



Sıçanlarda deneysel uyku yoksunluğunun kardiyovasküler sisteme etkilerinin araştırılması

Investigations of the effects of sleep deprivation on the cardiovascular system in rats

Mustafa Saygın¹, Mehmet Fehmi Özgüner¹, Önder Öztürk², Duygu Kumbul Doğuç³, İter İlhan³, İ. Aydın Candan⁴.

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Isparta.

² Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD, Isparta.

³ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Isparta.

⁴ Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Isparta.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, deneysel olarak uyku yoksunluğu oluşturulan sıçanlarda, uyku yoksunluğunun kardiyovasküler sisteme olan etkileri araştırıldı.

Materyal ve Metod: Sıçanlar randomize olarak kontrol ve uyku yoksunluğu olarak 2 gruba ayrıldı. Grup A: kontrol grubu; deney süresince yem ve suya serbest ulaşmaları sağlanarak kafeslerinde fizyolojik uykuyu uyumalarına izin verildi. Grup B: uyku yoksunluğu grubu; normal kafes içerisinde su ve yeme her zaman ulaşmalarına izin verilirken, özel bir düzenek ile 15 dakikada bir 5 dakika süresince uyaran verilir, günde 8 saat uyanık bırakıldılar. Yedi gün boyunca uyku yoksunluğu oluşturuldu. Hayvanların günlük ağırlık tartımları yapıldı ve istatistiksel olarak bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Deney sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek, tam kan sayımı, kalp dokusundan histopatolojik inceleme ve malondialdehid (MDA), süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) düzeylerine bakıldı. İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS 17.0 programında, grupların homojenliğine Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldı. Homojen dağılım gösteren gruplar, tekrarlı ölçümler, Ki-kare, bağımsız t testi ve Mann Whitney U testleri ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Katalaz, GPx, SOD ve MDA trombosit sayısı ve ortalama trombosit hacmi (OTH), değerleri açısından her iki grup arasında farklılık yoktur ($p>0.05$). Histopatolojik incelemede; her iki grup arasında myokardit ($p<0.012$) ve myokardiyal liflerde dejenerasyon ($p<0.028$) özelliği bakımından fark saptandı.

Tartışma ve Sonuç: Bu bulgular çerçevesinde, uyku yoksunluğu oluşturulan sıçanlarda oksidatif stres artmakta, bağışıklık sistemi etkilenmekte ve kardiyovasküler sistemde enflamasyona dair bulgular oluşmaktadır. Bu bağlamda, uyku yoksunluğunun uzun dönemde kardiyovasküler riskleri artırabileceğini öngörmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Uyku yoksunluğu, oksidatif stres, OTH, kardiyovasküler hastalıklar.

Abstract

Objective: In this study, the effects of sleep deprivation on the cardiovascular system were investigated in experimentally sleep deprivation rats. Material and method: The rats were randomly divided into 2 groups as control and sleep deprivation. Group A: control group; ensuring free access to food and water and physiological sleep were allowed to sleep in cages throughout the experiment. Group B: sleep deprivation group; was always permitted to reach food and water in a cage normally whether 8 hours per day were being awake through stimulus for 5 minutes with an interval of 15 minutes by a special arrangement. Sleep deprivation was generated throughout seven days. The daily weight of the animals was weighted and there was no statistical difference between groups ($p>0.05$). At the end of the experiment the animals were sacrificed, complete blood counts and histopathological examination of cardiac tissue, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase levels were measured. Statistical evaluations were performed by the SPSS 17.0 program and homogeneity of the groups was analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. Groups which showed homogeneous distribution were evaluated by repeated measures, chi-square, independent t-test, and Mann-Whitney U tests

Results: There were no significant differences between the two groups ($p>0.05$) in terms of Catalase, GPx, SOD and MDA platelet count and mean platelet volume (MPV) values. In histopathological examination, the difference was detected in terms of the property of myocarditis ($p<0.012$) and degeneration ($p<0.028$) in myocardial fibers between the two groups

Discussion: Within the framework of these findings, sleep deprivation increased oxidative stress, alterations in the immune system and inflammation in the cardiovascular system. In this context, we predict that the long term sleep deprivation may increase cardiovascular risks.

