

## UYKUSUZLUK SÜRESİNCE VE SONRASINDA OPSONİZASYON

Levent ÖZTÜRK\*, Yaman SAĞLAM\*\*, Nuran GÖKHAN\*

### ÖZET

Bu çalışmada, 48 saat uykusuzluğun, fagositik aktiviteyi belirleyen göstergelerden biri olan opsonizasyon üzerine etkileri araştırıldı. Sağlıklı, genç erişkin 10 erkek gönüllü çalışmaya dahil edildi. Fizik muayene sonrasında, denekler, uyku bozukluğu açısından değerlendirilmek amacıyla bir gece poligrafik uyku kayımda alındılar. Uyku tetkikini takiben 48 saat süre ile sedanter koşullarda uykusuz bırakılan denekler, yine kayıt altında telafi uykularını uyudular. 0 - 24 - 48 ve 72. saatlerde venöz kan örnekleri toplandı. Alman kan örneklerinde kortizol, IgG ve klasik protokole uygun olarak opsonizasyon değerlendirildi. Sonuçlarımıza göre, 48 saat uykusuzluğun, sağlıklı insanlarda opsonizasyonda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı.

**Anahtar kelimeler:** Opsonizasyon, uyku, uyku yoksunluğu, immün sistem

### SUMMARY

*Opsonization during and after sleep deprivation.* The present study was undertaken to investigate the effects of forty-eight hours of sleep deprivation on opsonization which is one of the determinants of phagocytic activity. Ten young healthy male subjects were included the study. After the physical examination, subjects were recorded for one night with polysomnography (PSG) to exclude sleep pathologies. Following PSG, subjects underwent to continuous wakefulness under sedentary conditions. At the end of forty-eight hours, they were allowed for recovery sleep. Venous blood samples were collected at 0 - 24th - 48th and 72nd hours. Cortisol, IgG measurements and opsonization test was performed in blood samples by using classical method. Our results showed that 48 hours [L.Ö.1] of sleep deprivation did not lead to any alteration in opsonization.

**Key words:** Opsonization, sleep, sleep deprivation, immune system

### GİRİŞ

Modern yaşam ve çalışma koşulları nedeniyle uykusuz kalan insanların sayısı oldukça fazladır. Uyku kaybının hastalıklara direnci azalttığı ve iyileşme sürecini uzattığına dair yaygın bir inanış olmasına rağmen, uyku ve immün sistem arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların sayısı nisbeten azdır ve sonuçları birbirini ile uyumlu görünmemektedir. Bununla birlikte immün savunma sistemlerinin düzenli çalışabilmesi için uyku ihtiyacının uygun şekilde karşılanması gerektiği yönünde oldukça kuvvetli veriler elde edilmiştir (3,4,6,14).

Uyku-uyanıklık sistemi ile immün-endokrin sistem arasında iki yönlü haberleşme olduğu ve değişen uyku fizyolojisinin immün yanıtı değiştirdiği bilinmektedir. Uyku yoksunluğu

protokolleri, değişen uyku fizyolojisinin psikolojik ve fizyolojik işlevler üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (3).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda, REM uyku deprivasyonunun ölçülen immün parametrelerde değişikliğe yol açmadığı (1), fakat, uzun süreli total uyku kaybının yaklaşık 16-17 gün içinde sistemik enfeksiyonlar ve fırsatçı mikroorganizmalara bağlı afebril septisemi sonucunda ölüme neden olduğu gösterilmiştir (6,7). Bergmann ve arkadaşları, sıçanlarda yaptıkları çalışmada total uyku yoksunluğunun geç evrelerinde, barsak duvarındaki savunma sistemlerinin iflasi sonucunda bakteriyel invazyonun geliştiğini öne sürmüşlerdir (2).

