

A szelektív REM megvonás és a stressz hatásai az ezt követő alvás rebound architektúrájára és egyes hypothalamicus neuropeptidekre

Doktori tézisek

Kitka Tamás

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Bagdy György egyetemi tanár, D.Sc.
Hivatalos bírálók: Dr. Fekete Csaba tudományos tanácsadó, D.Sc.
Dr. Boros András témafelelős (kutatásban), Ph.D.
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fonyó Attila ny. egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bódizs Róbert tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Wittner Lucia tudományos munkatárs, Ph.D.

Budapest

2012

1 Bevezetés

1.1 Az alvás fázisai

Az alvás fázisait alapvetően, de nem kizárólag, elektro-encephalográfiás (EEG) jellemzőik alapján különítik el. Az EEG nem az egyes neuronok aktivitásáról, hanem egy adott területen lévő neuronok szinkronizációjáról ad információt, így a kapott jel amplitúdója akkor a legnagyobb, ha az elektród által érzékelt területen lévő sejtek szinkron aktivitást mutatnak. Az EEG hullámokat általában frekvenciájuk szerint csoportosítják. A sávhatárok nem egyértelműen definiáltak, így a különböző munkacsoportok által használt értékek eltérhetnek, de alapvetően a következő típusokat különíthetjük el: lassú oszcilláció (0,5-1 Hz), delta (1-4 Hz), theta (5-7, vagy 5-9 Hz), alfa (8-13, vagy 10-20 Hz), béta (14-30, vagy 20-30 Hz), gamma (30-60 Hz) hullámok.

Az alvást REM alvásra, valamint lassú hullámú alvásra (SWS: slow wave sleep) osztjuk fel. A REM alvás szinonimájaként a paradox alvás (PS: paradoxical sleep) az SWS szinonimájaként a non-REM (NREM) is használható. Az elalváskor először az SWS fázis jelentkezik, melynek állatoknál pedig két stádiumát (SWS1 és SWS2) különböztetjük meg.

1.2 A melanin-koncentráló hormon

Az MCH egy 19 aminosavból álló ciklikus neuropeptid, melyet először a lazac hipofízisében írtak le, mint a bőr világosodását kiváltó hormont. Mint hamarosan kiderült, az MCH-t az emlősgagy sejtjei is expresszálják, de a bőr pigmentációját ezekben az állatokban nem befolyásolja. Az MCH tartalmú neuronok emlősben alapvetően a tuberális hypothalamus és a zona/subzona incerta területén találhatóak.

Az MCH-erg neuronok számos, alvás-ébrenlét és táplálékfelvétel szabályzásában részt vevő agyterület felé küldenek rostokat. Az MCH-val kolokalizáltan több peptid, illetve transzmitter jelenlétét kimutatták, például az MCH-erg neuronok túlnyomó része neszfatint és GABA-t is tartalmaz, valamint egy hányaduk esetében CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) jelenlétét is kimutatták.

Az MCH-erg rendszer alvás-ébrenlét szabályozásában játszott szerepét számos kutatócsoport vizsgálta. Eredményeik egybehangzóan bizonyítják, hogy az MCH-erg

neuronok aktivitásuk maximumát REM alvás alatt éri el, valamint ennek a rendszernek a farmakológiai, immunológiai és genetikai modulálásával befolyásolható a REM-ben töltött idő. Ezzel szemben az MCH-erg aktivitás REM-architektúrára gyakorolt hatása nem ismert. A források mind a REM szakaszok hosszának, mind a REM szakaszok darabszámának változásával összefüggésbe hozzák ezt a rendszert, de mindkét paraméter esetén ezekkel ellentétes eredmények is ismertek.

Az MCH-erg sejtek CART-immunreaktivitásuk alapján két alpopulációra oszthatóak: a CART-immunoreaktív (CART-IR), és a CART-ot nem tartalmazó (non-CART-IR) neuronokra. Ezek a neuron-csoportok projekciós területeiket tekintve is eltérnek: A CART-IR neuronok az agykéreg, a REM alatti hippocampalis theta generálásában ismert módon részt vevő medialis septalis complex, valamint a hippocampus felé küldenek rostokat, de az agytörzs felé, ezen belül a tectum, a dorsolateralis periaqueductalis szürkeállomány és a dorsalis raphe felé induló projekciókat is leírtak. Az MCH/CART immunopozitív rostoknak ez az ága a legdenzebben a DPGi területét idegzi be. Ezzel szemben az MCH-tartalmú sejtek non-CART-IR alcsoportja az alsó agytörzs és a gerincvelő egyes neuronpopulációit innerválja. Ismert, hogy a kis porondon történő REM-megvonást követő visszacsapás alatt az MCH-neuronok mindkét alcsoportja aktiválódik (a metodika leírását ld. az 1.2 fejezetben). Mindazonáltal megjegyzendő, hogy ez a protokoll egyértelműen stresszel jár az állatokra nézve és az MCH ismert módon szerepet játszik a stresszre adott viselkedési és hőmérséklet-szabályozási válaszokban, valamint számos, stresszre adott válasz gátolható MCHR1 (MCH receptor 1) antagonistával. Ezek alapján feltételezhető, hogy az MCH neuronok kis porondos REM-megvonást követő fentebb leírt aktivációjában az alvás-visszacsapáson túl a módszerrel járó stressz is szerepet játszhat.

1.1 Orexinek

Az orexin A-t és B-t (más néven hypocretin 1-t és 2-t) 1998-ban írta le egymástól függetlenül két kutatócsoport, és először a táplálékfelvételre gyakorolt hatásukat fedezték fel. A két orexin ugyanannak a fehérjének, a prepro-orexinnek a hasítási terméke. Az orexin-tartalmú neuronok elhelyezkedése az MCH-tartalmú neuronok lokalizációjához hasonló: sejttestjeik a dorsalis LH (lateralis hypothalamus), a PFA (perifornicalis area) és

a PH (posterior hypothalamus) területén találhatóak. Ezek a neuronok projekcióikkal szinte a teljes központi idegrendszert behálózzák, de terminálisaik legsűrűbben a táplálékfelvétellel és autonóm szabályzással, illetve az alvás-ébrenlét szabályzásával összefüggésbe hozható agyterületeken mutathatók ki.

Az orexinerg neuronok alvás alatt nem tüzelnek, ez alól kivételt a REM alatti végtágrángások jelentik. Ezzel összhangban az orexinről kimutatták, hogy hatékonyan csökkenti az alvásban, ezen belül a REM alvásban töltött időt is. Ez utóbbi hatását elsősorban a REM szakaszok számának csökkentésén keresztül fejt ki.

Az orexin- és MCH-tartalmú sejtek reciprok monosynapticus kapcsolatban állnak. Az MCH-tartalmú neuronok orexin 1 receptort expresszálnak, és ezzel összhangban az orexin A és B is serkenti az MCH-tartalmú idegsejteket. Az orexin-tartalmú neuronok orexin A-val való ingerelhetősége MCH adásával gátolható, és ez a hatás MCHR1 KO egerekben nem figyelhető meg.

1.2 A „flower pot” REM-megvonásos technika

A módszer lényege az, hogy az állatot egy kisméretű, kerek porondra helyezzük, amit víz vesz körbe. A porond mérete elégséges ahhoz, hogy az állat rajta meg tudjon állni, de ráfeküdni még összegömbölyödve sem tud, így amint belép a REM fázisba, az izomatónia miatt beleesik a vízbe és felébred. Általában két különböző méretű porondot használnak egy ilyen kísérletben: a fentebb jellemzett kisebbet, valamint kontrollként egy nagyobbat. Ez utóbbi már alkalmas arra, hogy az állat összegömbölyödve aludjon rajta, így lehetővé válik a REM alvás, de egyéb körülmények tekintetében megegyezik a kisebbel.