Keywords: Sleep deprivation, oxidative stress, MPV, cardiovascular diseases.

Doç. Dr. Mustafa SAYGIN

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Çünür, Isparta

Tel: 0246 211 36 05

E mail: fizyolog@gmail.com

Fax: +90 246 2371165



Giriş

Uyku; serebral aktivitenin minimum düzeylerde olduğu, tersine çevrilebilir bir tepkisizlik halidir ve herhangi bir uyarana sona erebilen geçici bir şuur kapalılığıdır (1). Amerikan Uyku Bozuklukları Birliği (American Sleep Disorders Association-ASDA) tarafından Uluslararası Uyku Bozuklukları Sınıflaması (International Classification of Sleep Disorders-ICSD) ismi ile 1991 yılında yayınlanmıştır. 2014 yılında yeniden sınıflama yapılmıştır. Uyku yoksunluğu uykunun sirkadiyen ritm bozuklukları sınıflandırması içinde ele alınmaktadır. Uyku yoksunluğunda; total, parsiyel ya da selektif olmasına göre farklı etkiler ortaya çıkmaktadır. Uyku yoksunluğunun en belirgin etkisi, uykululuk halidir. Bu durum, MSLT (multiple sleep latency test) testi ile EEG değişikliklerinin kaydı veya sadece kişinin fizyolojik durumundan anlaşılabilir. Uyku yoksunluğunun etkileri davranışsal ve fizyolojik olarak ele alınabilir (2). Uykusuzluk süresince görülen değişiklikler; nörolojik (EEG bulguları dahil), otonomik ve biyokimyasal değişiklikler olarak sınıflandırılabilir. Uykusuz bir kişiyi görsel olarak tanımlamak kolay olmasına rağmen, ölçülebilir nörolojik değişiklikler nispeten az düzeydedir ve çabuk geri döner. Uyanıklık EEG'sindeki delta ve teta aktiviteleri de % 17 ve % 12'den sırasıyla % 38 ve % 26'ya yükselmiş, beta aktivitesinde ise bir değişiklik bulunamamıştır (3).

Çeşitli çalışmalarda uyku yoksunluğu sırasında vücut ısısında 0.3 ile 0.4°C lik küçük düşüşler bulunmuştur (4). Bunun yanında uyku kaybının hipoksi ve hiperkapniye yanıtta % 20' lik bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (5-7). Bu değişiklikler gelişen bir sistem iflasının erken bulguları olmaktan çok, geçici bir ayar noktası değişikliği olarak yorumlanabilir.

Total uyku zamanında, uyku dönemlerine spesifik olmayan azalmalara, parsiyel uyku yoksunluğu olarak tanımlanmaktadır. Bu tip uykusuzluk, gerçek hayatta en sık karşılaşılan uykusuzluk şeklidir. Kısa ve uzun süreli olmak üzere iki şekilde incelenmektedir. Bu çalışmada "Kısa-Dönem" parsiyel uyku yoksunluğu modeli oluşturularak kalp üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metod

Sıçanlar randomize olarak kontrol ve uyku yoksunluğu olarak (n=12) 2 gruba ayrıldı.

Grup A: Kontrol grubu; deney süresince yem ve suya serbest ulaşmaları sağlanarak kafeslerinde fizyolojik uykuyu uyumalarına izin verildi.

Grup B: Uyku yoksunluğu (UY) grubundaki hayvanlar normal kafes içerisinde tutulmuş, su ve yeme her zaman ulaşmalarına izin verilmiştir. Normal aydınlık-karanlık siklusunda totalde 12 saat uyuyan bu sıçanlara normal uykularından %75 daha az uyumaları sağlanmıştır (8). Yani total fizyolojik uykuları 12 saat olan bu sıçanlara 8 saat uyanık 4 saat uyumalarına izin verilmiştir. Uykuya dalma süresi (Sleep onset latans) 20.3 dakika olarak belirtilen (9), sıçanlarda uyku yoksunluğunu oluşturabilmek için gece 00:00'dan itibaren 15 dakikada bir 5 dakika uyaran verilerek sıçanların uyumaları engellenmiştir. Uyku yoksunluğu 7 gün boyunca yapılmıştır. 7 günün sonunda % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) - % 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV) anestezisi altında sıçanlar sakrifiye edilerek kalp dokuları alınmıştır.