Mecmuaya geldiği tarih: 02.01.2002

\* Kadir Has Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Gayrettepe, İstanbul

\*\* Kadir Has Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gayrettepe, İstanbul

İnsanlarda yapılan ilk çalışmada Palmlad ve arkadaşları, 77 saat uyanıklık sonucunda interferon üretiminin arttığını ve fagositik aktivitenin azaldığını göstermişlerdir (16). Daha sonra, 10 sağlıklı erkekte 40 saat uykusuzluk sonucunda plazmada interlökin-1 benzeri ve interlökin-2 benzeri aktivite-lerin arttığı ve telafi uykusu ile birlikte başlangıç değerlerine geri döndüğü bildirilmiştir (11). Bir önceki çalışmalarında yine aynı grup tarafından bildirilen 64 saat uykusuzluk sonucu NK hücre aktivitesinde görülen artış (12), bu kez 40 saatlik uykusuzluk sonucu gözlenmemiştir. İmmün parametrelerin geniş bir yelpazede incelendiği bir çalışmada, 64 saat uykusuzluk sonucu NK hücre aktivitesinde artış, yardımcı T lenfosit sayısında azalma bildirilmiştir (5). Yakın zaman önce normal uyku sikluslarını sürdüren bir kontrol grubunun da dahil edildiği bir çalışmada sedanter koşullarda gerçekleştirilen 48 saat uykusuzluk sonucunda NK hücrelerinin sayısında uykusuzluk ile birlikte azalma ve telafi uykusu sonucunda da başlangıç değerlerine geri dönüş gösterilmiş; yardımcı T lenfosit sayısında ise uykusuzlukla birlikte artış bildirilmiştir (15).

Total uyku yoksunluğu dışında bazı gruplar tarafından parsiyel uyku yoksunluğu protokolleri oluşturulmuş ve bunlarla yapılan çalışmalarda da, immün sisteme ait çeşitli göstergelerin arttığı ya da azaldığı bildirilmiştir (8,9). Tüm bu çalışmalar gözönüne alındığında uyku-uyanıklık sistemi ile immün sistem arasında sıkı bir ilişki olduğu görülmektedir. Yine de bu iki sistemin birbirini hangi yollarla ve nasıl etkilediği konusunda daha çok sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, immün sisteme dahil olarak, fagositik aktiviteyi belirleyen göstergelerden biri olan opsonizasyonun 48 saat uyku yoksunluğu süresince değişiklik gösterip göstermediği araştırıldı.

## MATERYAL ve METOD

**DENEKLER:** Düzenli uyku alışkanlığını sürdüren, sigara kullanmayan sağlıklı, genç erişkin 10 erkek gönüllü çalışmaya dahil edildi. Çalışma öncesinde yerel Etik Kurul onayı ve çalışmaya katılan gönüllülerden yazılı olarak bilgilendirilmiş muvaffakat alındı. Rutin muayeneleri ve tam kan sayımları yapılan denekler, uyku bozukluğu açısından değerlendirilmek amacıyla bir gece poligrafik uyku kaydına alındılar. Bu kayıda, iki kanal elektroensefalografi (EEG), iki kanal elektrookülografi (EOG), submental elektromiyografi (EMG), bacak EMG'si, toraks ve abdomen hareketleri, oro-nasal hava akımı, kan oksijen saturasyonu (pulse oksimetre), vücut pozisyonu, horlama (mikrofon) dahil edildi.

**UYKUSUZLUK PROTOKOLÜ:** Uyku tetkikini takiben tüm denekler, iki gün süreli uykusuzluk dönemine başladılar. Uykusuzluk süresince iki doktor tarafından sürekli gözetimde, sabit çevresel koşullar altında, sedanter bir ortamda tutulan deneklere istedikleri miktarda yemek sağlandı. İki günlük uyanıklığın sonunda tekrar poligrafik kayıt altında telafi uykularını uyuyan deneklerin uyku makroorganizasyonuna yansıyan, uykusuzluğa bağlı "rebound" etkileri gözlemlendi.

**KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI:** Kan örnekleri 0 (başlangıç) -24 (uykusuzluğun ilk günü) -48 (uykusuzluğun ikinci günü) ve 72. (telafi uykusu sonrası) saatlerde antekübital venden her defasında 10 ml olarak alındı. Pıhtılaşmanın tamamlanması için 20 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum ayırıldı. Ayırılan serum, kortizol, IgG ölçümleri ve opsonizasyon çalışması yapılana kadar -20° C'de saklandı.