Ismert, hogy mind a kis-, mind a nagy porondos alvásmegvonás csökkenti az SWS-ben töltött időt, valamint komoly stresszforrást is jelentenek. Ugyanakkor bizonyítást nyert, hogy a kis és a nagy porondon lévő állatok alvásmintázatában az alapvető különbség a REM alvásban töltött időben mutatkozik, az SWS-ben töltött idő tekintetében a két porond hatásai megegyeznek. Ezen kívül az okozott stressz tekintetében sem térnek el. Ezek alapján bár szelektív REM-megvonásra egyik porond sem alkalmas, a két porond hatásainak összehasonlításával a szelektív REM-megvonás által okozott változások jól tanulmányozhatóak. Így a dolgozat további részeiben a

szelektív REM-megvonás hatásaként a két porond összehasonlításából származó eredményekre fogok hivatkozni.

2 Célkitűzések

A „flower pot” módszer alvásmintázatra gyakorolt hatását, valamint az ezzel a módszerrel végzett ismételt alvásmegvonás – alvás-visszacsapás hatásait is számos kutatócsoport vizsgálta. Ennek ellenére a kis és a nagy (stressz-kontroll) porondon töltött alváshiányos időszakot követő 24 óra alatt a két csoport alvás-mintázatának részletes összehasonlítását egyik kutatócsoport sem írta le. Így nem különítették el a REM-megvonás hatásait a módszerrel együtt járó stressz hatásaitól, és az alvás-visszacsapás időbeli lefutása sem ismert. A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletünk célja ennek az összehasonlításnak a megtétele, és így a REM alvás teljes, szelektív megvonása eredményeképp létrejövő alvásmintázati változások leírása volt. Ennek megtételét követően a hypothalamicus MCH-erg és orexinerg neuronok endogén aktivációja, valamint a REM-megvonást követő visszacsapás architektúrája közti kapcsolatot vizsgáltuk, valamint annak tisztázását is célul tűztük ki, hogy az MCH sejtek CART-immunreaktivitás alapján elkülönített alpopulációi egyenlő, vagy eltérő mértékben hozhatók kapcsolatba a REM alvás architektúrájával.

A két kísérlet céljai összefoglalva:

- Az első kísérlet (1) a szelektív REM-megvonás következtében kialakuló REM-visszacsapás architektúrájának, valamint (2) az alvás-visszacsapás időbeli lefutásának leírását célozta (Kitka és mtsai, 2009).
- A második kísérletben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy (3) az MCH-tartalmú sejtek két ismert (CART-ot tartalmazó és CART-ot nem tartalmazó) alcsoportja közül melyik állhat idegélettni kapcsolatban a szelektív REM-megvonást követő REM-visszacsapással (Kitka és mtsai, 2011).
- Ezen kívül (4) azt vizsgáltuk, hogy az MCH-t, illetve orexint tartalmazó neuronok aktivitása párhuzamosan változik-e a REM alvás szerkezetében megfigyelhető, a szelektív REM-megvonást követő változásokkal. Más szavakkal: feltételezhető-e, hogy a szelektív REM megvonást követő

visszacsapás architektúrájának kialakításában ezen neuroncsoportok vesznek részt?

3 Anyagok és módszerek

3.1 Kísérleti elrendezés

Mindkét kísérlet során hím Wistar patkányokat használtunk, melyeket frontoparietális EEG és nyaki EMG elektródákkal láttunk el. A motoros aktivitást az EEG és EMG jeleket közvetítő drót mozgásából regisztráltuk. A műtéttől való felépülést követően az állatokat habituáltuk a mérési körülményekhez, majd a következő csoportokba osztottuk:

- HC (home cage, saját ketrecben tartott) csoport: az alvásmegvonás ideje alatt saját ketrecükben tartott állatok
- SP (small platform, kis porondon tartott) csoport (csak a második kísérletben): 72 órát töltöttek a kis porondon
- LP (large platform, nagy porondon tartott) csoport (csak a második kísérletben): 72 órát töltöttek a nagy porondon
- SPR (small platform, sleep rebound, kis porondon tartott, alvás-visszacsapásos) csoport: 72 órát töltöttek a kis porondon, majd a csoport tagjairól az alvás-visszacsapás alatt a poliszomnográfias felvételt készítettünk
- LPR (large platform, sleep rebound, nagy porondon tartott, alvás-visszacsapásos) csoport: 72 órát töltöttek a nagy porondon, majd a csoport tagjairól az alvás-visszacsapás alatt a poliszomnográfias felvételt készítettünk

A kis porond átmérője 6,5 cm, a nagy porondé 13 cm volt. Az alvásmegvonás után az első kísérletben 23, a másodikban 3 órás alvásvizsgálatot alkalmaztunk. A második kísérletben az alvásmegvonás végén (HC, SP, LP), illetve a poliszomnográfias felvételt követően (SPR, LPR) az állatokat perfundáltuk. Az alvásmegvonás, illetve a poliszomnográfias felvételek kezdetét a fény felkapcsolásához időzítettük. A víz és a táp az állatok számára mindkét kísérlet folyamán végig korlátlanul elérhető volt.

3.2 A felvételek kiértékelése

A vigilancia-állapotokat SleepSign for Animal alváskiértékelő program (Kissei Komtec America, Inc, USA) segítségével különítettük el. A felvétel kiértékeléséhez 4 másodperces epoch-hosszt használtunk. Az egyes vigilancia-állapotokat az alábbi jellemzők alapján definiáltuk:

- AW (active wake, aktív ébrenlét): az EEG jelet alacsony amplitúdójú alfa- (8-13 Hz) és beta- (14-30 Hz) frekvenciák jellemzik, valamint magas az EMG- és a motoros aktivitás
- PW (passive wake, passzív ébrenlét): az EEG jelet alacsony amplitúdójú alfa- (8-13 Hz) és beta- (14-30 Hz) frekvenciák jellemzik, az EMG-aktivitás magas, de motoros aktivitás nem látható
- SWS1 (light slow wave sleep, felszínes lassú hullámú alvás): nagy amplitúdójú, lassú EEG hullámok (0,5-4 Hz), melyeket alacsony feszültségű, gyors alvási orsók szakítanak meg (6-15 Hz), az EMG aktivitás alacsony
- SWS2 (deep slow wave sleep, mély lassú hullámú alvás): folyamatos, nagy amplitúdójú, lassú EEG hullámok (0,5-4 Hz), az EMG aktivitás alacsony
- IS (intermediate stage, átmeneti szakasz, egy rövid, átmeneti állapot közvetlenül a REM fázis előtt, ill. néha utána): 12-13 Hz körüli frekvenciájú orsók és alacsony frekvenciájú theta ritmus (5-6 Hz) szokatlan asszociációja jellemzi
- REM (rapid eye movement, gyors szemmozgásos) alvás: szabályos theta ritmusok (5-9 Hz) jellemzik, EMG és motoros aktivitás nincs, kivéve az időnkénti rángásokat

Az automata értékelést követően az eredményeket vizuálisan ellenőriztük. A nyers eredményekből a REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletben a következő adatokat számoltuk minden állat esetében külön, órás bontásban:

- Az egyes alvásfázisokban töltött idő
- TSWS (total slow wave sleep, összes lassú hullámú alvás): SWS1+SWS2
- SWS2%: SWS2-ben töltött idő a TSWS százalékában (a lassú hullámú alvás átlagos mélységét mutatja)
- TW (total wake, összes ébrenlét): AW+PW

- REM szakaszok átlagos hossza
- REM szakaszok darabszáma

A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben csak a REM alvás mintázatát értékeltük ki (REM-ben töltött idő, REM szakaszok átlagos hossza, REM szakaszok darabszáma). A REM alvás mintázatának kiértékelésekor az ún. sRa-kat (short REM attempts, rövid REM „próbálkozások”) nem tekintettük valódi, különálló REM szakaszoknak, vagyis egy összefüggő REM szakasznak azt az időszakot definiáltuk, ami legalább 16 másodpercig tart, és nem szakítja meg 16 másodperces, vagy annál hosszabb egyéb vigilancia-fázis.

