ağırlıklarının ortancası (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

Grupların fark ortalamalarının karşılaştırılması Tablo II 'de gösterilmiştir. Grupların, deney öncesine göre deney sonunda oluşan ağırlık değişimleri karşılaştırılmış, anlamlı bulunmuştur ($\chi^2=8,461$, $p<0.05$).

Kruskal Wallis Varyans analizi ile gruplar birbirinden farklı bulunmuş olup, Dunn's methodu ile yapılan ileri analizde farkın Grup I'den kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Tablo II. Gruplarda deney öncesi ve sonrasında vücut ağırlıkları arasındaki farkların karşılaştırılması

	N	Vücut Ağırlıkları arasındaki farkların ortancası	X ²	p
		(min-max)		
Grup I	11	30 (-5-77)	8.461	< 0,05
Grup II	10	16,5 (-75-92)		
Grup III	10	0 (0-0)		

Değerler vücut ağırlıkları arasındaki farkların ortancası (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki su tankı (Platform Tekniği) düzeneği sıçanlarda uygun bir REM uyku yoksunluğu yaratma modelidir (2-5,7,8). Uyku yoksunluğu yaratılan grubun kontrolü için oluşturulan ızgaralı ortam kontrol grubu da en uygun ortam kontrol grubu olarak kabul edilmesine rağmen, su tankı yönteminde stresin mükemmel bir kontrolünün olmadığı kabul edilmektedir. Bu yöntemde her ne kadar en ideal kontrol grubuyla çalışılsa da stres oluşturan faktörleri tamamen ortadan kaldırmak mümkün değildir. Ancak stres en aza indirilebilir (2,3,7).

Su tankı yöntemi kullanılarak uyku yoksunluğu oluşturulan çalışmalarda, ortam kontrol grubu olarak sadece ızgara yada sadece geniş platformlar içeren düzenekler kullanılmıştır. Geniş platformlar kullanıldığında ortam kontrol grubunda da bir miktar uyku yoksunluğu oluştuğu gözlenmiş, bu nedenle ızgara kullanılması tavsiye edilmiştir (2,3,7). Izgara kullanımıyla hayvanların suya düşme tehlikesi olmadan rahatça hareket etmesini ve uyumasını sağlamak amaçlansa da suya temas eden hayvanların uyku kalıplarının bir miktar bozulduğu gözlenmiştir. Bu sorunu ortadan kaldırmak amacıyla sunulan çalışmada su tankı yöntemi tel ızgarayla beraber geniş platformlar içerecek şekilde modifiye edilmiştir. Böylece sıçanların suya temas etmeden rahatça uyuyabilmeleri sağlanmıştır. Ayrıca, Suchecki ve arkadaşları (2,3) havuz sistemine dayanarak oluşturdukları sabit düzenek, pleksiglass ile kurularak daha ekonomik ve taşınabilir hale getirilmiştir.

Suchecki ve arkadaşları (2,3) su tankı yöntemi ile sıçanlarda yapmış oldukları uyku yoksunluğu oluşturma çalışmalarında uyku yoksunluğu oluşturulan grupta ortam kontrol grubuna göre daha fazla ağırlık azalmasını saptamışlar ve yöntemin uygunluğunu ağırlık azalması ile açıklamışlardır(2,3,7). Bu çalışmada da uyku yoksunluğu oluşturulan grupta ortam kontrol grubuna göre daha fazla ağırlık azalması saptandı. Kafes kontrol grubuna göre ortam kontrol grubunda ağırlıktaki azalmanın ortam farklılığından kaynaklanan strese bağlı olarak ortaya

çıktığı düşünüldü. Uyku yoksunluğu oluşturulan grupta ortam kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla ağırlık azalmasının saptanması ise REM uyku yoksunluğunun oluştuğunu göstermektedir. Sonuç olarak geliştirilen yöntemin ortam kontrol grubundaki stresi daha çok azaltması nedeni ile REM uyku yoksunluğu oluşturma çalışmalarında kullanılabilir daha uygun bir yöntem olduğu düşünüldü.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızın başından sonuna kadar her türlü desteğini esirgemeyen sayın Prof.Dr.Çiğdem ÖZESMİ'ye, deney hayvanı ve uygun deney ortamı sağlayan DEKAM'a, istatistik analizlerin yapımında yardımlarını gördüğümüz Yard.Doç.Dr.İskender GÜN'e ve düzeneğimizde kullandığımız pleksiglass levhaları sağladıkları için Önder Kimya A.Ş'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Karakaş S, Aydın H, Erdemir C, Özemi Ç. *Beyin ve Kognisyon*. 2000, 103-112.
2. Suchecki D, Tufik S. *Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. Physiology&Behavior*, 2000, 68:309-316.
3. Suchecki D, Palma Duarte B, Tufik S. *Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. Brain Research*, 2000, 875:14-22.
4. Morden B, Mitchell G, Dement W. *Selective REM sleep deprivation and compensation phenomena in the rat. Brain Research*, 1967, 5:339-349.
5. Coll-Andreu M, Ayara-Mascarell L, Trullas-Oliva R, et al. *Behavioral evaluation of the stress induced by the method for short-term paradoxical sleep deprivation in rats. Brain Research*, 1989, 22(5):825-828.

6. Fadda P, Fratta W. Stress-Induced sleep deprivation modifies Corticotropin Releasing Factor (CRF) levels and CRF binding in rat brain and pituitary. *Pharmacological Research*, 1997, 35(5).
7. Dametto M, Suchecki D, Bueno O.F.A, et al. Social stress does not interact with paradoxical sleep deprivation-induced memory impairment. *Behavioural Brain Research*, 2002, 129:171-178.
8. Grahnstedt S, Ursin R. Platform sleep deprivation affects deep slow wave sleep in addition to REM sleep. *Behavioural Brain Research*, 1985, 18:233-239.