Resim 1: Uyku yoksunluğu için platform uygulaması

Biyokimyasal Analizler

Hayvanların günlük ağırlık tartımları yapıldı. Kalp dokuları; 50 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile dolu ependorf tüplere alınarak, tartılmıştır ve fosfat tamponu ile 9 kat sulandırılarak homojenize edildi. Homojenizasyon doku parçalamaya (Janke & Kunkel Ultratur-



rax T-25, Almanya) ve sonikasyon işlemi (UW-2070 Bandelin Electronic, Almanya) yapılmıştır. Homojenatlar, +4 C'de, 10000 g'de, 10 dk. santrifüj (Eppendorf 5415-R, Almanya) edilmiş ve süpernatantlarından Bardford yöntemi ile protein tayini yapıldı (10). Süpernatantlar alınıp, enzim aktivitelerinin ölçümüne kadar -80 OC'de saklandı.

Malon Dialdehit (MDA) Ölçümü

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehid (MDA) ölçümü için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemine göre yapıldı (11). Metodun prensibi TCA ile çöktürme işleminden sonra MDA-TBA (Tio-barbitürik asit) kompleksinin 532 nm'de (Shimadzu UV-1601, Almanya) verdiği absorbansın ölçülmesi ile konsantrasyon hesaplanarak bulunur. Sonuçlar nmol/gr. protein olarak verildi.

Katalaz (KAT) Ölçümü

KAT enzim aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışıldı. Yöntem, hidrojen peroksidin (H_2O_2) katalaz varlığında su ve moleküler oksijene dönüşmesi sırasında harcanan H_2O_2 'in absorbansının 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır (12). Karaciğer dokusuna ait KAT aktivite değerleri, U/mg protein olarak verildi.

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçümü

GSH-Px enzim aktivitesi, Olympus AU 2700 (Japonya) marka otoanalizöre applike, Randox marka ticari kit kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü. Yöntem, kümen hidroperoksit varlığında GSH-Px'in glutasyonun oksidasyonunu katalizlemesi sonucunda okside olan glutasyonun tekrar redükte forma dönüşmesi için harcanan NADPH'in absorbansının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır (13). Kalp dokusuna ait GSH-Px aktivite değerleri, U/mg protein cinsinden ifade edildi.

Süperoksit Dismutaz (SOD) Ölçümü

SOD enzim aktivitesi, Olympus AU 2700 (Japonya) marka otoanalizöre applike, Randox marka ticari kit kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü. Yöntemin prensibi, ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon sonucunda ksantinden ürik asit ve süperok-

sit radikali oluşumuna ve bunu takiben oluşan süperoksit radikalinin de kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenil tetrazolium chloride ile reaksiyona girmesine dayanır. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür (14). Karaciğer dokusuna ait SOD aktivite değerleri, U/mg protein şeklinde ifade edildi.

Histopatolojik Çalışmalar

Kalp doku örnekleri %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda fiske edildi. Dokulara rutin ışık mikroskopik teknikler uygulandı. Parafin bloklara gömülen dokular 3-5 mikrometre kalınlığında kesilerek hematoksilin eozinle boyandı. Elde edilen preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirilerek fotoğraflandı. Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının (15) yapmış olduğu skorlamaya göre değerlendirilmiştir (Tablo 1).

