

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Ćirić

**Rani elektrofiziološki znaci poremećaja  
spavanja i motorne kontrole u starenju  
pacova sa neurodegeneracijom  
holinergičkih neurona**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena M. Ćirić

**Early electrophysiological markers of the  
sleep and motor control disorders during  
aging in rats with neurodegeneration of  
the cholinergic neurons**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

**Mentori:**

**Dr Jasna Šaponjić**, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” ,

**Dr Pavle Anđus**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

**Članovi komisije:**

**Dr Jasna Šaponjić**, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” ,

**Dr Pavle Anđus**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet,

**Dr Tihomir Ilić**, redovni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Datum odbrane:

## **Zahvalnica**

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja“ (projekat OI 173022), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom dr Jasne Šaponjić, naučnog savetnika.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, **dr Jasni Šaponjić**, na nemepljivom strpljenju i podršci, nesebičnoj pomoći i usmeravanju, kao i na dragocenom vremenu koje mi je pružila u svim fazama eksperimentalnog rada i pisanja ove doktorske disertacije. Za mene je dragoceno što je deo njenog ogromnog znanja i ljubavi prema naučnom radu podelila sa mnom i hvala joj na ukazanom poverenju i prilici da budem deo njenog naučno istraživačkog tima.

Zahvaljujem se **profesorima dr Pavlu Anđusu i dr Tihomiru Iliću** na uloženom vremenu i svim korisnim savetima i sugestijama u završnim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i **dr Aleksandru Kalauziju**, koji je vodio računarsku obradu signala i napisao programe koji su korišćeni u analizi EEG i EMG signala, na stručnoj pomoći i dragocenim savetima.

Mojim dragim kolegincama **dr Jeleni Petrović i Katarini Lazić** posebno zahvaljujem što su bile sa mnom tokom izvođenja eksperimentalnog dela doktorske disertacije, njihova pomoć, podrška i iskreno prijateljstvo su bili više nego dragoceni.

Posebnu zahvalnost dugujem **mojoj porodici** za bezgraničnu ljubav, razumevanje i podršku, uvek i u svemu, a **dragim prijateljima** zahvaljujem što su imali strpljenja i vremena za mene i kada nisam mogla da im uzvratim.

Na kraju, ogromno hvala dugujem mojim momcima, **Nenadu i Kostu**, čija ljubav pokreće, zagrljaji umiruju, a osmesi leče. Njima, posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

## **Rani elektrofiziološki znaci poremećaja spavanja i motorne kontrole u starenju pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona**

### **Rezime**

Cilj ove doktorske disertacije bio je da ispita uticaj starenja na spavanje u eksperimentalnim modelima holinergičke neuropatologije Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, i da pronađe najranije znake poremećaja spavanja u fiziološkom starenju i u starenju sa neurodegenerativnim bolestima.

Uticaj starenja na arhitekturu spavanja, elektroencefalografsku (EEG) mikrostrukturu i motornu kontrolu, u toku svake faze spavanja, je praćen u eksperimentalnim modelima bilateralnih oštećenja jedara *nucleus basalis* (NB) i *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT) u pacova, kao eksperimentalnim *in vivo* modelima funkcionalno različitih holinergičkih neuropatologija.

Fiziološko starenje dovodi do topografski različitih promena arhitekture spavanja i motorne kontrole iz senzomotorne kore (SMCx) u odnosu na motornu koru (MCx). Pored promena arhitekture spavanja koje su se javile samo u SMCx, fiziološko starenje dovodi i do povećanja propagacije delta i beta oscilacija iz obe kore za vreme budnosti, ali samo iz MCx za vreme REM faze spavanja.

Najraniji znaci starenja u eksperimentalnim modelima funkcionalno različitih holinergičkih neuropatologija, dokazani po prvi put, predstavljaju topografski specifične razlike u EEG mikrostrukturi za vreme REM faze spavanja. Smanjenje delta EEG relativne amplitude u SMCx predstavlja najraniji znak starenja kod NB lediranih pacova, dok povećanje sigma EEG relativne amplitude u MCx predstavlja najraniji znak starenja kod PPT lediranih pacova, za vreme REM faze spavanja. Pored toga, starenjem izazvane promene su

različito izražene kroz mišićnu kontrolu iz SMCx, a istovremeno i istovetno izražene iz MCx u toku svih faza spavanja.

Ova doktorska disertacija je po prvi put dokazala različite poremećaje REM faze spavanja i motorne kontrole u toku spavanja, kao najranije znake početka starenja u funkcionalno različitim holinergičkim neuropatologijama.

**KLJUČNE REČI:** starenje, spavanje, motorna kontrola, neurodegenerativne bolesti, kortikomuskularna koherencija (CMC), *nucleus basalis* (NB), *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT), gubitak holinergičkih neurona, elektroencefalografija (EEG), elektromiografija (EMG)

**NAUČNA OBLAST:** Neuronauke

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Neurofiziologija sa biofizikom

## Early electrophysiological markers of the sleep and motor control disorders during aging in rats with neurodegeneration of the cholinergic neurons

### Abstract

The aim of the present doctoral dissertation was to evaluate the impact of aging during sleep in the rat models of Alzheimer's and Parkinson's disease cholinergic neuropathology, and to determine the possible different and earlier onset of age-related sleep disorder during healthy aging and aging with the neurodegenerative diseases.

We used the bilateral *nucleus basalis* (NB) and *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT) lesioned rats as the *in vivo* models of functionally distinct cholinergic neuropathology, and we followed the impact of aging on sleep architecture, the electroencephalographic (EEG) microstructure and motor control across sleep/wake states.

We evidenced the topographically distinct impact of healthy aging on sleep architecture and motor control within the sensorimotor (SMCx) vs. motor cortex (MCx). Whereas healthy aging consistently altered only the SMCx sleep architecture, it increased the delta and beta cortical drives from both cortices during Wake, but only through the MCx drive during rapid eye movement sleep (REM).

Our results have shown for the first time that the earliest signs of aging during distinct cholinergic neuropathology were expressed through a different and topographically specific EEG microstructure during REM. EEG delta amplitude attenuation within the SMCx was the earliest sign of aging in the NB lesion, whereas EEG sigma amplitude augmentation within the MCx was the earliest sign of aging in the PPT lesion during REM. In addition, aging was

differently expressed through the SMCx drive alterations, but it was commonly expressed through the MCx drive alterations during all sleep/wake states.

This doctoral dissertation provided for the first time an evidence of distinct REM sleep disorders and sleep state related cortical drives as the signs of aging onset during functionally distinct cholinergic neuropathologies.

**KEY WORDS:** aging, sleep, motor control, neurodegenerative diseases, cortico-muscular coherence (CMC), *nucleus basalis* (NB), *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT), cholinergic neuronal loss, electroencephalography (EEG), electromyography (EMG)

**RESEARCH AREA:** Neuroscience

**RESEARCH FIELD:** Neurophysiology and Biophysics



### ***Skraćenice:***

AB – Alchajmerova bolest

A/P – antero-posteriorno

BCIP – 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat

CLR – lokomotorni region malog mozga

CMC – kortikomuskularna koherencija

CPG – generator centralnog obrasca (eng. „Central Pattern Generator“)

CWT – kontinualna transformacija talasića (eng. „Continious Wavelet Transform“)

DB – *stria diagonalis*

d-MRF/v-MRF – dorazalna i ventralna medularna retikularna formacija

DMSO – dimetil sulfoksid

DR – *nucleus raphe dorsalis*

D/V – dorzo-ventralno

EEG – elektroencefalografija

EMG – elektromiografija

EOG – elektrookulografija

EPn – *entopeduncular nucleus*

f – *fornix*

GABA – gama-aminobuterna kiselina

GPe – *external globus pallidus*

GPi – *internal globus pallidus*

IBO – ibotenična kiselina

LBD – demencija sa Luvijevim telašcima

LC – *locus coeruleus*

LDT - *nucleus tegmentum laterodorsalis*

LH - lateralni hipotalamus

LPT - laterodorzalni pontinski tegmentum

MCx - motorna kora

M/L - medio-lateralno

MLR - mezencefalički lokomotorni region

MnR - *nucleus raphe medianus*

MRF - medularna retikularna formacija

MS - *nucleus septalis medialis*

MSA - multipla sistemska atrofija

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NB - *nucleus basalis*

NREM faza spavanja - sporotalasno spavanje (eng. „non-Rapid Eye Movement“ spavanje)

PB - Parkinsonova bolest

PBS - fosfatni pufer

PC - *precoeruleus* region

PDE - grupna raspodela gustine verovatnoće (eng. „Probability Density Estimation“)

PET - pozitron emisiona tomografija

PGO talasi - ponto-genikulo-okcipitalni talasi

PMRF - pontomedularna retikularna formacija

PPT - *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*

PRF - pontinska retikularna formacija

RBD - poremećaj ponašanja u toku REM faze spavanja (eng. „REM sleep behavioral disorder“)

REM faza spavanja - paradoksalno spavanje (eng. „Rapid Eye Movement“ spavanje)

RSN - retikulo-spinalni neuroni

SLD - *nucleus sublaterodorsalis*

SLR - subtalamički lokomotorni region

SMCx - senzomotorna kora

SN - *nucleus substantiae nigrae*

SNc - *substantiae nigrae pars compacta*

SNr - *substantiae nigrae pars reticulata*

SO - *nucleus supraopticus*

STN - *nucleus subthalamicus*

VLH - *nucleus hypothalamus ventrolateralis*

vIPAG - ventrolateralna periakvaduktalna siva masa

VLPO - ventrolateralni preoptički region

VTA - ventralni tegmentalni region

xscp - *decussation pedunculorum cerebellarium superiorum*

# Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. Uvod.....   | 1  |
| 1.1. Fiziološko starenje mozga .....   | 2  |
| 1.2. Holinergički sistem mozga sisara .....  | 4  |
| 1.3. Neurodegeneracija holinergičkih neurona .....   | 8  |
| 1.4. Spavanje kao ponašanje.....   | 12 |
| 1.4.1. Elektrofiziološke karakteristike budnosti, NREM i REM faze spavanja .....               | 13 |
| 1.4.2. Neurohemijska osnova budnosti i spavanja.....   | 15 |
| 1.4.3. Promene spavanja u toku razvoja i starenja.....   | 19 |
| 1.5. Motorna kontrola.....   | 20 |
| 1.5.1. Osnovna organizacija nervno-mišićnog sistema.....                                       | 20 |
| 1.5.2. Regulacija posturalnog mišićnog tonusa i lokomotornog ritma.....                        | 21 |
| 1.5.3. PPT i motorna kontrola .....  | 25 |
| 1.5.4. Motorna kontrola u toku spavanja.....   | 27 |
| 1.5.5. Poremećaj ponašanja u toku REM faze spavanja (RBD) .....                                | 29 |
| 2. Ciljevi.....  | 32 |
| 3. Materijal i metode.....   | 35 |
| 3.1. Eksperimentalne životinje.....  | 36 |
| 3.2. Eksperimentalne grupe .....   | 36 |
| 3.3. Operativna procedura.....   | 38 |
| 3.4. Procedura registrovanja spavanja .....  | 42 |
| 3.5. Priprema tkiva za histohemijsku identifikaciju i kvantifikaciju NB i PPT lezija .....     | 43 |
| 3.6. Analiza spavanja i EEG signala .....  | 46 |
| 3.7. Statistička obrada podataka .....   | 57 |
| 4. Rezultati.....  | 59 |
| 4.1. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u fiziološkom starenju pacova .....                 | 60 |
| 4.1.1. Topografija arhitekture i dinamike epizoda spavanja u fiziološkom starenju pacova ..... | 60 |
| 4.1.2. Topografija EEG mikrostrukture svih faza spavanja u fiziološkom starenju pacova .....   | 67 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1.3. Topografske promene motorne kontole u spavanju izazvane fiziološkim starenjem.....   | 71  |
| 4.2. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona .....                | 77  |
| 4.2.1. Histoheмиjska identifikacija i kvantifikacija NB i PPT lezije.....   | 77  |
| 4.2.2. Topografija arhitekture i dinamike epizoda spavanja u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona..... | 82  |
| 4.2.3. Topografija EEG mikrostrukture svih faza spavanja u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona.....   | 89  |
| 4.2.4. Topografske promene motorne kontrole u spavanju izazvane starenjem pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona  | 94  |
| 4.2.5. Dinamika vretena spavanja u starenju pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona PPT jedra .....  | 98  |
| 5. <i>Diskusija</i> .....   | 100 |
| 5.1. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u fiziološkom starenju pacova ....   | 102 |
| 5.2. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona .....                | 107 |
| 6. <i>Zaključci</i> .....   | 117 |
| 7. <i>Literatura</i> .....  | 122 |

# *1. Uvod*

U današnje vreme trajanje života u najrazvijenijim zemljama se približava osmoj deceniji. Procenjuje se da će se za nekoliko desetina godina broj ljudi preko 65 godina udvostručiti, a naročit porast se očekuje kod osoba starijih od 85 godina (Rapp i Bachevalier, 2008). Razumevanje promena koje prate starenje je jako važno, s obzirom da ove promene utiču na kvalitet svakodnevnog života, a njihovo poznavanje je od velike važnosti u dijagnozi i lečenju bolesti. Savremene biomedicinske nauke su poslednjih godina intenzivno usmerile istraživanja ka identifikovanju strukturnih i fizioloških promena u mozgu, koje su povezane sa kognitivnim i motornim funkcijama u fiziološkom starenju i starenju sa neurodegeneracijama.

### **1.1. Fiziološko starenje mozga**

Fiziološko starenje mozga se može posmatrati kao generalizovani poremećaj mnogih regulacionih neuronskih sistema. Usled kumulativnog efekta suptilnih promena, koje su široko rasprostranjene u mozgu, dolazi do slabljenja kognitivnih i motornih funkcija. Kognitivne funkcije koje se pogoršavaju sa starenjem su: inteligencija, mišljenje, govor, pamćenje, učenje, imaginacija i spavanje. Sa druge strane od motornih funkcija najviše su ugroženi kretanje i ravnoteža usled povećanja varijabilnosti kao i smanjenja koordinacije i brzine pokreta (Seidler i sar., 2010), pa je kod starih osoba prisutna povećana učestalost padova (Seidler i sar., 2010).

Istraživanja XX veka su pokazala da najveći doprinos u smanjenju kognitivnih funkcija imaju masivan gubitak nervnih ćelija (Brody, 1955) i progresivne promene dendritskih nastavaka (Scheibel i sar., 1976; Scheibel, 1979). Danas se zna da su promene koje se javljaju u toku fiziološkog starenja suptilnije i selektivnije nego što se mislilo (Burke i Barnes, 2006; Rapp i Bachevalier, 2008). Naime, regionalno specifične promene u morfologiji dendrita, smanjen broj sinaptičkih veza, disregulacija  $Ca^{2+}$  i izmenjena

ekspresija gena menjaju dinamiku neuronskih mreža koje igraju važnu ulogu u kognitivnim procesima (Burke i Barnes, 2006; Rapp i Bachevalier, 2008).

Iako su dosadašnja istraživanja ustanovila i donekle rasvetlila vezu između oslabljenih kognitivnih funkcija i starenjem izazvanih strukturnih promena u mozgu, veza sa oslabljenim motornim funkcijama još uvek nije dovoljno razjašnjena. Uprkos brojnim dokazima o usporavanju motorne dinamike tokom fiziološkog starenja, i dalje su nepoznati centralni mehanizmi slabljenja motornih funkcija u starenju (Seidler i sar., 2010). Promene u mišićno-skeletnom sistemu i promene u povezivanju perifernog i centralnog nervnog sistema, kao i smanjenje nivoa različitih neurotransmitera i smanjenje sive i bele moždane mase, samo su neki od uzroka poremećene motorne funkcije kod starih osoba (Seidler i sar., 2010; Kamp i sar. 2013). Generalno, kod ovog dela populacije je u motornoj kontroli uključeno više moždanih regiona nego kod mlađih osoba, naročito prefrontalna kora i mreža bazalnih ganglija, dva regiona koja su paradoksalno najugroženija u procesu starenja (Seidler i sar., 2010).

Poseban značaj u procesu kako fiziološkog tako i patološkog starenja imaju poremećaji spavanja. Dosadašnja istraživanja su dobro dokumentovala promene u arhitekturi spavanja i odgovarajućih elektroencefalografskih (EEG) promena koje se javljaju u toku fiziološkog starenja (Mendelson i Bergmann, 1999a; Mendelson i Bergmann, 1999b; Mendelson i Bergmann, 2000; Moyanova i sar., 2002; Ohayon i sar., 2004; Vitiello, 2006), ali se o promenama motorne kontrole u toku spavanja veoma malo zna (Seidler i sar., 2010).

Neurofiziološke studije na eksperimentalnim modelima su pokazale da fiziološko starenje nije posledica globalnog degenerativnog procesa, već degeneracije specifičnih grupa neurona, čije ushodne, široko rasprostranjene projekcije, utiču na različite moždane regione (Rapp i Bachevalier, 2008). Najvažniju ulogu u procesu starenja imaju holinergički, serotonergički, noradrenergički i dopaminergički neuroni, čiji deficit, uslovljen fiziološkim



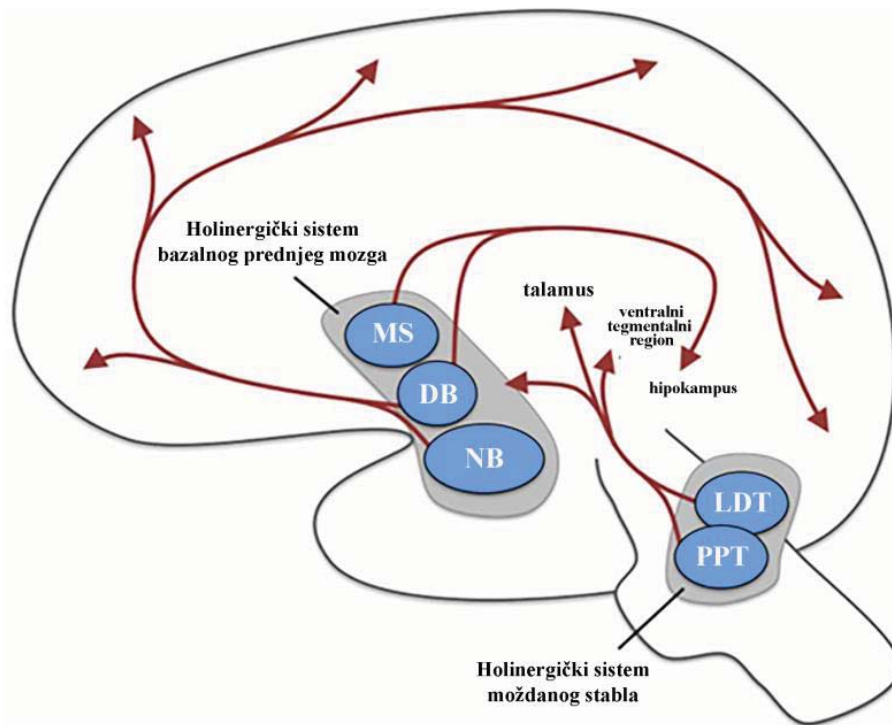
starenjem dovodi do promena u ponašanju i do slabljenja kognitivnih i motornih funkcija (Seidler i sar., 2010). Do smanjenja nivoa acetilholina može doći iz dva razloga: usled smanjene aktivnosti acetilholin transferaze ili acetilholin esterase, odnosno usled smanjene sinteze ili oslobađanja acetilholina, kao i usled smanjenja nikotinskih i muskarinskih receptora (Schliebs i Arendt, 2006). Holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga, su intenzivno izučavani, s obzirom da je ovaj sistem naročito ugrožen u Alchajmerovoj bolesti (AB). Kod AB pacijenata dolazi do znatnog smanjenja acetilholina u hipokampusu, i to dovodi do izrazitog slabljenja kognitivnih sposobnosti, naročito učenja i pamćenja (Seidler i sar., 2010). Manje posledice su primećene i u toku fiziološkog starenja, gde se javljaju promene holinergičkih neurona, koji se projektuju na hipokampus, amigdaloidno jedro i koru velikog mozga. Gubitak holinergičkih neurona može poremetiti obradu informacija u ovim regionima, što dovodi do promena kognitivnih funkcija (Rapp i Bachevalier, 2008). Poremećaji dopaminergičkog sistema, izazvani starenjem, su takođe intenzivno izučavani zbog njegove povezanosti sa poremećajima motornih funkcija koje se javljaju u Parkinsonovoj bolesti (PB) (Romero i Stelmach, 2001). Starenje smanjuje transmisiju dopamina usled smanjenja nivoa dopamina, različitih dopaminskih receptora i dopaminskih transportera (Seidler i sar., 2010).

## **1.2. Holinergički sistem mozga sisara**

Acetilholin igra važnu ulogu u kognitivnim funkcijama. Farmakološke studije su pokazale njegov uticaj na dugotrajnu i kratkotrajnu memoriju, pažnju i prostornu memoriju (Newman i sar., 2012). Takođe, acetilholin ima važnu ulogu i u homeostazi budnosti i spavanja (Kaur i sar., 2008), razvoju kore velikog mozga (Berger-Sweeney, 2003), ali i u motornoj kontroli (Takakusaki, 2013). Visoke doze skopolamina, antagoniste muskarinskih receptora, dovode do poremećaja kognitivnih funkcija koje se manifestuje u vidu delirijuma (Crow i Grove-White, 1973), dok niže doze skopolamina remete kognitivne procese

vezane za procenu i pažnju (Beatty i sar., 1986). Elektrofiziološke studije su pokazale različite efekte acetilholina na funkcionisanje pojedinačnih neurona, a neki od njih su: depolarizacija; povećanje dugotrajne potencijacije (eng. „long-term potentiation“); presinaptička inhibicija glutamatergičke i GABAergičke sinaptičke transmisije (Newman i sar., 2012).

Holinergički sistem sisara je izgrađen od dve funkcionalno različite grupe holinergičkih neurona, koje su smeštene u bazalnom prednjem mozgu i moždanom stablu (**Slika 1.1.**; Semba i Fibiger, 1989; Semba, 1993; Rye, 1997; Newman i sar., 2012).



**Slika 1.1. Holinergički sistem mozga sisara.** Projekcije holinergičkog sistema bazalnog prednjeg mozga i holinergičkog sistema moždanog stabla. NB - *nucleus basalis*; DB - *stria diagonalis*; MS - *nucleus septalis medialis*; PPT - *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LDT - *nucleus tegmentum laterodorsalis*.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Frontiers Media S.A.; Newman i sar., 2012; ©2012.

**Holinergički sistem bazalnog prednjeg mozga** se sastoji od *nucleus basalis* (NB), *substantia innominata* i horizontalnog ogranka dijagonalne trake, *stria diagonalis* (Sarter i sar., 2009). Predstavlja glavni izvor holinergičke inervacije kore velikog mozga, limbičke kore i hipokampusa (**Slika 1.1.**; Newman i sar., 2012). Holinergički sistem bazalnog prednjeg mozga ima brojne funkcije, a neke od njih su: homeostaza budnosti i spavanja, održavanje pobuđenosti, učenje (Datta i MacLean, 2007). Holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga imaju veoma važnu ulogu u regulaciji aktivnosti kore velikog mozga putem kontrole visoko frekventnih oscilacija (Dringenberg i Olmstead, 2003), a imaju i ulogu u generisanju teta i gama EEG ritma u toku budnosti i REM faze spavanja (eng. „Rapid Eye Movement“ spavanje) (Jones, 2004; Lee i Jones, 2004). Dodatno, neuroni bazalnog prednjeg mozga primaju stimulse iz moždanog stabla i predstavljaju ekstratalamičko relejno jedro do kore velikog mozga (Lee i Jones, 2004).

Anatomske, elektrofiziološke i studije ponašanja su pokazale ulogu acetilholina u toku razvoja kore velikog mozga, kao i njegov značaj, kako u uspostavljanju sinaptičkih veza, tako i u strukturnom i funkcionalnom remodelovanju neuronskih mreža (Berger-Sweeney, 2003; Schliebs i Arendt, 2006). Sa druge strane, holinergički sistem bazalnog prednjeg mozga podleže promenama koje se javljaju u starenju, i ima ključnu ulogu u funkcionalnim procesima koji vode razvoju Alchajmerove bolesti. Nakon dokazane značajne povezanosti poremećenih kognitivnih funkcija i hipofunkcije holinergičkog sistema, postavljena je „holinergička hipoteza“ o poremećajima pamćenja u starosti i AB (Drachman i Leavitt, 1974; Bartus, 2000).

**Holinergički sistem moždanog stabla** se sastoji od *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT) i *nucleus tegmentum laterodorsalis* (LDT) (**Slika 1.1.**). PPT jedro je podeljeno u dva dela: dorzolateralni, kaudalni deo jedra, sa gusto grupisanim neuronima – PPT *pars compacta*, i razređeniji rostro-medijalni deo – PPT *pars dissipata*. PPT jedro je glavni talamo-kortikalni izvor

holinergičke inervacije velikog mozga i ima važnu ulogu u regulaciji: REM faze spavanja (Lu i sar., 2006; Urbano i sar., 2014); pobuđivanja (Datta i MacLean, 2007; Urbano i sar., 2014); motorne kontrole (Rye, 1997; Takakusaki i sar., 2004; Garcia-Rill i sar., 2015); i kontrole disanja (Saponjic i sar., 2003; Saponjic i sar., 2005a; Saponjic i sar., 2005b). Pored toga, PPT jedro predstavlja glavni kontrolni centar celokupnog REM fenomena (Semba, 1993; Rye, 1997; Datta i MacLean, 2007). Ovaj fenomen podrazumeva istovremenu pojavu: aktivacije kore velikog mozga, teta ritma u hipokampusu, atoniju antigravitacionih mišića, brzih pokreta očiju, ponto-genikulo-okcipitalnih talasa (PGO talasi), i iregularnih autonomnih funkcija tj. iregularnog srčanog rada i disanja.

Kako PPT holinergički neuroni direktno inervišu i talamus i bazalni prednji mozak (Losier i Semba, 1993), ovo jedro moždanog stabla predstavlja glavno relejno jedro za integraciju funkcija oba holinergička sistema i reguliše aktivaciju kore velikog mozga (Sarter i Bruno, 2000; Dringenberg i Olmstead, 2003). Pored ovih ushodnih projekcija, PPT jedro je višestruko povezano sa bazalnim ganglijama (Mena-Segovia i sar., 2004), malim mozgom (Ruggiero i sar., 1997; Vitale i sar., 2016) i monoaminergičkim neuronima moždanog stabla (Rye, 1997).

PPT jedro integriše različite informacije i učestvuje u ekspresiji različitih tipova ponašanja (Takakusaki i sar., 2016). Neki od motornih i kognitivnih poremećaja, kao i poremećaji spavanja kod PB pacijenata se mogu pripisati degeneraciji holinergičkih neurona PPT jedra, zbog njegove jedinstvene anatomske i fiziološke pozicije (Takakusaki i sar., 2016). Takođe, degeneracija PPT jedra je povezana i sa ostalim neurodegenerativnim bolestima starenja iz grupe sinukleinopatija (demencija sa Luvijevim telašcima (LBD), multipla sistemska atrofija (MSA)), kao i sa poremećajima ponašanja u toku REM faze spavanja (RBD) (Boeve i sar., 2007).

### 1.3. Neurodegeneracija holinergičkih neurona

Neurodegeneracija podrazumeva progresivne promene u strukturi i funkciji neurona i selektivno zahvata funkcionalno različite populacije neurona, što dovodi do različitih kliničkih manifestacija neurodegenerativnih bolesti. Kako se promene u strukturi i funkciji neurona javljaju i u fiziološkom starenju, starenje koje je opterećeno neurodegenerativnim promenama predstavlja patološko starenje.

Alchajmerova i Parkinsonova bolest predstavljaju najčešće neurodegenerativne bolesti starenja. Njihova prevalencija iznosi 0,5-1%, a nakon 69. godine života se uvećava na 1-3% kod PB, a kod AB i do 50% (Nussbaum i Ellis, 2003). AB i PB se karakterišu selektivnim gubitkom specifičnih neuronskih populacija. Kada se gleda holinergički sistem, AB podrazumeva gubitak holinergičkih neurona bazalnog prednjeg mozga (Dringenberg, 2000; Schliebs i Arendt, 2006; Kotagal i sar., 2012a), dok se kod PB javlja selektivan gubitak holinergičkih neurona moždanog stabla (Bohnen i sar., 2009; Bohnen i Albin, 2011; Kotagal i sar., 2012a).

„Holinergička hipoteza“ o povezanosti degeneracije holinergičkih neurona bazalnog prednjeg mozga i AB, koju su postavili Drachman i Leavitt (1974), je pokrenula lavinu biohemijskih, molekularnih i farmakoloških studija, studija ponašanja na novim eksperimentalnim modelima, kao i mnogobrojne kliničke studije (Bartus, 2000). Ova istraživanja su omogućila uvid u etiologiju i patogenezu bolesti i ukazala su na pravac u strategiji lečenja. Naime, holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga prolaze kroz degenerativne promene koje uključuju poremećenu aktivnost acetilholin transferaze i acetilholin esterase, kao i umeren gubitak i atrofiju neurona, što dovodi do disfunkcije holinergičkog sistema, koji je povezan sa progresivnim gubitkom memorije (Wenk, 1993; Bartus, 2000; Schliebs i Arendt, 2006). U prilog ovome govore i savremene pozitron emisione tomografske (PET) studije u ljudi, koje su

pokazale da se ekspresija acetilholina menja u različitim fazama AB u zavisnosti od progresije bolesti (Nordberg, 2001), a da je deficit kognitivnih funkcija moguće detektovati tek kada degeneracija holinergičkih neurona bazalnog prednjeg mozga dostigne 30% (Schliebs i Arendt, 2011). Do sada je od strane Agencije za hranu i lekove SAD (eng. „U. S. Food and Drug Administration“) odobreno nekoliko inhibitora acetilholin esteraze, koji u izvesnoj meri mogu usporiti progresiju bolesti (Bartus, 2000).

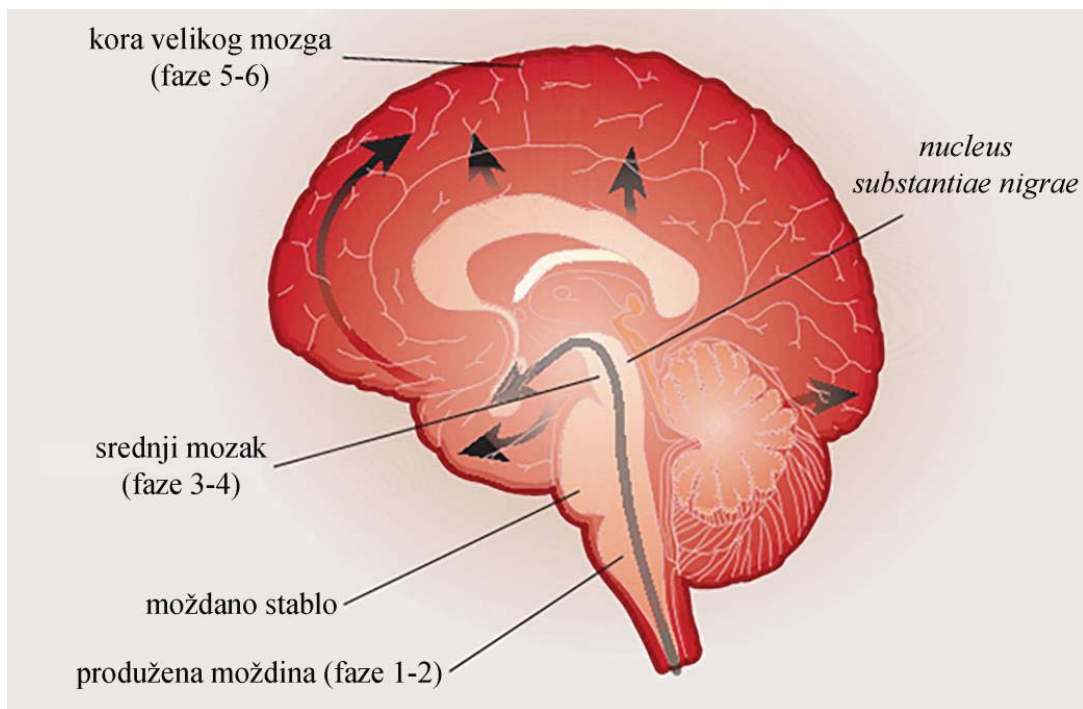
AB karakterišu i histopatološke promene kojima su zahvaćeni delovi kore velikog mozga i hipokampusa, kao što su vanćelijski depoi amiloid- $\beta$  proteina u vidu plaka i unutarćelijski depoi izmenjenog tau-proteina u vidu neurofibrilarnih čvorova. Različite studije su poslednjih godina dale potvrdu o povezanosti metabolizma prekursora amiloid proteina i holinergičke neurotransmisije, koja je uzrok strukturnih i funkcionalnih promena holinergičkih neurona, a koje vremenom dovode do neurodegeneracije (Schliebs i Arendt, 2011).

Parkinsonova bolest je multisistemski neurodegenerativni sindrom sa izrazito heterogenim motornim i ne-motornim poremećajima (Müller i sar., 2013; Boeve, 2013). Motorni poremećaji koji karakterišu PB su rigidnost, tremor, bradikinezija i posturalna nestabilnost, dok su poremećaji kognitivnih funkcija, depresija, anksioznost, smanjena olfaktorna funkcija i poremećaji spavanja samo neki od ne-motornih poremećaja. Disfunkcija i smanjenje broja dopaminergičkih neurona *nucleus substantiae nigrae* (SN) je osnovni PB neuropatološki substrat, ali u ranoj fazi bolesti može doći i do degeneracije glavnih projekcija holinergičkog sistema (Bohnen i Albin, 2011; Bohnen i sar., 2012; Müller i sar., 2013).

Neuropatološke studije PB su opisale značajnu degeneraciju (50%) holinergičkih neurona u okviru *pars compacta* dela PPT jedra (Rinne i sar., 2008; Bohnen i Albin, 2011), kao i holinergičkih neurona bazalnog prednjeg mozga (Arendt i sar., 1983; Karachi i sar., 2010). Kortikalna i talamo-kortikalna

holinergička denervacija kod PB pacijenata je povezana sa: poremećenim kognitivnim funkcijama (Bohnen i sar., 2012; Müller i sar., 2013); sa poremećajima u hodu i ravnoteži, uključujući i česte padove kod PB pacijenata (Rinne i sar., 2008; Karachi i sar., 2010; Bohnen i Albin, 2011; Kotagal i sar., 2012b); kao i sa poremećajem ponašanja u toku REM faze spavanja (Bohnen i Albin, 2011). Humane PET studije su pokazale značajno smanjenje holinergičke inervacije talamusa kod PB pacijenata koji imaju česte padove (Bohnen i sar., 2012), a kliničke studije su potvrdile da upotreba donepezila (inhibitor acetilholin esteraze) drastično smanjuje broj padova kod ovih pacijenata (Chung i sar., 2010).