3.3 Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai vizsgálatot csak a REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben végeztünk. Az állatokat mély altatásban transzkardiálisan perfundáltuk, majd az agyakat eltávolítottuk, és a hypothalamusokból 4 párhuzamos sorozat 50 µm vastag metszetet készítettünk.

Az immunhisztokémia során az elsődleges antitestek minden esetben nyúlból származtak, kivéve az MCH/CART/cFos hármas festést, ahol kecske anti-MCH-t használtunk. Az antitest-keresztreakció megakadályozásához és a HRP (horse radish peroxidase, tormaperoxidáz) enzim blokkolásához mikrohullámú kezelést alkalmaztunk. A kettős festés során a cFos-tartalmú idegelemeket nikkel-diaminobenzidinnel, az MCH- és orexin-tartalmú neuronokat pedig diaminobenzidinnel vizualizáltuk. A hármas immunhisztokémia előhívásához FITC-Tyramide-ot (cFos), Alexa 594-et (CART), illetve Streptavidin-Pacific Blue-t (MCH) használtunk.

A kettős festés során az MCH-immunoreaktív (MCH-IR) sejteket a zona incerta (ZI), lateralis hypothalamus (LH), paraventricularis area és perifornicalis area (PFA); az orexin-immunoreaktív neuronokat pedig az LH, PFA, dorsomedialis és posterior hypothalamus területén számoltuk össze. Ehhez Reichert vizopán mikroszkópot használtunk.

A hármas immunhisztokémia során a neuronokat a ZI, PFA és LH területén számoltuk meg Nikon Eclipse E 8000 konfokális mikroszkóppal.

3.4 Statisztikai kiértékelés

A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletben az előre definiált időintervallumokra vonatkozó statisztikai vizsgálathoz ismétléses variancia-analízist (ANOVA: analysis of variance) végeztünk egy nem ismétléses és egy ismétléses faktorral. (Nem ismétléses faktor: kezelési csoport, ismétléses faktor: idő.) A vizsgált időintervallumok: 2-24 óra, 2-6 óra, 7-12 óra, 2-12 óra, valamint 13-24 óra voltak. Ezen kívül minden egyes óra eredményeit külön-külön kiértékeljük egyutas ANOVA-val (faktor: kezelési csoport). Mindkét típusú ANOVA-t követően (szignifikáns kezelés-hatás esetén) Tukey post hoc tesztet végeztünk egy faktorral (kezelési csoport). Egy szakasz, ill. vizsgált óra esetén a szignifikáns hatást a post hoc teszt alapján, $p < 0,05$ esetén állapítottunk meg.

A napi ritmusok kiértékeléséhez cosinor analízist végeztünk (sinusoid görbe illesztése), 24 órás periódusidővel. Szignifikáns eltérésnek azt tekintettük, ha az adott paraméter tekintetében (akrofázis: az illesztett görbe maximum-értékének helye; mezor: az illesztett görbe átlagos értéke; amplitúdó) a két kezelési csoport 95%-os konfidencia-intervallumai nem fedtek át.

A kettős immunohisztokémia esetén a sejtek számát, valamint a REM alvás paramétereit a különböző csoportokban egyutas ANOVA-val hasonlítottuk össze (faktor: csoport). A hármas immunohisztokémia kiértékeléséhez faktoriális ANOVA-t használtunk (faktorok: csoport, CART-immunoreaktivitás). Szignifikáns csoport-hatás esetén Tukey post hoc tesztet végeztünk.

Az interindividuális korrelációkat lineáris regresszióval vizsgáltuk. Mivel a cFos-IR sejtek arányának eloszlása az orexin-IR sejteken belül a legtöbb összehasonlításban exponenciális-hoz hasonlóan bizonyult, ennek az arálynak a regressziós analíziséhez az érték 10-es alapú logaritmusát használtuk.

A statisztikai vizsgálatokat STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA), illetve Time Series Analysis Serial Cosinor 6.0 Lab View (Expert Soft Technologie) programokkal végeztük. Az adatokat az összes ábrán átlag \pm átlag szórása formában ábráztuk.

4 Eredmények

4.1 A REM-visszacsapás 24 órás architektúráját vizsgáló kísérlet

Ebben a kísérletben a szelektív REM-megvonást követő alvás-visszacsapás architektúráját, valamint időbeli lefutását vizsgáltuk (Kitka és mtsai, 2009).