İstatistiksel Analiz

Tüm gruplara ait, histopatolojik değerlendirmeler ve MDA, SOD, KAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin istatistiksel analizi için SPSS Ver 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Amerika) programı kullanıldı. Grupların homojenliğine Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldı. Homojen dağılım gösteren gruplar, tekrarlı ölçümler, Ki-kare, bağımsız t testi ve Mann Whitney U testleri ile değerlendirilmiştir. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

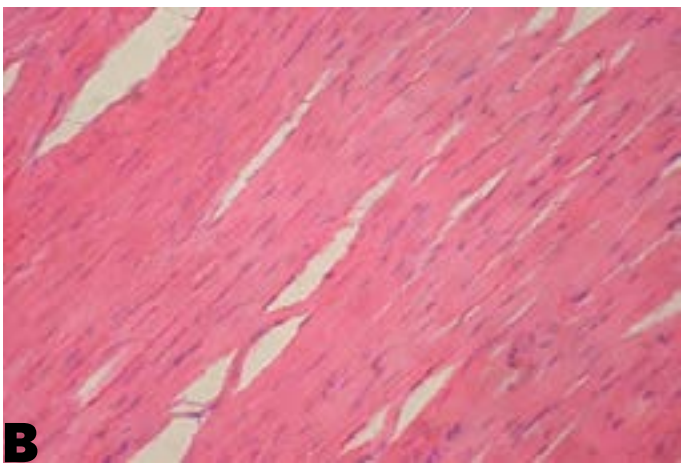
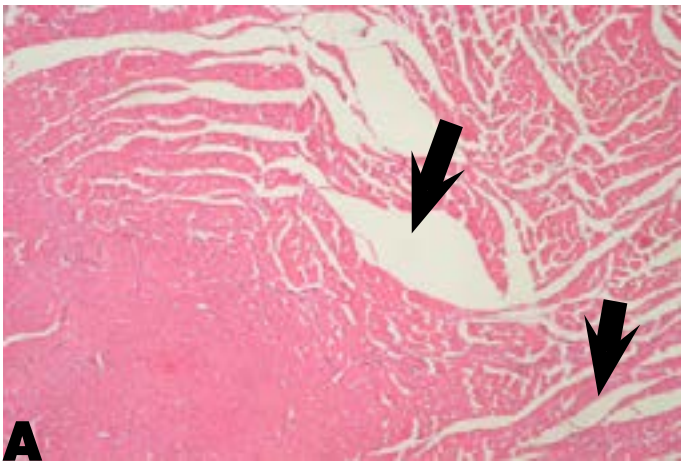
Histolojik Bulgular

Kalp dokuları histopatolojik olarak incelendi. İncelemeler sonucunda kontrol grubu ile UY grubu arasında bazı histopatolojik farklılıklar gözlenmiştir. Her iki grupta vasküler konjesyon, vasküler proliferasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonuna rastlandı. Ancak bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı. Kontrol grubu ile UY grubu arasında myofibrillerde dejenerasyon ve myokardit gözlemleri değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi ($p < 0.05$).

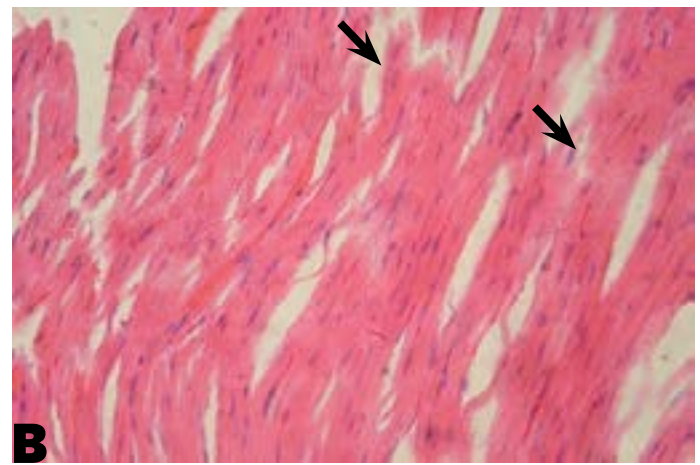
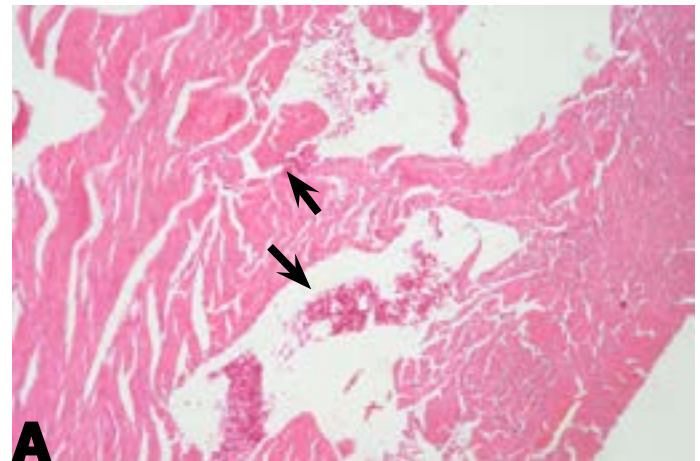


Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarında gözlenen yapısal değişiklikler ve p değerleri.

Deney grupları	Grup A (Kontrol) n=12				Grup B (Uyku yoksunluğu) n=12				Ki-Kare Testi P değerleri
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Parametreler/skor	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Polimiyozit	12	-	-	-	8	4	-	-	p>0.05
Myokardit	12	-	-	-	7	5	-	-	p=0.012
Myokardiyal septada inflamasyon ve hücre infiltrasyonu	8	4	-	-	5	5	2	-	p>0.05
Myokardiyal liflerde dejenerasyon	10	2	-	-	5	7	-	-	p=0.028
Konjesyon	2	7	3	-	3	4	5	-	p>0.05



Resim 2: Kontrol grubuna ait kalp dokusu. Myoliflerde dejenerasyon ve myokardit bulgularına rastlanmadı. (H-E) (A:10X) (B:40X)



Resim 3: SF grubuna ait kalp dokusu. Kontrol grubuyla kıyaslandığında myoliflerde dejenerasyon ve myokardit bulgularına rastlandı. (H-E) (A:10X) (B:40X) (B'de oklar myoliflerde dejenerasyonu, A'da oklar ise myokardit, damarlarda proliferasyon, konjesyon ve mononükleer hücre infiltrasyonunu gösteriyor)



Biyokimyasal bulgular

Katalaz, GPx, SOD ve MDA, trombosit sayısı ve ortalama trombosit hacmi (OTH) değerleri açısından her iki grup arasında farklılık yoktu ($p>0.05$).

tasyon yoluyla beyinde oksidatif detoksifikasyon olduğu ileri sürülmüş ve bu detoksifikasyon GABAerjik ve Glutamaterjik transmisyon ile ilişkilendirilmiştir (17). Uyku deprivasyonunun oksidan-antioksidan

Tablo 2. Tüm Grupların Kalp Dokusuna ait Antioksidan Enzim Aktivite Değerleri

Gruplar	MDA Düzeyi ($\mu\text{mol}/\text{mg prt}$)	KAT Aktivitesi (U/mg prt)	GSH-PX Aktivitesi (U/mL prt)	SOD Aktivitesi (U/mg prt)
Grup A (n=12)	0,68±0,12	19,42±24,13	44644,18±16832,53	380,14±76,81
Grup B (n=12)	0,67± 0,11	6,74±5,22	39318,10±15378,79	478,74±227,45

Veriler ortalama±SD olarak verilmiştir.

Tablo 3. Tüm Grupların PLT, OTH ve Ağırlık Değerleri

Gruplar	PLT değerleri ($10^3/\text{mm}^3$)	OTH değerleri (μm^3)	Ağırlıklar (gr)
Grup A (n=12)	867,66±135,41	4,99±0,43	Deney başlangıcı: 303,91 ±33,79 Deney Sonu: 316,75±37,26
Grup B (n=12)	912,91±254,89	5,02±0,46	Deney başlangıcı: 313,83 ±32,98 Deney Sonu: 319,75 ±38,65

Veriler ortalama±SD olarak verilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Uyanıklık ile uyku ritmi ve dönemlerinin sistemler üzerine etkileri genel olarak insanlar üzerinde çalışılmıştır. Deneysel olarak oluşturulan uyku yoksunluğu modeli ve kalp üzerindeki etkisi ilk olarak bu çalışmada incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre uyku yoksunluğu kalp dokusu üzerinde oksidatif strese neden olmaktadır.