PB je neurodegenerativna bolest iz grupe sinukleinopatija i histopatološki se karakteriše abnormalnom akumulacijom proteina  $\alpha$ -sinukleina u vidu inkluzija označenih kao Luvijeva telašca i Luvijevi neuriti. Luvijeva telašca i neuriti, intracitoplazmatske tvorevine, su neurotoksične tvorevine koje selektivno deluju na pojedine moždane strukture i javljaju se na relativno predvidiv način. Povezanost histopatoloških promena i različitih kliničkih manifestacija PB, u zavisnosti od pojave i progresije inkluzija  $\alpha$ -sinukleina, Braak i saradnici (2003) su šematski predstavili u 6 faza (**Slika 1.2.**). Prema Braak-ovoj hipotezi, Luvijeva telašca i tvorevine se prvo javljaju u olfaktornim strukturama produžene moždine (faza 1), odakle se postepeno ascedentno šire na ostale strukture moždanog stabla (faza 2), srednji mozak i bazalne ganglije (faze 3-4), da bi na kraju zahvatile i koru velikog mozga (faze 5-6) (Braak i sar., 2003). Ovo može da objasni postojeće razlike u kliničkom fenotipu, kao i u brzini progresije neurodegenerativnih promena, usled razlika u stepenu neurodegeneracije u različitim delovima mozga.



**Slika 1.2.** Prikaz Braak-ove hipoteze ascedentnog širenja inkluzija proteina  $\alpha$ -sinukleina (Luvijeva telašaca i Luvijevi neuriti).

Preuzeto i modificovano uz dozvolu izdavača Mcmillan Publishers Ltd; Nature; Abbott, 2005; ©2005.

Zajednička karakteristika AB i PB jeste poremećeno spavanje, koje utiče na kvalitet svakodnevnog života. Poremećaji spavanja se javljaju kod 80% PB pacijenata i mogu se javiti 5-40 godina pre kliničke dijagnoze bolesti (Boeve i sar., 2007; Whitwell i sar., 2007), dok se kod AB poremećaji spavanja mogu javiti oko 3 godine pre kliničke dijagnoze bolesti (Simic i sar., 2009).

Na osnovu hipoteze da degeneracija holinergičkih neurona bazalnog prednjeg mozga ima važnu ulogu u etiologiji kognitivne slabosti u AB, ustanovljen je pacovski model selektivnom lezijom NB jedra, koji predstavlja najčešće korišćeni eksperimentalni *in vivo* model za istraživanja neuropatologije AB (Arendash i sar., 1987; Rugg i sar., 1992; Toledano i Alvarez, 2004; Šaponjić, 2011; Saponjic i sar., 2013). Selektivno bilateralno oštećenje NB jedra u pacova predstavlja eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije



AB. Sa druge strane, nedavno je ustanovljen eksperimentalni *in vivo* model holinergičke PB neuropatologije, odnosno selektivna lezija PPT jedra, kao višeg nervnog centra integrativne holinergičke kontrole aktivnosti velikog mozga i veoma važne strukture u regulaciji spavanja (Petrovic i sar., 2013a; 2013b; Petrović, 2014). Selektivno bilateralno oštećenje PPT jedra u pacova predstavlja eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije PB. S obzirom da NB ima ulogu u homeostazi budnosti i spavanja, a da PPT ima ulogu u regulaciji REM faze spavanja i pobuđivanja, ovi eksperimentalni modeli se mogu koristiti u istraživanjima poremećaja spavanja koji su uslovljeni funkcionalno različitim holinergičkim neuropatologijama najčešćih neurodegenerativnih bolesti starosti.

Istraživanja u eksperimentalnim modelima sa odgovarajućim farmakološkim manipulacijama ili selektivnim oštećenjima moždanih jedara, funkcionalno važnih kako u regulaciji spavanja tako i u regulaciji motornih funkcija, imaju poseban značaj u ispitivanjima spavanja (Šaponjić, 2009; 2011). Ova istraživanja bi mogla doprineti novim saznanjima o centralnim mehanizmima poremećaja spavanja i motorne kontrole u toku spavanja, kako u fiziološkom starenju, tako i u starenju sa neurodegeneracijama.

#### **1.4. Spavanje kao ponašanje**

Spavanje je kompleksno, globalno stanje u ponašanju svih sisara, koje je homeostatski regulisano (Datta i MacLean, 2007). Spavanje je reverzibilno i periodično stanje, u kome je svest i mišićna aktivnost privremeno umanjena ili ukinuta, a odgovori na spoljne stimuluse su smanjeni. O kompleksnosti spavanja kao ponašanja govori i to, da i dalje nemamo definiciju spavanja koja uspešno objedinjuje sve njegove aspekte (Šaponjić, 2009). Naime, spavanje nije homogeno stanje, već mešavina više različitih stanja, čija regulacija zavisi od više neuronskih populacija, koje su neurohemijski heterogene, a čija aktivnost zavisi kako od cirkadijalnog ritma budnost/spavanje, tako i od cikličnog

smenjivanja osnovnih faza spavanja tj. NREM i REM faze spavanja. Takođe, kontrolni mehanizmi spavanja se manifestuju na svim nivoima biološke organizacije, pa se tako neurobiologija spavanja proučava na molekulskom, ćelijskom i sistemskom nivou (Pace-Schott i Hobson, 2002; Datta i MacLean, 2007).

#### **1.4.1. Elektrofiziološke karakteristike budnosti, NREM i REM faze spavanja**

Otkriće električne prirode moždane aktivnosti i razvoj elektrofizioloških tehnika su nam omogućili merenje i kvantifikaciju moždane aktivnosti, na osnovu koje je moguća analiza spavanja kao i praćenje fizioloških promena u toku spavanja. Karakteristike moždanih promena koje se javljaju u toku života su od velike važnosti za razumevanje mehanizama fiziološkog starenja, kao i neurodegenerativnih poremećaja. Kako promene moždane aktivnosti za vreme spavanja reflektuju promene u anatomiji i neurofiziologiji, EEG za vreme spavanja predstavlja još uvek veoma važan metodološki pristup za proučavanje mozga koji stari, posebno imajući u vidu visoku temporalnu rezoluciju ove tehnike, čime je omogućeno praćenje „mikro“ promena.

Uz pomoć polisomnografije, koja podrazumeva EEG, elektrookulografiju (EOG) i elektromiografiju (EMG), moguće je razlikovati tri osnovne faze spavanja: budnost, sporotalasno (NREM) i paradoksalno (REM) spavanje.

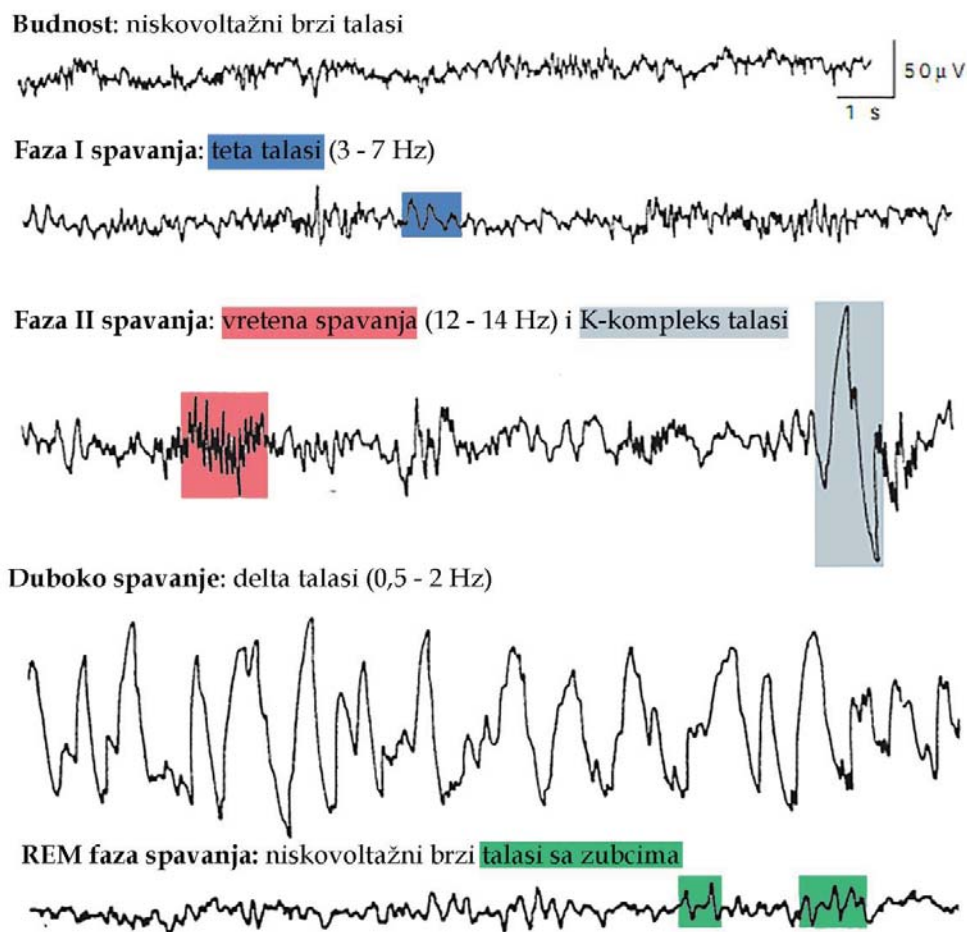
**Budnost** karakteriše EEG aktivnost mozga brzih frekvencija i niskih amplituda („aktivirani EEG“), i prisustvo mišićnog tonusa u EMG zapisu (**Slika 1.3.**). Za vreme budnog stanja prisutni su voljni pokreti, prag za spoljne stimulse je na najnižem nivou, a uključeni su i brojni kognitivni aspekti (senzacija, percepcija, pažnja, memorija, volja) koji doprinose svesnosti i omogućavaju interakciju sa okolinom.

**Sporotalasno spavanje** ili **NREM faza spavanja** (eng. „non-Rapid Eye Movement“ spavanje) je kod ljudi podeljena na četiri stadijuma u zavistnosti od

dubine spavanja. Kako se dubina spavanja povećava, u EEG zapisu sve više dominiraju talasni oblici sporih frekvencija i visokih amplituda (**Slika 1.3.**). Prvi stadijum predstavlja prelaz iz budnog stanja u pospanost, i karakteriše ga aktivnost relativno niske amplitude, različite frekvencije sa naglašenom aktivnošću u teta ritmu, kao i opadanje mišićnog tonusa. U drugom stadijumu opadanje mišićnog tonusa se nastavlja, a u EEG zapisu se pored sporih oscilacija (< 1 Hz) pojavljuju i karakteristična vretena spavanja (sigma ritam; 12-15 Hz) i K-kompleks talasi (spore oscilacije 0-1 Hz). Najdublji stadijumi NREM faze spavanja (treći i četvri stadijum, sporotalasno spavanje) se odlikuju delta ritmom, spore frekvencije i visoke amplitude (1-4 Hz), u EEG zapisu. Vretena spavanja i K-kompleks talasi postaju retki u trećem stadijumu, a u četvrtom stadijumu iščezavaju.

Kod životinja, koje se najčešće koriste za analizu spavanja (miš, pacov i mačka), NREM faza spavanja je podeljena na dva stadijuma (Datta i MacLean, 2007). U prvom stadijumu su u EEG zapisu prisutna vretena spavanja, dok drugi stadijum karakteriše prisustvo delta ritma, spore frekvencije i visoke amplitude.

**Paradoksalno spavanje** ili **REM faza spavanja** (eng. „Rapid Eye Movement“ spavanje) se odlikuje: EEG aktivnošću kore velikog mozga brzih frekvencija i niskih amplituda („aktivirani EEG“) (**Slika 1.3.**), slično kao u budnom stanju; atonijom antigravitacionih mišića; pojedinačnom ili grupisanom aktivnošću u EOG zapisu; prisustvom teta ritma u hipokampalnom EEG zapisu; pojavom toničnih šiljaka koji su nazvani PGO talasi; kao i promenama u nekim autonomnim funkcijama, kao što su kontrola telesne temperature i iregularnost u srčanom radu i disanju. Pored ovih fizioloških karakteristika, u toku REM faze spavanja se javljaju snovi (Datta i MacLean, 2007).



**Slika 1.3.** Elektroencefalografski zapisi električne aktivnosti mozga čoveka u toku različitih stanja.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevier; Pace-Schott i sar., 2008; ©2008.

### 1.4.2. Neurohemijska osnova budnosti i spavanja

Budnost je kompleksno stanje koje se konstantno menja u zavisnosti od unutrašnjih i spoljašnjih stimulusa i okruženja (Datta i MacLean, 2007). Kod sisara različiti složeni sistemi kontrolišu nastajanje i održavanje budnosti. Neuronske populacije koje učestvuju u nastanku budnosti su: noradrenergički neuroni jedra *locus coeruleus* (LC); serotonergički neuroni jedra *nucleus raphe dorsalis* (DR); holinergički neuroni PPT i LDT jedara; glutamatergički neuroni

retikularne formacije srednjeg mozga, *formatio reticularis mesencephali* i dopaminergički neuroni SN jedra i ventralnog tegmentalnog regiona (VTA) (Datta i MacLean, 2007). Ushodne projekcije ovih neuronskih populacija, smeštenih u moždanom stablu i srednjem mozgu, projektuju se dorzalno do talamusa gde se aktivira talamo-kortikalni sistem, kao i ventralno do hipotalamusa i bazalnog prednjeg mozga gde se aktiviraju hipotalamo-kortikalni i bazalo-kortikalni sistemi, a preko njih se aktivira i kora velikog mozga u toku budnosti. Intenzitet i trajanje moždane aktivacije je direktno proporcionalan sintezi i akumulaciji moždanih metabolita u regionima koji učestvuju u nastanku i održavanju budnosti (Datta i MacLean, 2007).

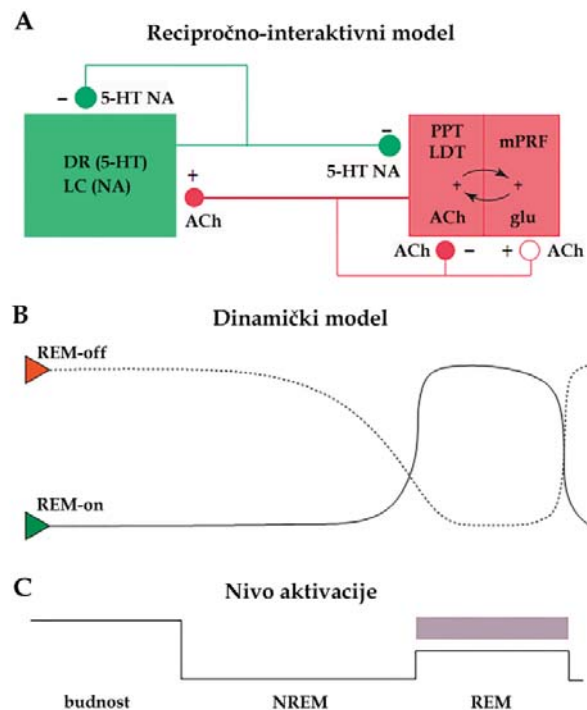
Pored neuronskih populacija moždanog stabla i srednjeg mozga, u kontroli budnosti učestvuju i histaminergički neuroni zadnjeg hipotalamusa, hipokretinski (oreksinski) neuroni lateralnog hipotalamusa (LH), holinerški neuroni bazalnog prednjeg mozga, kao i neuroni suprahijazmatskog jedra (Datta i MacLean, 2007).

Prelazak iz budnosti u spavanje je pasivan proces, koji je homeostatski regulisan i zavisi od nivoa endogenih metaboličkih faktora, koji se sintetišu za vreme budnosti. Do sada je poznato stotinak metabolita, a samo adenzin, gama-aminobuterna kiselina (GABA), glicin, prostaglandin D<sub>2</sub> i citokini (IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$ ) su identifikovani kao metaboliti koji iniciraju spavanje (Datta i MacLean, 2007).

U toku spavanja, NREM i REM faze spavanja se ciklično smenjuju, a dužina ciklusa varira između vrsta (kod ljudi iznosi 90 min, kod primata 66 min, kod mačaka 22 min, a kod pacova između 8 i 17 min) (McCarley, 2007).

Treba istaći da iako REM faza spavanja čini približno 20% ukupnog vremena koje provedemo spavajući, njegova regulacija je dosta kompleksnija od regulacije NREM faze spavanja (Datta i MacLean, 2007).

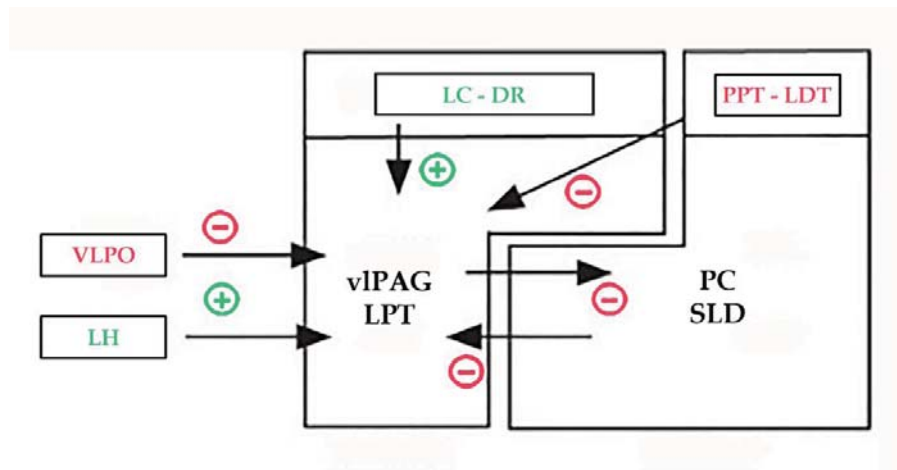
Prema starom recipročno-interaktivnom modelu regulacije REM faze spavanja (McCarley i Hobson, 1975), monoaminergički LC i DR neuroni se nazivaju „REM-isključivačima“, a holinergički neuroni PPT i LDT jedra „REM-uključivačima“ (Slika 1.4.). Ove dve grupe neurona su međusobno recipročno povezane i inhibitorno interreaguju (Rye, 1997). Monoaminergički neuroni moždanog stabla (LC i DR neuroni) su najaktivniji za vreme budnosti, njihova aktivnost se smanjuje od budnosti do NREM faze, a u toku REM faze spavanja su neaktivni i tada nastupa tzv. „monoaminska tišina“ (Hobson i sar., 1975; Datta, 1997). Nasuprot tome, holinergički PPT i LDT neuroni su najaktivniji za vreme budnosti i REM faze, a svoju aktivnost smanjuju u toku NREM faze spavanja (Hobson i sar., 1975; Lu i sar., 2006).



**Slika 1.4. Recipročno-interaktivni model regulacije REM faze spavanja.** (A) Recipročno-interaktivni model regulacije REM faze spavanja. (B) Dinamički model aktivnosti neurona „REM-uključivača“ (REM-on) i „REM-isključivača“ (REM-off) u pontinskim jedrima. (C) Nivo aktivacije koji pokazuje smenu NREM i REM faze spavanja.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevier; Pace-Schott i sar., 2008; ©2008.

Prema novom „flip-flop” modelu (Lu i sar., 2006), nastajanje REM faze i ciklično smenjivanje NREM i REM faze spavanja je pod kontrolom dve GABAergičke populacije neurona moždanog stabla, koje međusobno reaguju i jedna drugu inhibiraju (Slika 1.5.). Naime, neuroni „REM-isključivača” (GABAergički neuroni smešteni u ventrolateralnoj periakvaduktalnoj sivoj masi (vlPAG) i laterodorzalnom pontinskom tegmentumu (LPT)) smanjuju REM fazu tako što inhibiraju neurone „REM-uključivača” (GABAergički neuroni smešteni u *nucleus sublaterodorsalis* (SLD) i *precoeruleus* regionu (PC)), i obrnuto (Lu i sar., 2006). Hipokretinski LH neuroni i monoaminergički LC i DR neuroni aktiviraju „REM-isključivač” i na taj način dovode do smanjenja REM faze spavanja, dok ga GABAergički neuroni ventrolateralnog preoptičkog jedra hipotalamusa, kao i holinergički neuroni PPT i LDT jedra inhibiraju i na taj način doprinose njegovom nastajanju (Lu i sar., 2006).



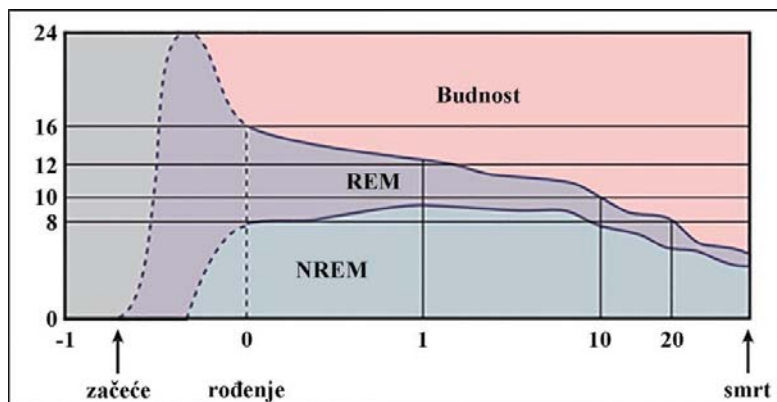
**Slika 1.5. „Flip-flop” model regulacije REM faze spavanja.** Šematski prikaz regulacije REM faze spavanja prema „flip-flop” modelu sa međusobno inhibitornim „REM-uključivač” i „REM-isključivač” regionima. VLPO - ventrolateralni preoptički region; LH - lateralni hipotalamus; vIPAG - ventrolateralna periakvaduktalna siva masa; LPT - laterodorzalni pontinski tegmentum; PC - *precoeruleus* region; SLD - *nucleus sublaterodorsalis*; DR - *nucleus raphe dorsalis*; LC - *locus coeruleus*; PPT - *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LDT - *nucleus tegmentalis posterolateralis*.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Mcmillan Publishers Ltd; Nature; Lu i sar., 2006; ©2006.

### 1.4.3. Promene spavanja u toku razvoja i starenja

Odnos trajanja budnosti, NREM i REM faze spavanja se menja u toku života i razlikuje se između vrsta (Slika 1.6.). Podaci prevremeno rođenih beba pokazuju da u 26. gestacionoj nedelji dominira REM faza spavanja, dok normalno rođene bebe, u prvim danima života, imaju jednaku zastupljenost budnosti, NREM i REM faza spavanja i provedu oko osam sati u svakom stanju (Garcia-Rill i sar., 2008). Sa daljim razvojem, trajanje REM faze se postepeno smanjuje dok se budnost povećava, pa u 15-oj godini života REM faza spavanja traje samo jedan sat, a budnost do 16 sati. Nakon rođenja trajanje NREM faze spavanja se može prolazno povećati, a zatim se postepeno smanjuje sa osam na sedam sati do 15. godine života.

Komplementarni rezultati ukazuju da je kritičan period u kome se uspostavlja odnos budnosti, NREM i REM faze spavanja u pacova između 10. i 30. dana starosti (Garcia-Rill i sar., 2008). Trajanje REM faze na rođenju iznosi više od 75% ukupnog spavanja i opada do 15% u 30. danu starosti pacova (Jouvet-Mounier i sar. 1970). U toku ovog kritičnog perioda, u pacova je primećena povećana aktivacija acetilholin transferaze, kao i hipertrofija holinergičkih neurona PPT jedra 15. dana starosti, koja se poklapa sa otvaranjem očiju i ušiju u pacova (Garcia-Rill i sar., 2008).



**Slika 1.6.** Promena odnosa trajanja budnosti, NREM i REM faze tokom života. Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevier; Pace-Schott i sar., 2008; ©2008.



Kao i kod mnogih drugih fizioloških procesa, i u spavanju se javljaju promene kao posledica fiziološkog starenja. Procenjuje se da oko 50% starih osoba ima poteškoća u spavanju (Vitiello, 2006). Fiziološko starenje se karakteriše padom kvaliteta spavanja, koje se ispoljava progresivnim smanjenjem efikasnosti spavanja u toku života (Ohayon i sar., 2004). U toku starenja se javljaju značajne kvantitativne i kvalitativne promene u spavanju, a neke od njih su: odloženo uspavljanje, veća fragmentisanost sna, buđenje u toku noći, kao i smanjeno trajanje 3. i 4. faze NREM spavanja i smanjenje ukupnog spavanja (Mendelson i Bergmann, 1999a; Ohayon i sar., 2004; Vitiello, 2006; Crowley, 2011). Ukupno vreme razbuđenosti u toku spavanja se značajno povećava sa starenjem, tako da kada dođe do razbuđivanja ono traje duže i javlja se češće kako noć odmiče (Crowley, 2011). Meta-analiza, koja je obuhvatila 65 studija spavanja, je pokazala da se većina, starenjem prouzrokovanih promena spavanja, javlja između 16. i 60. godine života (Ohayon i sar., 2004).

## **1.5. Motorna kontrola**

### **1.5.1. Osnovna organizacija nervno-mišićnog sistema**

Motorni sistem se sastoji iz centralnog motornog sistema i velikog broja motornih jedinica (Moritani i sar., 2004). Motorna jedinica je osnovna jedinica nervno-mišićnog sistema, i sastoji se iz motornog neurona koji inerviše određen broj mišićnih vlakana jednog mišića. Interneuroni različitih motornih programa ili refleksnih centara, kao i nishodni putevi prednjeg mozga i moždanog stabla, aktiviraju motorne neurone koji su smešteni u motornim jedrima moždanog stabla i kičmene moždine. Interakcijom ovih različitih izvora, aktiviraju se motoneuroni sa velikom preciznošću, određuje se tačno vreme, kao i stepen aktivacije motoneurona određenih mišića. Grupa interneurona koja aktivira specifičnu grupu motoneurona, a inhibira druge motoneurone koji ometaju određenu motornu radnju, često se naziva generator centralnog obrasca (eng. „Central Pattern Generator“, CPG) ili motorni program (Grillner, 1981).

Neuronske mreže sadrže neophodne informacije za koordinaciju specifičnog motornog programa (npr. gutanje, hodanje ili disanje). Kada je aktivirana jedna neuronska mreža, samo ponašanje koje ona kontroliše će biti eksprimirano.

### **1.5.2. Regulacija posturalnog mišićnog tonusa i lokomotornog ritma**

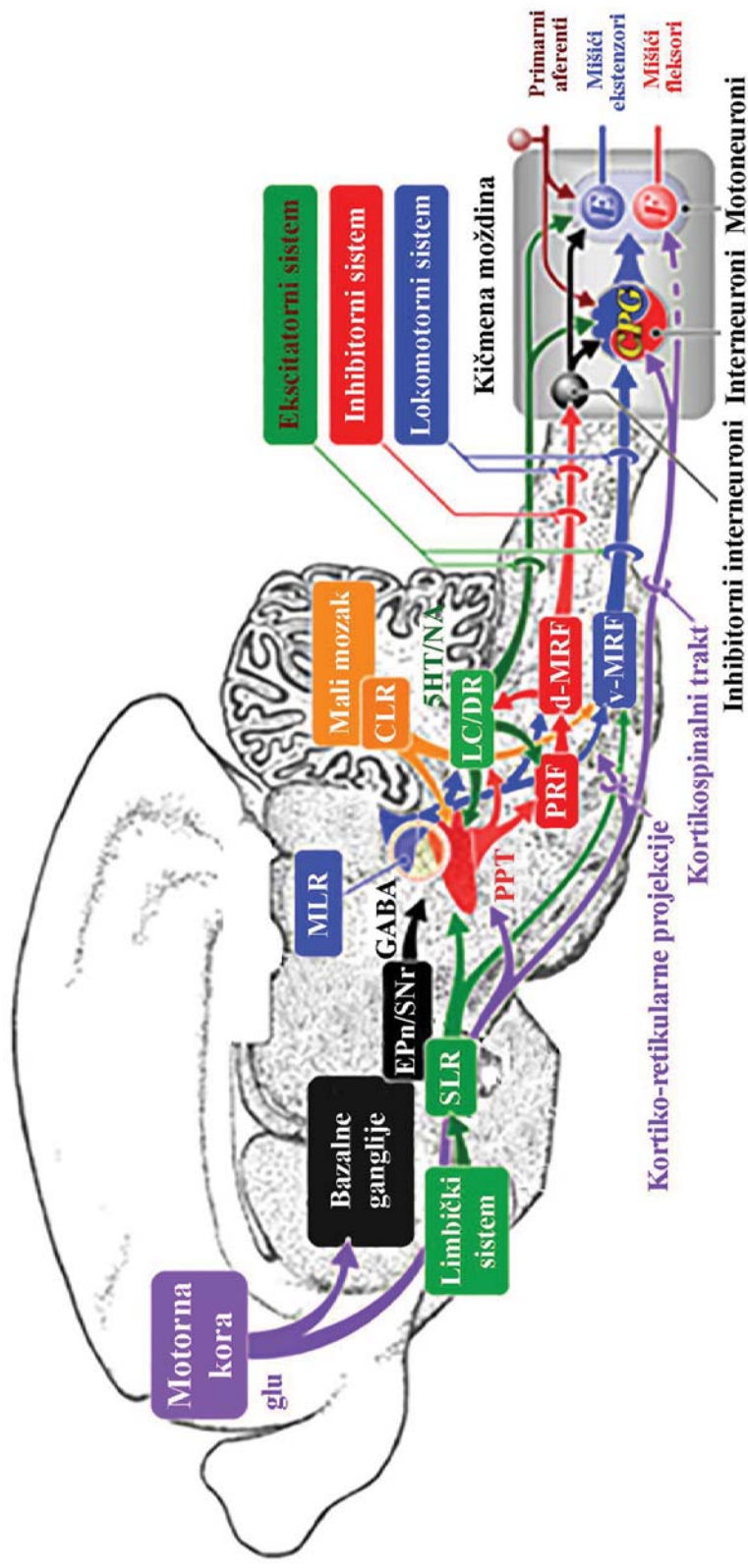
U kori velikog mozga se nalazi nekoliko važnih regiona (primarna motorna kora, premotorna i suplementarna motorna kora velikog mozga) koji su direktno uključeni u izvršenje različitih kompleksnih motornih zadataka (npr. vešti pokreti ruku i prstiju tokom pisanja, crtanja ili sviranja instrumenta). Kortiko-spinalni neuroni mogu direktno da aktiviraju odgovarajuće motoneurone kičmene moždine, ali i da utiču na određen broj interneurona u moždanom stablu i kičmenoj moždini (**Slika 1.7.**). Moždano stablo sadrži veliki broj nishodnih puteva koji mogu da iniciraju kretanje i koriguju motorno ponašanje, ili omoguće fino modifikovanje motoneurona u kičmenoj moždini. Ovi putevi podešavaju osetljivost različitih tipova neurona, sinapsi i mreža spinalnih neurona. Takođe, postoje direktne projekcije od kore velikog mozga do ulaznog regiona bazalnih ganglija (**Slika 1.7.**). Dakle, kortikalna kontrola motorne koordinacije se ostvaruje preko direktnog delovanja na motorne centre u moždanom stablu i kičmenoj moždini, ali dobrim delom i preko paralelnih delovanja na različita jedra bazalnih ganglija.

Retikularna formacija, osnovna struktura moždanog stabla, preko ushodnih i nishodnih puteva, pored regulacije vitalnih funkcija, učestvuje i u regulaciji ciklusa budnost/spavanje. Ushodne projekcije modulišu kortikalnu aktivnost preko talamo-kortikalne mreže (Steriade i sar., 1993), dok projekcije unutar moždanog stabla, kao i nishodne projekcije koje se pružaju do kičmene moždine, doprinose u inicijaciji motornih funkcija, ali i u kontroli ravnoteže i kretanja (**Slika 1.7.**; Rossignol, 1996; Takakusaki i sar, 2016). Retikulospinalni trakt se sastoji od mezencefaličke retikularne formacije, pontinske retikularne

formacije (PRF) i medularne retikularne formacije (MRF), a njihovi retikulo-spinalni neuroni (RSN) aktiviraju neuronske mreže u kičmenoj moždini, koje generišu motorni program (Grillner, 1981; Mori, 1987; Rossignol, 1996). Neurotransmiteri modifikuju delovanje neurona retikularne formacije i na taj način menjaju efekte retikulo-spinalnog trakta (Pace-Schott i Hobson, 2002; Takakusaki i sar., 2016). Ekscitabilnost retikulo-spinalnih neurona zavisi od stanja budnost/spavanje kao i od impulsa iz prednjeg i malog mozga. Mezencefalička i pontomedularna retikularna formacija (PMRF) primaju direktne projekcije iz kore velikog mozga, limbičko-hipotalamičkog sistema i malog mozga (**Slika 1.7.**; Takakusaki i sar., 2016). Takođe, GABAergička eferentna vlakna bazalnih ganglija inhibicijom/dezinhicijom kontrolišu mišićni tonus i lokomotorni ritam delujući na moždano stablo preko mezopontinskog tegmentuma (Garcia-Rill, 1986; Takakusaki i sar., 2004). U lateralnom delu mezopontinskog tegmentuma postoje funkcionalno različite grupe neurona (funkcionalna topografija), koje su uključene u generisanje lokomotornog ritma (dorzalni deo) i kontrolu mišićnog tonusa (ventralni deo) (Takakusaki i sar., 2016). Holinergički neuroni PPT jedra u velikoj meri doprinose regulisanju posturalnog mišićnog tonusa, pa se iz tog razloga PPT jedro smatra sastavnim delom mezencefaličkog lokomotornog regiona (MLR). Oštećenje nishodnih PPT-PRF projekcija može poremetiti regulaciju mišićnog tonusa, i dovodi do poremećaja ravnoteže i hoda. Sa druge strane, oštećenje ushodnih PPT projekcija ka talamusu može poremetiti integrisanje senzornih signala koji doprinose motornoj kontroli. Zaista, smanjena holinergička inervacija talamusa kod PB pacijenata ne dovodi do kognitivnih i motornih oštećenja, ali uslovljava povećanje posturalne nestabilnosti (Müller i sar., 2013). Posturalna nestabilnost i poremećaji u hodu predstavljaju najčešće uzroke padova kod PB pacijenata, naročito pacijenata sa oštećenjem holinergičkih neurona PPT jedra (Bohnen i sar., 2009).

Monoaminergički silazni putevi takođe učestvuju u regulaciji mišićnog tonusa i generisanju lokomotornog ritma i smatraju se delom ekscitatornog sistema mišićnog tonusa. Naime, LC/DR neuroni se projektuju do PRF, a preko njih i neurona MRF dovode do ekscitacije lokomotornog ritma i povećanja mišićnog tonusa (**Slika 1.7.**). Takođe, direktne LC projekcije na motoneurone kičmene moždine dovode do njihove ekscitacije i generisanja lokomotornog ritma (Takakusaki i sar., 2016).