4.1.1 Alvás-paraméterek

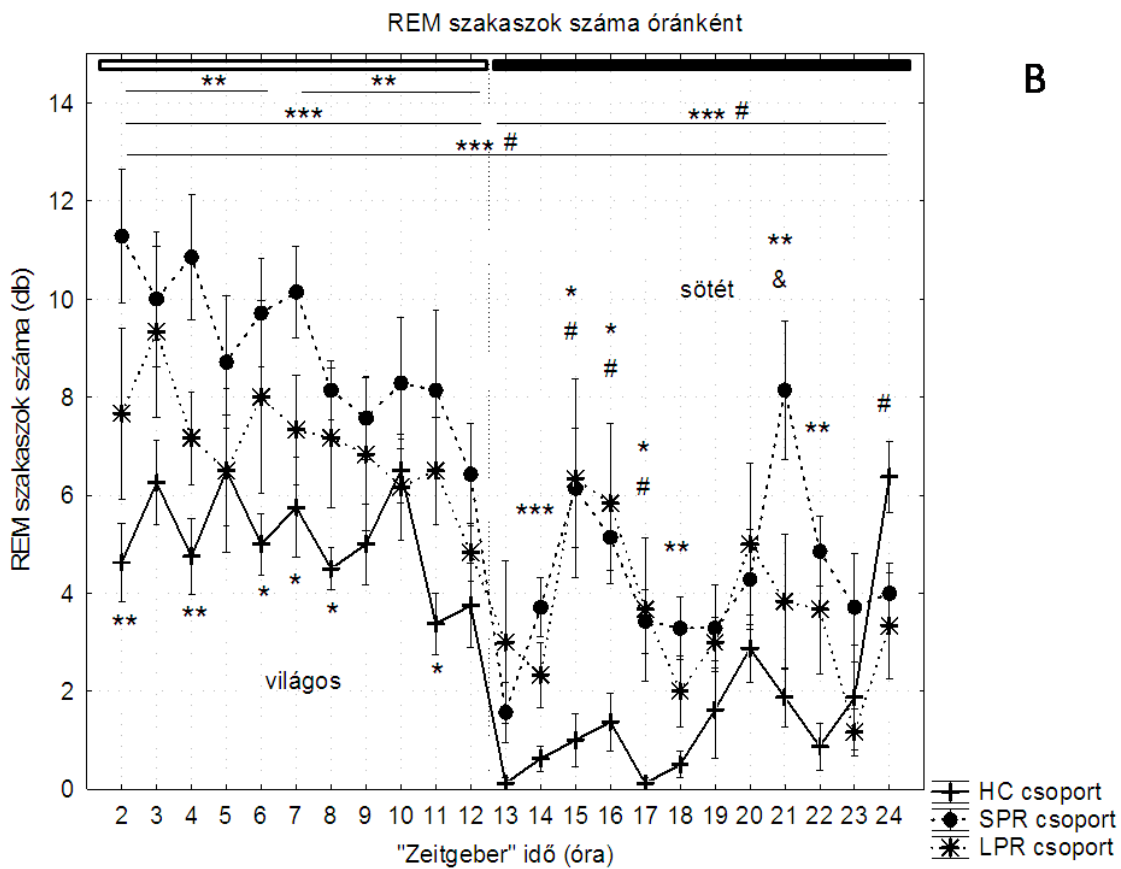
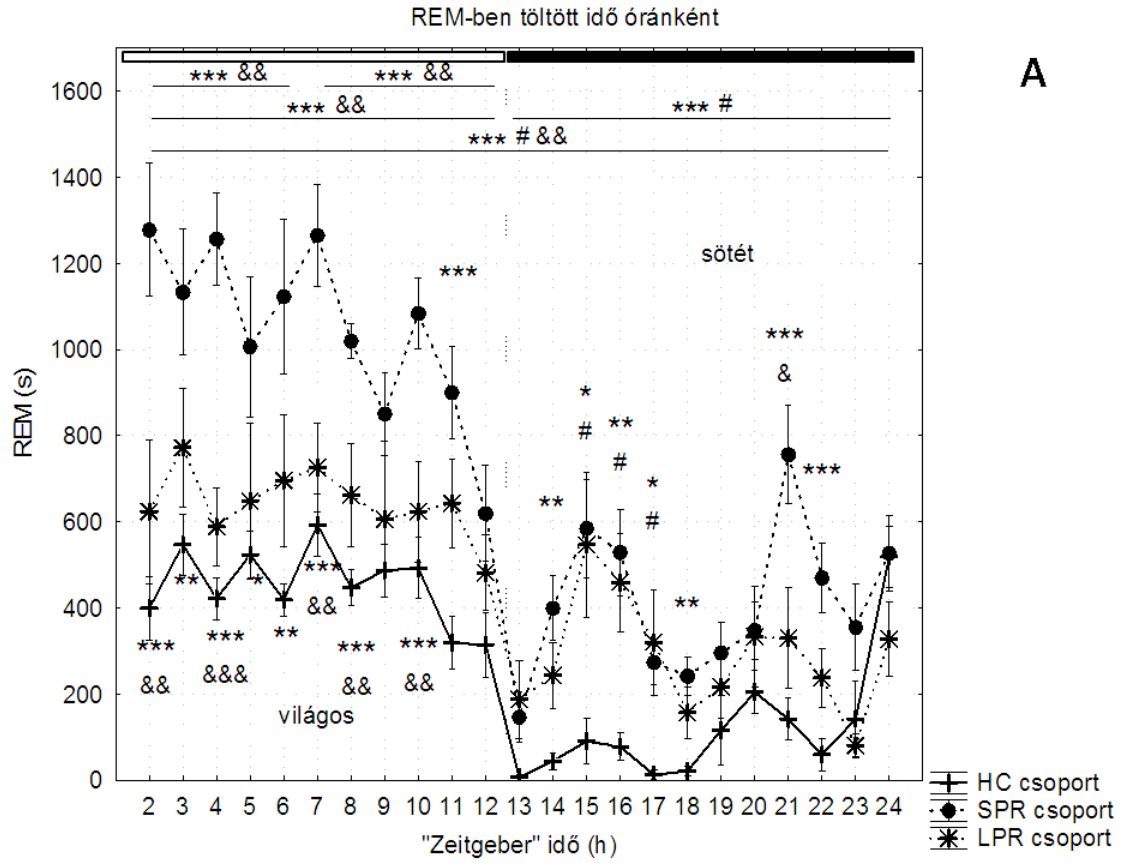
A három vizsgált csoport alvásmintázata között számos különbség volt látható a teljes mérési nap folyamán. Általánosságban tekintve az SPR csoport eredményei gyakorlatilag a teljes vizsgált nap folyamán eltértek a HC csoport eredményeitől. Az LPR csoport adatai a passzív fázisban inkább SPR csoport adataival, míg az aktív fázisban inkább HC csoport adataival szemben mutattak több eltérést. A kísérlet eredményeit (szignifikáns változások) a könnyebb áttekinthetőség kedvéért táblázatos formában tüntetem fel (1. táblázat). A REM alvás architektúrájára vonatkozó eredményeket részletesebben az 1. ábra mutatja.

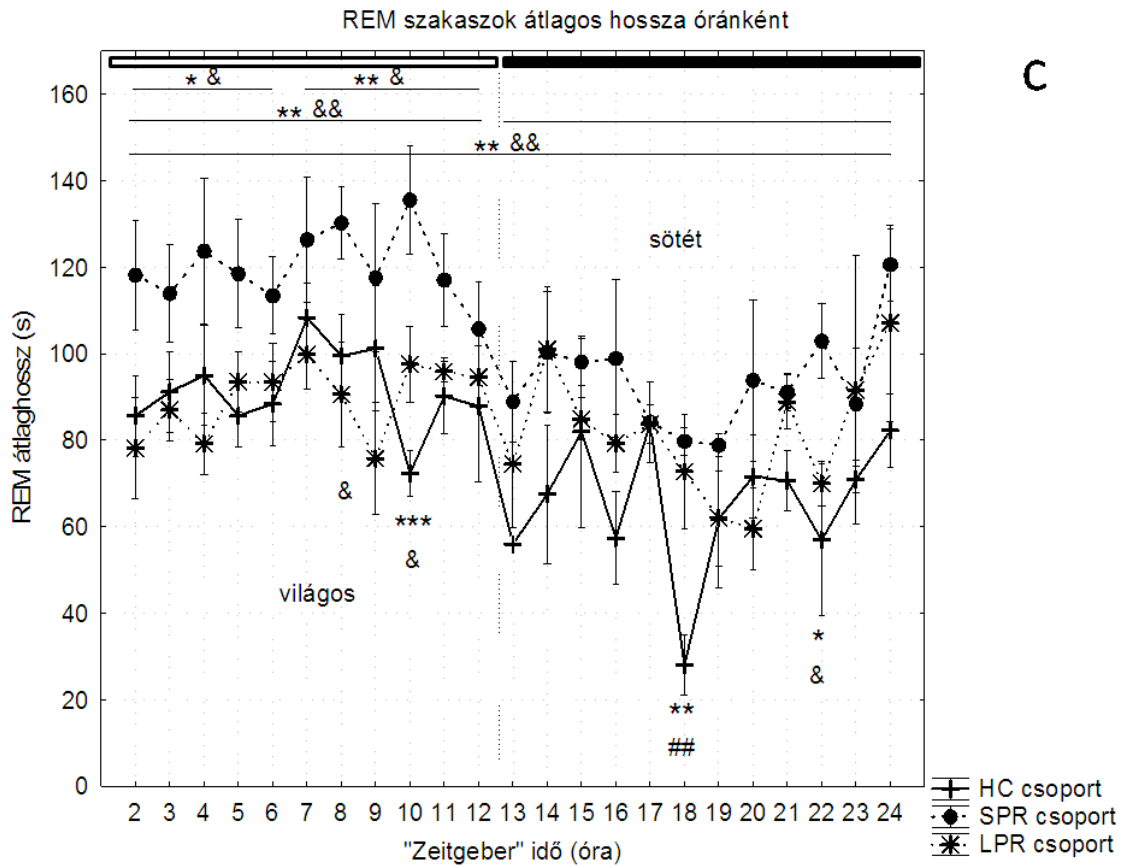
1. táblázat (következő oldal). A HC (home cage, saját ketreces), SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos) és LPR (large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos) csoportok különbségei egyes alvás-paraméterek tekintetében. AW: active wake, aktív ébrenlét; PW: passive wake, passzív ébrenlét; SWS: slow wave sleep, lassú hullámú alvás (1: felszínes, 2: mély); IS: intermediate stage, átmeneti szakasz; REM: rapid eye movement sleep, gyors szemmozgásos alvás; sRa: short REM attempt, rövid REM „próbálkozás”; TSWS: total slow wave sleep, összes lassú hullámú alvás; TW: total wake, összes ébrenlét; SWS2%: SWS2 a TSWS százalékában. A világos (passzív) periódus a mérés kezdetétől a 12. óráig tartott. Egy jel: $p < 0,05$, két jel: $p < 0,01$, három jel: $p < 0,001$; ▲: növekedés, ▼: csökkenés.