**KORTİZOL VE IgG ÖLÇÜMLERİ:** Serum IgG ve kortizol ölçümleri tüm serum örneklerinde toplu olarak yapıldı. IgG ölçümleri

nefelometre'de (QM300 Sanofi Diagnos.), ticari IgG kiti (Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc. Cat. No:540, C.Z. Code:30880) kullanılarak yapıldı. Kortizol ölçümleri ise "radioimmunoassay" (RIA) yöntemiyle yapıldı. Ölçümde ticari kortizol kiti (DSL-2100 ACTIVE) kullanıldı.

**OPSONİZASYON:** Bu test için önce normal bir kişinin kanından polimorf nüveli lökositlerden zengin hücre süspansiyonu hazırlandı. Daha sonra opsonik aktivitesi ölçülecek olan serum örnekleri, hazırlanan polimorf nüveli lökosit süspansiyonu ve mantar süspansiyonu ile muamele edilerek test gerçekleştirildi.

Hasta sayısı kadar iki sıra tüp hazırlandı. İkinci sıradaki tüplere 0,9 ml serum fizyolojik konuldu. Üzerlerine derin dondurucudan çıkarılan serumlardan 0,1 ml eklenerek karıştırıldı. Böylece %10 seyreltilmiş opsonik aktivitesi ölçülecek serum örnekleri elde edildi. 1-2 dakika pastör pipeti ile karıştırıldıktan sonra 0,1 ml mantar süspansiyonu ve 0,2 ml PNL süspansiyonu eklenerek 37 C derece etüvde 1/2 saat bekletildi. Daha sonra 500 rpm'de 5 dakika çevrilerek üst kısım dö-küldü. Kalan kısma pastör pipeti ile bir damla serum fizyolojik konularak karıştırıldı. Bu karışımdan yayma preparat hazırlanarak May-Grünwald - Giemsa ile boyandı. Polimorf nüveli lökositler, içlerine aldıkları mantar hücrelerinin sayılarına göre gruplandırılarak toplam 100 hücre sayıldı. Aynı sayıda mantar içeren hücrelerin sayısı içerdikleri mantar sayısı ile çarpıldı. Elde edilen sayılar toplanarak yüze bölündü. Elde edilen

son rakam  $>2,50$  ise normal,  $<2,50$  ise düşük kabul edildi.

**İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME:** Sonuçların istatistiksel analizi "Wilcoxon Matched Pair's Signed Ranks" testi ile yapıldı.  $P<0,05$  sınırı anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

İlk gece yapılan polisomnografik uyku tetkiki ile uykusuzluk sonrasında yapılan polisomnografik kayıttan elde edilen uyku parametrelerinin karşılaştırılması Tablo 1'de görülmektedir. Her iki kayıt da Rechtschaffen ve Kales<sup>(17)</sup> kriterlerine göre değerlendirilmiştir. İlk gece uykusu ile karşılaştırıldığında telafi uykusunda uykuya dalma süresinin oldukça kısaldığı; yüzeysel uyku evrelerinin (Evre 1+2) oranının azaldığı; derin uyku evrelerinin (Evre 3+4) ise oranının arttığı görülmüştür. Total uyku süresinin değişmemesine karşın derin uyku süresindeki artış, uykusuzluğun neden olduğu "rebound" etki olarak değerlendirilmektedir. REM uykusu döneminde ise herhangi bir rebound etki gözlenmemiştir. Uyku Etkinlik İndeksi de ilk gece ortalama %76 iken telafi gecesinde %94'e yükselmiştir. Telafi döneminde uyunulan uykunun verimliliği anlamlı derecede artmıştır.

Uykusuzluk protokolünün ne derecede stres oluşturduğunu anlamak amacıyla yapılan serum kortizol ölçümleri ve opsonizasyon değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Oponizasyon testinde uykusuzluk döneminde ve sonrasında

**Tablo 1.** İlk uyku kaydı ile telafi uykusu kayıtlarının karşılaştırılması. AD: Anlamlı Değil Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

	Başlangıç (0. saat)	Uykusuzluk dönemi (24. saat) (48. saat)		Telafi uykusu sonrası	Wilcoxon test
Opsonizasyon	3.06 $\pm$ 0.6	3.26 $\pm$ 0.4	3.01 $\pm$ 0.8	3.06 $\pm$ 0.6	AD
IgG mg/dl	837 $\pm$ 193	802 $\pm$ 254	880 $\pm$ 220	869 $\pm$ 212	AD
Kortizol mg/dl	19.6 $\pm$ 7.2	20.4 $\pm$ 5.7	17.7 $\pm$ 5.0	17.0 $\pm$ 4.0	AD