Dakle, mehanizmi koji su uključeni u regulaciju posturalnog mišićnog tonusa i lokomotornog ritma su integrisani, kako bi se postigao odgovarajući motorni odgovor (Mori, 1987).



Slika 1.7. Putevi regulacije posturalnog mišićnog tonusa i generisanja lokomotornog ritma. SLR – subtalamički lokomotorni region; EPn/SNr – *entopeduncular nucleus/substantiae nigrae pars reticulata*; GABA – gama-aminobuterna kiselina; CLR – lokomotorni region malog mozga; MLR – mezencefalički lokomotorni region; PPT – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LC/DR – *locus coeruleus/nucleus raphe dorsalis*; PRF – pontinska retikularna formacija; d-MRF/v-MRF – dorazalna i ventralna medularna retikularna formacija; CPG – generator centralnog obrasca.

Preuzeto i modifikovano iz Takakusaki i sar., 2016. (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

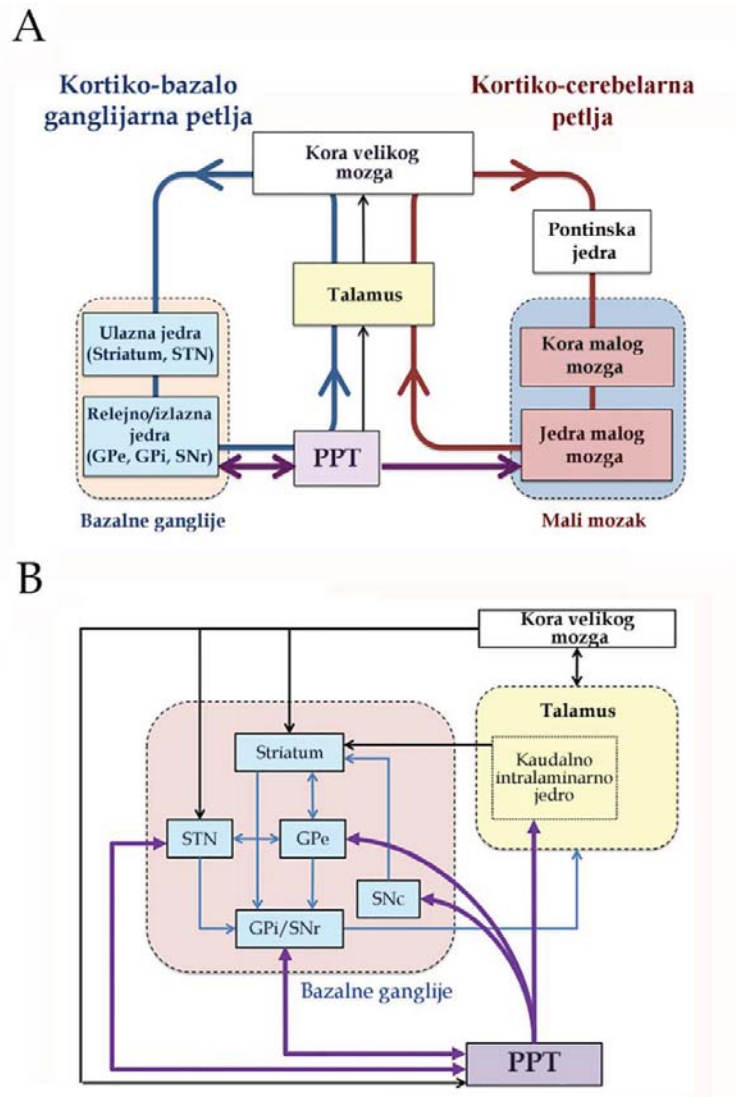
### 1.5.3. PPT i motorna kontrola

PPT jedro, kao važan deo ushodnog retikularnog aktivirajućeg sistema, učestvuje u regulaciji kognitivnih procesa, kao i u regulaciji motorne kontrole (Garcia-Rill i sar., 2015; Mori i sar., 2016). Holinergički neuroni PPT jedra su uključeni u regulaciju mišićnog tonusa, a imaju i značajnu ulogu u kontrolisanju položaja tela, održavanju ravnoteže kao i u generisanju lokomotornog ritma (Takakusaki i sar., 2016).

Kontrola mišićnog tonusa i lokomocije zavisi od ekscitabilnosti funkcionalno različitih neurona medularne retikularne formacije, neurona koji kontrolišu mišićni tonus (dorzalni deo, d-MRF) i neurona koji generišu motorni ritam (ventralni deo, v-MRF). Takakusaki i saradnici (2004; 2016) su predložili da inhibitorni sistem mišićnog tonusa kreće od holinergičkih neurona PPT jedra, koji preko holinoceptivnih PRF neurona i d-MRF neurona regulišu aktivnost interneurona, ali i motoneurona kičmene moždine (**Slika 1.7.**). Povećana aktivnost holinergičkih neurona PPT jedra smanjuje mišićni tonus, dok inhibicija holinergičkih neurona PPT jedra dovodi do povećanja mišićnog tonusa i/ili izazivanja kretanja (Takakusaki i sar., 2016).

PPT jedro je višestruko povezano sa različitim delovima bazalnih ganglija (Mena-Segovia i sar., 2004), a jedna od njegovih ključnih funkcija je da reguliše i poveže različite aspekte njihovog delovanja (Mori i sar., 2016). Zahvaljujući jedinstvenim recipročnim vezama, PPT i bazalne ganglije zajedno učestvuju u motornoj kontroli (inicijacija ili inhibicija voljnih pokreta) i zajedno modulišu različite kognitivne aspekte izvršenja motornih funkcija (Mori i sar., 2016). Izlazna jedra bazalnih ganglija, *substantiae nigrae pars reticulata* (SNr) i *internal globus pallidus* (GPi), su recipročno povezana sa PPT jedrom (Moriizumi i Hattori, 1992; Semba i Fibiger, 1992). GABAergička eferentna vlakna SNr inhibiraju holinergičke neurone PPT jedra i na taj način suprimiraju aktivnost inhibitornog sistema mišićnog tonusa (Takakusaki i sar., 2004; 2016). Takođe,

mešovite projekcije iz PPT jedra su ekscitatorno povezane (sinaptička konekcija) sa dopaminergičkim neuronima *substantiae nigrae pars compacta* (SNc) (Kitai, 1998; Mena-Segovia i sar., 2004), a preko njih se ostvaruje specifična subkortikalna integracija motornih i kognitivnih funkcija (Kitai, 1998).



**Slika 1.8. Interstrukturna povezanost PPT jedra. (A)** Povezanost kore velikog mozga, bazalnih ganglija, malog mozga i PPT jedra. **(B)** Povezanost bazalnih ganglija i PPT jedra. PPT - *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; STN - *nucleus subthalamicus*; GPe - *external globus pallidus*; GPi - *internal globus pallidus*; SNr - *substantiae nigrae pars reticulata*; SNc - *substantiae nigrae pars compacta*.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Frontiers Media S.A.; Mori i sar., 2016; ©2016.

Kora velikog mozga je na različite načine povezana sa bazalnim ganglijama i zajedno deluju na različite aspekte motornog ponašanja, za koje je neophodna precizna vizuelno-motorna koordinacija (Georgopoulos i Grillner, 1989; Brooks, 1995). Takođe, motorna kora je preko kortiko-retikularnih projekcija povezana i sa PPT jedrom i sa PRF, a njihovom ekscitacijom se smanjuje mišićni tonus (**Slika 1.7.**; Takakusaki i sar., 2004). Dakle, kortikalna kontrola PPT jedra se ostvaruje kombinovanjem direktne ekscitacije iz motorne kore i kontrolisane inhibicije preko bazalnih ganglija.

Smatra se da mali mozak i bazalne ganglije učestvuju u formiranju posebnih anatomskih petlji, koje imaju različite funkcionalne uloge u motornoj i kognitivnoj kontroli, a nedavno je predloženo da je PPT jedro centralno mesto njihovih interakcija (Mori i sar., 2016). Neuroanatomske studije su pokazale postojanje veza PPT jedra i dubokih jedara malog mozga kod pacova (Woolf i Butcher, 1989; Ruggiero i sar., 1997), a kliničke studije su potvrdile postojanje ovih veza i kod ljudi (Aravamuthan i sar., 2007). Takođe, skorašnje studije su pokazale da PPT projekcije sinaptički aktiviraju duboka jedra malog mozga (Vitale i sar., 2016; Mori i sar., 2016).

Zbog jedinstvene anatomske i fiziološke pozicije PPT jedra, a na osnovu brojnih studija na životinjama (Garcia-Rill, 1986; 1991), PPT jedro predstavlja ciljno mesto za duboke moždane stimulacije u lečenju motornih poremećaja i poremećaja posturalne nestabilnosti (Garcia-Rill i sar., 2015).

#### **1.5.4. Motorna kontrola u toku spavanja**

Mišićna aktivnost pokazuje opadajući obrazac za vreme ciklusa budnost-spavanje. Za vreme NREM faze spavanja i mirnog budnog stanja, postoji veoma nizak nivo mišićne aktivnosti (mišićnog tonusa) u poređenju sa aktivnim budnim stanjem. Sa druge strane, REM faza spavanja je stanje gde je tonična mišićna aktivnost odsutna (mišićna atonija) ili znatno umanjena (mišićna hipotonija) (Chase i Morales, 2005; Chase, 2013). Iako se za vreme REM faze



spavanja javlja mišićna atonija, mogu se javiti i kratke fazne epizode mišićnih kontrakcija koje dovode do grčenja i trzanja ekstremiteta i pomeranja očnih jabučica, što predstavlja još jedan paradoks REM faze spavanja. Prema tome, REM fazu karakterišu tonična inhibicija mišićnog tonusa, ali i kratki periodi fazne aktivacije koji se manifestuju u vidu iznenadnih mišićnih trzaja.

Fenomen mišićne atonije za vreme REM faze spavanja prvi put su opisali Jouvet i Michel (1959). Iako je prošlo skoro 60 godina od prvog opisa REM atonije, neuronski mehanizmi koji su odgovorni za obrazac mišićne kontrole nisu još uvek u potpunosti razjašnjeni.

Određivanje mehanizama koji posreduju u mišićnoj aktivnosti za vreme spavanja je veoma važno da bi se razumela osnovna neuronska kontrola mišića. Osim toga, remećenje motorne kontrole leži u osnovi ozbiljnih poremećaja spavanja kao što su: poremećaj ponašanja u toku REM faze spavanja (RBD), opstruktivna apnea (eng. „Obstructive Sleep Apnea”), sindrom nemirnih nogu (eng. „Restless Legs Syndrome”), bruksizam i narkolepsija.

Retikulospinalni sistem pokazuje funkcionalnu topografiju koja doprinosi kontroli posturalnog mišićnog tonusa i kontroliše lokomotorni ritam, a njegovo funkcionisanje je stanjem determinisano (Chase, 1980; Takakusaki i sar., 2016). Ekscitatorni sistem mišićnog tonusa polazi od monoaminergičkih silaznih puteva iz LC i DR jedara, dok inhibitorni sistem mišićnog tonusa polazi od holinergičkih neurona PPT jedra. PRF predstavlja važno mesto gde se ukrštaju projekcije holinergičkih i monoaminergičkih neurona i gde dolazi do regulacije nivoa posturalnog mišićnog tonusa.

Naime, aktivnost holinergičkih i monoaminergičkih neurona je recipročno regulisana i zavisi od ciklusa budnost-spavanje (Rye, 1997; Pace-Schott i Hobson, 2002). Za vreme budnosti aktivnost monoaminergičkih neurona je veća od aktivnosti holinergičkih neurona, a za vreme REM faze spavanja monoaminergički neuroni su utišani (monoaminska tišina), dok su

holinergički neuroni veoma aktivni. Dakle, PRF neuroni vrše modifikaciju ekscitabilnosti u zavisnosti od stanja, tj. u odnosu na to koje ulaze primaju (holinergičke ili monoaminergičke). Medijalni PRF neuroni sa ekscitatornim holinergičkim i inhibitornim serotonergičkim odgovorom dovode do supresije mišićnog tonusa (Greene i Carpenter, 1985), dok PRF neuroni koji pokazuju inhibitorni holinergički i ekscitatorni serotonergički odgovor dovode do povećanja mišićnog tonusa. Takođe, noradrenergički neuroni LC jedra imaju i direktne projekcije na motoneurone kičmene moždine, i dovode do generisanja lokomotornog ritma ekscitacijom.

### **1.5.5. Poremećaj ponašanja u toku REM faze spavanja (RBD)**

Poremećaj ponašanja u toku REM faze spavanja (RBD, eng. „REM sleep behavioral disorder“) je jedinstvena parasomnija čija se klinička manifestacija karakteriše bizarnim oblicima ponašanja (energički, nekontrolisani pokreti ekstremiteta koji su povezani sa patološki povišenim tonusom mišića u toku REM faze spavanja), zbog kojih može doći do samopovređivanja ili povređivanja partnera u toku spavanja (Boeve i sar., 2007; Postuma i sar., 2012). Elektrofiziološki, RBD se karakteriše EMG abnormalnostima za vreme REM faze spavanja u vidu povećanja mišićnog tonusa ili izražene, kako fazne, tako i tonične kontrakcije mišića (Boeve i sar., 2007; Postuma i sar., 2012; Boeve, 2013), a za postavljanje dijagnoze je neophodna polisomnografska potvrda (American Academy of Sleep Medicine, 2005).

Kada se RBD javi u kombinaciji sa nekim neurološkim poremećajem (narkolepsija ili neko neurodegenerativno oboljenje) onda govorimo o „simptomatskom“ RBD-u, a u odsustvu neuroloških poremećaja govorimo o „idiopatskom“ RBD-u (Postuma i sar., 2012).

Iako se RBD može izazvati farmakološki (Postuma i sar., 2012), on je generalno povezan sa strukturnim oštećenjima srednjeg mozga i moždanog stabla, koja dovode do dezinhibicije mišićne kontrole iz motorne kore do

ekstremiteta, verovatno zaobilazeći bazalne ganglije ili druge modulatorne strukture (Boeve i sar., 2007; Sapin i sar., 2009; Postuma i sar., 2012). RBD kod ljudi može biti povezan sa tumorima ili moždanim udarom u pontomedularnom regionu (Boeve i sar., 2007), narkolepsijom, limbičkim encefalitisom, Gullain-Barre-ovim sindromom, farmakološkim agensima (triciklični ili serotonergički antidepresivi, alkohol, beta blokatori), ali i sa mnogim neurodegenerativnim bolestima uključujući i progresivnu supranuklearnu paralizu, kortikobazalni sindrom, frontotemporalnu demenciju i Hantingtonovu bolest (Postuma i sar., 2012).

Ipak, idiopatski RBD je najčešće uslovljen jednom od sinukleinopatija, a kod više od 80% RBD pacijenata se na kraju razvije PB, LBD ili MSA (Iranzo i sar., 2006; Boevi, 2013).

Humane studije su pokazale da je RBD prvi klinički znak početka neurodegenerativnih bolesti, naročito bolesti iz grupe sinukleinopatija, i da se može javiti 5-40 godina pre kliničke dijagnoze bolesti kao njihova rana klinička manifestacija (Boeve i sar., 2007; Whitwell i sar., 2007; Simic i sar., 2009). Ova parasomnija predstavlja posebnu mogućnost sa ciljem definisanja ranih markera dijagnoza neurodegenerativnih bolesti, čime bi se unapredile mogućnosti za primenu neuroprotektivnih tretmana u što ranijoj fazi bolesti. (Iranzo i sar., 2013; Peever i sar., 2014).

Prvi eksperimentalni model RBD su predstavili Jouvet i Delorme davne 1965 godine, selektivnom lezijom jedra *peri locus coeruleus* u mačke (Schenck, 2013). Danas se koristi veliki broj eksperimentalnih modela koji obuhvataju selektivne lezije moždanih jedara koja su uključena u regulaciju REM faze spavanja kod mačaka, pacova i miševa, kao i transgeni mišiji modeli sa poremećenom neurotransmisijom glicina i GABA-e (Schenck, 2013). Najčešće korišćeni RBD model u pacova je selektivna lezija *nucleus sublaterodorsalis* (SLD), koja uslovljava dezinhibiciju motoneurona kičmene moždine i povećanje mišićnog tonusa (Lu i sar., 2006; Boeve i sar., 2007).

I pored velikog broja eksperimentalnih modela, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni patofiziološki mehanizmi RBD-a, kao ni neuronske mreže koje učestvuju u regulaciji mišićne atonije u toku REM faze spavanja.

Najnovije kliničke studije su pokazale da PB pacijenti sa poremećajem ponašanja u toku REM faze spavanja imaju znatno manji volumen pontomezencefaličkog tegmentuma, medularne retikularne formacije, hipotalamusa, talamusa (Boucetta i sar., 2016). Ovi rezultati potvrđuju povezanost RBD-a i značajnog smanjenja pontomezencefaličkog tegmentuma, koji sadrži holinergičke, GABAergičke i glutamatergičke neurone, kao i važnu ulogu ovih neurona u izazivanju REM faze spavanja i mišićne atonije (Boucetta i sar., 2016). Podaci druge kliničke studije su pokazali da deficit holinergičkih neurona PPT/LDT jedra možda leži u osnovi RBD-a (Benarroch i Schmeichel, 2002), što bi moglo da objasni pozitivan terapijski efekat donepezila kod RBD pacijenata (Ringman i Simmons, 2000). Takođe, skorašnji eksperimentalni rezultati su pokazali da degeneracija holinergičkih neurona PPT jedra pacova uslovljava nastajanje dva različita REM stanja, koja se razlikuju kako na osnovu ukupne snage EMG-a, tako i na osnovu EEG mikrostrukture (Petrovic i sar., 2014). Pored toga, u ovom eksperimentalnom modelu, kontrola vratnih mišića iz senzomotorne kore je bila izmenjena, naročito u zdravom REM spavanju (REM sa atonijom, teta REM), za razliku od patološkog REM spavanja (REM bez atonije, sigma REM), nastalog usled oslabljene holinergičke inervacije iz PPT jedra. Poremećaj kontrole mišića vratne muskulature iz senzomotorne kore velikog mozga se iskazao kao smanjenje kortikomuskularne koherencije (CMC) u beta frekventnom opsegu (Petrovic i sar., 2014).

Ovi podaci podstiču dalja istraživanja na nedavno ustanovljenom eksperimentalnom modelu težeg oblika holinergičke neuropatologije PB, (selektivno bilateralno oštećenje PPT jedra pacova), u cilju daljih objašnjenja centralnih patofizioloških mehanizama poremećaja ponašanja u toku REM faze spavanja.

## *2. Ciljevi*

Ova doktorska disertacija je imala kao glavni predmet istraživanje uticaja starenja na spavanje i motornu kontrolu dorzalne vratne muskulature u toku spavanja kako u fiziološkom starenju, tako i u starenju u eksperimentalnim modelima holinergičke neuropatologije najčešćih humanih bolesti starenja.

Selektivno bilateralno oštećenje NB jedra u pacova (glavni izvor holinergičke inervacije kore velikog mozga) je predstavljalo eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije AB, dok je selektivno bilateralno oštećenje PPT jedra u pacova (glavni izvor talamo-kortikalne holinergičke inervacije velikog mozga) predstavljalo eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije PB.

Rani znaci poremećaja spavanja, koji su izazvani bilo fiziološkim starenjem, bilo starenjem pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona, su praćeni putem analize promena u: arhitekturi spavanja, dinamici epizoda tri osnovne faze spavanja (broj i trajanje epizoda osnovnih faza spavanja), EEG mikrostrukturi, dinamici vretena REM faze spavanja (frekvencija pojavljivanja vretena, trajanje vretena i unutrašnja frekvencija vretena spavanja) i motornoj kontroli u toku svake faze spavanja (promene u propagacijama oscilacija od kore velikog mozga ka mišićima dorzalne vratne muskulature, merene kortikomuskularnom koherencijom). Poremećaji spavanja i motorne kontrole u toku spavanja, uslovljeni procesom starenja, su praćeni u periodu od 3 do 5,5 meseci starosti pacova.

Cilj ove doktorske disertacije je da se pronađu različiti i najraniji elektrofiziološki znaci poremećaja spavanja, kao i znaci izmenjene motorne kontrole u fiziološkom starenju i starenju u funkcionalno različitim holinergičkim neuropatologijama, sa daljom mogućnošću njihove primene u ranoj dijagnostici, prevenciji i eventualnom praćenju terapije pacijenata sa rizikom razvoja AB i PB.

U skladu sa ciljem istraživanja ove doktorske disertacije postavljeni su neposredni zadaci:

1. Ispitati uticaj fiziološkog starenja na arhitekturu spavanja, dinamiku epizoda, EEG mikrostrukturu i motornu kontrolu u toku budnosti, NREM i REM faze spavanja u cilju definisanja ranih elektrofizioloških markera poremećaja spavanja;
2. Ispitati uticaj starenja kod bilateralnih NB i PPT lediranih pacova na arhitekturu spavanja, dinamiku epizoda, EEG mikrostrukturu i motornu kontrolu u toku budnosti, NREM i REM faze spavanja u cilju definisanja ranih elektrofizioloških markera poremećaja spavanja i motorne kontrole u toku spavanja u neurodegeneraciji funkcionalno različitih holinergičkih neurona.

### *3. Materijal i metode*



### 3.1. Eksperimentalne životinje

U istraživanjima koja su obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom korišćeni su odrasli mužjaci pacova Wistar soja, čija je starost na početku eksperimenata bila 2–2,5 meseca, a prosečna težina 250–290 g. Životinje su gajene u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u standardnim uslovima (konstantna temperatura:  $23 \pm 2$  °C; relativna vlažnost vazduha 60–70%; svetlosni režim 12 h svetlo/12 h mrak; slobodan pristup vodi i hrani). Nakon operacije i u toku eksperimentalnog protokola, životinje su čuvane pojedinačno u kavezima od pleksiglasa (30 cm x 30 cm x 30 cm) sa prostirkom od sterilisane strugotine.

Sve eksperimentalne procedure, korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji, su bile u saglasnosti sa Evropskom direktivom (86/609/EEC) za zaštitu životinja i bile su odobrene od strane Etičke komisije Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (broj rešenja: 02-21/10).

### 3.2. Eksperimentalne grupe

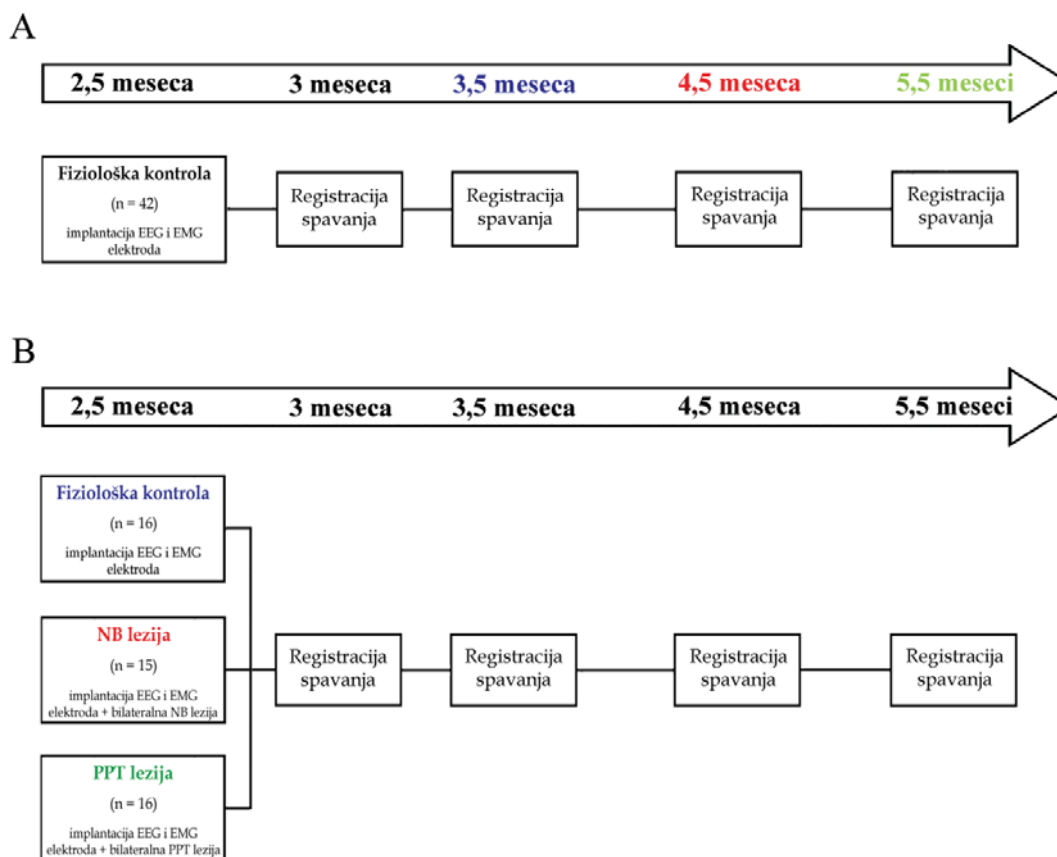
Za potrebe eksperimenata je korišćeno 89 mužjaka pacova Wistar soja, kojima su implantirane EEG i EMG elektrode za hronično registrovanje spavanja. U toku operativne procedure, pored implantacije elektroda, u odgovarajućim eksperimentalnim grupama su izvršene i bilateralne lezije jedra *nucleus basalis* (NB) ili jedra *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT).

Rane elektrofiziološke znake poremećaja spavanja i motorne kontrole u starenju smo pratili kako u fiziološkim kontrolama (**Slika 3.1.A.**) tako i u pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona (**Slika 3.1.B.**) u toku 5,5 meseci u četiri vremenska termina: 3 meseca starosti; 3,5 meseca starosti; 4,5 meseca starosti i 5,5 meseci starosti pacova.

Eksperimentalne grupe pacova su bile:

- **fiziološka kontrola** (pacovi implantirani za hronično registrovanje spavanja);
- **NB lezija** (pacovi sa bilateralnom ekscitotoksičnom lezijom jedra NB implantirani za hronično registrovanje spavanja);
- **PPT lezija** (pacovi sa bilateralnom ekscitotoksičnom lezijom jedra PPT implantirani za hronično registrovanje spavanja).

Selektivno bilateralno oštećenje NB jedra u pacova (glavni izvor holinergičke inervacije kore velikog mozga) je predstavljalo eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije AB (Saponjic i sar., 2013; Petrovic i sar., 2013b; Petrović, 2014; Ciric i sar., 2016), dok je selektivno bilateralno oštećenje PPT jedra u pacova (glavni izvor talamo-kortikalne holinergičke inervacije velikog mozga) predstavljalo eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije PB (Petrovic i sar., 2013a; 2013b; 2014; Petrović, 2014).



**Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimentalnih grupa i eksperimentalnog protokola.** (A) Šematski prikaz eksperimentalnog prokola za registrovanje spavanja i broja pacova (n) korišćenih u eksperimentima fiziološkog starenja; (B) Šematski prikaz eksperimentalnog protokola za registrovanje spavanja različitih eksperimentalnih grupa i broja pacova (n) korišćenih u eksperimentima starenja pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona.

### 3.3. Operativna procedura

Operativna procedura za implantaciju EEG i EMG elektroda za hronično registrovanje spavanja, kao i za selektivnu mikroinfuziju ekscitotoksina je izvršena standardnom metodom naše laboratorije (Saponjic i sar., 2013; Petrović, 2014; Ciric i sar., 2015; 2016) u ketamin/diazepam anesteziji (50 mg/kg, *i.p.*; Zoletil 50, Virbac, Francuska). Naime, nakon postavljanja pacova u stereotaksički ram (Slika 3.2.B.), skalpelom je napravljen rez duž sagitalnog

šava lobanje i lobanja je oslobođena kože i mišićnog tkiva. Zahvaljujući orijentacionim tačkama na kostima lobanje (bregma i lambda, **Slika 3.2.A.**) stereotaksički smo razmerili mesta za postavljanje EEG elektroda. U toku operativne procedure, pacovima smo implantirali po četiri epiduralne, parijetalne šraf elektrode od nerđajućeg čelika. Dve elektrode su implantirane u region motorne, a druge dve u region senzomotorne kore velikog mozga pacova, za registrovanje EEG aktivnosti. Po jednu šraf elektrodu smo implantirali u nazalnu kost i ona je služila za uzemljenje. Takođe, bilateralne EMG teflonom obložene žičane elektrode (Medwire, SAD) smo implantirali u dorzalnu vratnu muskulaturu za registrovanje mišićne aktivnosti u toku spavanja. Stereotaksičke koordinate za položaj EEG šraf elektroda su određene na osnovu stereotaksičkog atlasa za pacove (Paxinos i Watson, 2005). U skladu sa atlasom osnovni preduslovi za stereotaksičku preciznost su: pacovi stari 2-2,5 meseca; težina pacova između 250 i 290 g; a udaljenost između bregme i lambde 9 mm. U našoj operativnoj proceduri stereotaksičke koordinate za motornu i senzomotornu koru velikog mozga pacova su bile:

- **motorna kora** (MCx): antero-posteriorno (A/P): +1,00 mm od bregme; medio-lateralno (M/L): 2,00 mm; dorzo-ventralno (D/V): 1,00 mm od površine lobanjske kosti;
- **senzomotorna kora** (SMCx): A/P: -3,00 mm od bregme; M/L: 2,00 mm; D/V: 1,00 mm od površine lobanjske kosti.

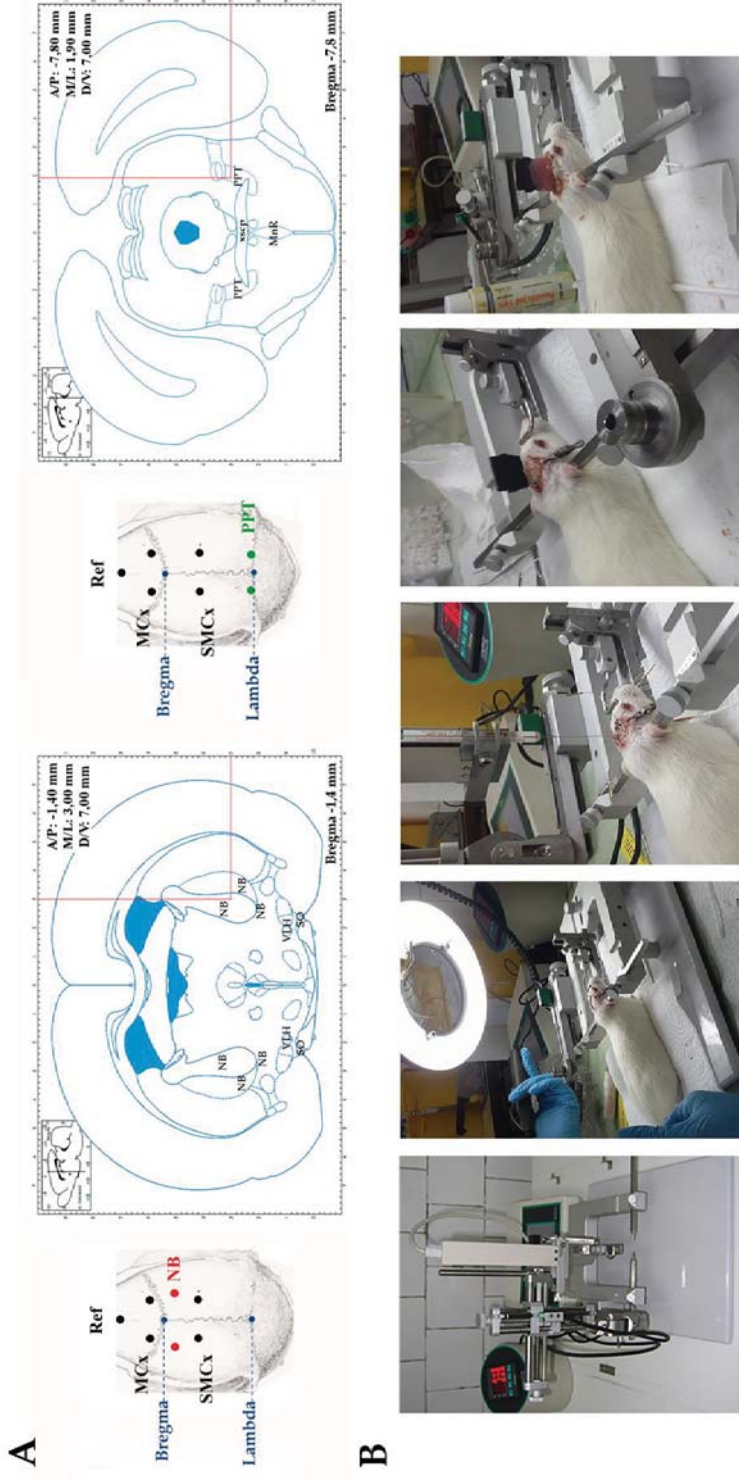
Svi izvodi postavljenih epiduralnih EEG elektroda i EMG elektroda su bili utisnuti u minijaturni, plastični konektor (39F1401, Newark Electronics, SAD), koji smo fiksirali za šraf elektrode i kosti lobanje pomoću dentalnog akrilata i cementa (Biocryl-RN, Galenika a.d., Srbija).

U toku operativne procedure, za implantaciju EEG i EMG elektroda, izvršili smo i selektivna bilateralna oštećenja dubokih moždanih struktura, NB ili PPT jedra. Bilateralne ekscitotoksične lezije su izvršene stereotaksički

navođenom mikroinfuzijom ibotenične kiseline (IBO, Sigma, SAD; 100 nl 0,1 M rastvora IBO u 0,1 M Na-fosfatnom puferu (PBS), pH=7,4) i u desno i u levo NB ili PPT jedro, pomoću digitalizovanog standardnog laboratorijskog stereotaksičkog aparata sa injektorom (Stoelting Co, SAD) i Hamiltonovim špricom (1 $\mu$ l, sa 26 ga iglom). IBO je generalni agonista glutamatskih receptora, koja izaziva ekscitotoksičan efekat (patološko povećanje vanćeljske koncentracije glutamata) delujući preko jonotropnih (NMDA, AMPA i kainatni receptori) i metabotropnih (mGluR<sub>1</sub> do mGluR<sub>8</sub>) glutamatskih receptora i posledično dovodi do odumiranja neurona (Rugg i sar., 1992; Inglis i Semba, 1997; Petrović, 2014). Stereotaksičke koordinate za položaj igle Hamiltonovog šprica, radi selektivnih bilateralnih oštećenja dubokih moždanih struktura (NB ili PPT), su određene na osnovu stereotaksičkog atlasa za pacove (Paxinos i Watson, 2005) i one su bile (**Slika 3.2.A.**):

- **za NB jedro:** A/P: -1,40 mm od bregme; M/L: 3,00 mm; D/V: 7,00 mm od površine mozga;
- **za PPT jedro:** A/P: -7,80 mm od bregme; M/L: 1,90 mm; D/V: 7,00 mm od površine mozga.