| | SPR csoport eredményei az LPR csoportéhoz képest | | | | |
|----------------------|--|-------|--------|--------|---------|
| | 2-24 h | 2-6 h | 7-12 h | 2-12 h | 13-24 h |
| AW | | | | | |
| PW | | | | | |
| SWS1 | | ▼ | | | |
| SWS2 | | | | | |
| IS | | | | | |
| REM | ▲▲ | ▲▲ | ▲▲ | ▲▲ | |
| REM db | | | | | |
| REM hossz | ▲▲ | ▲ | ▲ | ▲▲ | |
| REM db (sRa-kkal) | | | | | |
| REM hossz (sRa-kkal) | ▲ | ▲ | ▲ | ▲▲ | |
| TSWS | | ▼ | | | |
| TW | ▼ | | | | |
| SWS2% | | | | | |

| | SPR csoport eredményei a HC csoportéhoz képest | | | | |
|----------------------|--|-------|--------|--------|---------|
| | 2-24 h | 2-6 h | 7-12 h | 2-12 h | 13-24 h |
| AW | ▼ | | | | ▼▼ |
| PW | | | | | |
| SWS1 | | | | | ▲▲ |
| SWS2 | | | | | |
| IS | | | | | |
| REM | ▲▲▲ | ▲▲▲ | ▲▲▲ | ▲▲▲ | ▲▲▲ |
| REM db | ▲▲▲ | ▲▲ | ▲▲ | ▲▲▲ | ▲▲▲ |
| REM hossz | ▲▲ | ▲ | ▲▲ | ▲▲ | |
| REM db (sRa-kkal) | ▲▲▲ | ▲▲ | ▲▲ | ▲▲ | ▲▲ |
| REM hossz (sRa-kkal) | ▲▲▲ | ▲▲ | ▲▲ | ▲▲ | ▲ |
| TSWS | | ▼▼▼ | | ▼ | ▲▲ |
| TW | ▼▼▼ | | ▼▼ | | ▼▼▼ |
| SWS2% | | | | | |

| | LPR csoport eredményei a HC csoportéhoz képest | | | | |
|----------------------|--|-------|--------|--------|---------|
| | 2-24 h | 2-6 h | 7-12 h | 2-12 h | 13-24 h |
| AW | | | | | ▼ |
| PW | | | | | |
| SWS1 | ▲ | | | | ▲▲ |
| SWS2 | | | | | ▼ |
| IS | | | | | |
| REM | ▲ | | | | ▲ |
| REM db | ▲ | | | | ▲ |
| REM hossz | | | | | |
| REM db (sRa-kkal) | ▲ | | | | ▲ |
| REM hossz (sRa-kkal) | | | | | |
| TSWS | | | | | |
| TW | ▼▼▼ | | | | ▼▼ |
| SWS2% | | | | | ▼ |





1. ábra. REM-ben töltött idő (A), REM szakaszok darabszáma (B) és átlagos hossza (C) a három napos alvásmegvonást követő napon. HC: home cage (saját ketreces), SPR: small platform sleep rebound (kis porondos, alvás-visszacsapásos csoport), LPR: large platform, sleep rebound (nagy porondos, alvás-visszacsapásos csoport). *: különbség a HC és SPR, #: különbség a HC és LPR, &: különbség az SPR és LPR csoportok között; egy jel: $p < 0,05$, két jel: $p < 0,01$, három jel: $p < 0,001$.

4.1.2 Napi ritmusok vizsgálata

Az akrofázis (az illesztett görbe maximumhelye) tekintetében semmilyen alvásparaméter esetén sem találtunk eltérést a csoportok között, vagyis szignifikáns fáziseltolást nem láttunk. Így a továbbiakban az illesztett görbe amplitúdója és a mezor (az illesztett görbe átlagos értéke) változásainak bemutatkozására szorítkozom (2. táblázat).

2. táblázat. A cosinor-analízis eredményei. HC: home cage, saját ketreces csoport; SPR: small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos csoport; LPR: large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos csoport; AW: active wake, aktív ébrenlét; PW: passive wake, passzív ébrenlét; SWS1: slow wave sleep 1, felszínes lassú hullámú alvás; SWS2: slow wave sleep 2, mély lassú hullámú alvás; IS: intermediate stage, átmeneti szakasz; REM: rapid eye movement sleep, gyors szemmozgásos alvás; sRa: short REM attempt, rövid REM „próbálkozás”; TSWS: total slow wave sleep, összes lassú hullámú alvás; TW: total wake, összes ébrenlét; SWS2%: SWS2 a TSWS százalékában. *: különbség a HC és SPR, #: különbség a HC és LPR, &: különbség az SPR és LPR csoportok között (p<0,05)