**Tablo 2.** Uykusuzluk süresince opsonizasyon ve kan kortizol düzeyleri. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. AD: Anlamlı Değil

	İlk Uyku	Telafi Uykusu	İstatistik
Uyku Latansı (dak)	37.40 $\pm$ 40.94	1.95 $\pm$ 1.38	p<0.01
Evre 1 uyku (%)	3.74 $\pm$ 1.97	0.69 $\pm$ 0.52	p<0.01
Evre 2 uyku (%)	62.10 $\pm$ 3.67	38.30 $\pm$ 8.12	p<0.01
Evre 3 uyku (%)	4.04 $\pm$ 1.83	7.78 $\pm$ 6.24	p<0.05
Evre 4 uyku (%)	15.90 $\pm$ 7.09	40.10 $\pm$ 12.40	p<0.01
REM uykusu (%)	12.09 $\pm$ 5.54	12.21 $\pm$ 9.85	AD
Total uyku süresi (dak)	357.60 $\pm$ 65.19	383.90 $\pm$ 95.89	AD
Uyku Etkinlik İndeksi	0.76 $\pm$ 0.14	0.94 $\pm$ 0.06	p<0.01

da herhangi bir anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca IgG ve kortizol düzeylerinde de anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.

## TARTIŞMA

Çalışmamızda sağlıklı, genç erişkin 10 erkek gönüllüde uykusuzluk sonucunda opsonizasyon, IgG ve kortizol düzeyleri ölçüldü. Moldofsky ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, menstrüel döngünün yüksek progesteron üretimi olan dönemi ile düşük progesteron üretimi olan döneminde immün parametrelerin farklı şekillerde etkilendiğini gösterdiler (13). Bu nedenle çalışmamızda erkek denekler tercih edildi. Böylece menstrüel siklus süresince farklı progesteron üretim dönemlerinin yaratabileceği etkilerden sakınılmış oldu. Sonuçları etkileyebilecek diğer bir faktör de stres reaksiyonlarıdır. Stres durumunda genellikle hipotalamo-hipofizer-adrenal eksenin aktivasyonuna bağlı olarak glukokortikoid hormonların salgılanmasında artış ya da sempatik sinir sisteminin aktivasyonuna bağlı olarak katekolamin salgılanması gözlenir. Uykusuzluk süresince yaptığımız serum kortizol ölçümlerinde herhangi bir artış saptamadık. Böylece ölçümünü yaptığımız immün parametrelerde meydana gelebilecek değişikliklerin stres yanıtından dolayı ortaya

çıkması olasılığından uzaklaşmış olduk. Bu bulgu da, sedanter koşullarda yapılan ve insan deneklerin değerlendirildiği önceki uykusuzluk çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur (5,11,15).

Antijene spesifik olmayan immün yanıtın önemli bir parçasını opsonizasyon oluşturmaktadır. Özellikle kompleman sistemi ve IgG tarafından gerçekleştirilen opsonizasyon, fagositoz için önemli bir hazırlık aşamasını oluşturur (18). Polimorf nüveli lökositlerde, fagositozu kolaylaştıran tek immünglobulin grubu IgG'dir (10). Bakteriye Fab ucu ile bağlanan IgG, Fc kısmı ile de fagositik hücre üzerinde bulunan Fc reseptörüyle etkileşime girer. Bu etkileşim, fagositozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (10). Bu çalışmada değerlendirilen IgG düzeylerinde uykusuzlukla birlikte anlamlı bir değişiklik olmaması opsonizasyon sonuçları ile de uyumlu görünmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan ve deneklerin 77 saat süre ile uyanık tutulduğu bir çalışmada, uyanıklık süresince fagositik aktivitenin azaldığı bildirilmiştir (16). Çalışmamızda, 48 saat uykusuzlukla birlikte alınan kan örneklerinde ölçülen opsonizasyon düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu sonuç, önceki çalışma ile uyumlu görünmemekle birlikte fagositik aktivitenin ince-

lendiği çalışmada uyanık kalma süresinin bizim çalışmamıza göre daha uzun olması, geç dönemde oponizasyonda uykusuzluğa bağlı değişimler görülebileceğini ortaya çıkarmaktadır.