Koncentraciju i volumen IBO smo odabrali na osnovu prethodnih studija (Inglis i Semba, 1997; Bjelobaba i Saponjic, 2013; Saponjic i sar., 2013). Mikroinfuzije su izvedene u volumenu od 100 nl u jednom pulsu u trajanju od 60 s, a Hamiltonov špric je ostavljen lokalno u tkivu 5 min nakon mikroinfuzije kako bi IBO mogla da difunduje u NB ili PPT jedro. Nakon mikroinfuzije u NB ili PPT jedro sa jedne strane mozga, vrh Hamiltonove igle je ispiran fiziološkim rastvorom i onda stereotaksički postavljen u jedro sa druge strane mozga za narednu kontralateralnu mikroinfuziju. Na kraju operativne procedure za implantaciju elektroda i bilateralne lezije, koža lobanje je zašivena, i pacovi su ostavljeni da se oporave 13 dana.



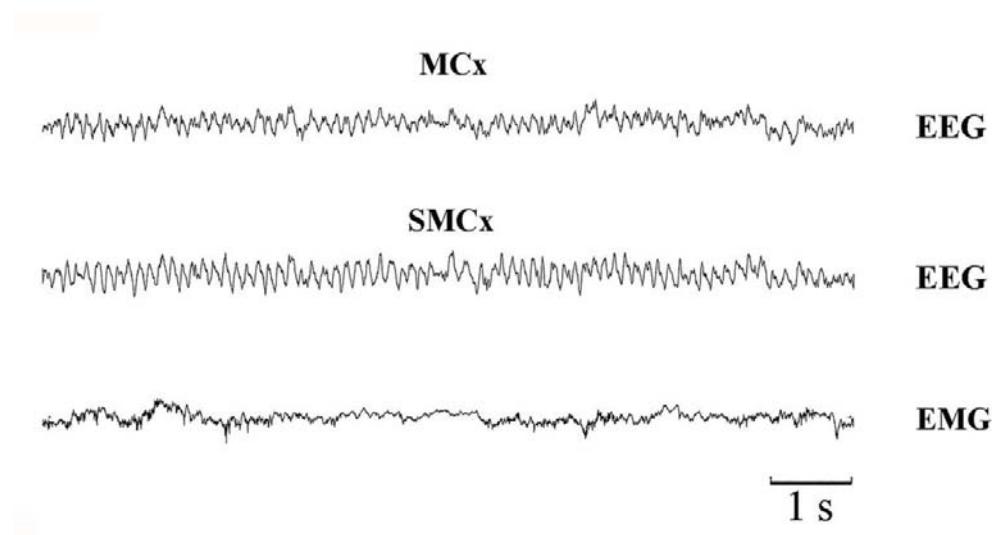
**Slika 3.2. Prikaz operativne procedure.** (A) Šematski prikaz svih korišćenih stereotaksičkih koordinata za otvore na kostima lobanje za implantaciju EEG elektroda i postavljanje mikroinfuzione igle za lezije dubokih moždanih struktura, sa tipičnim stereotaksičkim koordinatama za ekscitotoksičnu NB i PPT leziju. MCx – motorna kora; SMCx – senzomotorna kora; Ref – referentna elektroda; NB – *nucleus basalis*; VLH – *nucleus hypothalamus ventrolateralis*; SO – *nucleus supraopticus*; PPT – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; xscp – *decussation peduncularum cerebellarium superiorum*; MnR – *nucleus raphe medianus*. Preuzeto i modifikovano iz Paxinos i Watson, 2005; (B) Prikaz operativne procedure za implantaciju EEG i EMG elektroda i ekscitotoksične mikroinfuzije pomoću digitalizovanog standardnog laboratorijskog stereotaksičkog aparata sa injektorom.

### 3.4. Procedura registrovanja spavanja

Nakon 13 dana postoperativnog oporavka, životinje su stavljene na jednodnevnu adaptaciju, na registrujuću kutiju i kabl. Registrovanje spavanja se odvijalo za vreme normalno neaktivne cirkadijalne faze pacova (od 9 do 15 h), u trajanju od šest sati.

Snimanje EEG i EMG aktivnosti je diferencijalno registrovano i sastojalo se od 6 ulaza (levi MCx, desni MCx, levi SMCx, desni SMCx, levi EMG i desni EMG), svaki sa (+) na levoj strani i (-) na desnoj strani, i svi imaju istu zemlju (šraf elektroda implantirana u nazalnu kost). Diferencijalno registrovanje pojačava razlike potencijala između leve i desne MCx ili SMCx elektrode, dok se njihove sličnosti gube, pa nam ovaj način registrovanja omogućava poređenje antero-posteriornih EEG specifičnosti (Ciric i sar., 2015; 2016). EEG i EMG aktivnosti su bile vidljive na kompjuterskom monitoru i čuvane su na disku radi njihove dalje analize. Nakon uobičajenog pojačanja i filtriranja (0,3 – 100 Hz pojasni filter; A-M System Inc. Model 3600, SAD), analogni signali su digitalizovani frekvencijom uzorkovanja od 256/s, korišćenjem *DataWave SciWorks Experimenter Version 8.0* akvizicionog softvera (DataWave Technologies, SAD). Prikaz analognih EEG signala motorne (MCx) i senzomotorne (SMCx) kore i EMG signala vratnih mišića u toku registrovanja spavanja u trajanju od 10 s dat je na **Slici 3.3**.

Spavanje smo registrovali kod svih pacova u toku 5,5 meseci starenja u nekoliko vremenskih termina: 3 meseca starosti; 3,5 meseca starosti; 4,5 meseca starosti i 5,5 meseci starosti pacova (Ciric i sar., 2015; 2016).



**Slika 3.3.** Prikaz 10 s analognih EEG signala motorne (MCx) i senzomotorne (SMCx) kore i EMG signala vratnih mišića u toku registrovanja spavanja.

### **3.5. Priprema tkiva za histochemijsku identifikaciju i kvantifikaciju NB i PPT lezija**

Na kraju perioda starenja koji smo pratili i nakon svih registracija spavanja, NB i PPT lezije su identifikovane NADPH - diaforaza histochemijskim bojenjem (Vincent i sar., 1983; Sabbatini i sar., 1999; Datta i sar., 2001; Paxinos i sar., 2009) i kvantifikovane prebrojavanjem NADPH - diaforaza pozitivno obojenih ćelija (Saponjic i sar., 2013; Petrovic i sar., 2013a; 2014; Ciric i sar., 2016).

Duboko anestezirani pacovi (50 mg/kg, *i.p.*; Zoletil 50, Virbac, Francuska), su transkardijalno perfundovani, počevši sa ispiranjem krvnih sudova fiziološkim rastvorom dok se jetra ne obezboji (200 ml 0,9% NaCl, brzina perfuzije 40 ml/min), zatim 4% rastvorom paraformaldehida u 0,1 M PBS (200 ml; prvih 100 ml brzinom perfuzije 40 ml/min, a zatim 30 ml/min) i na kraju 10% rastvorom saharoze u 0,1 M PBS (200 ml; brzina perfuzije 30 ml/min). Nakon transkardijalne perfuzije životinje su dekapitovane, njihovi



mozgovi su ekstrahovani i očišćeni od moždanih opni i krvnih sudova, a zatim su postfiksirani u 4% paraformaldehidu na temperaturi od +4 °C preko noći. Nakon toga su mozgovi dehidratirani u 30% rastvoru saharoze (30% rastvor saharoze u 0,1 M PBS) nekoliko dana na temperaturi od +4 °C, dok mozak ne padne na dno bočice.

Ovako pripremljeni mozgovi su isečeni na 40 µm koronalne preseke korišćenjem kriotoma *Leica CMI850 Cryostat* (Leica, Biosystems Nusloch, Nemačka). Mozgovi su sečeni iz dva bloka u po četiri serije (A-D), što omogućava identifikaciju i kvantifikaciju deficita holinergičkih neurona NB i PPT jedra kroz čitavu antero-posteriornu dimenziju. Preseci su sakupljeni i stavljeni u rastvor antifrizu (40% rastvor etilen-glikola u 0,1 M kalijum-acetatu koji sadrži 1% polivinilpirolidon (PVP40, Sigma Aldrich, Nemačka)) i odloženi na temperaturi od -20 °C do daljeg korišćenja.

Nefiksirani, slobodno plutajući preseci su zatim obojeni NADPH - diaforaza histo hemijskim bojenjem (Vincent i sar., 1983; Paxinos i sar., 2009; Petrović, 2014). Naime, preseci su prvo isprani 3 puta po 10 min u 0,1 M PBS-u (pH = 7,4), a zatim inkubirani 1 h na +37 °C u rastvoru za bojenje - mešavini supstratnog rastvora, β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfatom-Na-4 soli (β - NADPH, Serva, Nemačka) i dimetil sulfoksida (DMSO, Sigma Aldrich, Nemačka). Supstratni rastvor je sadržao nitro blue tetrazolium hlorid (NBT, Serva, Nemačka) i 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat (BCIP, Serva, Nemačka) u supstratnom puferu pH = 9,5 (0,1 M Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Kako bi se redukovali artefakti pozadine, koji potiču od endogenih alkalnih fosfata, u rastvor za bojenje smo dodali specifičan inhibitor - levamizol (Sigma Aldrich, Nemačka) finalne koncentracije 2 mM (Bjelobaba i Saponjic, 2013). Nakon inkubacije, preseci su isprani u 0,1 M PBS-u, 3 puta po 10 min, i navučeni na mikroskopske pločice, koje su zatim ostavljene preko noći na sobnoj temperaturi. Tako osušene pločice su narednog dana stavljene u ksilol 24 h (Zorka, Srbija), kako bi se uklonile sve nečistoće. Posle nanošenja DPX

medijuma (Sigma Aldrich, Nemačka) i prekrivanja pločica pokrovnim staklima, preseki tkiva su bili spremni za dalju analizu *Carl Zeiss AXIOVERT* mikroskopom, opremljenim kamerom (Carl Zeiss, Nemačka).

Za kvantifikaciju gubitka holinergičkih neurona smo koristili ImageJ 1,46 program (NIH, SAD). Broj NADPH - diaforaza pozitivno obojenih ćelija je omogućio procenu broja holinergičkih neurona ili veličine lezije, pre nego pokušaj da se ustanovi deficit u apsolutnom broju holinergičkih neurona u NB ili PPT jedru. Svi preseki su grupisani u tri definisana stereotaksička opsega, posteriorno od bregme, u okviru celokupne antero-posteriorne dimenzije NB ili PPT jedra. Stereotaksički opsezi za NB jedro su bili: 1,00 - 1,30 mm; 1,40 - 1,60 mm; 1,70 - 1,90 mm, a za PPT jedro: 6,90 - 7,40 mm; 7,50 - 8,00 mm; 8,10 - 8,60 mm posteriorno od bregme. Naime, preseki su prvo uslikani i razvrstani u definisane stereotaksičke opsege (Saponjic i sar., 2013; Petrovic i sar., 2013a; Ciric i sar., 2016), a NADPH - diaforaza pozitivno obojene ćelije su prebrojavane na .tif slikama za svaku stranu mozga posebno, na tri koronalna preseka po svakoj strukturi (jedru NB ili PPT) i po svakom mozgu pacova. Zatim smo odredili grupnu srednju vrednost broja holinergičkih neurona za svaku eksperimentalnu (fiziološka kontrola, NB i PPT lezija) i starosnu grupu (3 i 5,5 meseca stari pacovi), a i u okviru svakog definisanog stereotaksičkog opsega.

Gubitak holinergičkih neurona smo iskazali po strani mozga za svaki stereotaksički opseg u okviru celokupne dimenzije NB ili PPT jedra, kao procenat razlike NADPH - diaforaza pozitivnih ćelija u odnosu na fiziološku kontrolu odgovarajuće starosne grupe. Preciznije, svi procenti razlike su iskazani u odnosu na grupnu srednju vrednost apsolutnih brojeva izbrojanih neurona kod fizioloških kontrola, za svaki stereotaksički opseg, koji je uzet kao 100%. Broj NADPH - diaforaza pozitivno obojenih ćelija nam je omogućio procenu veličine bilateralnih oštećenja NB i PPT jedra, kao i procenu gubitka

holinergičkih neurona koji je uslovljen samim starenjem kod fizioloških kontrola.

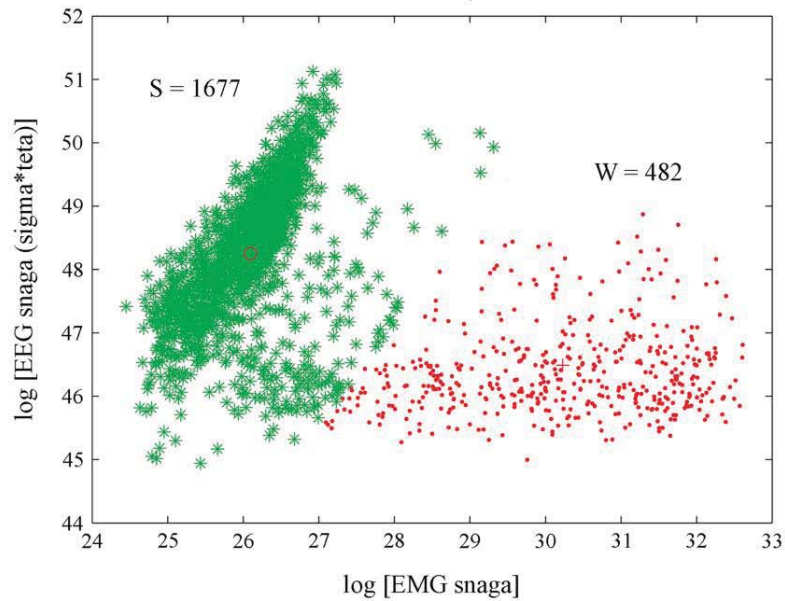
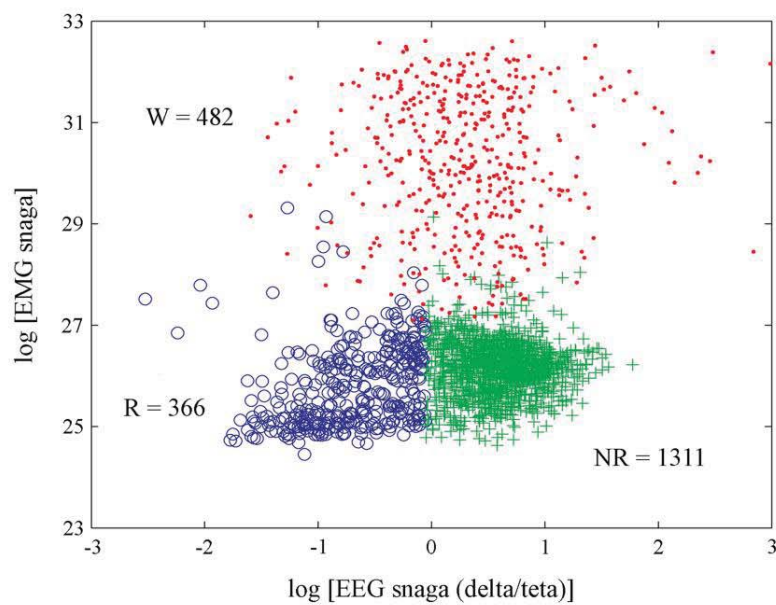
Identifikaciju i kvantifikaciju smo vršili na uzorcima tkiva fizioloških kontrola 3 meseca starosti (n = 8 za fiziološki NB; n = 10 za fiziološki PPT) i 5,5 meseci starosti (n = 6 za fiziološki NB; n = 8 za fiziološki PPT), kao i na uzorcima bilateralnih NB i PPT lediranih pacova 3 meseca starosti (n = 5 za NB leziju; n = 9 za PPT leziju) i 5,5 meseci starosti (n = 6 za NB leziju; n = 9 za PPT leziju).

### **3.6. Analiza spavanja i EEG signala**

Analiza snimljenih signala, svih eksperimentalnih i starosnih grupa, je urađena korišćenjem originalnog analiznog paketa, razvijenog u MATLAB 6.5 programu (Saponjic i sar., 2013; Petrovic i sar., 2013b; Ciric i sar., 2015; 2016). Istraživanje je obuhvatilo analizu: arhitekture i dinamike epizoda spavanja (broj i trajanje epizoda spavanja), EEG mikrostrukture i motorne kontrole u toku spavanja, kao i analizu dinamike vretena spavanja (frekvencija pojavljivanja vretena, trajanje, kao i unutrašnja frekvencija vretena).

Primenom Furijeove transformacije na šestočasovne signale (2160 10 s Furijeovih epoha), svaku 10 s epohu smo diferencirali kao jednu od tri osnovne faze: budnost, NREM ili REM faza spavanja, na osnovu EEG i EMG karakteristika. Prvo smo izdvojili sve 10 s epohe budnosti iz svakog šestočasovnog signala, na osnovu proizvoda snaga EEG sigma i teta frekventnog opsega na y - osi, i ukupne snage EMG signala na x - osi (**Slika 3.4.A.**). Epohe budnosti imaju visoku ukupnu snagu EMG signala i nisku vrednost proizvoda snaga EEG sigma i teta frekventnog opsega, dok epohe spavanja imaju nisku ukupnu snagu EMG signala i visoku vrednost proizvoda snaga EEG sigma i teta frekventnog opsega. U drugom koraku izvršeno je diferenciranje NREM i REM 10 s epoha na osnovu ukupne snage EMG signala na y - osi, i količnika snaga EEG delta i teta frekvenentnog opsega na x - osi

(**Slika 3.4.B.**, Petrovic i sar., 2013a). Epohe sa nižom ukupnom snagom EMG signala i manjim količnikom snaga EEG delta i teta frekventnog opsega pripadaju REM fazi spavanja, dok epohe koje imaju višu ukupnu snagu EMG signala i veću vrednost količnika snaga EEG delta i teta frekvencije pripadaju NREM fazi spavanja (**Slika 3.4.B.**). Razdvajanje epoha budnosti od epoha spavanja, kao i dalje razdvajanje NREM i REM epoha je postignuto korišćenjem algoritma K-sredine za dva grupisanja, a radi boljeg grupisanja su korišćene logaritmovane vrednosti na x i y osi (Saponjic i sar., 2013; Petrovic i sar., 2013a; 2013b; 2014; Ciric i sar., 2015). Ovako diferencirane 10 s epohe smo koristili za dalju analizu arhitekture spavanja, EEG mikrostrukture, dinamike epizoda i vretena spavanja, kao i motorne kontrole svake faze spavanja.

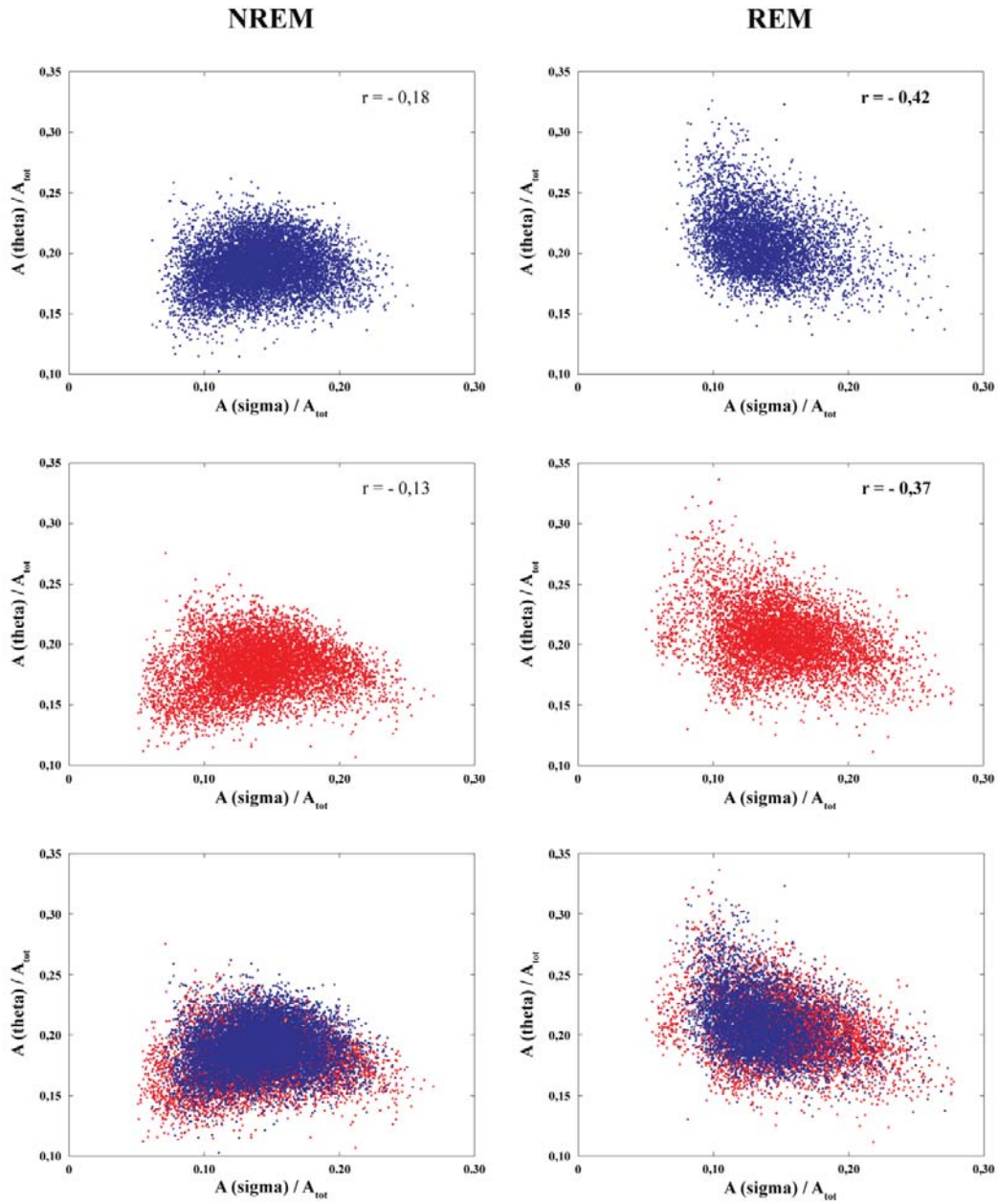
**A****B**

**Slika 3.4. Tipičan primer grafika razdvajanja grupisanja faza budnosti i spavanja u kontrolnog pacova.** Razdvajanja grupisanja epoha od 10 s budnosti, NREM i REM faze spavanja tokom 6 h. **(A)** Razdvajanje epoha budnosti (W grupisanje – crvene tačkice) i spavanja (S grupisanje – zelene zvezdice); **(B)** razdvajanje NREM (NR grupisanje – zeleni krstići) i REM (R grupisanje – plavi kružići) epoha. Svaki simbol predstavlja jednu 10 s epohu. Epohe budnosti na finalnom grafiku razdvajanja faza spavanja su samo prenešene iz prethodnog razdvajanja budnosti i spavanja.

Našu proceduru diferenciranja NREM i REM faze spavanja smo dodatno testirali putem linearne korelacije relativnih amplituda tipičnih EEG frekventnih opsega za NREM i REM fazu spavanja tj. amplitude sigma i teta opsega (**Slika 3.5.**), da bi smo uporedili istovetnost diferencijacije u fiziološkim i patološkim uslovima, posebno u leziji PPT jedra. Rezultati ove analize su pokazali da je diferenciranje NREM faze spavanja od REM faze spavanja u našim istraživanjima vršeno na isti način, a i sa istim eventualnim greškama, i u fiziološkim i u patološkim uslovima (**Slika 3.5.**).

• Kontrola

• PPT lezija



**Slika 3.5.** Diferenciranje NREM i REM 10 s epoha na osnovu linearne korelacije sigma i teta relativnih amplituda kod fiziološke kontrole i PPT lezije. Zadebljane vrednosti pokazuju umerenu negativnu korelaciju.

Arhitektura spavanja predstavlja ukupno trajanje svake faze spavanja, u toku šestočasovnog registrovanja. Za svaku pojedinačnu životinju je definisana arhitektura spavanja, a zatim je za svaku eksperimentalnu i starosnu grupu izračunato grupno srednje trajanje budnosti, NREM i REM faze spavanja u toku 6 h.

Epizoda svake faze spavanja (budnost, NREM, REM) predstavlja ili pojedinačnu (10 s) ili niz istoimenih, uzastopnih 10 s epoha (20 s, 30 s...), koji se prekida sa prvom neistoimenom 10 s epohom. Za potrebe analize dinamike epizoda svih faza spavanja (broj i trajanje epizoda svake faze spavanja na 6 h), prvo su određene epizode svih faza spavanja kod svake pojedinačne životinje, a onda i njihove grupne srednje vrednosti.

Za analizu EEG mikrostrukture, tj. za analizu relativnih amplituda svih konvencionalnih EEG frekventnih opsega ( $\delta = 0,3-4$  Hz;  $\theta = 4,1-8$  Hz;  $\sigma = 10,1-15$  Hz;  $\beta = 15,1-30$  Hz;  $\gamma = 30,1-50$  Hz), određivali smo grupnu raspodelu gustine verovatnoće relativnih amplituda u toku budnosti, NREM i REM faze spavanja koristeći PDE funkciju (eng. „Probability Density Estimation“) u MATLAB 6.5 programu. Da bismo izbegli bilo kakav uticaj individualnog variranja apsolutne amplitude signala, računali smo relativne Furijeove amplitude (Saponjic i sar., 2013; Petrovic i sar., 2013a; 2013b; 2014; Ciric i sar., 2015; 2016):

$$(RA)_b = \frac{\sum Amp}{\sum_{tot} Amp}, b=\{\delta, \theta, \sigma, \beta, \gamma\}.$$

Naime, za svaku fazu spavanja i za svaku eksperimentalnu (fiziološka kontrola ili ledirani pacovi) i starosnu grupu (3 meseca; 3,5 meseca; 4,5 meseca i 5,5 meseca stari pacovi), relativne amplitude  $(RA)_b$  svih 10 s epoha svakog EEG frekventnog opsega smo grupisali u jedinstveni ansambl, koji smo dalje koristiti za PDE analizu. Grupne raspodele gustine verovatnoće smo zatim usrednjili na



60 min za budnost i NREM fazu, a na 30 min za REM fazu spavanja, zbog statističke obrade podataka.

Takođe smo crtali i EEG spektrograme REM faze koristeći iste parametre Furijeove analize: 10 s Furijeova epoha (frekventna rezolucija  $y$  - ose 0,1 Hz), korak pomeranja Furijeove epohe 10 s (vremenska rezolucija  $x$  - ose 10 s).

Za potrebe analize motorne kontrole u toku spavanja računali smo kortikomuskularne koherencije (CMC) između EEG signala senzomotorne, odnosno motorne kore, i EMG signala dorzalne vratne muskulature. Koherencija predstavlja meru linearne korelacije u frekventnom domenu, i definisana je kao kvadrirana vrednost kros-spektra koja je normalizovana auto-spektrom dva signala (Jung i sar., 2012). Kada su dva signala u apsolutnom linearnom odnosu koherencija je jednaka jedinici, a u njihovoj apsolutnoj linearnoj nezavisnosti je jednaka nuli. CMC vrednosti smo računali pomoću „cohere” rutine u MATLAB 6.5 programu (Jung i sar., 2012; Petrović, 2014; Ciric i sar., 2016). Kortikomuskularna koherencija u stvari računa koherenciju kvadriranog modula dva signala  $x$ (EEG) i  $y$ (EMG) kao:

$$C_{xy}(f) = \frac{|P_{xy}(f)|^2}{P_{xx}(f)P_{yy}(f)},$$

gde  $f$  predstavlja određenu frekvenciju ili frekventni opseg signala od interesa, dok  $P_{xy}(f)$  predstavlja kros-spektralnu gustinu dva signala  $x$  i  $y$ , a  $P_{xx}(f)$  i  $P_{yy}(f)$  predstavljaju auto-spektre dva signala  $x$  i  $y$  (Jung i sar., 2012; Petrović, 2014; Ciric i sar., 2016).

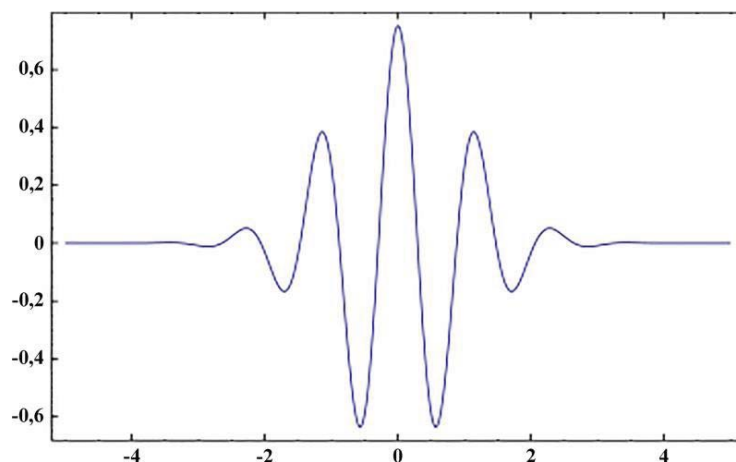
Sve  $P_{xy}(f)$ ,  $P_{xx}(f)$  i  $P_{yy}(f)$  vrednosti su određivane za svaku 10 s epohu šestočasovnih EEG i EMG signala svake faze spavanja, i za svaku pojedinačnu frekvenciju u okviru opsega od 0,3 - 50 Hz, sa rezolucijom od 0,1 Hz. Ovako dobijene CMC vrednosti smo zatim usrednjili u okviru svakog konvencionalnog EEG frekventnog opsega ( $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\sigma$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), i potom za svaku fazu i

svaku eksperimentalnu i starosnu grupu smo izračunali grupne srednje vrednosti koherencije na 60 min za budnost i NREM fazu, a na 30 min za REM fazu spavanja.

Za potrebe definisanja celokupne patologije REM spavanja u pacova sa obostranom lezijom PPT jedra analizirali smo dinamiku vretena spavanja motorne kore. Ova analiza je podrazumevala praćenje broja i trajanja vretena, zatim frekvenciju pojavljivanja vretena, kao i njihovu unutrašnju frekvenciju. Za detekciju vretena spavanja koristili smo kontinualnu transformaciju talasića - CWT (eng. „Continuous Wavelet Transform“). Naime, svaki talasić predstavlja funkciju koja osciluje oko vremenske ose na malom intervalu, a izvan njega brzo opada ka nuli (Mallat, 2009), pa nam CWT omogućava da detektujemo i lokalizujemo promene čija je vrednost transformacije veća od nule. Za osnovni talasić (eng. „mother wavelet“) u okviru „wavelet toolbox“-a u MATLAB 6.5 postoji funkcija „cmorl-2“ što označava kompleksni Morletov talasić centralne frekvencije 2, a mi smo za samu kontinualnu transformaciju talasića koristili komandu „cwt“. Morletov talasić je predstavljen jednačinom:

$$\psi\left(\frac{t-b}{a}\right) = \frac{1}{\pi^{1/4}} e^{i2\pi f_0 [(t-b)/a]} e^{-[(t-b)/a]^2},$$

gde  $t$  predstavlja vreme, a  $a$  je parametar skaliranja (stepen razvučenosti), tako da osnovni talasić može da bude razvučen ili zbijen, u zavisnosti od ciljane frekvencije, i pomeran duž signala zahvaljujući translacionom parametru  $b$  (Adamczyk i sar., 2015). Pošto prethodni osnovni talasić predstavlja kompleksnu funkciju vremena, ne može se eksplicitno predstaviti grafikom. Zato je, kao ilustracija, na **Slici 3.6.** prikazana realna verzija Morletovog osnovnog talasića, koja ima isti oblik kao i realna i imaginarna komponenta kompleksnog Morletovog talasića. Za osnovni talasić smo odredili centralnu frekvenciju  $f_0 = 2$ , koja najviše odgovara talasnom obliku vretena (Adamczyk i sar., 2015).



Slika 3.6. Grafički prikaz realnog Morletovog osnovnog talasića.

Sama analiza talasića podrazumeva određivanje kompleksnih koeficijenata transformacije po formuli:

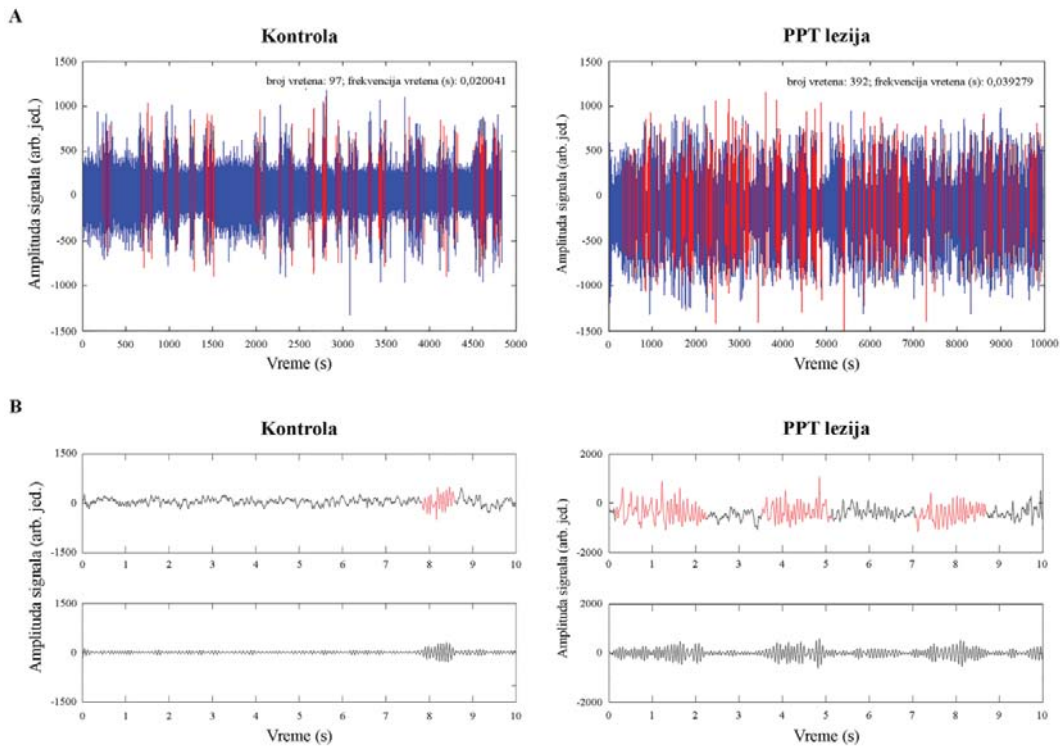
$$[W_{\psi} f](a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi\left(\frac{t-b}{a}\right) s(t) dt,$$

koji zavise kako od analitičkog izraza za osnovni talasić tako i od oblika signala,  $s(t)$ , ali samo u intervalu gde se osnovni talasić značajno razlikuje od nule. Pošto se promenom parametra  $b$  osnovni talasić stalno pomera po vremenskoj osi, u stvari se vrši jedna vrsta testiranja gde ispitivani biološki signal više liči po obliku na osnovni talasić. Tamo gde je ta sličnost veća, raste i amplituda kompleksnog koeficijenta transformacije. Ako ta amplituda pređe određeni kritični nivo, detektovan je kandidat za vreteno. Uz to, promenom parametra  $a$  osnovni talasić se na tom mestu vremenske ose sažima ili širi, menjajući pri tom svoju frekvenciju, i kad se ta frekvencija poklopi sa frekvencijom kandidata za vreteno, amplituda koeficijenta transformacije je maksimalna po  $a$ -osi. Time smo odredili i trenutak pojave i unutrašnju frekvenciju dela signala koja je kandidat za vreteno. Finalna odluka da li je vreteno detektovano ili ne zavisi od

postavljenog kritičnog nivoa amplitude koeficijenta, a taj kriterijum nije lako odrediti jer zavisi od više spoljašnjih faktora, pa i individue koja generiše signal. Pokazalo se da je skup kandidata za vreteno veoma bogat kako po talasnim oblicima, tako i po trajanju i po unutrašnjoj frekvenciji. Ma kako postavili kritični nivo, greške, i to ne male, su neminovne, što potvrđuju i drugi autori (Warby i sar., 2014; Adamczyk i sar., 2015; Ujma i sar., 2015). Te greške su utvrđivane kao razlike u broju detektovanih vretena kako između različitih numeričkih metoda i vizuelnih rezultata iskusnih kliničara, tako i između samih različitih algoritama. Drugi kriterijum da bi neki kandidat bio proglašen za vreteno je da mora da traje najmanje 0,5 s, a vrednost CWT-a treba da pređe, kao što je rečeno, određen kritični nivo. Grupni kritični nivo kod fizioloških kontrola je iznosio 6,75, a kod PPT lediranih pacova 5,5. Trajanje kandidata za vreteno se određuje na sledeći način: amplituda kompleksnog koeficijenta transformacije,  $|[W_{\psi}f](a,b)|$ , geometrijski predstavlja krivu 2-dimenzionalnu površinu nad  $(a,b)$  ravni. Ako uvedemo kritični nivo te amplitude, u oznaci  $n_{kr}$ , tada je jednačinom  $|[W_{\psi}f](a,b)| = n_{kr}$  određen niz kontura, zatvorenih ako su dovoljno udaljene od granica polja ispitivanja, pri čemu je svaka zatvorena kontura kandidat za vreteno. Projekcijom svake konture na vremensku osu dobija se duž čije je trajanje određeno razlikom maksimalne i minimalne tačke duži. Srednji stepen razvučenosti talasića određen je usrednjavanjem svih tačaka projekcije konture na ortogonalnu „a” osu. Veza između stepena razvučenosti osnovnog talasića i unutrašnje frekvencije vretena određena je analizom niza matematički generisanih vretena, sa različitim ali poznatim unutrašnjim frekvencijama. Za taj niz, zavisnost usrednjenih vrednosti ordinata kontura (srednjih vrednosti parametra  $a$ ) i unutrašnjih frekvencija matematičkih talasića bila je linearna sa visokim stepenom značajnosti i omogućila je konstrukciju kalibracione prave koju smo koristili u kasnijim merenjima.