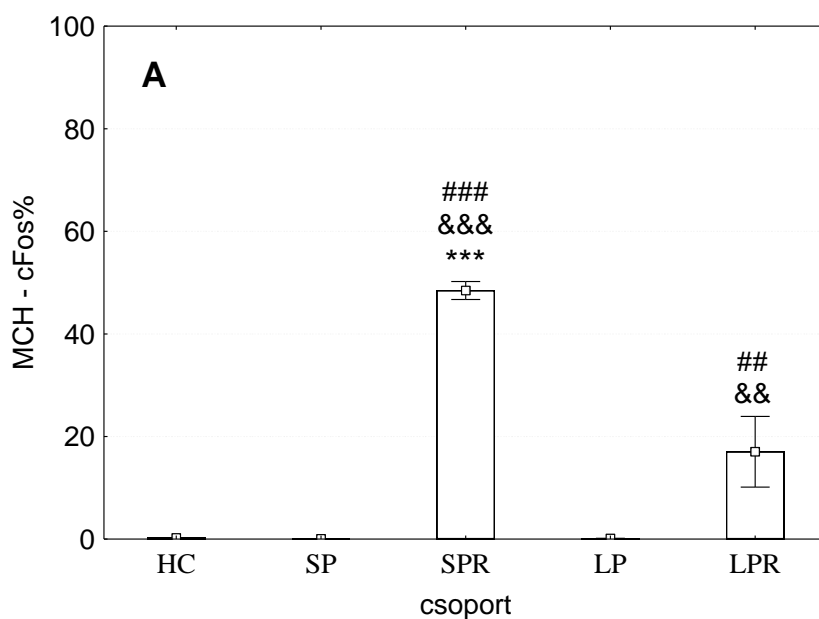
| | csoport | p(H0) | amplitúdó | | | mezor | | |
|-------------------|---------|--------|-----------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | | | átlag | CI min | CI max | átlag | CI min | CI max |
| AW (s) | HC | 0 | 995 | 860 | 1130 | 1130 | 1030 | 1230 |
| | SPR | 0 | 595 * | 475 | 716 | 820 * | 733 | 907 |
| | LPR | 0 | 640 # | 496 | 784 | 861 # | 757 | 964 |
| PW (s) | HC | 0,0127 | 118 | 40,3 | 197 | 730 | 674 | 785 |
| | SPR | 0 | 192 | 137 | 247 | 540*& | 500 | 579 |
| | LPR | 0,0007 | 210 | 104 | 317 | 696 | 620 | 773 |
| SWS1 (s) | HC | 0 | 329 | 253 | 405 | 646 | 591 | 701 |
| | SPR | 0,4346 | 50,6 * | -26,6 | 128 | 775 *& | 722 | 829 |
| | LPR | 0,0038 | 200 | 84,1 | 316 | 1020 # | 935 | 1100 |
| SWS2 (s) | HC | 0 | 555 | 456 | 653 | 699 | 629 | 768 |
| | SPR | 0 | 300 * | 220 | 318 | 582 & | 525 | 639 |
| | LPR | 0 | 347 # | 243 | 451 | 362 # | 288 | 436 |
| IS (s) | HC | 0 | 96,3 | 79,5 | 113 | 112 | 99,9 | 124 |
| | SPR | 0 | 92,6 | 71,3 | 114 | 161 *& | 145 | 176 |
| | LPR | 0 | 131 | 91,1 | 170 | 205 # | 176 | 234 |
| REM (s) | HC | 0 | 250 | 215 | 256 | 283 | 257 | 308 |
| | SPR | 0 | 442 *& | 373 | 511 | 723 *& | 673 | 772 |
| | LPR | 0 | 231 | 163 | 299 | 457 # | 408 | 507 |
| REM db | HC | 0 | 2,67 | 2,22 | 3,12 | 3,33 | 3 | 3,65 |
| | SPR | 0 | 2,52 | 1,79 | 3,25 | 5,49 * | 4,97 | 6,02 |
| | LPR | 0 | 2,19 | 1,39 | 2,99 | 5,62 # | 4,69 | 5,84 |
| REM db (sRa-kkal) | HC | 0 | 3,32 | 2,78 | 3,87 | 4,32 | 3,93 | 4,7 |
| | SPR | 0 | 3,5 | 2,68 | 4,32 | 7,88 *& | 7,29 | 8,47 |
| | LPR | 0 | 2,64 | 1,76 | 3,53 | 6,45 # | 5,81 | 7,08 |
| TSWS (s) | HC | 0 | 770 | 659 | 881 | 1340 | 1270 | 1420 |
| | SPR | 0 | 260 *& | 172 | 348 | 1360 | 1290 | 1420 |
| | LPR | 0 | 496 # | 391 | 600 | 1380 | 1310 | 1460 |
| TW (s) | HC | 0 | 1110 | 972 | 1250 | 1860 | 1760 | 1960 |
| | SPR | 0 | 788 * | 653 | 923 | 1360 * | 1260 | 1460 |
| | LPR | 0 | 844 | 692 | 996 | 1560 # | 1450 | 1670 |
| SWS2% | HC | 0 | 18,4 | 13 | 23,7 | 45,8 | 42 | 49,5 |
| | SPR | 0 | 13,8 | 8,79 | 18,8 | 40,5 & | 36,9 | 44 |
| | LPR | 0 | 13,7 | 7,47 | 20 | 22,9 # | 18,5 | 27,3 |

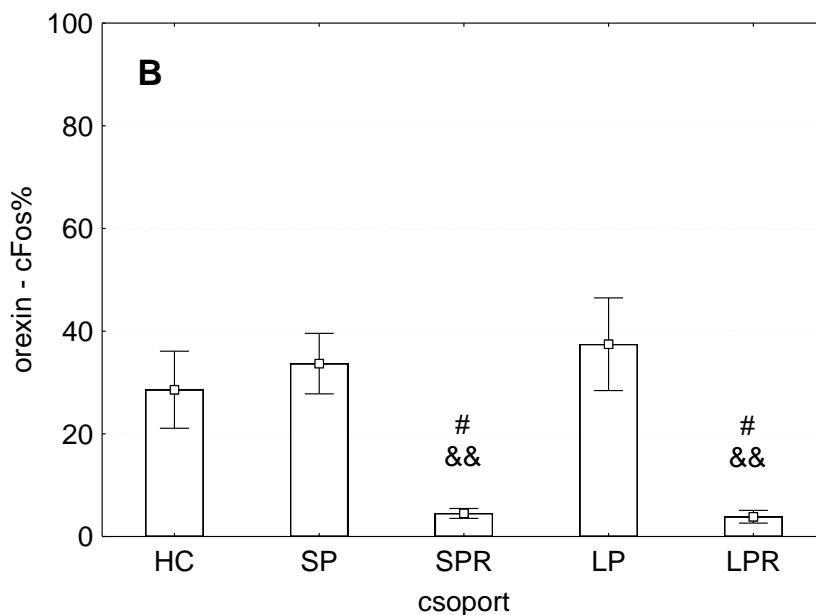
4.2 A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérlet

Az előző kísérlethez hasonlóan a 72 órás REM-megvonást követő alvás-visszacsapás során az SPR csoport állatai több időt töltöttek REM alvásban, mint az LPR csoportéi ($p=0,011$). Emellett a REM szakaszok átlagos hossza is nagyobbnak bizonyult ($p=0,017$), míg a REM szakaszok darabszáma tekintetében a két csoport között nem volt szignifikáns különbség

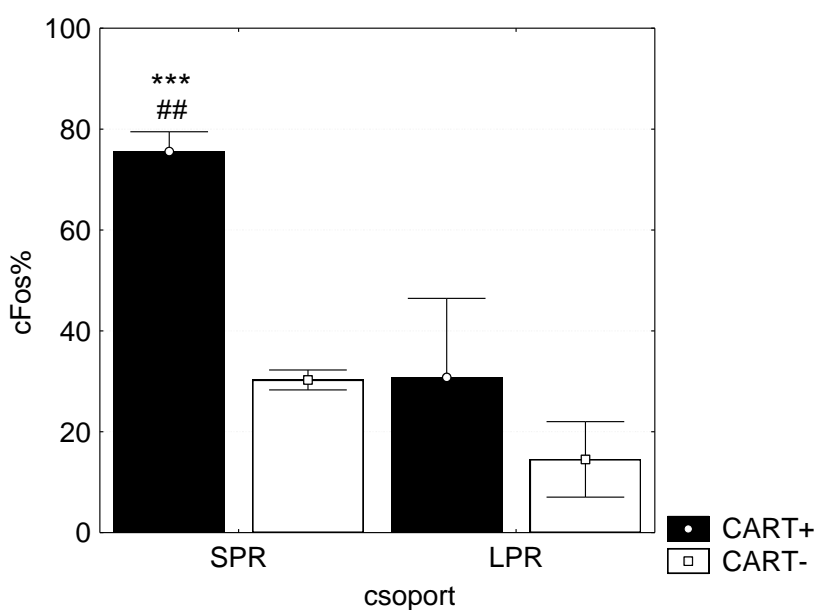
4.2.1 Morfológiai adatok

Az orexin-cFos és MCH-cFos kettős jelölt sejtek százalékos arányát a 2. ábra, míg a cFos immunoreaktív sejtek arányát az MCH-tartalmú neuronok CART-IR és non-CART-IR alpopulációin belül a 3. ábra szemlélteti.