Çalışmamızda oksidan strese dair bulguları değerlendirdiğimizde; gruplar arasında CAT, GSH-Px, SOD ve MDA açısından her iki grup arasında farklılık bulunmamıştır. Fakat MDA değerleri uyku yoksunluğu grubunda kontrole yakın bir değerde çıkmıştır. Bu anlamda sürenin uzaması durumunda oksidan stresin artacağı sonucuna varılabilir. Bu konuda ileri sürülen ilk hipotezlerden biri uyanıklıkta beyinde serbest radikallerin biriktiği, bunun uyku sırasında temizlendiği şeklindedir (16). Uykuda özellikle uridin ve glu-

sistemle ilişkisi deney hayvanlarında araştırılmıştır (18-20). Uyku deprivasyonunun insanda oksidatif hasara yol açtığı ve uykunun oksida-

tif strese karşı koruyucu rol oynadığı bilinmektedir (21). Oksidatif stres kanser, ateroskleroz, diyabetes mellitus ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik tablonun patogeneğinde olduğu gibi biyolojik yaşlanmanın mekanizmasında da rol almaktadır. Oksidatif stres oksidan üretimi ile antioksidan korunma arasındaki dengesizlik nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu dengesiz oksidan üretimi artışına ve/veya antioksidan korunmadaki azalmaya bağlı olabilir. Hücresel düzeyde ise bu imbalans protein, lipid ve nükleik asitlerin oksidatif modifikasyonu nedeniyle yapısal hasarla sonuçlanabilir (22). Temel hücresel oksidanlar reaktif oksijen türlerini (ROT, O_2 ve H_2O_2 gibi) ve reaktif nitrojen türlerini (RNT; NO gibi) içerir. Her ne kadar ROT'lar büyük oranda elektron transport zincirinin bir ara ürünü ise de, NADPH oksidazlar ve nitrik oksit sentazlar gibi mitokondri dışı kaynaklar yoluyla da üretilebilir (23).



Uyanıklıkta beyinde oksidan etkinlikte artış olduğu oksidanların uyku sırasında temizlendiği teorik olarak ileri sürülmüş (24), fakat insanlarda yapılan uyku ve uyanıklıkta beyin metabolizmasındaki değişimleri gösteren çalışmalar (25-27) ve hayvanlarda yapılan beyin ve perifer dokuların uyku ve uyanıklıktaki oksidan antioksidan durumunu inceleyen çalışmalar (18-20, 28) çelişkili sonuçlar vermiştir. Beyinde ve/veya perifer dokularda spontan uyanıklıkta, uyku deprivasyonunda uykunun NREM ve REM dönemlerinde oksidan ve antioksidan sistemin ne durumda olduğu ile ilişkili hayvanlarda birçok çalışma yapılmıştır. Sıçanlarda yapılan daha detaylı bir çalışmada ise ne kısa süreli ne de uzun süreli uyku deprivasyonunun beyinde ya da perifer dokularda oksidatif strese neden olmadığı gösterilmiştir. Uzun süreli uyku deprivasyonunda beyin metabolizmasındaki nisbi azalma ve noradrenerjik sistem etkinliğindeki değişikliklerin oksidatif ürünlerin potansiyel artışına karşı koruyucu rol oynayacakları da ileri sürülmüştür (29).

Kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olarak değerlendirdiğimiz trombosit sayısı ve OTH değerleri açısından anlamlı bir fark yoktur. Fakat PLT ve OTH için uyku yoksunluğu grubunda artış vardır. Platelet aktivasyonunun artışı ve agregasyonu kardiyovasküler komplikasyonlarla yakın ilişkilidir (30). OTH değerinin ağır tıkaçıcı uyku apnesi vakalarında arttığı gösterilmiştir (31). Uyku yoksunluğunda da kronik dönemde NREM Evre-III uykuda kan basıncı %10-20, kalp hızı % 5-10 oranında fizyolojik olarak düşmekte (32), fakat REM döneminde de % 5 daha fazla kan basıncı gözlemlenmektedir. Bu durumda miyokard infarktüsü, unstable angina, ventriküler taşartimiler, pulmoner emboli, iskemik ve hemorajik serebrovasküler olaylar, ani ölüm, trombosit agregasyonu, plak rüptürü ve koroner spazminin tetiklendiği REM döneminde gerçekleşen olayları başlatıyor olabileceği düşünülmektedir (33-37). Bu siklusların fizyolojik olmaktan çıkıp, kısalması ve kronik hale gelerek devam etmesi bu durumları tetikliyor olabilir. Bu anlamda kalp dokusunda histopatolojik olarak anlamlı

saptanan myofilerde dejenerasyon ve myokardit bulguları, kronik hale gelen uyku yoksunluğu durumlarında gelişebilecek muhtemel patolojiler için bir yol göstermektedir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları arasında, kalp dokusundaki enflamasyonun değerlendirilmemesi, aynı şekilde kandan da oksidatif stres ve enflamasyon belirteçlerinin değerlendirilmemesi ve bunun yanında da oluşan stresi kortizol ile göstermemek çalışmanın kısıtlılıklarından sayılabilir. Sonuç olarak; günümüz toplumunda en sık yaşadığımız uyku bozukluklarından biri olan parsiyel uyku yoksunluğunun sonuçlarına kısmen de olsa ışık tutmaktadır. Uzun dönemde gerekli önlem alınmadığı takdirde olası kardiyovasküler komplikasyonları günümüz toplumunda çok görülecek gibi durmaktadır.

Kaynaklar

1. Guyton AC, Hall JE. 2013. Tıbbi Fizyoloji çev. ed. Berrak Ç. Yegen, Zeynep Solakoğlu, İnci Alican. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi Ltd Sti. s. 721-727.
2. Angus RG, Heslegrave RJ, Myles WS. Effect of prolonged sleep deprivation with and without chronic physical exercise, on mood and performance. *Psychophysiology* 1985; 22(3): 276-282.
3. Hung CS, Sarasso S, Ferrarelli F, Riedner B, Ghilardi MF, Cirelli C, Tononi G. Local experience-dependent changes in the wake EEG after prolonged wakefulness. *Sleep*. 2013 Jan 1;36(1):59-72. doi: 10.5665/sleep.2302.
4. Johnson LC, Naitoh P, Moses JM, Lubin A. Interaction of REM deprivation and stage 4 deprivation with total sleep loss: experiment 2. *Psychophysiology*, 1974; 11(2): 147-159.
5. Copper KR and Philips BA. Effect of short term sleep loss on breathing. *J. Appl. Physiol*. 1982; 53(4): 855-858.
6. Schiffman PL, Trontel MC, Mazar MF, Edelman NH. Sleep deprivation decreases ventilatory response to CO₂ but not load compensation. *Chest* 1983; 84(6): 695-668.
7. White DP, Douglas NJ, Pickett CK. Sleep deprivation and the control of ventilation. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1983; 128(6): 984-986.
8. Ayas NT, White DP, Manson JE, Stampfer MJ, Speizer FE, Malhotra A et al. A prospective study of sleep duration