Naime, sve 10 s epohe koje pripadaju REM fazi jedne životinje su spojene u novi signal, koji smo filtrirali pojasnim filterom od 11 do 17 Hz, i ovako

filtrirane signale smo koristili za detekciju vretena spavanja. Nakon kontinualne transformacije talasića, za svaku životinju smo dobili frekvenciju pojavljivanja vretena (Hz) – broj vretena normalizovan ukupnim trajanjem REM faze. Pošto je talasne oblike koji su detektovani a nisu vretena („lažno pozitivni“) moguće naknadno eliminisati, dok nedetektovana vretena („lažno negativni“) nije moguće naknadno uvrstiti u račun, namerno se išlo na niže vrednosti kritičnih nivoa od ravnotežnih (gde bi broj lažno pozitivnih i negativnih bio izjednačen). Stoga, zbog posledične pojave većeg broja lažno pozitivnih vretena pribegli smo vizuelnom potvrđivanju ili odbacivanju svakog pojedinačnog, automatski detektovanog vretena, i na taj način smo izolovali i objedinili sva vizuelno detektovana vretena. Nakon vizuelno korigovanog broja vretena i njihove frekvencije pojavljivanja u svakog pacova (**Slika 3.7.A.**) mogli smo da odredimo srednju vrednost frekvencije vretena spavanja, njihovu grupnu srednju vrednost trajanja i unutrašnje frekvencije, kao i raspodele trajanja i unutrašnje frekvencije svih detektovanih vretena spavanja u fiziološkim i patološkim uslovima. Na **Slici 3.7.** su predstavljeni individualni primeri filtriranih EEG signala motorne kore u toku REM faze spavanja u vremenskom domenu, sa automatski obeleženim vretenima spavanja u kontrolnog pacova i lediranog pacova (PPT lezija), kao i vretena spavanja različitog oblika i trajanja.



**Slika 3.7. Detekcija vretena spavanja.** (A) Individualni primeri filtriranih EEG signala motorne kore, koji su konkatenirani u celokupnom vremenskom domenu REM faze spavanja, sa automatski obeleženim vretenima spavanja; (B) i primeri njihovih pojedinačnih analognih i filtriranih 10 s epoha sa vizuelno korigovanim obeležavanjem vretena spavanja različitog oblika i trajanja, u različitim eksperimentalnim uslovima.

### 3.7. Statistička obrada podataka

S obzirom da u prethodnim studijama (Saponjic i sar., 2013; Petrovic i sar., 2013a) nismo našli statistički značajne razlike u arhitekturi spavanja i EEG mikrostrukturi, između fiziološke kontrole (pacovi bez ikakve manipulacije u mozgu) i unilateralne ili bilateralne lažne lezije (pacovi sa unilateralnom ili bilateralnom mikroinfuzijom 100 nl 0,1 M PBS), svi rezultati su prikazani u odnosu na fiziološku kontrolu. Takođe, samo one promene koje su trajale u poslednja dva uzastopna perioda starenja koja smo pratili, smo smatrali konzistentnim promenama uslovljene starenjem.

Svi rezultati istraživanja su predstavljeni kao grupne srednje vrednosti  $\pm$ /+ standardna greška (SE). Za statističku obradu podataka je korišćen softverski paket SPSS Statistics 19. Za analizu statističke značajnosti je korišćen Kruskal-Walis ANOVA test, kao neparametrijska jednofaktorska analiza varijanse, sa Mann-Whitney U kontrastnim testom. Za analizu linearne korelacije korišćen je Pearson-ov test. Statistički značajnim razlikama su smatrane one kod kojih je  $p \leq 0,05$ , i one su na graficima i u tabelama obeležene simbolom \* ili su zadebljane.

## *4. Rezultati*



U skladu sa prethodno postavljenim ciljevima, rane elektrofiziološke znake poremećaja spavanja i motorne kontrole smo ispitivali u fiziološkom starenju i u starenju pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona.

#### **4.1. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u fiziološkom starenju pacova**

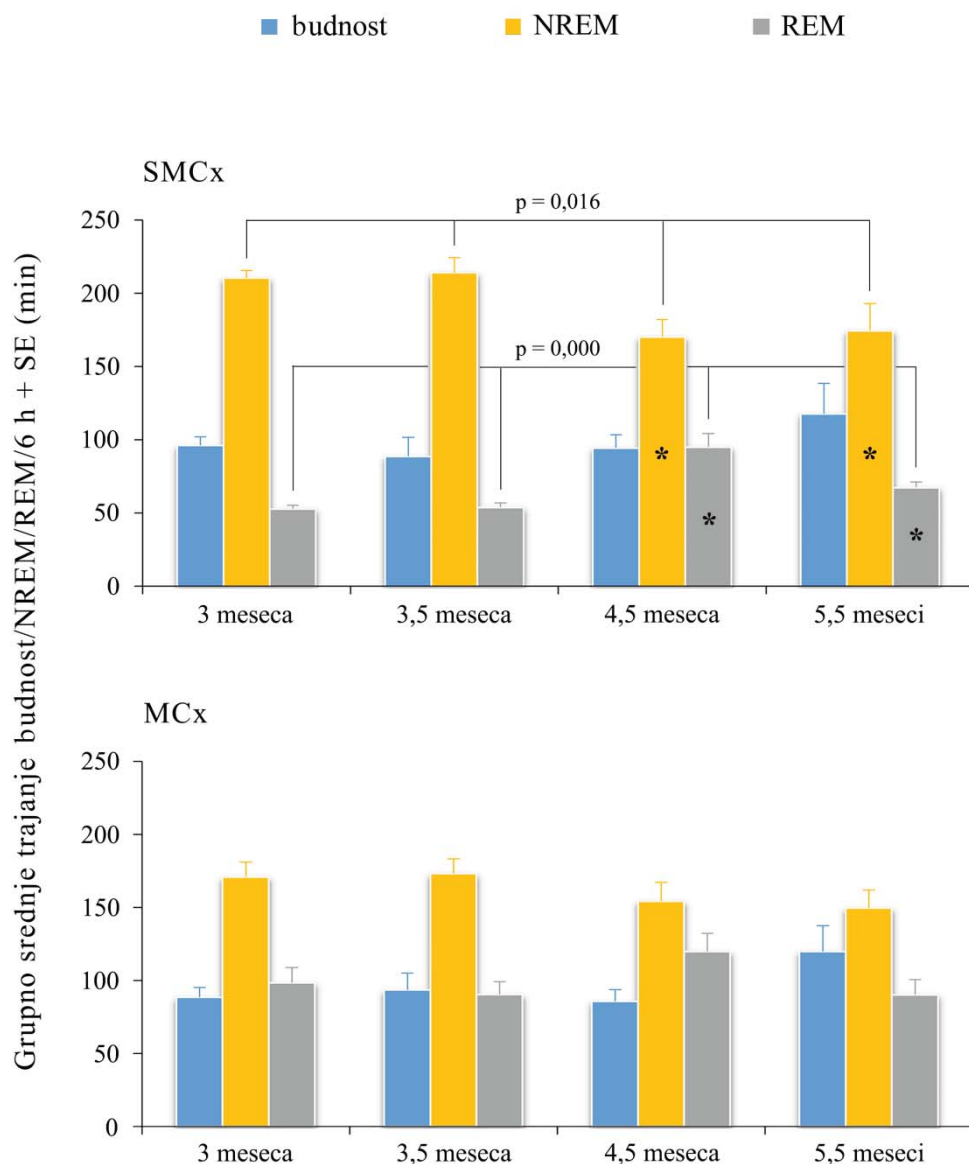
Uticaj fiziološkog starenja na spavanje i motornu kontrolu dorzalne vratne muskulature u toku spavanja je praćen putem analize promena u: arhitekturi spavanja (trajanje pojedinačnih faza spavanja u toku 6 h), dinamici epizoda tri osnovne faze spavanja (broj i trajanje epizoda osnovnih faza spavanja), EEG mikrostrukturi (promene relativnih amplituda svih konvencionalnih EEG frekventnih opsega svake osnovne faze spavanja) i motornoj kontroli u toku svake faze spavanja (promene u propagaciji oscilacija od kore velikog mozga ka mišićima dorzalne vratne muskulature, merene kortikomuskularnom koherencijom). Poremećaj spavanja i motorne kontrole u toku spavanja, uslovljen procesom starenja, je praćen u fiziološkim kontrolama, kojima su implantirane EEG i EMG elektrode za hronično registrovanje spavanja, tokom perioda od 5,5 meseci: 3 meseca starosti (n = 15); 3,5 meseca starosti (n = 10); 4,5 meseca starosti (n = 10) i 5,5 meseci starosti (n = 7).

##### **4.1.1. Topografija arhitekture i dinamike epizoda spavanja u fiziološkom starenju pacova**

Promene u trajanju budnosti, NREM i REM faze spavanja u fiziološkom starenju pacova su praćene na osnovu analize EEG signala senzomotorne (SMCx) i motorne (MCx) kore velikog mozga pacova. Analiza EEG signala SMCx je pokazala da fiziološko starenje izaziva promene u arhitekturi spavanja (**Slika 4.1., Tabela 4.1.**): skraćuje trajanje NREM faze ( $\chi^2 = 10,37$ ;  $p = 0,02$ ), produžava trajanje REM faze ( $\chi^2 = 18,34$ ;  $p = 10^{-4}$ ), dok se trajanje budnosti u toku 6 h spavanja nije menjalo ( $\chi^2 = 3,04$ ;  $p = 0,39$ ). Promene u trajanju NREM i REM faze su se prvi put javile u 4,5 meseca starosti (NREM:  $z = -2,42$ ;  $p = 0,02$ ;

REM:  $z = -3,45$ ;  $p = 0,00$ ) i nisu se promenile ni nakon 5,5 meseci starenja (NREM:  $z = -2,11$ ;  $p = 0,04$ ; REM:  $z = -2,43$ ;  $p = 0,02$ ), pa ih možemo smatrati konzistentnim. Nasuprot tome, starenje u MCx nije izazvalo promene u trajanju budnosti, NREM i REM faze spavanja u toku istog perioda starenja (**Slika 4.1.**, **Tabela 4.1.**;  $\chi^2 \geq 3,19$ ;  $p \geq 0,27$ ). Ovim smo dokazali topografsku razliku u arhitekturi spavanja u fiziološkom starenju (različito trajanje budnosti, NREM i REM faze spavanja, na osnovu analize EEG signala senzomotorne kore u odnosu na motornu koru).

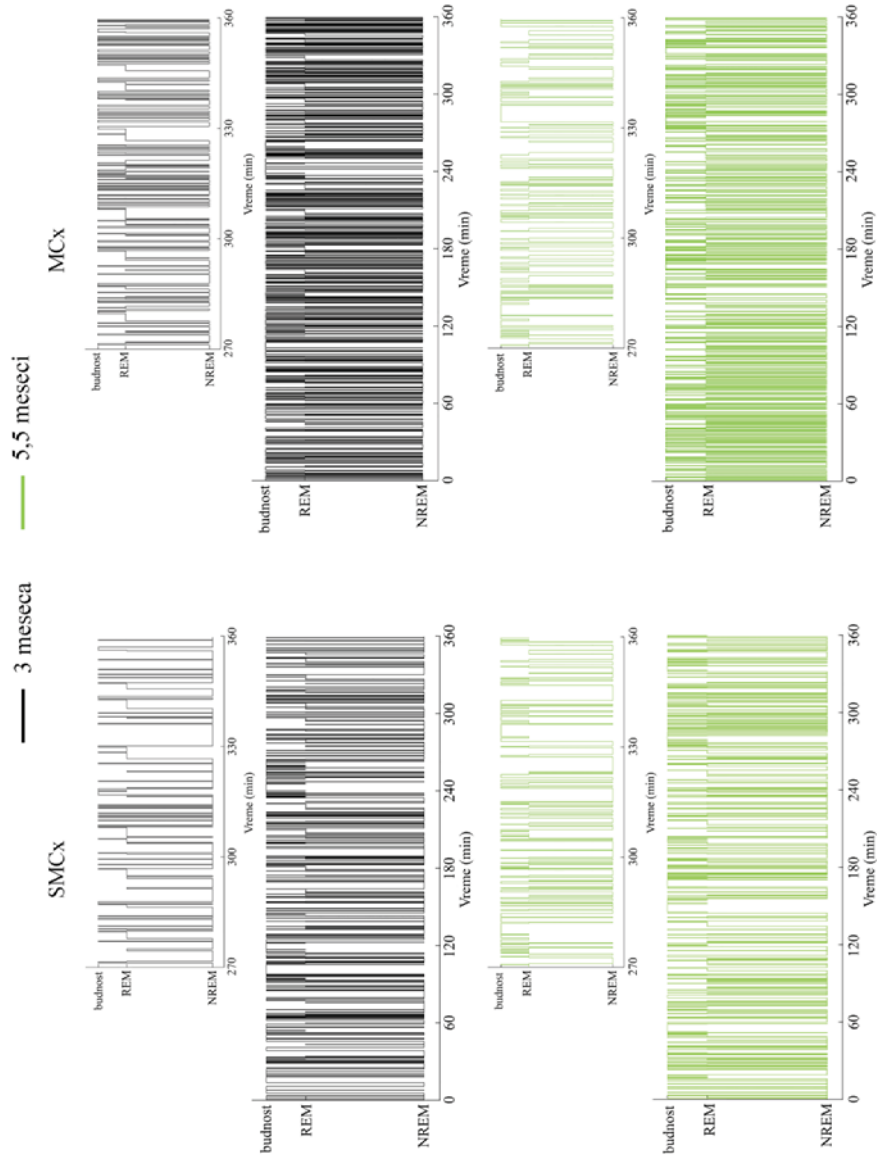
Individualni primeri šestočasovnih hipnograma SMCx i MCx, na početku i na kraju starosnog perioda koji smo pratili, dobijeni iz jednog pacova, a koji predstavljaju grupne rezultate (**Tabela 4.1.**), su prikazani na **Slici 4.2.**



**Slika 4.1. Topografija arhitekture spavanja u fiziološkom starenju pacova od 3 – 5,5 meseci starosti:** srednje trajanje budnosti, NREM i REM faza spavanja svake starosne grupe u toku 6 h + standardna greška (SE) u minutima. SMCx – senzomotorna kora; MCx – motorna kora;  $p$  – statističke značajnosti Kruskal-Wallis ANOVA testa. \* predstavlja statistički značajne razlike srednjih vrednosti za  $p \leq 0,04$  dobijene Mann-Whitney U testom.

Fiziološko starenje izaziva promene arhitekture spavanja samo u SMCx, skraćuje trajanje NREM faze, produžava trajanje REM faze, dok se trajanje budnosti u toku 6 h spavanja nije menjalo.

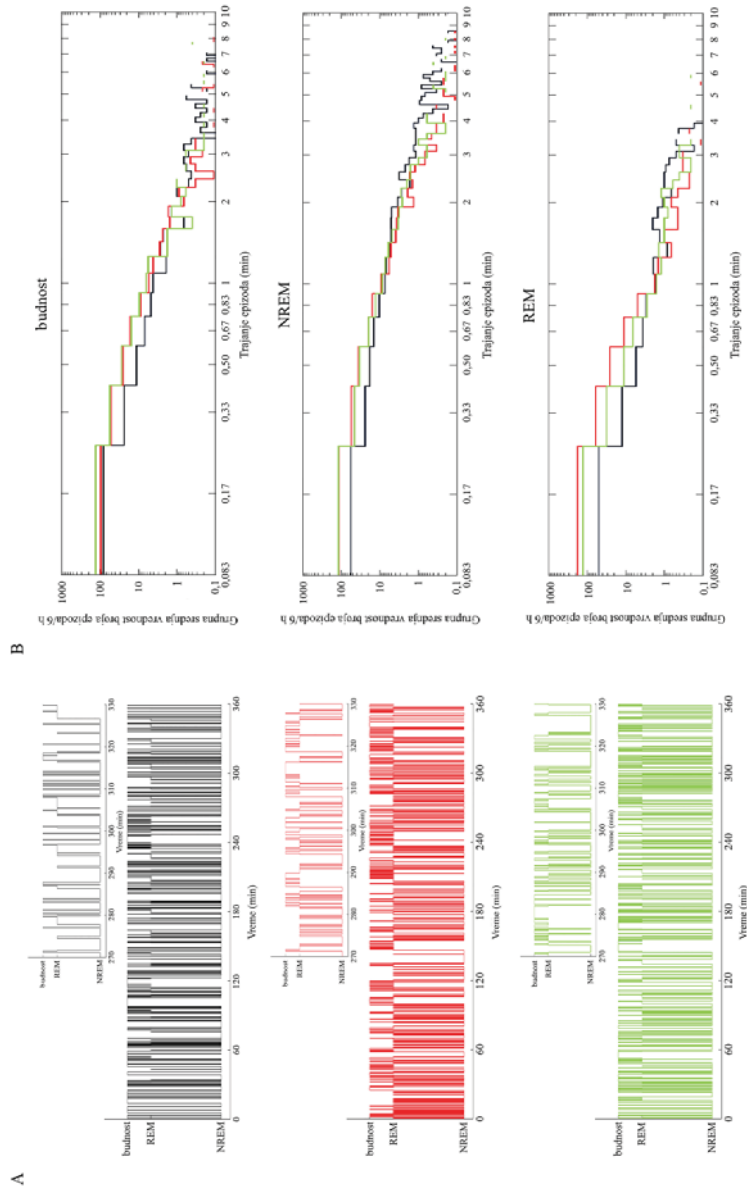




Slika 4.2. Tipični individualni primeri različitih SMCx i MCx hipnograma za vreme 6 h spavanja (spavanje registrovano od 9 h do 15 h), na početku (3 meseca) i na kraju (5,5 meseci) perioda starenja koji smo pratili, sa njihovim odgovarajucim insertima od 90 min. Kod ovog pacova broj epizoda u toku 6 h registrovanja za budnost/NREM/REM je 188/188/106 u SMCx, a 294/313/146 u MCx na početku; dok je na kraju perioda starenja broj epizoda bio 202/202/183 u SMCx, a 222/297/260 u MCx.

S obzirom da fiziološko starenje dovodi do promena u arhitekturi spavanja samo u SMCx, tipični primeri SMCx hipnograma i njihove grupne distribucije trajanja i broja epizoda budnosti, NREM i REM faze spavanja u različitim starosnim grupama su prikazani na **Slikci 4.3.**, kao i u **Tabeli 4.1.** Iako starenje povećava srednju vrednost broja NREM i REM epizoda, kraćeg trajanja u SMCx (**Slika 4.3.B.**, **Tabela 4.1.**;  $\chi^2 \geq 9,21$ ;  $p \leq 0,03$ ), ukupno trajanje NREM faze spavanja se smanjuje (**Slika 4.1.**, **Tabela 4.1.**) usled većeg smanjenja NREM epizoda dužeg trajanja (**Slika 4.3.B.**), dok se ukupno trajanje REM faze spavanja povećalo (**Slika 4.1.**, **Tabela 4.1.**) usled znatnog povećanja broja kraćih REM epizoda (**Slika 4.3.B.**).

Iako starenje nije uticalo na arhitekturu spavanja u MCx (**Slika 4.1.**, **Tabela 4.1.**), dovelo je do skraćenog trajanja REM epizoda kod pacova starosti 5,5 meseci (**Tabela 4.1.**;  $\chi^2 = 9,15$ ;  $p = 0,03$ ).



**Slika 4.3. Tipični primeri šestočasovnih hipnograma spavanja u SMCx u različitim starosnim grupama sa njihovim odgovarajućim insertima od 60 min (A), i njihove odgovarajuće grupne distribucije srednjeg trajanja i broja epizoda budnosti, NREM i REM faze spavanja u različitim starosnim grupama (B). U ovim log-log grupnim distribucijama srednjeg broja epizoda u funkciji njihovog srednjeg trajanja/6 h, svaki „horizontalni stepenik“ je postavljen iznad njegovog odgovarajućeg trajanja, koji je predstavljen na x - osi u minutima - npr. grupna srednja vrednost broja epizoda/6 h od 10 s je postavljen iznad  $10/60 = 0,17$  min itd. Delovi distribucije koji nedostaju predstavljaju srednju vrednost broja epizoda koji je jednak nuli, a logaritmovana vrednost ga identifikuje kao da nije broj.**

#### 4.1.2. Topografija EEG mikrostrukture svih faza spavanja u fiziološkom starenju pacova

Za dalje otkrivanje ranih elektrofizioloških znaka poremećaja spavanja u fiziološkom starenju analizirali smo promene relativnih amplituda svih EEG frekventnih opsega u okviru svake faze spavanja (EEG mikrostruktura budnosti, NREM i REM faze spavanja) svih starosnih grupa. Analiza EEG mikrostrukture budnosti, NREM i REM faze je pokazala topografski različit efekat fiziološkog starenja, a promene su bile prolaznog karaktera.

Naime, fiziološko starenje ne menja EEG mikrostrukturu budnosti u toku 6 h spavanja u SMCx ( $\chi^2 \geq 1,41$ ;  $p \geq 0,09$ ) i MCx ( $\chi^2 \geq 3,23$ ;  $p \geq 0,08$ ), izuzev povećanja sigma relativne amplitude budnosti u SMCx na kraju perioda starenja tj. u 5,5 meseci starosti ( $\chi^2 = 10,61$ ;  $p = 0,01$ ;  $z = -2,03$ ;  $p = 0,04$ ). S obzirom da je ovo povećanje sigma relativne amplitude budnosti bilo prolazno, i samo u SMCx, EEG mikrostruktura budnog stanja nije prikazana.

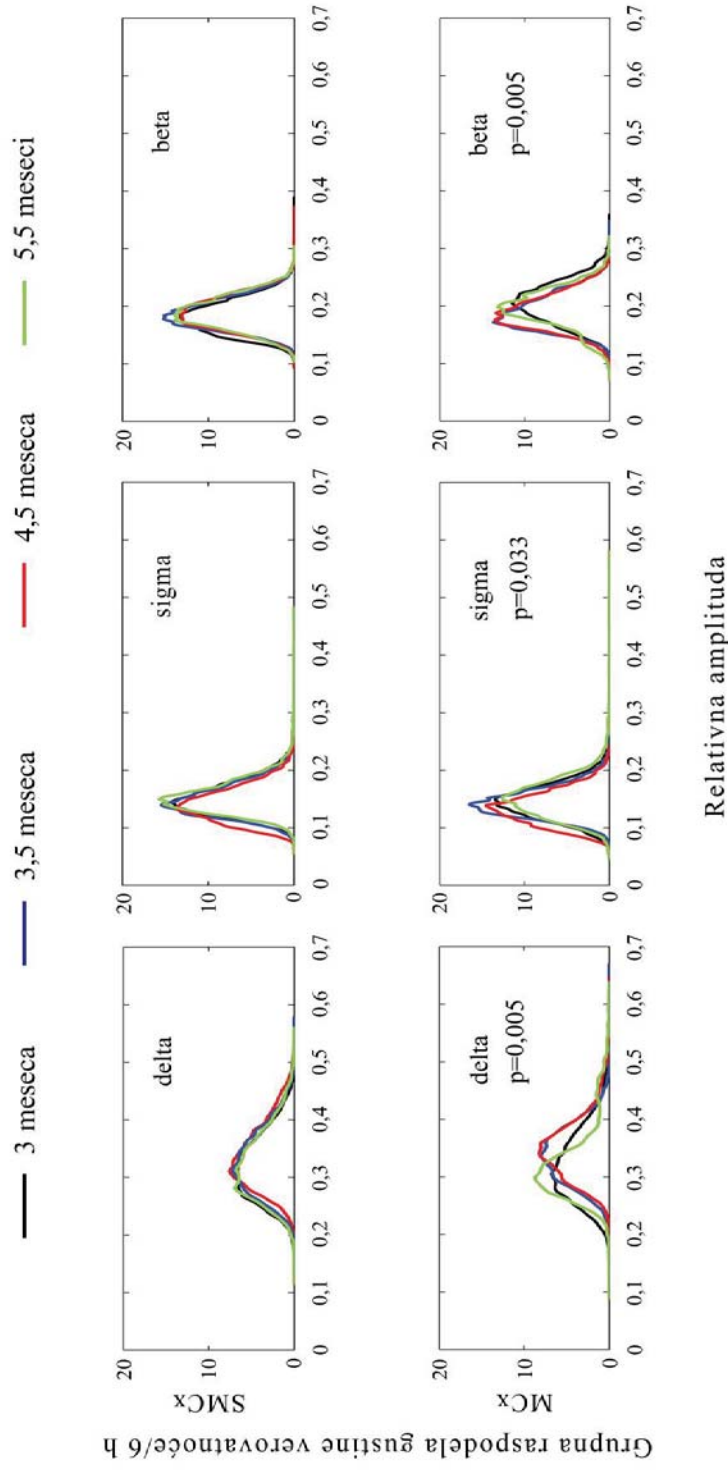
Takođe, fiziološko starenje ne menja EEG mikrostrukturu NREM faze u SMCx (**Slika 4.4.**;  $\chi^2 \geq 3,72$ ;  $p \geq 0,08$ ), ali prolazno povećava delta relativnu amplitudu ( $\chi^2 = 13,01$ ;  $p = 0,005$ ;  $z \geq -2,19$ ;  $p \leq 0,03$ ) i smanjuje sigma i beta relativne amplitude ( $\chi^2 \geq 8,72$ ;  $p \leq 0,03$ ;  $z \geq -2,20$ ;  $p \leq 0,03$ ) u MCx u 3,5 i 4,5 meseci starosti (**Slika 4.4.**). Na kraju perioda starenja ove promene se vraćaju na kontrolne vrednosti.

U toku REM faze (**Slika 4.5.**), u pacova 4,5 meseci starosti, došlo je do povećanja delta relativne amplitude ( $\chi^2 = 28,07$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z = -4,36$ ;  $p = 10^{-4}$ ), koje je praćeno smanjenjem teta, sigma i beta relativnih amplituda u SMCx ( $\chi^2 \geq 12,88$ ;  $p \leq 0,005$ ;  $z \geq -2,36$ ;  $p \leq 0,02$ ). Međutim, ove promene relativnih amplituda su bile prolaznog karaktera i kod pacova 5,5 meseci starosti su se vratile na kontrolne vrednosti. Takođe, fiziološko starenje prolazno povećava REM teta relativnu amplitudu u MCx ( $\chi^2 = 14,35$ ;  $p = 0,002$ ;  $z \geq -2,46$ ;  $p \leq 0,01$ ), od 3 do 4,5 meseci starosti, i praćeno je smanjenjem sigma relativne amplitude



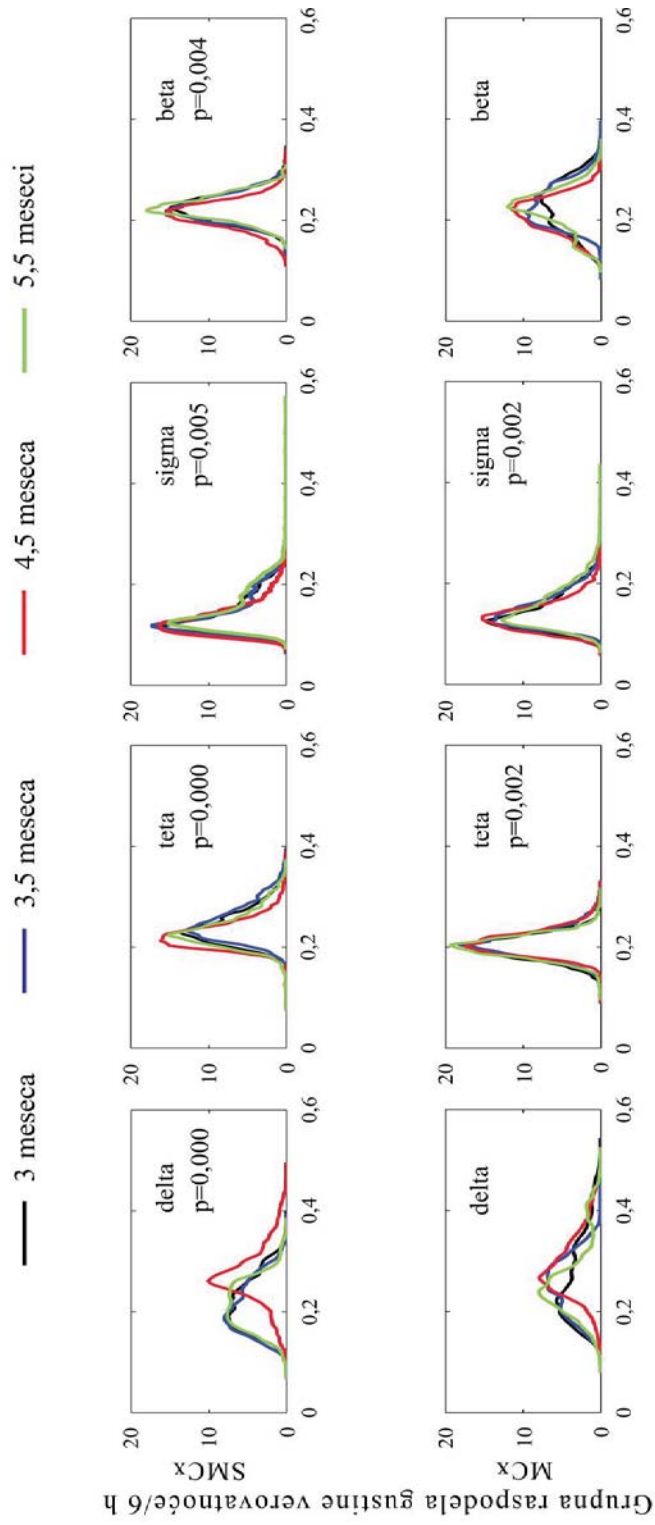
samo kod pacova 4,5 meseci starosti (**Slika 4.5.**;  $\chi^2 = 15,37$ ;  $p = 0,002$ ;  $z = -2,14$ ;  $p = 0,03$ ). Na kraju perioda starenja koji smo pratili (5,5 meseci starosti), REM sigma amplituda u MCx se prolazno povećava.

## NREM



**Slika 4.4. Topografija EEG mikrostrukture NREM faze u fiziološkom starenju pacova (3 - 5,5 meseci).** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih EEG delta, sigma i beta amplituda/6 h u toku NREM faze nakon 3 meseca (crna linija, n=15), 3,5 meseca (plava linija, n=10), 4,5 meseca (crvena linija, n=10) i 5,5 meseci starosti (zeleno linija, n=7). SMCx - senzomotorna kora; MCx - motorna kora. *p* - statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa.

## REM



**Slika 4.5. Topografija EEG mikrostrukture REM faze u fiziološkom starenju pacova (3 - 5,5 meseci).** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih EEG delta, teta, sigma i beta amplituda/6 h u toku REM faze nakon 3 meseca (crna linija, n=15), 3,5 meseca (plava linija, n=10), 4,5 meseca (crvena linija, n=10) i 5,5 meseci starosti (zeleno linija, n=7). SMCx - senzomotorna kora; MCx - motorna kora.  $p$  - statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa.