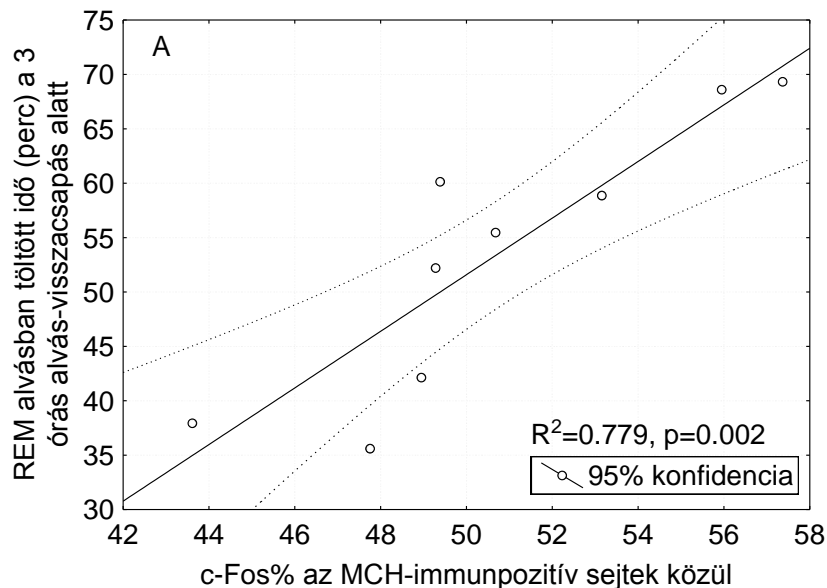
2. ábra. A cFos immunopozitív sejtek aránya az MCH- (melanin-koncentráló hormon-) immunoreaktív (A) és orexin-immunoreaktív (B) neuronok között az összes vizsgált agyterületen a 72 órás alvás-megvonást követő 3 órás visszacsapás után. HC (home cage, saját ketreces), SP (small platform sleep deprived, kis porondos alvás-megvonásos), SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos), LP (large platform sleep deprived, nagy porondos alvás-megvonásos) és LPR (large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos) csoport; #: különbség a HC csoporthoz képest, &&: különbség a megfelelő nem alvás-visszacsapásos csoporthoz képest, *: különbség az SPR és LPR csoportok között; egy jel: $p < 0,05$, két jel: $p < 0,01$, három jel: $p < 0,001$

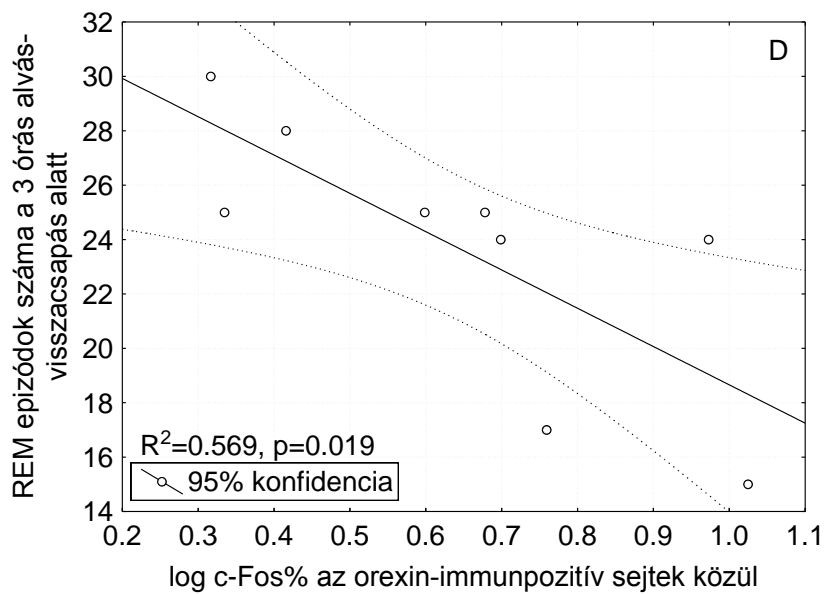
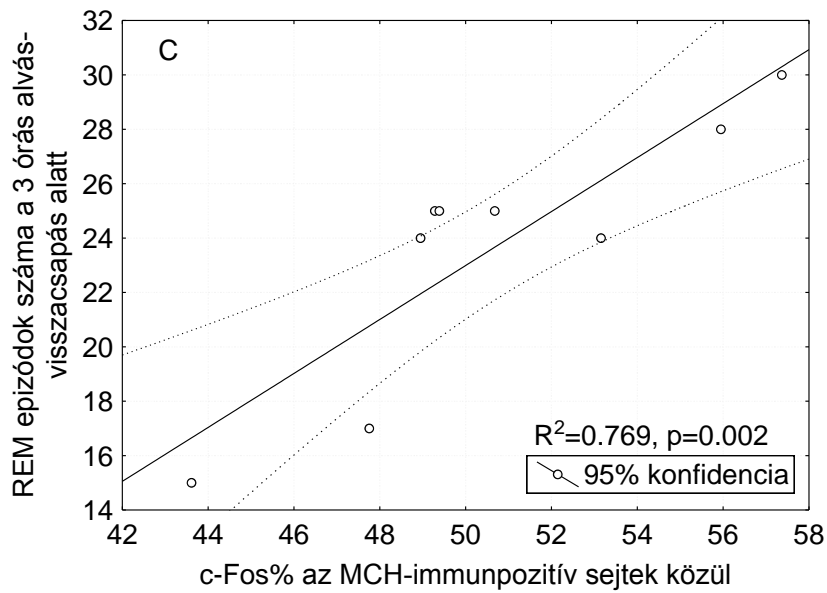
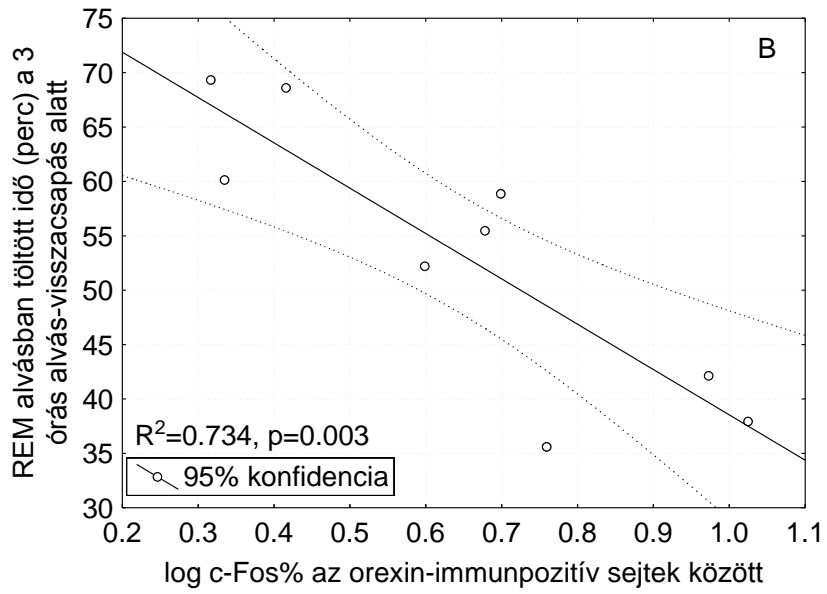


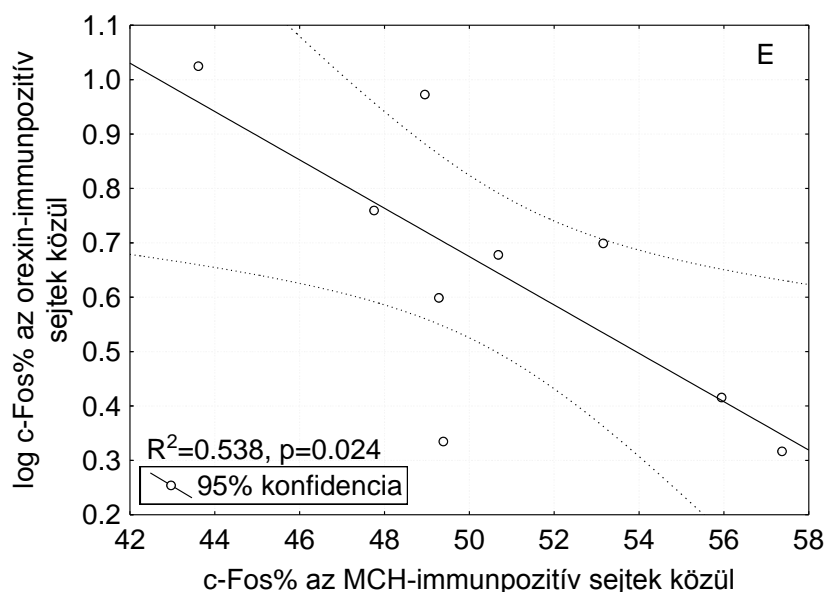
3. ábra (előző oldal) A cFos immunoreaktív sejtek aránya a melanin-koncentráló hormon-tartalmú neuronok CART-IR és non-CART-IR alpopulációin belül a 72 órás alvás-megvonást követő 3 órás visszacsapás után. SPR: small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos csoport; LPR: large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos csoport, CART-IR: cocaine- and amphetamine regulated transcript-immunreaktív. ***: $p < 0,001$ az SPR non-CART-IR sejtcsoporthoz, ##: $p < 0,01$ az LPR CART-IR sejtcsoporthoz képest.