- and coronary heart disease in women. *Arch Intern Med.* 2003; 163(2): 205-209.
9. Carrington MJ, Barbieri R, Colrain I M, Crowley K E, Kim Y, Trinder J. Changes in cardiovascular function during the sleep onset period in young adults. *J Appl Physiol* 2005; 98(2): 468-476.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal biochem.* 1976;72:248-254.
11. Drapper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-431.
12. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-26.
13. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-69.
14. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci.* 1983; 34: 69-77.
15. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: Prevention of Developmental Toxicity by L-Methionine in Rats. *J Applied Toxicol.* 1999; 19: 7-12
16. Reimund E. The free radical flux theory of sleep. *Med Hypotheses* 1994; 43(4): 231-233.
17. Inoue S, Honda K, Komoda Y. Sleep as neuronal detoxification and restitution. *Behav Brain Res* 1995; 69(1-2): 91-96.
18. D'Almeida V, Lobo LL, Hipólide DC, de Oliveira AC, Nobrega JN, Tufik S. Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport* 1998; 9(12): 2853-2856.
19. D'Almeida V, Hipólide DC, Lobo LL, de Oliveira AC, Nobrega JN, Tufik S. Melatonin treatment does not prevent decreases in brain glutathione levels induced by sleep deprivation. *Eur J Pharmacol* 2000; 390(3): 299-302.
20. Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM. Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *Neuroreport* 2002; 13(11): 1387-1390.
21. Atrooz F, Salim S. Sleep deprivation, oxidative stress and inflammation. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2020;119:309-336.
22. Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med* 2004; 20(2): 329-359.
23. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biol Med* 1995; 18(1): 125-126.
24. Bonnet MH, Berry RB, Arand DL. Metabolism during normal, fragmented, and recovery sleep. *J Appl Physiol* 1991; 71(3): 1112-1118
25. Bettendorff L, Sallanon-Moulin M, Touret M, Wins P, Margineanu I, Schoffeniels E. Paradoxical sleep deprivation increases the content of glutamate and glutamine in rat cerebral cortex. *Sleep* 1996; 19:65-71
26. Maquet P. Functional neuroimaging of normal human sleep by positron emission tomography. *J Sleep Res* 2000; 9(3): 207-231.
27. Maquet P. Current status of brain imaging in sleep medicine. *Sleep Med Rev* 2005; 9(3): 155-156.
28. D'Almeida V, Hipólide DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VB, Tufik S. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett* 1997; 235(1-2): 25-28.
29. Gopalakrishnan A, Ji LL, Cirelli C. Sleep deprivation and cellular responses to oxidative stress. *Sleep* 2004; 27(1): 27-35.
30. Tsiara S, Elisaf M, Jagroop IA, Mikhailidis DP. Platelets as predictors of vascular risk: Is there a practical index of platelet activity? *Clin Appl Thromb Hemost* 2003; 9:177-190
31. Varol E, Ozturk O, Gonca T, Has M, Ozaydin M, Erdogan D, Akkaya A. Mean platelet volume is increased in patients with severe obstructive sleep apnea. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010; 70(7):497-502.
32. Staessen JA, Bieniaszewski L, O'Brien E, Gosse P, Hayashi H, Imai Y, Kawasaki T, Otsuka K, Palatini P, Thijs L, Fagard R. Nocturnal blood pressure fall on ambulatory



monitoring in a large international database. The "Ad Hoc" Working Group. Hypertension. 1997; 29(1 Pt 1): 30-39.

33. Somers VK, Dyken ME, Mark AL, Abboud FM. Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. N Engl J Med. 1993; 328(5):303-7.

34. Verrier RL, Muller JE, Hobson JA. Sleep, dreams, and sudden death: the case for sleep as an autonomic stress test for the heart. Cardiovasc Res. 1996; 31(2):181-211. Review.

35. Chasen C, Muller JE. Cardiovascular triggers and morning events. Blood Press Monit. 1998; 3(1):35-42.

36. Cannon CP, McCabe CH, Stone PH, Schactman M, Thompson B, Theroux P, Gibson RS, Feldman T, Kleiman NS, Tofler GH, Muller JE, Chaitman BR, Braunwald E. Circadian variation in the onset of unstable angina and non-Q-wave acute myocardial infarction (the TIMI III Registry and TIMI IIIB). Am J Cardiol. 1997; 79(3):253-8.

37. Cohen MC, Rohtla KM, Lavery CE, Muller JE, Mittleman MA. Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. Am J Cardiol. 1997 Jun 1;79(11):1512-6. Erratum in: Am J Cardiol 1998; 81(2):260