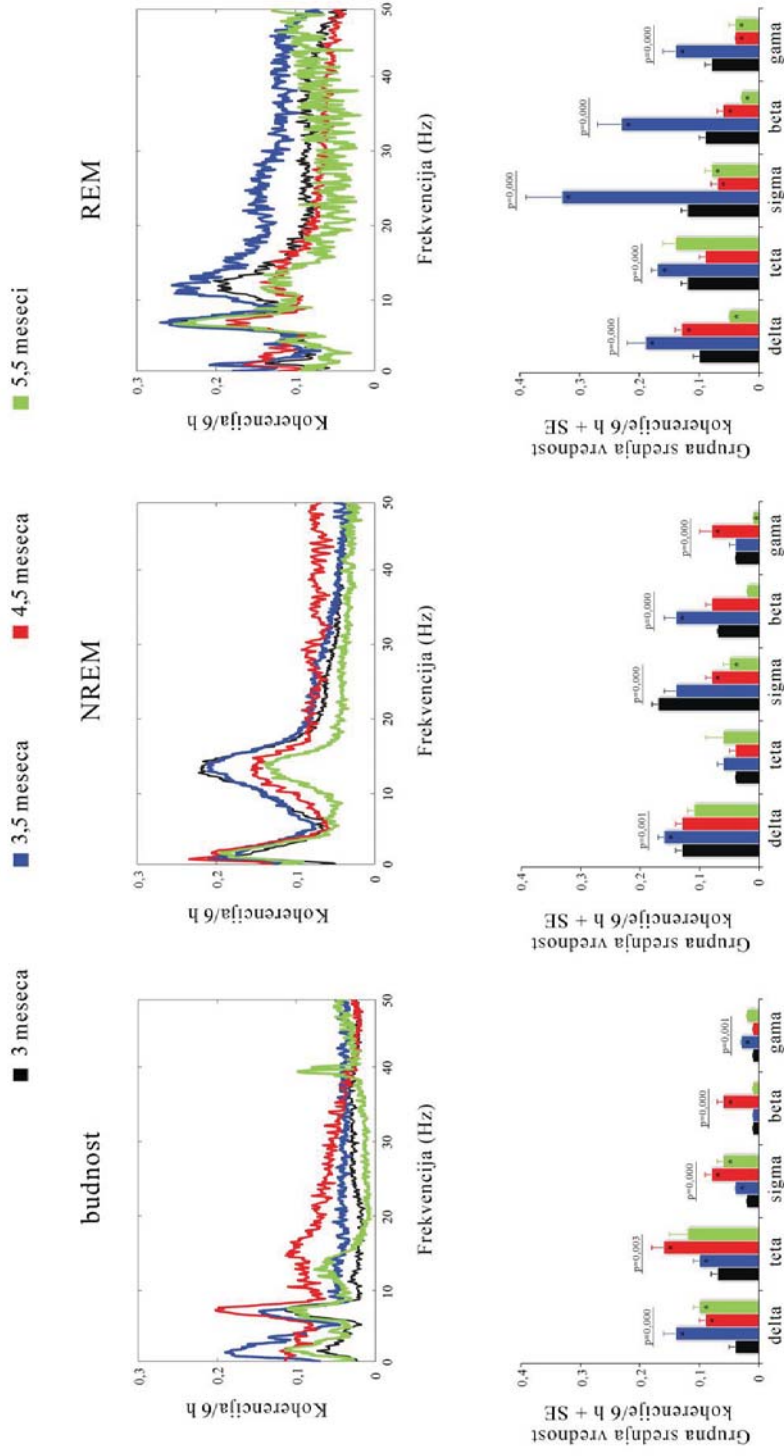
### 4.1.3. Topografske promene motorne kontole u spavanju izazvane fiziološkim starenjem

Promene motorne kontrole vratnih mišića u toku spavanja smo analizirali korišćenjem CMC, kao mere propagacije oscilacije od kore velikog mozga do perifernih mišića. Analiza CMC vrednosti, pokazala je da je motorna kontrola vratnih mišića iz SMCx u fiziološkim uslovima najviše iskazana CMC vrednostima u teta frekventnom opsegu u toku budnosti i REM faze, a CMC vrednostima u sigma frekventnom opsegu u NREM fazi (**Slika 4.6.**). Motorna kontrola vratnih mišića iz MCx u fiziološkom uslovima je najviše iskazana CMC vrednošću u teta frekventnom opsegu u budnosti, u delta frekventnom opsegu u NREM fazi, dok je u REM fazi najviša CMC vrednost u sigma frekventnom opsegu (**Slika 4.7.**).

Fiziološko starenje dovodi do dugotrajnih promena motorne kontrole vratnih mišića iz senzomotorne kore koje su se ispoljile kao povećanje delta, teta i sigma CMC u budnosti ( $\chi^2 \geq 14,11$ ;  $p \leq 0,003$ ), padom sigma CMC u NREM fazi ( $\chi^2 = 35,10$ ;  $p = 0,000$ ), kao i padom delta, sigma, beta i gama CMC u REM fazi (**Slika 4.6.**;  $\chi^2 \geq 28,76$ ;  $p = 0,000$ ). Sa druge strane, izmenjena motorna kontrola vratnih mišića iz motorne kore je bila izražena kao porast delta, teta i beta CMC u budnosti ( $\chi^2 \geq 16,68$ ;  $p \leq 0,001$ ), pad sigma CMC u NREM i REM fazi ( $\chi^2 \geq 15,76$ ;  $p \leq 0,001$ ), ali je u REM fazi došlo i do povećanja delta, beta i gama CMC (**Slika 4.7.**;  $\chi^2 \geq 19,04$ ;  $p = 0,001$ ).

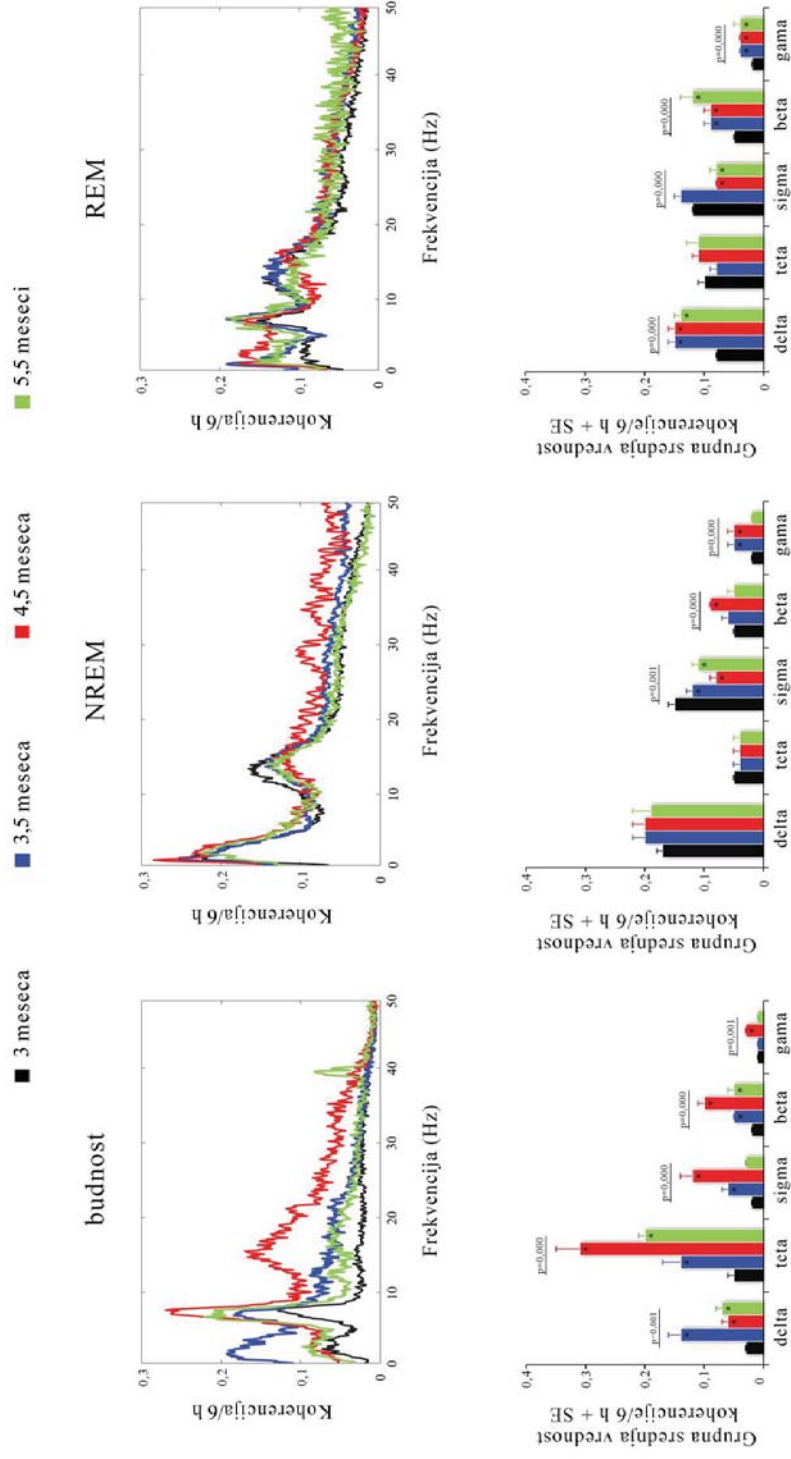
Analiza motorne kontrole u toku spavanja je pokazala topografski različit efekat fiziološkog starenja na propagaciju oscilacija iz različitih delova kore velikog mozga (SMCx i MCx) do dorzalnih vratnih mišića, koje su zavisne od faze spavanja. Starenje motorne kontrole iz MCx je bilo konzistentno izraženo kao povećanje delta i beta CMC u toku budnosti i REM faze spavanja (**Slika 4.7.**;  $\chi^2 \geq 16,68$ ;  $p \leq 0,001$ ). Starenje motorne kontrole iz SMCx je bilo izraženo porastom delta i beta CMC u budnosti, a njihovim padom u REM fazi

(**Slika 4.6.**;  $\chi^2 \geq 18,34$ ;  $p = 0,000$ ). Dodatno, dok fiziološko starenje konzistentno smanjuje sigma CMC za vreme NREM i REM faze iz obe kore (**Slika 4.6.**, **Slika 4.7.**;  $\chi^2 \geq 15,76$ ;  $p \leq 0,001$ ), sigma CMC za vreme budnosti se konzistentno povećava iz SMCx (**Slika 4.6.**;  $\chi^2 = 20,37$ ;  $p = 0,000$ ).



**Slika 4.6. Promene motorne kontrole vratnih mišića iz senzomotorne kore (SMCx) u toku spavanja za vreme fiziološkog starenja pacova (3 – 5,5 meseci).** Srednji koherentni spektri za vreme budnosti, NREM i REM faze, dobijeni između EEG signala senzomotorne kore (SMCx) i EMG signala dorzalnih vratnih mišića, kao i njihovi odgovarajući histogrami grupnih srednjih vrednosti koherencija/6 h + standardna greška (SE) za svaki konvencionalni EEG frekventni opseg (delta, teta, sigma, beta, gama). *p* – statističke značajnosti Kruskal-Wallis ANOVA testa.

\* predstavlja statistički značajne rezultate za  $p \leq 0,03$ , testirane Mann-Whitney U testom.



**Slika 4.7. Promene motorne kontrole vratnih mišića iz motorne kore (MCx) u toku spavanja za vreme fiziološkog starenja pacova (3 – 5,5 meseci).** Srednji koherentni spektri za vreme budnosti, NREM i REM faze, dobijeni između EEG signala motorne kore (MCx) i EMG signala dorzalnih vratnih mišića, kao i njihovi odgovarajući histogrami grupnih srednjih vrednosti koherencija/6 h + standardna greška (SE) za svaki konvencionalni EEG frekventni opseg (delta, teta, sigma, beta, gama). *p* – statističke značajnosti Kruskal-Wallis ANOVA testa.

\* predstavlja statistički značajne rezultate za  $p \leq 0,03$ , testirane Mann-Whitney U testom.

Prvi znaci poremećene motorne kontrole u spavanju, uslovljene fiziološkim starenjem, su se ispoljili kroz promene delta i beta koherencije u budnosti i REM fazi već nakon 3,5 meseca starosti i održali su se do kraja perioda starenja koji smo pratili. Kako se ovo može smatrati zajedničkim početkom promena, a ujedno i fiziološkim markerima izmenjene motorne kontrole u spavanju, u ovim terminima smo dodatno primenili analizu linearne korelacije relativnih amplituda pojedinačnih EEG frekventnih opsega (delte i bete) i njihovih odgovarajućih CMC vrednosti u cilju otkrivanja mogućih funkcionalnih veza. Za analizu linearne korelacije korišćen je Pearson-ov test, a samo rezultati sa najvećim statističkim značajnostima tj. sa najvećim vrednostima  $r$  su prikazani na **Slici 4.8**.

Najveća značajna negativna korelacija je bila u REM fazi kod 4,5 meseca starih pacova, i to između delta relativnih amplituda motorne kore i njenih delta CMC vrednosti (**Slika 4.8.**), gde je inače delta koherencija bila povećana (**Slika 4.7.**), a delta relativna amplituda motorne kore se nije menjala (**Slika 4.5.**). Za vreme budnosti jedina značajna i to pozitivna korelacija je bila između delta relativnih amplituda senzomotorne kore i njenih delta CMC vrednosti (**Slika 4.8.**), gde je takođe delta koherencija bila povećana (**Slika 4.6.**), a delta relativna amplituda senzomotorne kore se nije menjala.

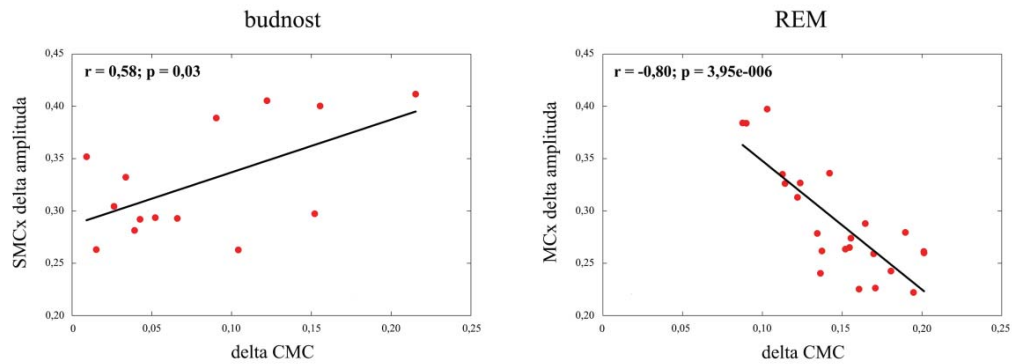
Na kraju perioda starenja koji smo pratili (5,5 meseci stari pacovi) jedine značajne pozitivne korelacije su bile u REM fazi između beta relativnih amplituda motorne kore i njenih beta CMC vrednosti, a u NREM fazi između beta relativnih amplituda senzomotorne kore i njenih beta CMC vrednosti (**Slika 4.8.**). Iako se beta relativna EEG amplituda u NREM i REM fazi u obe kore nije menjala, postoji značajna pozitivna linearna korelacija između EEG beta amplitude i beta CMC.

Dobijeni rezultati najvećih značajnih linearnih korelacija između relativnih amplituda konvencionalnih EEG frekventnih opsega motorne i senzomotorne kore i odgovarajućih CMC vrednosti, po fazama spavanja,

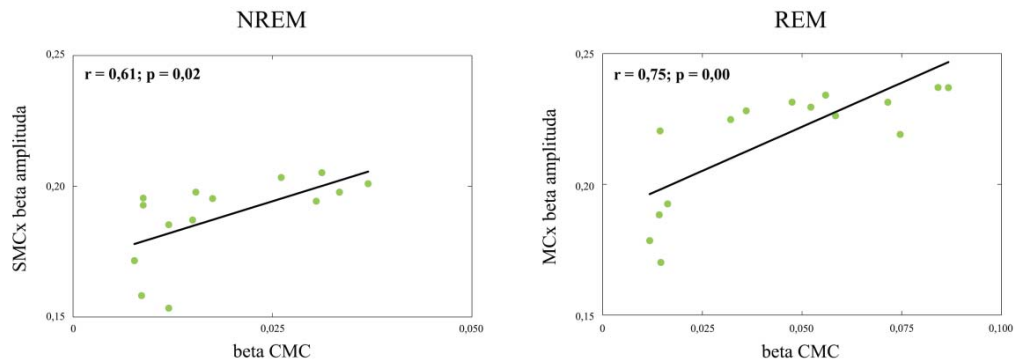


ukazuju da: 1) porast EEG relativne amplitude ne utiče na pojačanje prenosa te oscilacije ka vratnom mišiću (porast CMC vrednosti), niti na jačinu samog korelacionog odnosa; 2) propagacija delta i beta oscilacija iz motorne kore ka dorzalnom vratnom mišiću kao i jačina korelacionog odnosa između delta i beta EEG amplituda i odgovarajućih CMC vrednosti je potencirana (olakšana) samom REM fazom spavanja; 3) pojačana propagacija delta i beta oscilacija iz motorne kore (porast delta CMC i beta CMC) ka dorzalnom vratnom mišiću, u toku REM faze spavanja, sugeriše postojanje dvostruke i inverzne motorne kontrole.

4,5 meseca



5,5 meseci



**Slika 4.8.** Statistički značajne linearne korelacije delta i beta relativnih EEG amplituda i njihovih odgovarajućih CMC vrednosti za vreme budnosti, NREM i REM faze pacova starosti 4,5 i 5,5 meseci.

## **4.2. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona**

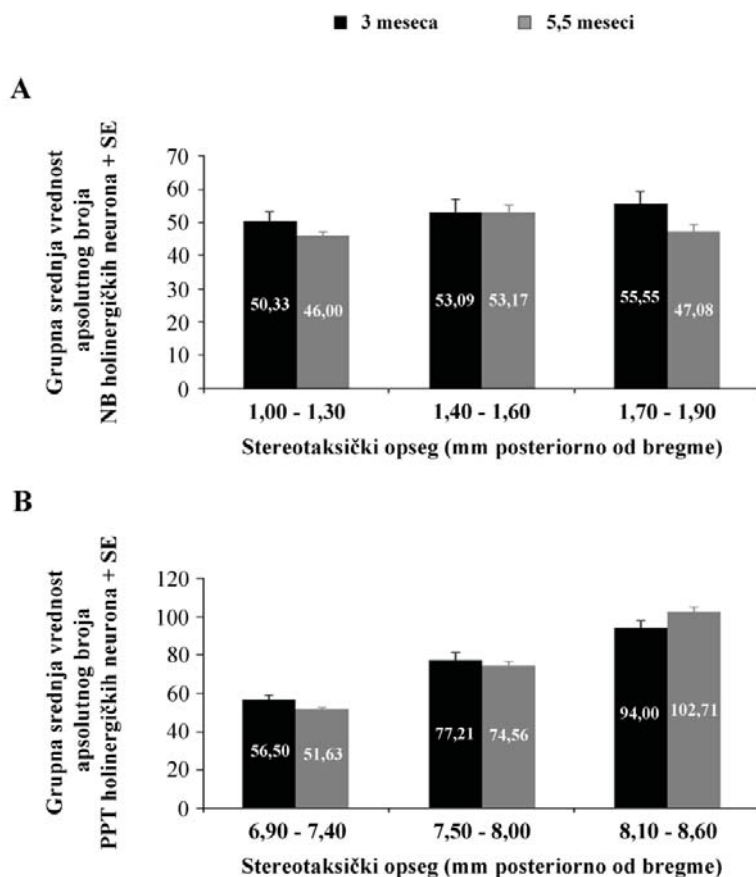
Uticaj starenja na spavanje i motornu kontrolu dorzalne vratne muskulature u toku spavanja, u pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona je praćen takođe putem analize promena u: arhitekturi spavanja, dinamici epizoda tri osnovne faze spavanja, EEG mikrostrukтури, dinamici vretena REM faze spavanja (frekvencija pojavljivanja vretena, trajanja vretena i unutrašnja frekvencija vretena spavanja) i motornoj kontroli u toku svake osnovne faze spavanja. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u toku spavanja, uslovljen procesom starenja, je praćen u fiziološkim kontrolama (n=16), kao i u pacova sa bilateralnim lezijama NB (n=15) i PPT (n=16) jedara. Hronično registrovanje spavanja je takođe izvršeno tokom perioda od 5,5 meseci u četiri vremenska termina (3; 3,5; 4,5 i 5,5 meseci).

### **4.2.1. Histochemijska identifikacija i kvantifikacija NB i PPT lezije**

Za procenu eventualnog gubitka holinergičkih neurona dve funkcionalno različite grupe holinergičkih neurona (NB i PPT jedro) u fiziološkom starenju, najpre su određene kontrolne vrednosti broja NADPH - diaforaza pozitivno obojenih ćelija - neurona. Ove kontrolne vrednosti su nam bile potrebne i za kvantifikaciju deficita holinergičkih neurona nakon bilateralnih lezija NB i PPT jedara. Naime, prvo su određene kontrolne srednje vrednosti apsolutnog broja NADPH - diaforaza pozitivno obojenih neurona kod kontrolnih pacova 3 meseca starosti u okviru svakog stereotaksičkog opsega i u odnosu na ove vrednosti (smatrane kao 100%) je računat deficit.

Broj holinergičkih neurona u NB i PPT jedrima se ne menja sa starenjem kod fizioloških kontrola ( $z \geq -1,75$ ;  $p \geq 0,08$  za kontrolno NB jedro, **Slika 4.9.A.**;  $z \geq -1,72$ ;  $p \geq 0,09$  za kontrolno PPT jedro, **Slika 4.9.B.**) tj. u periodu starenja koji

smo mi pratili. Takođe, naši podaci pokazuju da se broj holinerških neurona nije menjao od početka (3 meseca starosti) do kraja starosnog perioda koji smo pratili (5,5 meseci starosti) ni u NB ni u PPT lediranim pacovima (**Slika 4.10.A.**,  $z \geq -1,62$ ;  $p \geq 0,11$  za NB leziju; **Slika 4.11.A.**,  $z \geq -1,53$ ;  $p \geq 0,13$  za PPT leziju). Starenje nije izazvalo progresiju gubitka holinerških neurona nakon NB ili PPT lezije iboteničnom kiselinom.

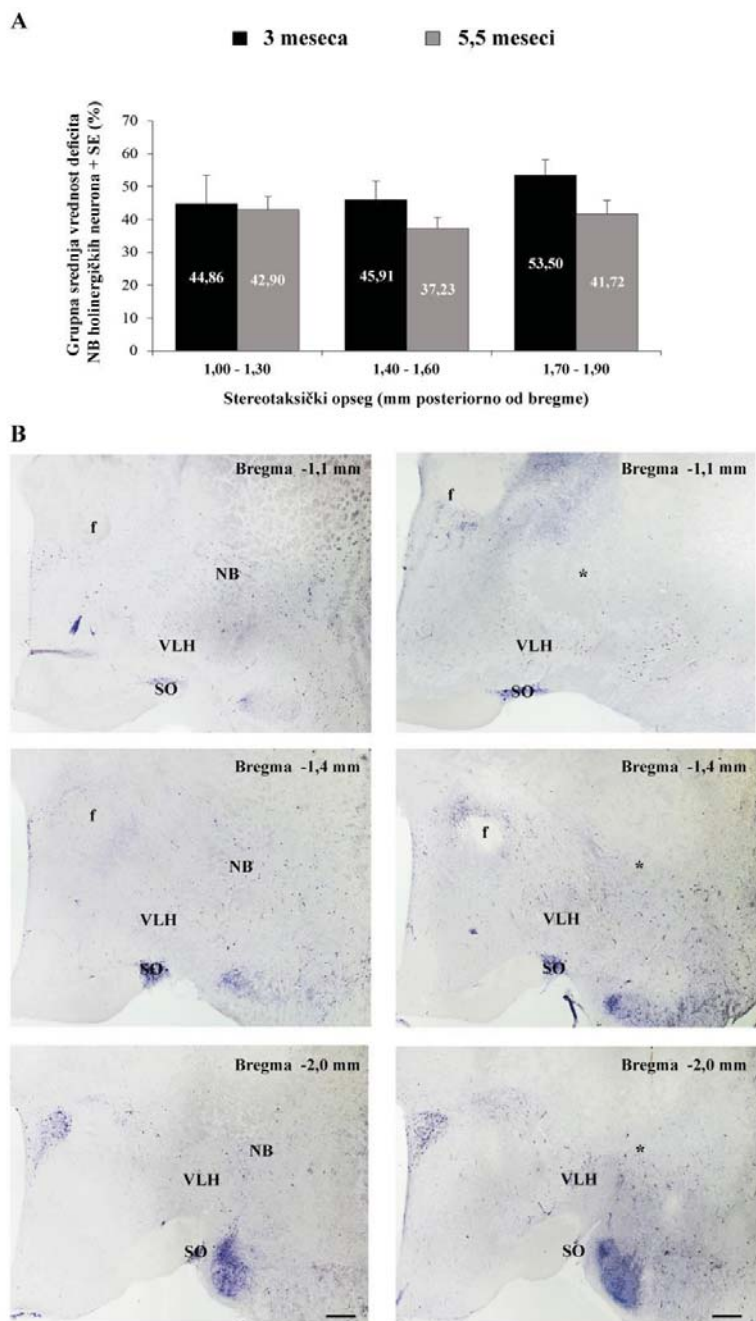


**Slika 4.9.** Promene broja holinerških neurona u NB i PPT jedrima u fiziološkom starenju pacova (3 - 5,5 meseci). **(A)** Grupna srednja vrednost apsolutnog broja NB holinerških neurona + standardna greška (SE) u tri sterotaksička opsega kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju NB jedra. **(B)** Grupna srednja vrednost apsolutnog broja PPT holinerških neurona + standardna greška (SE) u tri sterotaksička opsega kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra. Kvantifikaciju smo vršili na uzorcima tkiva fizioloških kontrola 3 meseca starosti ( $n = 8$  za fiziološki NB;  $n = 10$  za fiziološki PPT) i 5,5 meseci starosti ( $n = 6$  za fiziološki NB;  $n = 8$  za fiziološki PPT).

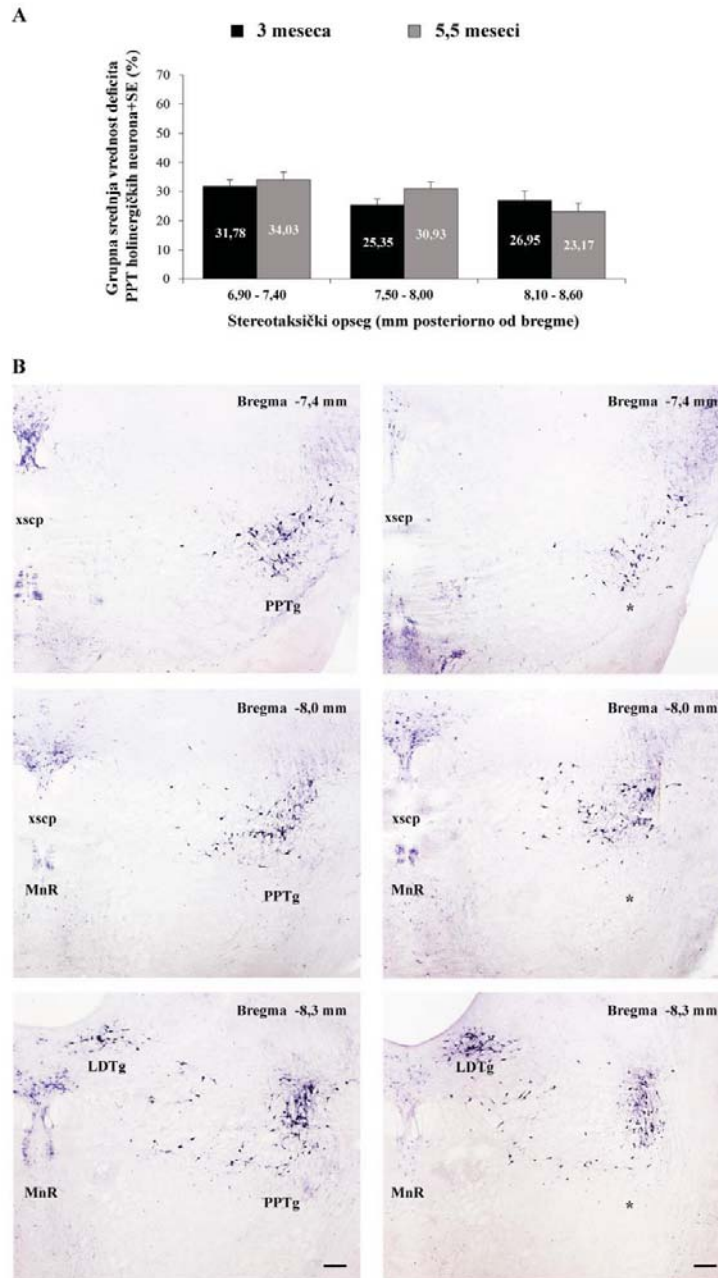
Kvantifikacija deficita holinergičkih neurona nakon NB i PPT lezije, je pokazala statistički značajno manji broj NADPH - diaforaza pozitivno obojenih neurona kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju NB i PPT jedra.

Kod NB lediranih pacova grupna srednja vrednost deficita NB holinergičkih neurona po strani mozga je bila  $\geq 37,23 \pm 3,37\%$  kroz celu antero-posteriornu dimenziju strukture (1,00 - 1,90 mm posteriorno od bregme), sa najvećim deficitom  $\geq 41,72 \pm 4,10\%$  u posteriornom regionu (1,70 - 1,90 mm posteriorno od bregme) i u početnom i u krajnjem periodu starenja koji smo pratili. Tipičan primer histološke identifikacije NB lezije, kao i rezultati kvantifikacije deficita holinergičkih neurona kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju NB jedra je predstavljen na **Slici 4.10**.

Kod PPT lediranih pacova grupna srednja vrednost deficita PPT holinergičkih neurona po strani mozga je bila  $\geq 23,17 \pm 2,74\%$  kroz celu antero-posteriornu dimenziju strukture (6,90 - 8,60 mm posteriorno od bregme), sa najvećim deficitom  $\geq 31,78 \pm 2,33$  u anteriornom regionu (6,90 - 7,40 mm posteriorno od bregme) i u početnom i u krajnjem periodu starenja koji smo pratili. Tipičan primer histološke identifikacije PPT lezije, kao i rezultati kvantifikacije deficita holinergičkih neurona kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra je predstavljen na **Slici 4.11**.



**Slika 4.10. Histološka identifikacija i kvantifikacija NB lezije. (A)** Grupna srednja vrednost deficita NB holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju NB jedra. **(B)** Tipični primeri fiziološkog NB jedra (leva kolona) i identifikovane NB lezije (desna kolona) u tri stereotaksičke koordinate kod pacova 5,5 meseci starosti. \* označava ledirani NB – *nucleus basalis*; VLH – *nucleus hypothalamus ventrolateralis*; SO – *nucleus supraopticus*; f – *forix*. Fiziološka kontrola: n=8 (3 meseca starosti) i n=6 (5,5 meseci starosti); NB lezija: n=5 (3 meseca starosti) i n=6 (5,5 meseci starosti). Skala 200  $\mu$ m.



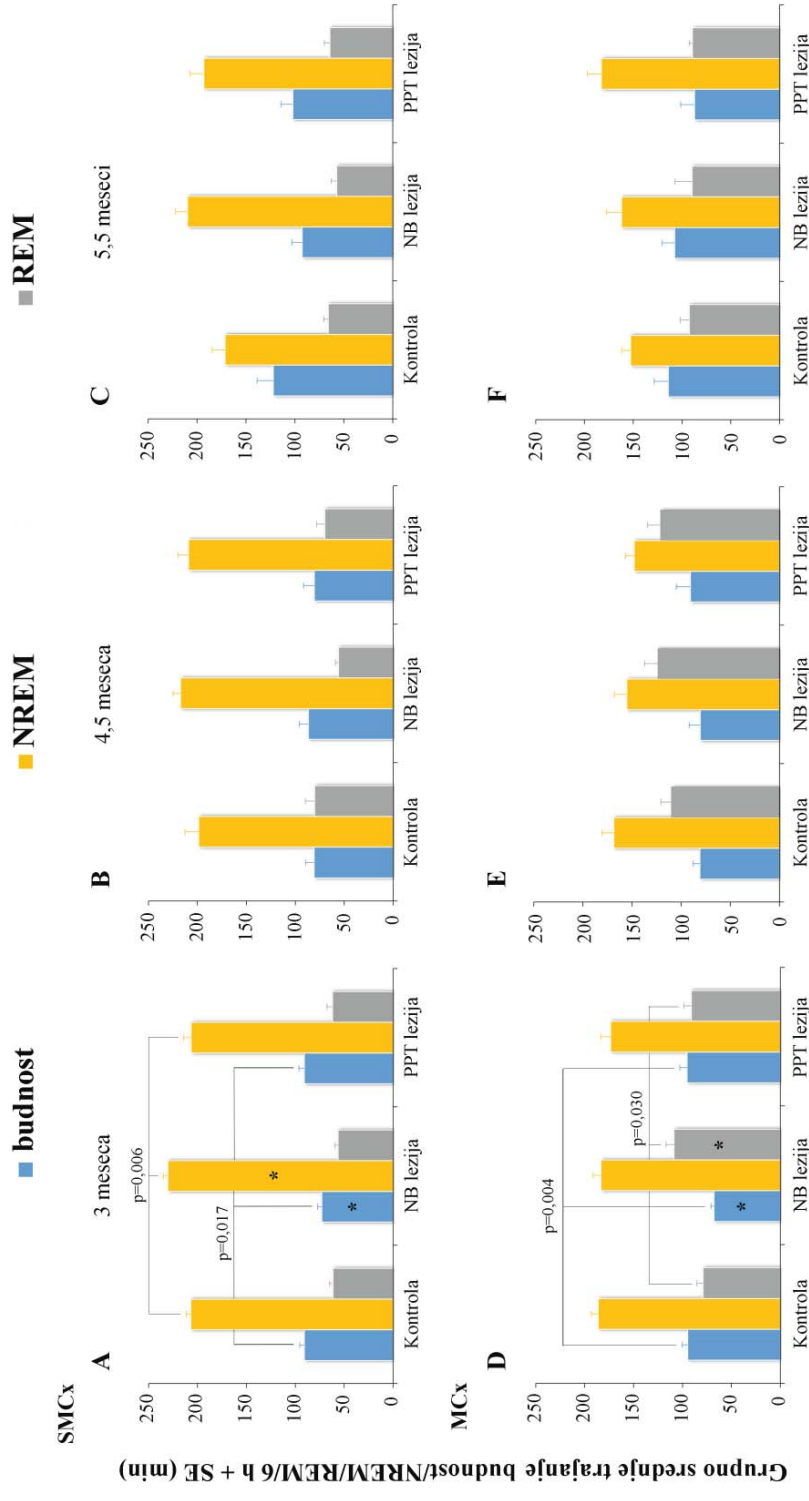
**Slika 4.11. Histološka identifikacija i kvantifikacija PPT lezije.** (A) Grupna srednja vrednost deficita PPT holinerškičkih neurona u tri stereotaksička opsega kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra. (B) Tipični primeri fiziološkog PPT jedra (leva kolona) i identifikovane PPT lezije (desna kolona) u tri stereotaksičke koordinate kod pacova 5,5 meseci starosti. \* označava ledirani PPT - *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LDT - *nucleus tegmentum laterodorsalis*; xscp - *decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum*; MnR - *nucleus raphe medianus*. Fiziološka kontrola: n=10 (3 meseca starosti) i n=8 (5,5 meseci starosti); PPT lezija: n=9 (3 meseca starosti) i n=9 (5,5 meseci starosti). Skala 200  $\mu$ m.