4.2.2 Interindividuális korrelációk

A REM mintázata és az MCH-, illetve orexin-tartalmú neuronok aktivációja közötti kapcsolat felderítéséhez lineáris regressziót végeztünk az SPR csoport állatainak adatain. Számos korrelációt találtunk, melyeket a 4. ábra szemléltet. A REM szakaszok átlagos hosszával semmilyen mért immunhisztokémiai mutató sem korrelált.







4. ábra. Az SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos) csoporton belüli korrelációk. Az immunhisztokémiai adatok az összes vizsgált agyterületre vonatkoznak. **A:** A 3 órás visszacsapás alatt REM alvásban töltött idő és az MCH- (melanin-koncentráló hormon) tartalmú sejtek között a cFos-immunopozitívak aránya; **B:** A 3 órás visszacsapás alatt REM alvásban töltött idő és az orexin-tartalmú sejtek között a cFos-immunopozitívak aránya; **C:** A 3 órás visszacsapás alatt a REM epizódok száma és az MCH-tartalmú sejtek között a cFos-immunopozitívak aránya; **D:** A 3 órás visszacsapás alatt a REM epizódok száma és az orexin-tartalmú sejtek között a cFos-immunopozitívak aránya; **E:** az MCH- és orexin-tartalmú sejtek között a cFos-immunopozitívak aránya

5 Következtetések és a Célkitűzések részben felvetett kérdések megválaszolása

1. Bár mind a kis- mind a nagy- (stressz-kontroll-) porondon végzett alvás-megvonást követő visszacsapás a REM szakaszok számának növekedésével járt, a két alvás-visszacsapásos csoport között ebben a tulajdonságukban nem találtunk szignifikáns eltérést. Ezzel szemben a REM szakaszok átlagosan hosszabbak voltak a kis, mint a nagy porondos alvás-megvonást követően. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a szelektív REM-megvonás következtében kialakuló REM-visszacsapás jellemzője a REM szakaszok átlagos hosszának növekedése; a REM szakaszok számának növekedése pedig a „flower pot” módszerből fakadó stressz (új környezet, nedvesség, immobilizáció, stb.), esetleg az általános alváshiány következménye.

2. A REM alvásban töltött idő szelektív REM-megvonás miatti növekedése leginkább a megvonás után rögtön következő passzív fázisra jellemző. Ezzel szemben a felszínes lassú hullámú alvásban töltött idő növekedése az ezt követő aktív fázis alatt figyelhető meg, ahol az LPR (stressz-kontroll) csoport esetében a lassú hullámú alvás felszínesedése is megjelenik.

3. Eredményeink szerint a kis porondos alvás-megvonást követő visszacsapás hatására az MCH-erg neuronok CART-ot nem tartalmazó alpopulációja hasonló mértékben aktiválódik, mint a nagy porond esetén. Ezzel szemben a CART-ot tartalmazó alpopuláció aktivitása a kis porondos alvás-megvonás utáni visszacsapás hatására nagyobb lesz, mint a nagy porond esetében, vagyis feltehetően ennek a neuroncsoportnak az aktivitása állhat kapcsolatban a szelektív REM-megvonás indukálta REM-visszacsapással.

4. Annak ellenére, hogy eredményeink alapján a szelektív REM-megvonás miatti visszacsapás során a REM-szakaszok átlagos hossza növekszik, és ugyanakkor az MCH-tartalmú idegsejtek aktivitásának fokozódása is megállapítható, a két jelenség közt nem találtunk interindividuális korrelációt. Ezzel szemben a REM-szakaszok darabszáma és az MCH-, illetve orexin-tartalmú neuronok aktivitása között szignifikáns korrelációt találtunk, mely a REM-re való ismert hatásukkal összhangban az MCH esetén pozitív, az orexin esetén negatív irányú volt. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy nem az MCH-erg neuronok REM-visszacsapás alatti aktivációja alakítja ki az erre az időszakra jellemző REM-mintázatot, vagyis a REM szakaszok átlagos hosszának növekedését. Így megállapíthatjuk, hogy ennek a jelenségnek a neurobiológiai háttere továbbra sem ismert, és ennek feltérképezése is további vizsgálatokat igényel.

6 Saját publikációk jegyzéke

6.1 Dolgozathoz kapcsolódó publikációk

Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, Papp RS, Toth ZE, Bagdy G. (2011) Association between the activation of MCH and orexin immunoreactive neurons and REM

sleep architecture during REM rebound after a three day long REM deprivation. *Neurochem Int* 59(5): 686-694.

Kitka T, Katai Z, Pap D, Molnar E, Adori C, Bagdy G. (2009) Small platform sleep deprivation selectively increases the average duration of rapid eye movement sleep episodes during sleep rebound. *Behav Brain Res* 205(2): 482-487.

6.2 Dolgozathoz nem kapcsolódó publikációk

Bagdy G, Filakovszky J, Kántor S, Juhász G, Graf M, Jakus R, Gonda X, Zsombok T, Ádori Cs, Balogh B, Kirilly E, Andó RD, Lazáry J, Gyöngyösi N, Benkő A, Molnár E, Kitka T (2009). A szerotonin a központi idegrendszerben: kirándulás a neurobiológiától, genetikától a farmakológia, pszichiátria és neurológia felé. *Orvostudományok S2 (53-132): 73-92*

Bálint E, Kitka E, Zachar G, Ádám, Á, Hemmings Jr HC, Csillag A (2004). Abundance and location of DARPP-32 in striato-tegmental circuits of domestic chicks. *J Chem Neuroanat* 28: 27-36

Balogh B, Kitka T, Kirilly E, Renoir T, Lanfumey L, Hamon M, Kantor S, Bagdy G (2008): Sleep effects of citalopram in control and MDMA-pretreated rats. *Fundam Clin Pharmacol* 22 (suppl 2): 122-122

Gyongyosi N, Balogh B, Kirilly E, Kitka T, Kantor S, Bagdy G (2008). MDMA treatment 6 months earlier attenuates the effects of CP-94,253, a 5-HT1B receptor agonist, on motor control but not sleep inhibition. *Brain Res* 22 (1231):34-46

Katai Z, Kitka T, Garay T, Molnar E, Bagdy G (2009). Peak in the theta power spectrum of EEG shows strong association with voluntary movements in rats. *Eur Neuropsychopharm* 19 (Suppl. 3):S292-S293

Kitka T, Bagdy G (2008). Effect of 5-HT2A/2B/2C receptor agonists and antagonists on sleep and waking in laboratory animals and humans. In: *Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*. Monti JM, Pandi-Perumal SR, Jacobs BL, Nutt, DJ (szerk.) Birkhauser Verlag, Switzerland, 2008: 387-415.