Çalışmamızın açık noktalarından birisi oponizasyon ile birlikte fagositik aktivite ve kemotaksisin değerlendirilmemiş olmasıdır. Non-spesifik immün yanıtın bu yönünün uykusu ile ilgisi hakkında daha detaylı bilgi edinebilmek için oponizasyon, fagositik aktivite ve kompleman sisteminin beraberce ele alınması daha uygun olacaktır. Bilgilerimize göre, bu çalışma uykusuzluk süresince oponizasyonun değerlendirildiği ilk çalışmadır. Diğer parametreleri de ele alarak çalışmayı genişletmeyi planlamaktayız.

#### KAYNAKLAR

1. Benca RM, Kushida CA, Everson CA, Kalski R, Bergmann BM, Rechtschaffen A: Sleep deprivation in the rat: VII. Immune function. *Sleep* 12: 47 (1989).
2. Bergmann BM, Gilliland MA, Feng PF, Russel DR, Shaw P, Wright M, Rechtschaffen A, Alverdy JC: Are physiological effects of sleep deprivation in the rat mediated by bacterial invasion? *Sleep* 19: 554 (1996).
3. Dickstein JB, Moldofsky H: Sleep, cytokines and immune function. *Sleep Med Rev* 3: 219 (1999).
4. Dinges DF, Douglas SD, Hamarman S, Zaugg L, Kapoor S: Sleep deprivation and human immune function. *Adv in Neuroimmunol* 5:97 (1995).
5. Dinges DF, Douglas SD, Zaugg L, Campbell DE, McMann JM, Whitehouse WG, Orne EC, Kapoor SC, Icaza E, Orne MT: Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J Clin Invest* 93: 1930 (1994).
6. Everson CA: Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 69: 43 (1995).
7. Everson CA: Sustained sleep deprivation impairs host defense. *Am J Physiol* 265: R1148 (1993).
8. Irwin M, Mascovich A, Gillin JC, Willoughby R, Pike J, Smith TL: Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. *Psychosom Med* 56: 493-498 (1994).
9. Irwin M, McClintick J, Costlow C, Fortner M, White J, Gillin JC: Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *FASEB J* 10: 643 (1996).
10. Melchart D, Martin P, Hallek M, Holzmann M, Jurcic X, Wagner H: Circadian variation of the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes and of various other parameters in 13 healthy male adults. *Chronobiol Int* 9: 35 (1992).
11. Moldofsky H, Lue FA, Davidson JR, Gorczynski R: Effects of sleep deprivation on human immune functions. *FASEB J* 3: 1972 (1989).
12. Moldofsky H, Lue FA, Davidson JR, Jephthah-Ochola J, Carayanniotis K, Gorczynski R: The effect of 64 hours of wakefulness on immune functions and plasma cortisol in human. In: *Sleep'88*, ed. J. Horne, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, sayfa: 185 (1989).
13. Moldofsky H, Lue FA, Shahal LB, Jiang CG, Gorczynski R: Diurnal sleep/wake-related immune functions during the menstrual cycle of healthy young women. *J Sleep Res* 4: 150 (1995).
14. Moldofsky H: Sleep and the immune system. *Int J Immunopharmac* 17: 649 (1995).
15. Öztürk L, Pelin Z, Karadeniz D, Kaynak H, Çakar L, Gözükırmızı E: Effects of 48 hours sleep deprivation on human immune profile. *Sleep Research Online* 2: 107 (1999).
16. Palmblad J, Cantell K, Strander H, Froberg J, Karlsson C, Levi L, Ganstrom M, Unger P: Stressor exposure and immune response in man: Interferon producing capacity and phagocytosis. *J Psychosom Med* 20: 193-199 (1976).
17. Rechtschaffen A, Kales A: A Manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. Los Angeles: Brain Information Service/Brain Research Institute, (1968).
18. Terzioğlu M, Yiğit G, Oruç T: *Fizyoloji Ders Kitabı Cilt II*, İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul (1993), s:134-144.