#### 4.2.2. Topografija arhitekture i dinamike epizoda spavanja u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona

Promene u arhitekturi spavanja u starenju pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona su praćene u toku 5,5 meseci starenja kod NB i PPT lediranih pacova, na osnovu EEG signala senzomotorne (SMCx) i motorne (MCx) kore velikog mozga pacova, i izražene su u odnosu na fiziološku kontrolu.

Analiza trajanja budnosti, NREM i REM faze spavanja nakon NB lezije, je pokazala da se javljaju prolazne promene koje su topografski specifične (različit uticaj NB lezije na SMCx i MCx). Naime, na početku perioda starenja trajanje budnosti se skraćuje, a trajanje NREM faze produžava u SMCx (**Slika 4.12.A.**;  $z \geq -3,16$ ;  $p \leq 0,01$ ), dok se u MCx trajanje budnosti skraćuje, a trajanje REM faze produžava (**Slika 4.12.D.**;  $z \geq -3,29$ ;  $p \leq 0,01$ ). Međutim, arhitektura spavanja NB lediranih pacova se nije razlikovala od arhitekture spavanja fizioloških kontrola već u narednom terminu, i tako je ostalo do kraja perioda starenja koji smo pratili (**Slika 4.12.B.,C.,E.,F.**;  $\chi^2 \geq 0,25$ ;  $p \geq 0,13$ ; podaci za 3,5 meseca nisu prikazani).

Nasuprot tome, starenje PPT lediranih pacova nije izazvalo promene u trajanju budnosti, NREM i REM faze spavanja ni u SMCx ni u MCx od početka do kraja starenja (**Slika 4.12.A-F.**;  $\chi^2 \geq 0,25$ ;  $p \geq 0,13$ ; podaci za 3,5 meseca nisu prikazani).

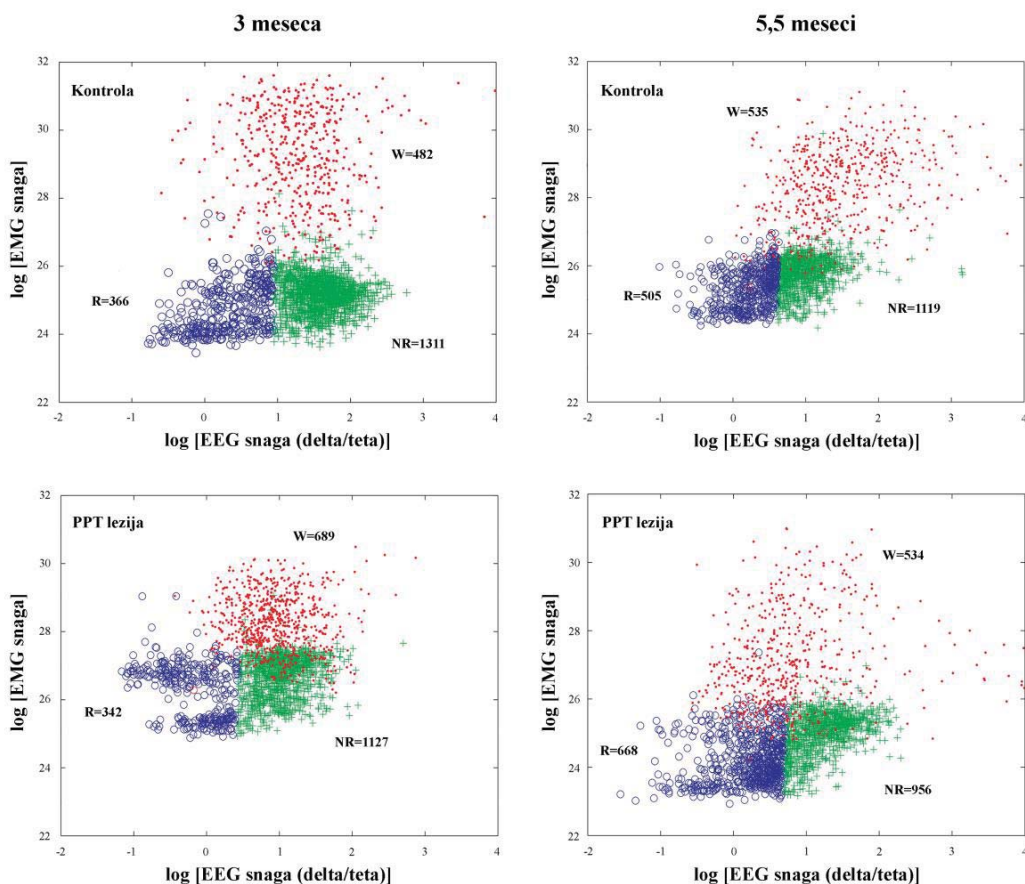


**Slika 4.12. Topografija arhitekture spavanja u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (bilateralna ekscitotoksična lezija NB jedra ili PPT jedra):** grupno srednje trajanje budnosti, NREM i REM faze spavanja u toku 6 h + standardna greška (SE) u minutima u senzomotornoj (SMCx; A-C) i motornoj kori (MCx; D-F); *p* – statističke značajnosti Kruskal-Wallis ANOVA testa.

\* predstavlja statistički značajne rezultate za  $p \leq 0,01$ , testirane Mann-Whitney U testom.



Tipični primeri finalnih grafika razdvajanja grupisanja faza spavanja na početku (3 meseca stari pacovi) i na kraju perioda starenja koji smo pratili (5,5 meseci stari pacovi) su prikazani na Slici 4.13.



**Slika 4.13. Tipični primeri finalnih grafika razdvajanja grupisanja faza spavanja.** Finalni grafici razdvajanja grupisanja 10 s epoha budnosti, NREM i REM faze u motornoj kori tokom 6 h spavanja kod fiziološke kontrole (gornji red) i PPT lezije (donji red) u toku starenja (3 i 5,5 meseci stari pacovi). Epohe budnosti (W grupisanje – tačke) su prenešene iz prethodnog razdvajanja budnosti i spavanja; NR grupisanje (krstići) – epohe NREM faze spavanja; R grupisanje (kružići) – epohe REM faze spavanja.

Analiza dinamike epizoda spavanja (broj i trajanje epizoda spavanja) je pokazala da je prolazno skraćenje srednjeg trajanja budnosti nakon NB lezije u obe kore, kod pacova starosti 3 meseca (SMCx i MCx), nastalo usled smanjenog broja epizoda budnosti istog trajanja (**Tabela 4.2.**; **Tabela 4.3.**;  $\chi^2 \geq 5,12$ ;  $p \leq 0,04$ ;  $z \geq -2,37$ ;  $p \leq 0,02$ ). Takođe, prolazno produženje srednjeg trajanja NREM faze nakon NB lezije u SMCx je nastalo usled smanjenog broja epizoda NREM faze, ali ove epizode su bile produženog trajanja (**Tabela 4.2.**;  $\chi^2 \geq 6,47$ ;  $p \leq 0,04$ ;  $z \geq -3,24$ ;  $p \leq 0,02$ ). Srednje trajanje NREM faze u MCx se nije menjalo usled suprotne dinamike NREM epizoda (broj NREM epizoda je bio povećan, ali su ove epizode bile kraćeg trajanja; **Tabela 4.2.**;  $\chi^2 \geq 7,65$ ;  $p \leq 0,02$ ;  $z \geq -3,24$ ;  $p \leq 0,01$ ). Konačno, prolazno produženje srednjeg trajanja REM faze nakon NB lezije u MCx je nastalo usled povećanog broja REM epizoda (**Tabela 4.3.**;  $\chi^2 = 10,48$ ;  $p \leq 0,01$ ;  $z = -3,11$ ;  $p \leq 0,01$ ).

Iako stabilnih promena u arhitekturi spavanja nije bilo, starenje remeti dinamiku epizoda REM faze nakon NB lezije samo u SMCx (**Tabela 4.2.**; **Slika 4.14.**). Starenje nije uticalo na trajanje REM faze, ali je uslovalo smanjenje broja epizoda koje su bile dužeg trajanja u SMCx od 4,5 meseca do 5,5 meseci starosti (**Tabela 4.2.**; **Slika 4.14.**;  $\chi^2 \geq 8,25$ ;  $p \leq 0,02$ ;  $z \geq -3,18$ ;  $p \leq 0,01$ ). **Slika 4.14.** predstavlja održivo smanjenje broja REM epizoda kraćeg trajanja, ali zajedno sa povećanjem broja REM epizoda dužeg trajanja od 4,5 meseca do 5,5 meseci starosti u SMCx nakon NB lezije nasuprot fiziološke kontrole i PPT lezije.

**Tabela 4.2. Promene u arhitekturi i dinamici epizoda spavanja senzomotorne kore (SMCx) u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (NB i PPT lezija): grupno srednje trajanje budnosti, NREM i REM faze u različitim starosnim grupama, sa njihovim grupnim srednjim vrednostima broja i srednjim trajanjem epizoda u toku 6 h spavanja ± standardna greška (SE).**

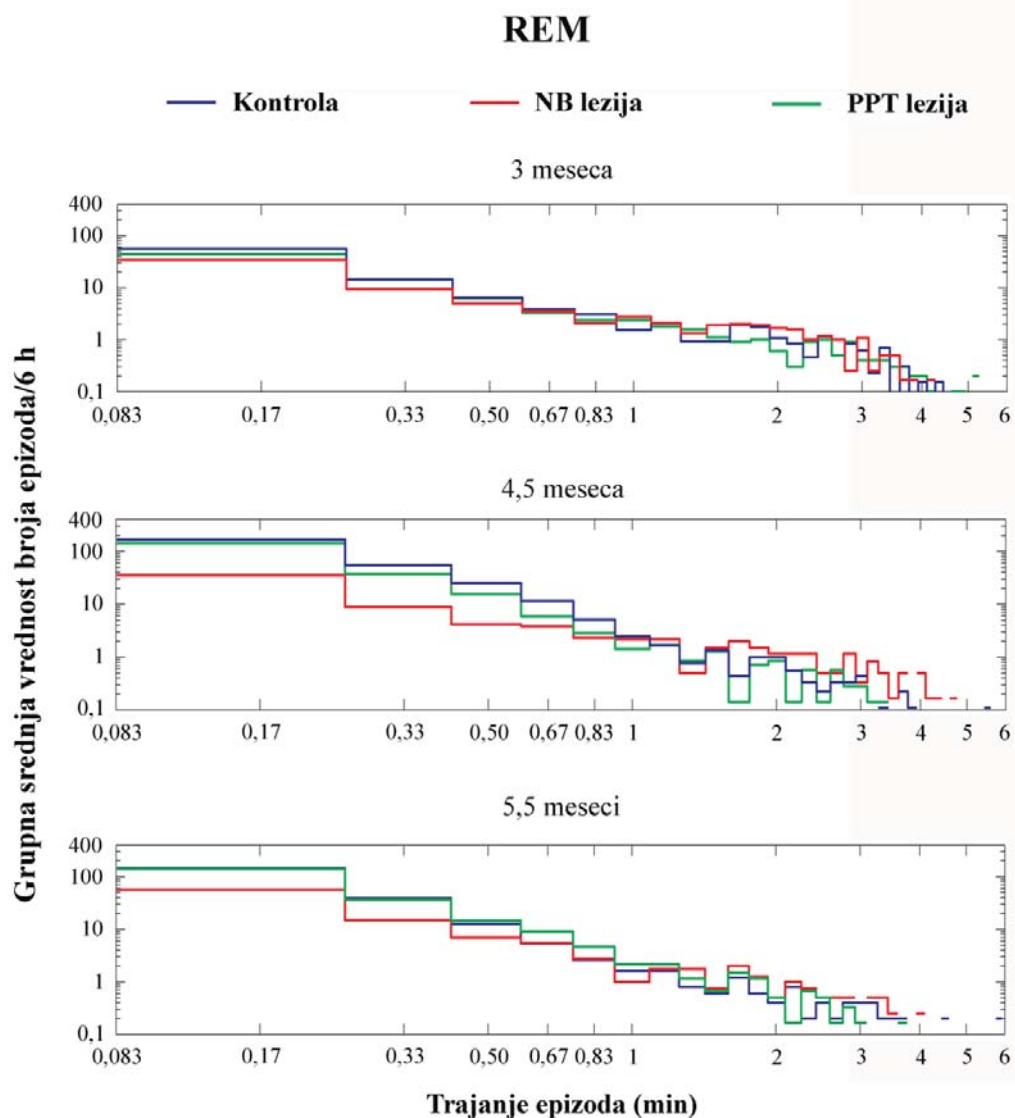
Statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,04$  su zadebljane i prebojene sivim.

| SMCx              | Srednje trajanje/6h ± SE (min) |                      |              | Srednja vrednost broja epizoda/6h ± SE |                      |                       | Srednje trajanje epizoda/6h ± SE (min) |                    |                    |
|-------------------|--------------------------------|----------------------|--------------|--|----------------------|-----------------------|--|--------------------|--------------------|
|                   | budnost                        | NREM                 | REM          | budnost                                | NREM                 | REM                   | budnost                                | NREM               | REM                |
| <i>3 meseca</i>   |                                |                      |              |  |                      |                       |  |                    |                    |
| Kontrola          | 91,10 ± 4,37                   | 206,91 ± 4,49        | 61,75 ± 3,18 | 140,54 ± 11,29                         | 189,31 ± 12,06       | 101,00 ± 12,38        | 0,69 ± 0,07                            | 1,19 ± 0,08        | 0,64 ± 0,06        |
| NB lezija         | <b>73,12 ± 4,15</b>            | <b>230,27 ± 4,86</b> | 56,43 ± 3,14 | <b>108,33 ± 6,53</b>                   | <b>149,83 ± 6,10</b> | 75,83 ± 4,97          | 0,65 ± 0,04                            | <b>1,58 ± 0,07</b> | 0,77 ± 0,04        |
| PPT lezija        | 90,97 ± 5,31                   | 206,60 ± 7,77        | 62,24 ± 5,42 | 134,00 ± 10,31                         | 170,10 ± 10,79       | 86,20 ± 11,47         | 0,65 ± 0,04                            | 1,37 ± 0,10        | 0,64 ± 0,05        |
| <i>3,5 meseca</i> |                                |                      |              |  |                      |                       |  |                    |                    |
| Kontrola          | 76,33 ± 5,38                   | 220,45 ± 7,75        | 60,56 ± 6,72 | 146,80 ± 14,51                         | 201,80 ± 12,91       | 111,40 ± 13,87        | 0,56 ± 0,05                            | 1,14 ± 0,08        | 0,51 ± 0,05        |
| NB lezija         | 72,14 ± 5,42                   | 233,65 ± 5,06        | 54,10 ± 2,70 | 138,55 ± 16,59                         | 185,09 ± 17,50       | 92,55 ± 12,15         | 0,59 ± 0,06                            | 1,38 ± 0,11        | 0,66 ± 0,06        |
| PPT lezija        | 93,40 ± 10,59                  | 206,74 ± 10,39       | 59,73 ± 5,60 | 143,00 ± 10,95                         | 192,78 ± 18,01       | 113,67 ± 16,89        | 0,56 ± 0,07                            | 1,22 ± 0,12        | 0,55 ± 0,04        |
| <i>4,5 meseca</i> |                                |                      |              |  |                      |                       |  |                    |                    |
| Kontrola          | 80,90 ± 8,66                   | 198,58 ± 14,22       | 80,31 ± 9,47 | 193,33 ± 26,10                         | 275,33 ± 28,14       | 273,33 ± 38,72        | 0,51 ± 0,05                            | 0,71 ± 0,10        | 0,37 ± 0,04        |
| NB lezija         | 86,72 ± 9,31                   | 217,17 ± 7,50        | 55,94 ± 3,15 | 196,00 ± 34,48                         | 230,33 ± 32,41       | <b>73,17 ± 4,13</b>   | 0,55 ± 0,05                            | 0,99 ± 0,15        | <b>0,75 ± 0,03</b> |
| PPT lezija        | 80,67 ± 11,02                  | 209,02 ± 10,51       | 70,06 ± 7,97 | 196,29 ± 17,42                         | 291,29 ± 30,85       | 211,86 ± 33,91        | 0,43 ± 0,06                            | 0,77 ± 0,12        | 0,33 ± 0,03        |
| <i>5,5 meseci</i> |                                |                      |              |  |                      |                       |  |                    |                    |
| Kontrola          | 122,30 ± 16,40                 | 171,46 ± 13,12       | 65,98 ± 4,67 | 250,20 ± 47,23                         | 320,80 ± 34,96       | 215,20 ± 27,29        | 0,45 ± 0,04                            | 0,60 ± 0,12        | 0,34 ± 0,02        |
| NB lezija         | 92,69 ± 10,46                  | 209,74 ± 12,14       | 57,36 ± 5,58 | 249,75 ± 29,16                         | 283,25 ± 29,60       | <b>100,75 ± 10,59</b> | 0,38 ± 0,02                            | 0,79 ± 0,11        | <b>0,52 ± 0,09</b> |
| PPT lezija        | 102,29 ± 11,95                 | 193,04 ± 14,34       | 64,42 ± 5,49 | 272,17 ± 36,75                         | 327,33 ± 28,94       | 218,17 ± 32,42        | 0,42 ± 0,04                            | 0,57 ± 0,07        | 0,36 ± 0,04        |

**Tabela 4.3. Promene u arhitekturi i dinamici epizoda spavanja motorne kore (MCx) u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (NB i PPT lezija): grupno srednje trajanje budnosti, NREM i REM faze u različitim starosnim grupama, sa njihovim grupnim srednjim vrednostima broja i srednjim trajanjem epizoda u toku 6 h spavanja ± standardna greška (SE).**

Statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,02$  su zadebljane i prebojene sivim.

| MCx               | Srednje trajanje/6h ± SE (min) |                |                      | Srednja vrednost broja epizoda/6h ± SE |                       |                       | Srednje trajanje epizoda/6h ± SE (min) |                    |             |
|-------------------|--------------------------------|----------------|----------------------|--|-----------------------|-----------------------|--|--------------------|-------------|
|                   | budnost                        | NREM           | REM                  | budnost                                | NREM                  | REM                   | budnost                                | NREM               | REM         |
| <i>3 meseca</i>   |                                |                |                      |  |                       |                       |  |                    |             |
| Kontrola          | 94,72 ± 5,51                   | 186,04 ± 7,02  | 78,97 ± 6,29         | 153,92 ± 7,55                          | 253,31 ± 13,70        | 203,85 ± 20,87        | 0,64 ± 0,05                            | 0,76 ± 0,06        | 0,40 ± 0,02 |
| NB lezija         | <b>67,82 ± 3,12</b>            | 183,24 ± 8,10  | <b>108,73 ± 8,08</b> | <b>120,22 ± 9,93</b>                   | <b>351,22 ± 19,39</b> | <b>316,00 ± 14,80</b> | 0,62 ± 0,04                            | <b>0,50 ± 0,04</b> | 0,38 ± 0,01 |
| PPT lezija        | 95,35 ± 7,49                   | 173,38 ± 9,74  | 91,11 ± 7,47         | 155,08 ± 16,03                         | 303,25 ± 18,89        | 251,75 ± 24,94        | 0,62 ± 0,04                            | 0,62 ± 0,06        | 0,38 ± 0,03 |
| <i>3,5 meseca</i> |                                |                |                      |  |                       |                       |  |                    |             |
| Kontrola          | 92,44 ± 10,45                  | 178,21 ± 10,46 | 86,70 ± 8,79         | 190,56 ± 28,85                         | 323,00 ± 22,18        | 252,22 ± 29,87        | 0,57 ± 0,06                            | 0,56 ± 0,07        | 0,36 ± 0,01 |
| NB lezija         | 80,24 ± 7,25                   | 178,40 ± 9,01  | 101,21 ± 10,29       | 139,11 ± 16,75                         | 321,89 ± 25,30        | 284,22 ± 31,59        | 0,65 ± 0,09                            | 0,44 ± 0,04        | 0,38 ± 0,01 |
| PPT lezija        | 80,72 ± 7,59                   | 185,48 ± 7,12  | 93,70 ± 4,84         | 155,67 ± 11,20                         | 295,11 ± 19,91        | 253,00 ± 20,82        | 0,53 ± 0,05                            | 0,66 ± 0,06        | 0,38 ± 0,02 |
| <i>4,5 meseca</i> |                                |                |                      |  |                       |                       |  |                    |             |
| Kontrola          | 81,03 ± 6,67                   | 168,51 ± 12,18 | 110,24 ± 10,41       | 183,67 ± 22,20                         | 334,11 ± 21,20        | 310,78 ± 29,59        | 0,48 ± 0,06                            | 0,51 ± 0,08        | 0,38 ± 0,03 |
| NB lezija         | 80,65 ± 11,37                  | 155,23 ± 12,76 | 123,94 ± 13,35       | 154,43 ± 31,92                         | 332,14 ± 19,01        | 274,43 ± 35,89        | 0,54 ± 0,06                            | 0,50 ± 0,07        | 0,48 ± 0,06 |
| PPT lezija        | 90,78 ± 14,20                  | 147,70 ± 9,05  | 121,30 ± 12,80       | 209,56 ± 20,34                         | 366,89 ± 21,52        | 305,00 ± 17,72        | 0,44 ± 0,06                            | 0,42 ± 0,04        | 0,39 ± 0,02 |
| <i>5,5 meseci</i> |                                |                |                      |  |                       |                       |  |                    |             |
| Kontrola          | 114,25 ± 14,15                 | 152,85 ± 9,07  | 92,65 ± 9,21         | 253,56 ± 32,65                         | 363,33 ± 10,59        | 282,44 ± 23,80        | 0,47 ± 0,03                            | 0,41 ± 0,03        | 0,33 ± 0,01 |
| NB lezija         | 107,76 ± 12,48                 | 162,14 ± 15,33 | 89,81 ± 17,27        | 213,60 ± 6,55                          | 330,80 ± 18,58        | 290,40 ± 49,68        | 0,44 ± 0,05                            | 0,50 ± 0,09        | 0,38 ± 0,06 |
| PPT lezija        | 87,31 ± 13,99                  | 182,81 ± 14,46 | 89,60 ± 2,94         | 198,71 ± 2,12                          | 336,29 ± 23,35        | 264,29 ± 21,18        | 0,44 ± 0,04                            | 0,58 ± 0,08        | 0,35 ± 0,03 |



Slika 4.14. Distribucije trajanja i grupne srednje vrednosti broja epizoda REM faze spavanja u SMCx u starenju pacova (od 3 do 5,5 meseci) sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (NB i PPT lezija). U ovim log-log distribucijama grupnih srednjih vrednosti broja epizoda/6 h u funkciji njihovog trajanja (min), svaki „horizontalni stepenik“ je postavljen iznad njegovog odgovarajućeg trajanja, koji je predstavljen na x - osi u minutima - npr. grupna srednja vrednost broja epizoda/6 h od 10 s je postavljen iznad  $10/60 = 0,17$  min itd. Delovi distribucije koji nedostaju predstavljaju srednju vrednost broja epizoda koji je jednak nuli, a logaritmovana vrednost ga identifikuje kao da nije broj.

#### 4.2.3. Topografija EEG mikrostrukture svih faza spavanja u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona

U toku perioda starenja koji smo pratili nije bilo konzistentnih promena EEG mikrostrukture budnosti, osim što starenje poništava povećanje beta relativne amplitude prouzrokovane PPT lezijom u SMCx, od 4,5 do 5,5 meseci starenja ( $\chi^2 \geq 1,57$ ;  $p \geq 0,22$ ; rezultati nisu prikazani).

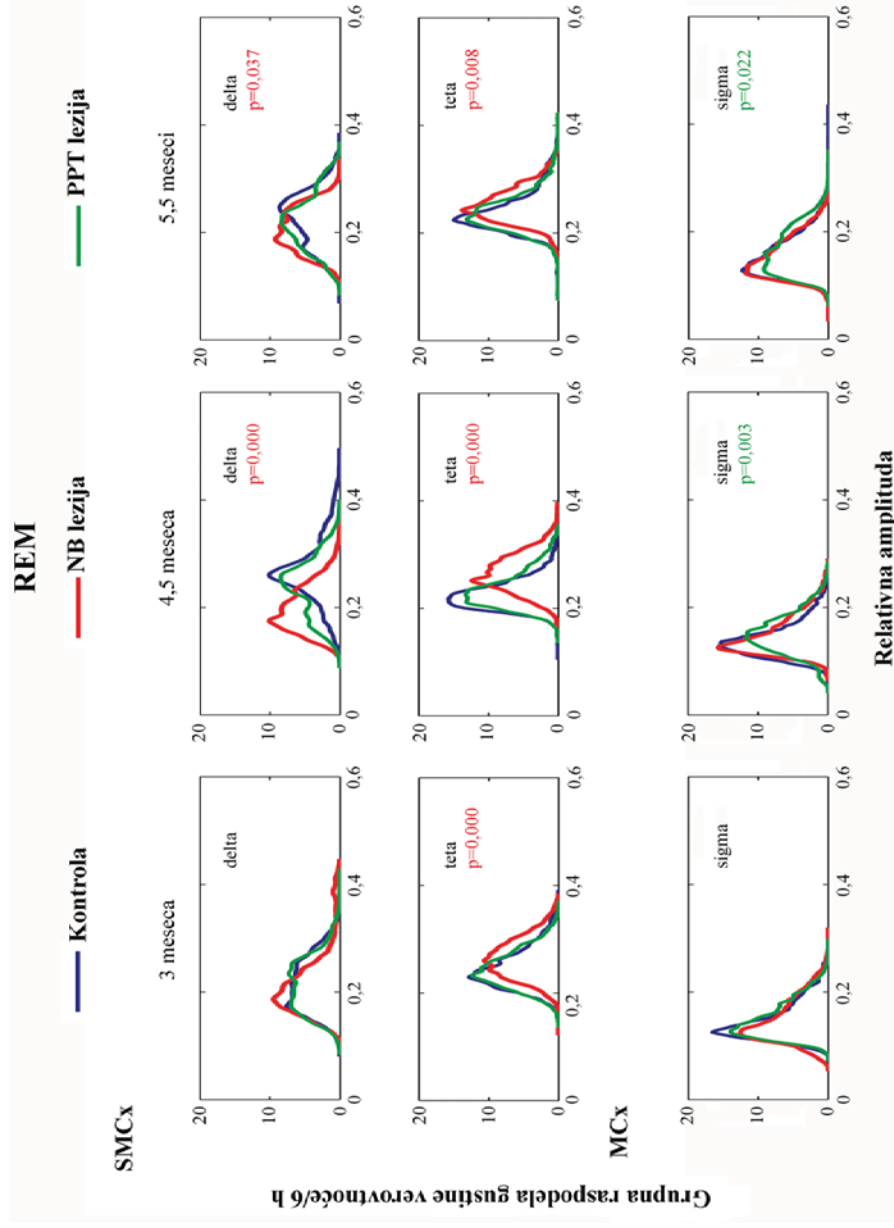
Starenje ne dovodi do konzistentnih promena EEG mikrostrukture NREM faze nakon NB lezije u obe kore, ali produžava efekat PPT lezije u SMCx, odn. konzistentno smanjuje delta relativnu amplitudu do 4,5 meseca starosti ( $\chi^2 \geq 14,31$ ;  $p \leq 0,001$ ), i konzistentno povećava beta i gama relativne amplitude do kraja perioda starenja koji smo pratili ( $\chi^2 \geq 6,11$ ;  $p \leq 0,05$ ; podaci nisu prikazani). Nasuprot efektima u SMCx, starenje poništava efekat PPT lezije u MCx (koji je bio iskazan kao smanjenje delta relativne amplitude i povećanje beta relativne amplitude) za vreme NREM faze od 4,5 do 5,5 meseci starenja ( $\chi^2 \geq 1,62$ ;  $p \geq 0,26$ ; podaci nisu prikazani).

Za razliku od efekata starenja na EEG mikrostrukturu budnosti i NREM faze spavanja, starenje dovodi do trajnih promena za vreme REM faze i to nakon obe lezije (**Slika 4.15.**). Kod NB lediranih pacova, za vreme REM faze, starenje produžava povećanje teta relativne amplitude ( $\chi^2 \geq 9,74$ ;  $p \leq 0,01$ ), koje je izazvano lezijom, i povećava delta relativnu amplitudu od 3,5 do 5,5 meseci u SMCx ( $\chi^2 \geq 6,82$ ;  $p \leq 0,03$ ). S druge strane, kod PPT lediranih pacova, starenje konzistentno (od 3,5 do 5,5 meseci) povećava sigma relativnu amplitudu u REM fazi u MCx ( $\chi^2 \geq 7,63$ ;  $p \leq 0,02$ ; rezultati za 3,5 meseca starosti pacova nisu prikazani).

Ovde bi trebalo ponoviti, da starenje kod NB lediranih pacova produžava povećanje teta relativne amplitude u toku REM faze (**Slika 4.15.**), a u PPT lediranih pacova poništava efekat na delta i beta relativne amplitude u toku budnosti i NREM faze (poništava povećanje beta relativne amplitude i

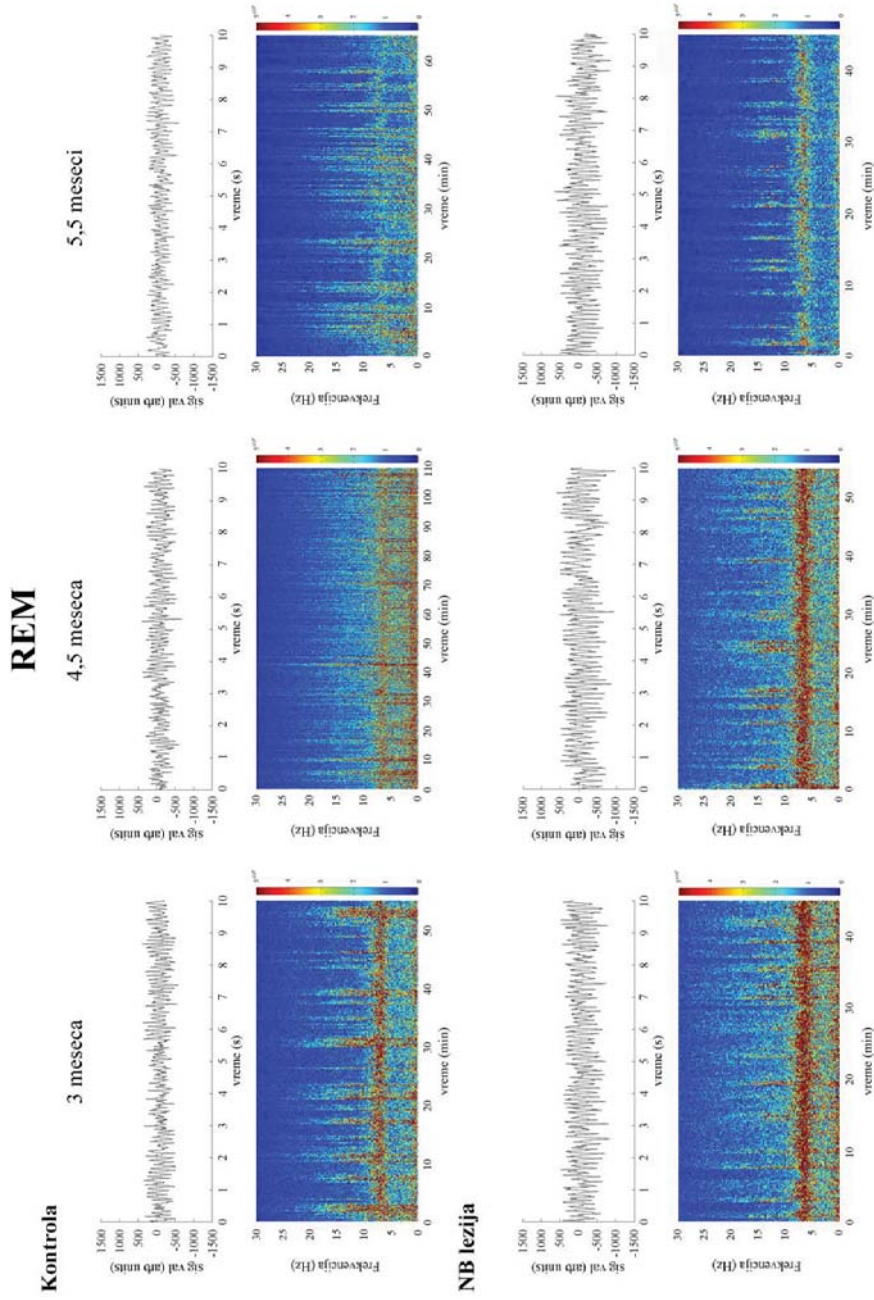
smanjuje delta relativnu amplitudu; podaci nisu prikazani). Takođe, najraniji znaci starenja su se javili u toku REM faze u obe lezije (**Slika 4.15.**): dok smanjenje delta EEG relativne amplitude u SMCx za vreme REM faze predstavlja najraniji znak starenja u NB leziji, povećanje sigma EEG relativne amplitude u MCx za vreme REM faze predstavlja njaraniji znak starenja u PPT leziji.

Takođe, stanjem zavisne promene koje su se javile u najmanje poslednja dva termina perioda starenja koji smo pratili, smatrane su konzistentnim i predstavljaju promene izazvane starenjem. **Slika 4.15.** prikazuje EEG mikrostrukture SMCx i MCx u starenju pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona (NB i PPT lezija) za vreme REM faze (podaci za 3,5 meseca starosti pacova nisu prikazani). Takođe, individualni primeri REM spektrograma prikazuju različite efekte starenja nakon NB (**Slika 4.16.**) i PPT lezije (**Slika 4.17.**), sa njihovim odgovarajućim analognim 10 s EEG signalima (podaci za 3,5 meseca starosti pacova nisu prikazani).

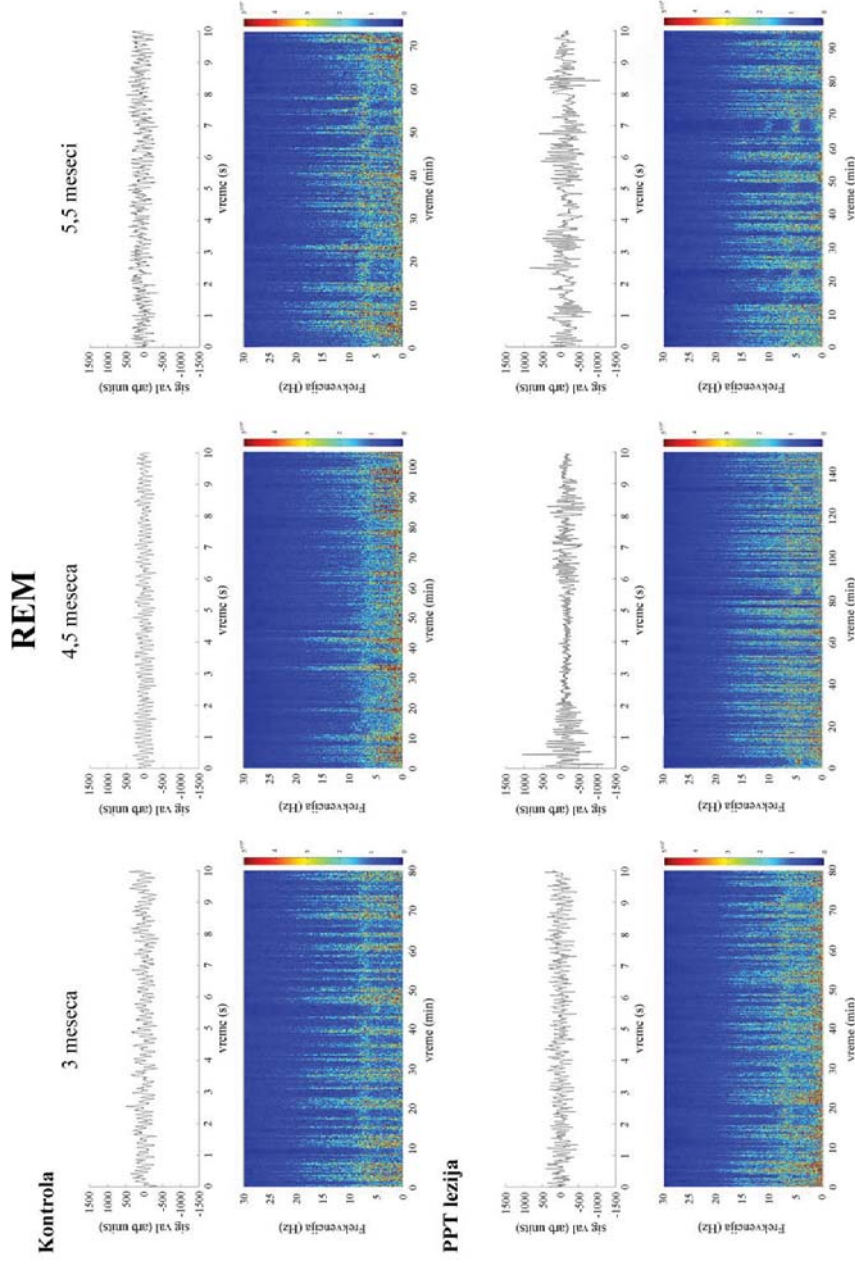


Slika 4.15. Topografija EEG mikrostrukture REM faze u starenju pacova (od 3 do 5,5 meseci) sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (NB i PPT lezija). Grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih EEG delta, teta i beta amplituda/6 h u toku REM faze u senzomotornoj (SMCx) i motornoj kori (MCx).  $p$ ,  $p$  – statističke značajnosti Mann-Whitney U testa odgovarajuće starosne eksperimentalne grupe.





Slika 4.16. Tipični individualni primeri REM spektrograma u senzomotornoj kori tokom 6 h spavanja kod fiziološke kontrole i NB lezije u toku starenja (od 3 do 5,5 meseci), sa njihovim odgovarajućim analognim 10 s EEG signalima koji predstavljaju grupne rezultate. Sve 10 s REM epohe su prvo izdvojene, a zatim spojene po njihovom redosledu pojavljivanja u vremenskom domenu u toku 6 h spavanja. Skale koje su kodirane bojama predstavljaju relativne amplitude pojedinačnih konvencionalnih EEG frekventnih opsega.



Slika 4.17. Tipični individualni primeri REM spektrograma u motornoj kori tokom 6 h spavanja kod fiziološke kontrole i PPT lezije u toku starenja (od 3 do 5,5 meseci), sa njihovim odgovarajućim analognim 10 s EEG signalima koji predstavljaju grupne rezultate. Sve 10 s REM epohe su prvo izdvojene, a zatim spojene po njihovom redosledu pojavljivanja u vremenskom domenu u toku 6 h spavanja. Skale koje su kodirane bojama predstavljaju relativne amplitude pojedinačnih konvencionalnih EEG frekventnih opsega.

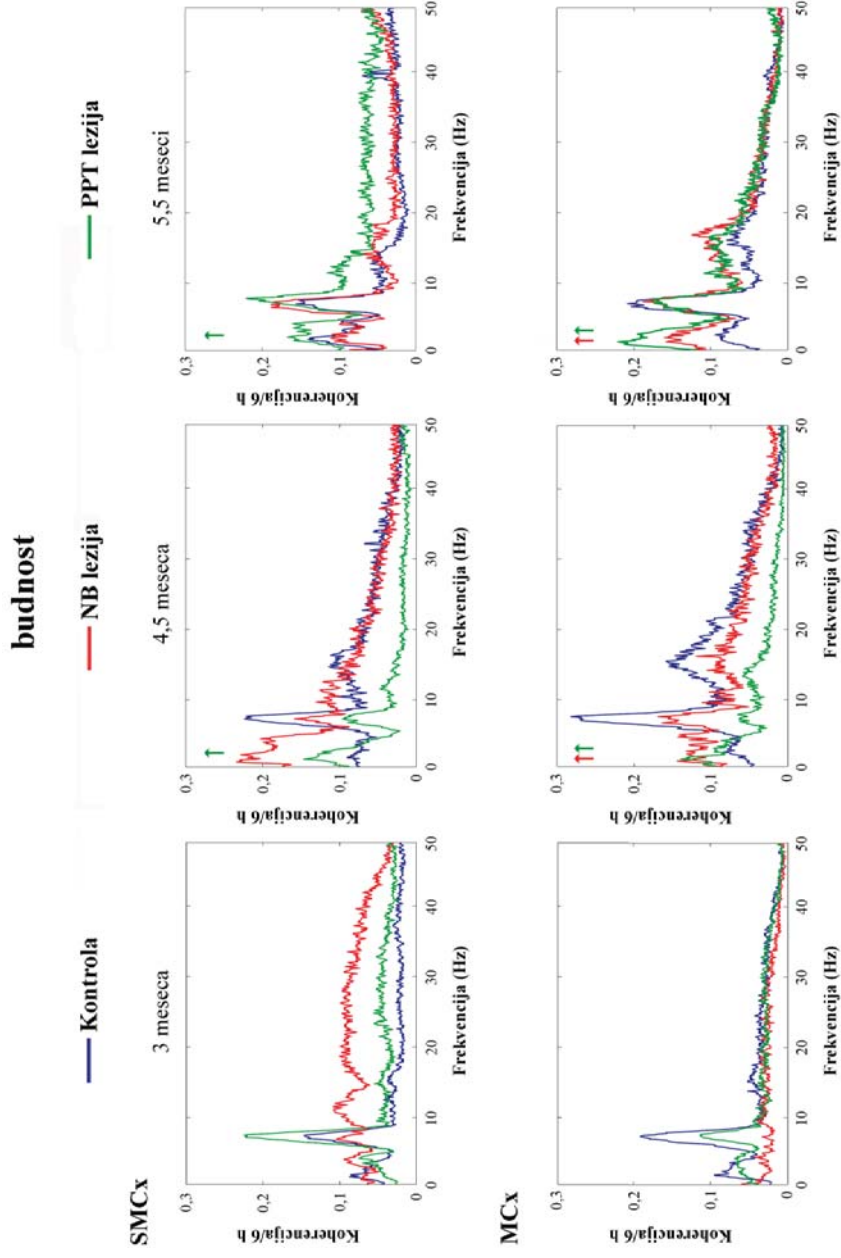
#### 4.2.4. Topografske promene motorne kontrole u spavanju izazvane starenjem pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona

Starenje pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona dva funkcionalno različita holinergička sistema (NB i PPT jedro) izaziva promene u motornoj kontroli dorzalnih vratnih mišića u toku spavanja. Uticaj starenja na motornu kontrolu smo analizirali korišćenjem CMC vrednosti, kao mere propagacije oscilacija od kore velikog mozga do perifernih mišića. Stanjem zavisne promene koje su se javile u najmanje poslednja dva termina perioda starenja koji smo pratili, smatrane su konzistentnim i predstavljaju promene izazvane starenjem.

Za vreme budnosti (**Slika 4.18.**) starenje motorne kontrole iz SMCx se eksprimiralo kao povećanje delta CMC samo kod PPT lediranih pacova ( $\chi^2 \geq 8,09$ ;  $p \leq 0,02$ ;  $z \geq -2,69$ ;  $p \leq 0,02$ ), dok je povećanje delta CMC bilo znak starenja motorne kontrole iz MCx i kod NB i kod PPT lediranih pacova ( $\chi^2 \geq 9,78$ ;  $p \leq 0,01$ ;  $z \geq -2,89$ ;  $p \leq 0,03$ ).

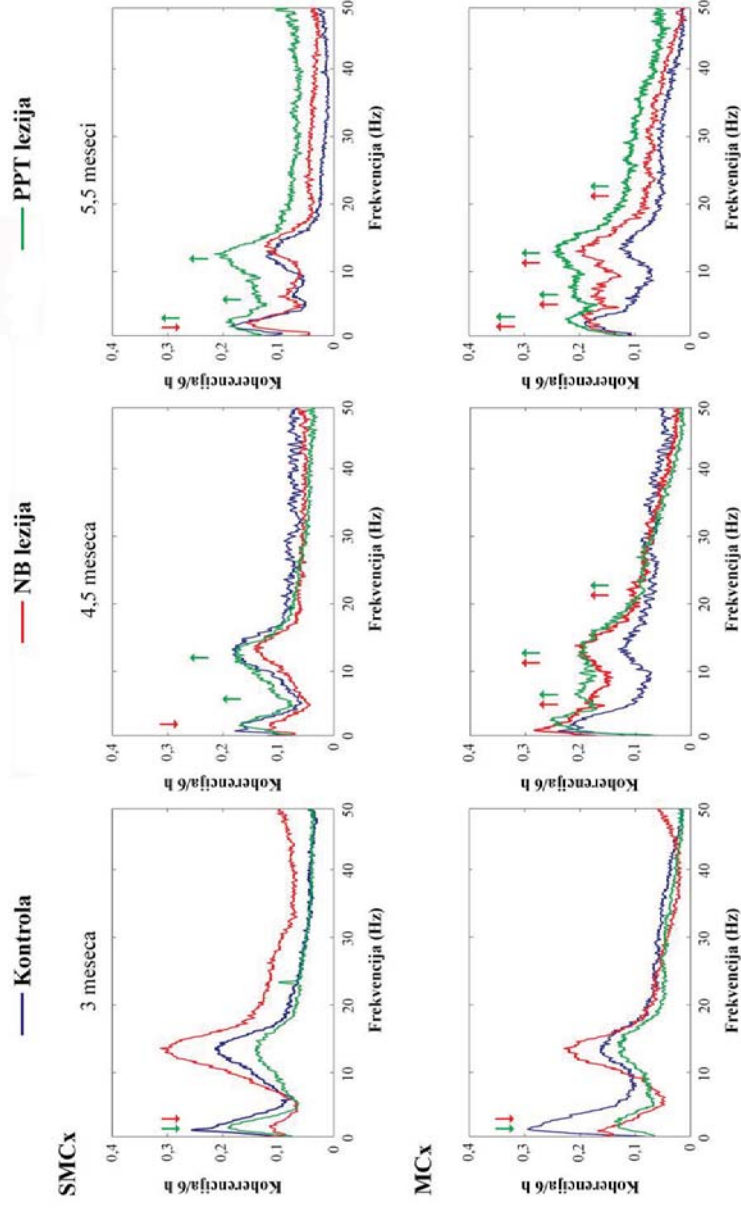
Za vreme NREM faze (**Slika 4.19.**) starenje motorne kontrole iz SMCx se iskazalo kao povećanje delta, teta i sigma CMC samo kod PPT lediranih pacova ( $\chi^2 \geq 15,79$ ;  $p \leq 10^{-4}$ ;  $z \geq -4,26$ ;  $p \leq 0,01$ ), dok je istovremeno povećanje delta, teta, sigma i beta koherencija bilo znak starenja motorne kontrole iz MCx i kod NB i kod PPT lediranih pacova ( $\chi^2 \geq 8,53$ ;  $p \leq 0,01$ ;  $z \geq -4,43$ ;  $p \leq 0,03$ ). Takođe, starenje motorne kontrole iz SMCx se konzistentno manifestovalo kao smanjenje delta CMC u toku NREM faze samo kod NB lediranih pacova ( $\chi^2 \geq 19,10$ ;  $p \leq 10^{-4}$ ;  $z \geq -3,66$ ;  $p \leq 0,02$ ).

U toku REM faze (**Slika 4.20.**) starenje motorne kontrole iz SMCx se iskazalo kao konzistentno povećanje teta i gama CMC samo kod NB lediranih pacova ( $\chi^2 \geq 7,82$ ;  $p \leq 0,02$ ;  $z \geq -3,37$ ;  $p \leq 0,02$ ), dok je starenje motorne kontrole iz MCx bilo manifestovano kao povećanje delta, teta, sigma i beta CMC i to i kod NB i kod PPT lediranih pacova ( $\chi^2 \geq 21,57$ ;  $p \leq 10^{-4}$ ;  $z \geq -5,66$ ;  $p \leq 0,004$ ).



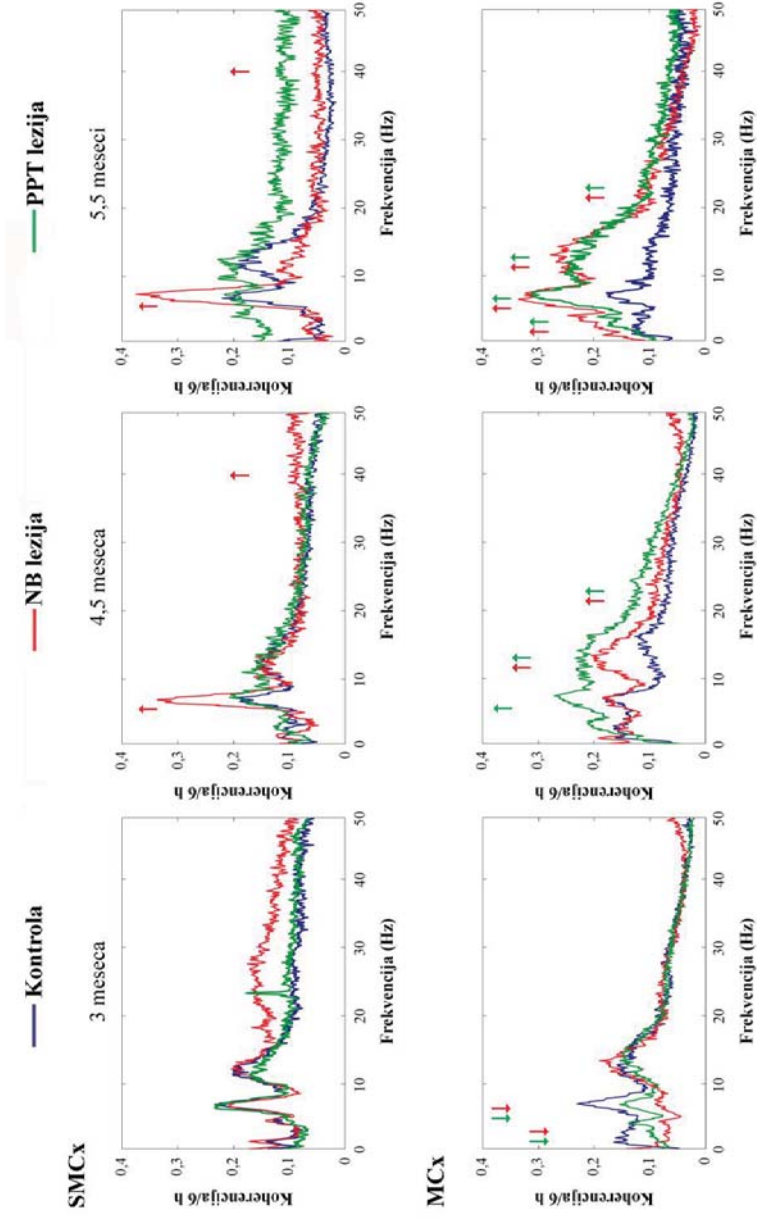
Slika 4.18. Topografske promene motorne kontrole vratnih mišića za vreme budnosti u starenju pacova (od 3 do 5,5 meseci) sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (NB i PPT lezija). Grupni srednji koherentni spektri za vreme budnosti, dobijeni između EEG signala senzomotorne (SMCx) ili motorne kore (MCx) i EMG signala dorzalnih vratnih mišića. Strelice ukazuju na starenjem izazvane, konzistentne i statistički značajne promene srednje vrednosti koherencije kortikomuskularne koherencije (CMC) odgovarajuće eksperimentalne grupe (↑ - NB lezija, ↑ - PPT lezija).

## NREM



**Slika 4.19. Topografske promene motorne kontrole vratnih mišića NREM faze u starenju pacova (od 3 do 5,5 meseci) sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (NB i PPT lezija). Grupni srednji koherentni spektri NREM faze, dobijeni između EEG signala senzomotorne (SMCx) ili motorne kore (MCx) i EMG signala dorzalnih vratnih mišića. Strelice ukazuju na starenjem izazvane, konzistentne i statistički značajne promene srednje vrednosti kortikomuskularne koherencije (CMC) odgovarajuće eksperimentalne grupe (↑ - NB lezija, ↓ - PPT lezija).**

## REM



**Slika 4.20. Topografske promene motorne kontrole vratnih mišića REM faze u starenju pacova (od 3 do 5,5 meseci) sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (NB i PPT lezija). Grupni srednji koherentni spektri REM faze, dobijeni između EEG signala senzomotorne (SMCx) ili motorne kore (MCx) i EMG signala dorzalnih vratnih mišića. Strelice ukazuju na starenjem izazvane, konzistentne i statistički značajne promene srednje vrednosti kortikomuskularne koherencije (CMC) odgovarajuće eksperimentalne grupe (↑ - NB lezija, ↓ - PPT lezija).**

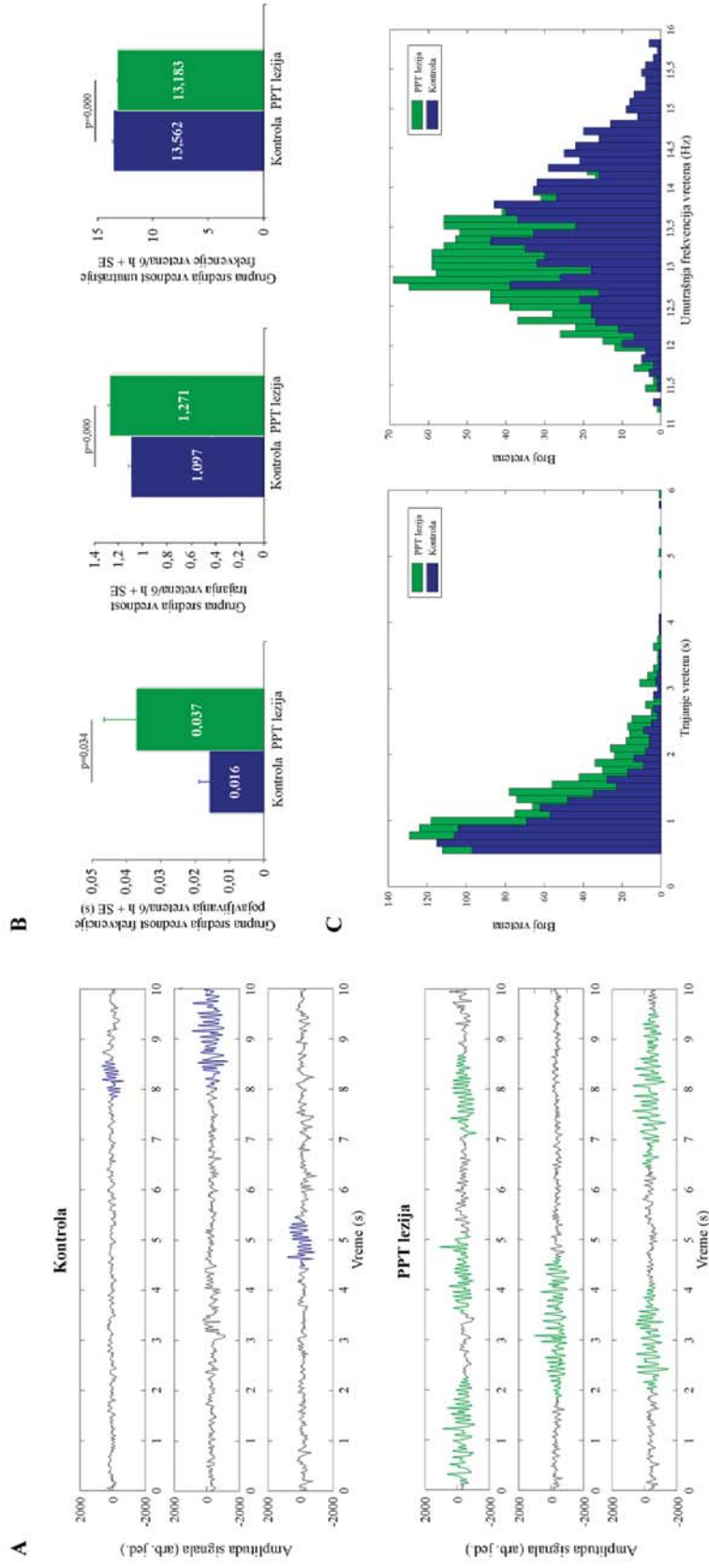
#### 4.2.5. Dinamika vretena spavanja u starenju pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona PPT jedra

Kako je starenje pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona PPT jedra uslovalo konzistentno povećanje EEG sigma relativne amplitude u MCx (od 3,5 – 5,5 meseci), za vreme REM faze spavanja (**Slika 4.15.;** **Slika 4.17.**), što je predstavljalo potpuno nov i patološki REM fenomen, a ujedno i najraniji znak odnosno najraniji elektrofiziološki marker početka starenja kod PPT lezije, javila se potreba za dodatnom analizom, odnosno za detekcijom vretena spavanja u toku REM faze spavanja i daljom analizom njihove dinamike.

Analiza dinamike vretena spavanja za vreme REM faze u MCx je pokazala da je starenje kod PPT lediranih pacova izazvalo povećanje srednje frekvencije pojavljivanja vretena (**Slika 4.21.B.;**  $z = -2,12$  ;  $p = 0,03$ ), kao i srednje trajanje vretena (**Slika 4.21.B.;**  $z = -6,59$  ;  $p = 0,00$ ). Sa druge strane, srednja unutrašnja frekvencija vretena kod PPT lediranih pacova je manja u poređenju sa fiziološkim kontrolama (**Slika 4.21.B.;**  $z = -10,45$  ;  $p = 0,00$ ).

Pored toga, grupne distribucije trajanja i unutrašnje frekvencije vretena (**Slika 4.21.C.**) pokazuju da PPT ledirani pacovi imaju daleko veći broj vretena dužeg trajanja, i niže unutrašnje frekvencije (12,5–13,5 Hz) u odnosu na fiziološke kontrole.

U toku vizuelne detekcije vretena spavanja ustanovljeno je prisustvo vretena veoma kompleksnih oblika, sa raznolikim (mešovitim) komponentama unutrašnjih frekvencija kod PPT lediranih pacova (**Slika 4.21.A.**).



**Slika 4.21. Vretena spavanja i njihova dinamika u toku REM faze spavanja u MCx fizioloških kontrola i PPT lediranih pacova 4,5 meseca starosti. (A)** Prikaz analognih i filtriranih EEG signala motorne kore u trajanju od 10 s sa obeleženim vretenima spavanja različitog oblika, trajanja, i unutrašnje frekvencije. **(B)** Grupni histogrami srednjih vrednosti frekvencije pojavljivanja, trajanja i unutrašnje frekvencije vretena spavanja/6 h + standardna greška (SE) kod fizioloških kontrola i PPT lediranih pacova. **(C)** Grupne distribucije trajanja i unutrašnje frekvencije vretena kod fizioloških kontrola i PPT lediranih pacova.



# *5. Diskusija*

U toku starenja se javljaju značajne kvantitativne i kvalitativne promene u spavanju, a neke od njih su: odloženo uspavlivanje, veća fragmentiranost sna, buđenje u toku noći, kao i smanjeno trajanje NREM faze spavanja (Mendelson i Bergmann, 1999a; Crowley, 2011). Kako se ove promene javljaju u kasnijoj životnoj dobi i utiču na kvalitet života i dnevnog funkcionisanja, neophodno je da se izdvoje promene spavanja koje nastaju u fiziološkom starenju od onih koje nastaju usled različitih patoloških procesa (Crowley, 2011).

U ovoj doktorskoj disertaciji je praćen uticaj starenja: na arhitekturu spavanja; EEG mikrostrukturu i dinamiku epizoda osnovnih faza spavanja; motornu kontrolu dorzalnih vratnih mišića u toku spavanja; kao i na dinamiku vretena spavanja za vreme spontanog spavanja kod mladih adultnih pacova (3 meseca starosti), pa sve do 5,5 meseci starosti. Ovaj period starenja smo odabrali u cilju pronalaženja najranijih markera poremećaja spavanja i motorne kontrole dorzalnih vratnih mišića u toku spavanja kako u fiziološkom starenju, tako i u starenju u eksperimentalnim modelima holinergičke neuropatologije najčešćih humanih bolesti starenja. Naime, kako su sve do sada dokumentovane, starenjem uslovljene promene u arhitekturi spavanja, kao i promene u odgovarajućim EEG frekventnim opsezima (Mendelson i Bergmann, 1999a; 1999b; 2000; Feinberg i sar., 2002; Kirov i Moyanova, 2002; Moyanova i sar., 2002) dobijene iz eksperimenata gde su korišćeni pacovi različite starosti, (mladi (3-5 meseci starosti), sredovečni (10-12 meseci starosti) i stari pacovi (21-24 meseci starosti)), još uvek nije poznat tačan početak ovih promena.

Iako se spavanje smatra globalnim fenomenom, koji je kontrolisan centralnim, specijalizovanim neuronskim mrežama (Nobili i sar., 2012), nedavno je takođe sugerisano da je spavanje i lokalni fenomen, tj. bazična odlika malih neuronskih grupa (Krueger i sar., 2008; Genzel i Dresler, 2012). Brojni dokazi u eksperimentalnim modelima kao i u ljudi su pokazali: da spavanje i budnost mogu biti istovremeni u različitim moždanim regionima; da granice između ovih moždanih stanja nisu striktno definisane; da faze spavanja

moгу biti prostorno neujednačene; kao i da spavanje i budnost ne moraju biti vremenski razdvojene faze (Nobili i sar., 2012). Pored toga, skorašnje studije na pacovima (Saponjic i sar., 2013; Petovic i sar., 2013b; 2014) su dokazale topografske promene u arhitekturi spavanja, strukturi prelaznih stanja u toku spavanja, kao i u EEG mikrostrukturi različitih faza spavanja koje su nastale kao posledica funkcionalno različitih holinergičkih neuropatologija velikog mozga.

### **5.1. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u fiziološkom starenju pacova**

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da fiziološko starenje dovodi do topografskih promena u arhitekturi spavanja i motornoj kontroli vratnih mišića u toku spontanog spavanja pacova. Za razliku od arhitekture spavanja, koja se u toku starenja menjala samo u senzomotornoj kori, po prvi put je dokazano da fiziološko starenje menja motornu kontrolu vratnih mišića u toku spavanja i iz senzomotorne i iz motorne kore.

Fiziološko starenje u senzomotornoj kori konzistentno skraćuje trajanje NREM faze, dok se trajanje REM faze spavanja konzistentno produžava (**Slika 4.1.**), i to zahvaljujući smanjenom broju dugih NREM epizoda i povećanom broju kratkih REM epizoda spavanja (**Tabela 4.1.**; **Slika 4.3.**). Iako starenje nije uticalo na arhitekturu spavanja u motornoj kori (**Slika 4.1.**; **Tabela 4.1.**), dovelo je do skraćenog trajanja REM epizoda spavanja na kraju perioda starenja koji smo pratili (**Tabela 4.1.**). Takođe, fiziološko starenje nije dovelo do konzistentnih promena EEG mikrostrukture budnosti, NREM i REM faze spavanja ni u senzomotornoj ni u motornoj kori (**Slika 4.4.**; **Slika 4.5.**). Ovim smo dokazali da fiziološko starenje dovodi do kvantitativnih i kvalitativnih promena spavanja koje su se topografski različito iskazale u senzomotornoj u odnosu na motornu koru. Takođe, ove promene govore o smanjenoj sposobnosti konsolidacije spavanja usled promena u broju i trajanju epizoda

različitih faza spavanja, odnosno povećanoj fragmentiranosti spavanja (**Slika 4.2., Tabela 4.1.**).

Iako podaci o promjenama arhitekture spavanja u starenju, koji su do sada objavljeni nisu konzistentni (Rosenberg i sar., 1979; Mendelson i Bergmann, 1999a; 1999b; 2000; Kirov i Moyanova, 2002; Moyanova i sar., 2002;), naši rezultati dobijeni na pacovima sa spontanom spavanjem su u saglasnosti sa dokazima o skraćivanju NREM faze i produženom trajanju REM faze spavanja, kao i stabilnoj NREM delta amplitudi kod sredovečnih pacova koji se oporavljaju od deprivacije spavanja (Mendelson i Bergmann, 1999b; 2000).

Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put dokazuju da fiziološko starenje dovodi do topografskih promena motorne kontrole vratnih mišića u toku spontanog spavanja pacova. Naime, stabilne promene delta, sigma i beta kortikomuskularne koherencije (CMC; **Slika 4.6.; Slika 4.7.**) dokazuju da fiziološko starenje uslovljava izmenu motorne kontrole vratnih mišića u toku spavanja, i iz senzomotorne i iz motorne kore. U toku budnosti i REM faze spavanja promene delta i beta CMC iz senzomotorne kore su bile suprotnog smera (**Slika 4.6.**), dok su promene delta i beta CMC iz motorne kore bile istog smera (**Slika 4.7.**). Takođe, fiziološko starenje smanjuje sigma CMC za vreme NREM i REM faze spavanja, ali i povećava sigma CMC za vreme budnosti iz obe kore.

Fiziološko starenje kod pacova izaziva istovremeno povećanje delta i beta CMC u budnosti i REM fazi spavanja, iako ne dovodi do promena relativnih amplituda EEG delta i beta frekventnog opsega. Naime, starenje ne menja EEG mikrostrukturu budnosti, ali povećava delta CMC iz obe kore (**Slika 4.6.; Slika 4.7.**), i beta CMC iz motorne kore (**Slika 4.7.**). Drugim rečima, fiziološko starenje povećava propagaciju delta oscilacija iz obe kore i propagaciju beta oscilacija iz motorne kore do dorzalnih vratnih mišića za vreme budnosti. Pored toga, starenje prolazno menja REM delta i beta relativne EEG amplitude samo u senzomotornoj kori (**Slika 4.5.**), ali dovodi do smanjenja

delta i beta CMC iz senzomotrne kore, istovremeno sa povećanjem delta i beta CMC iz motorne kore u REM fazi spavanja (**Slika 4.6.**; **Slika 4.7.**). Naime, ovi rezultati pokazuju istovremenu povećanu propagaciju delta i beta oscilacija iz motorne kore sa smanjenjem propagacije delta i beta oscilacija iz senzomotorne kore do dorzalnih vratnih mišića, za vreme REM faze spavanja, u fiziološkom starenju.

Ova dvostruka i inverzna motorna kontrola dorzalnih vratnih mišića u REM fazi spavanja, dokazana putem delta i beta CMC, može predstavljati homeostatski mehanizam za održavanje motorne kontrole u fiziološkom starenju.

Skorašnje studije su pokazale izraženu beta koherenciju tokom slabe do umerene izometrijske kontrakcije (Kristeva i sar., 2007), kao i da je smanjenje beta koherencije povezano sa usporavanjem pokreta (bradikinezija, akinezija i rigidnost) kod PB pacijenata (Salenius i sar., 2002), dok je povećana sinhronizacija u beta frekventnom opsegu prisutna kod tremora (Krause i sar., 2014). Sa druge strane, povećanje beta koherencije je dokazano u REM fazi kod pacijenata sa poremećenim ponašanjem u toku REM faze spavanja, dok promena beta koherencije za vreme budnosti i NREM faze spavanja nije bilo (Jung i sar., 2012). Petrovic i sar. (2013a; 2014) su na pacovskom modelu težeg oblika holinergičke neuropatologije PB pokazali dugotrajno i istovremeno smanjenje delta relativne amplitude u budnosti i NREM fazi spavanja i generalizovano povećanje beta relativne amplitude u svim fazama spavanja u senzomotornoj kori. U ovom modelu je takođe pokazana i pojava dva različita tipa REM faze spavanja, kao i izmenjena motorna kontrola dorzalnih vratnih mišića iz senzomotorne kore u REM fazi spavanja (Petrovic i sar., 2014). Zapravo, smanjena talamo-kortikalna holinergička inervacija dovodi do povećanja EEG beta relativne amplitude u senzomotornoj kori, ali i do smanjene beta CMC u REM fazi spavanja, što ukazuje na postojanje oštećenja

(prekida) nishodnih puteva propagacije oscilacija usled bilateralne PPT lezije (Petrovic i sar., 2014).

Postoje dokazi da se kontrola voljnih toničnih kontrakcija mišića ekstremiteta zdravih ljudi odvija putem tri osnovne motorne kontrole (tri nishodna prenosa oscilacija): 10 Hz motorna kontrola (povezana sa fiziološkim pozicionim tremorom); 20 Hz motorna kontrola (karakteristična za slabije mišićne kontrakcije) i 40 Hz motorna kontrola (karakteristična za veoma jake mišićne kontrakcije). Za razliku od 10 Hz oscilacija, čije je poreklo još uvek nejasno, 20 Hz i 40 Hz oscilacije potiču iz primarne motorne kore velikog mozga (Brown, 2000; Salenius i sar., 2002). Takođe je pokazano da levodopa u PB pacijenata preusmerava motornu koru iz „moda“ neefikasnog regrutovanja motornih jedinica, udruženog sa sinhronizacijom izlaza iz motorne kore u ritmu od oko 10 Hz, u „mod“ za poboljšanje regrutovanja motornih jedinica sa sinhronizacijom u ritmu između 15-30 Hz i 35-60 Hz (Salenius i sar., 2002).

Na osnovu svih pomenutih eksperimentalnih dokaza, možemo spekulirati da povećana beta CMC iz motorne kore za vreme budnosti i REM faze spavanja u našim istraživanjima može predstavljati homeostatski mehanizam za kompenzaciju istovremeno povećane delta CMC, kao i za poboljšanje motorne kontrole u fiziološkom starenju. Pored toga, inverzna motorna kontrola iz senzomotorne i motorne kore u REM fazi spavanja, iskazana preko delta i beta CMC, može služiti za održavanje homeostaze zdrave REM faze spavanja, REM faze sa atonijom antigravitacionih mišića, u fiziološkom starenju. Drugim rečima, povećani prenos oscilacija u beta frekventnom opsegu može predstavljati kompenzatorni homeostatski mehanizam za „ublažavanje“ povećanog prenosa oscilacija u delta frekventnom opsegu i održavanje zdrave REM faze u fiziološkom starenju.

Rezultati ove doktorske disertacije su u skladu sa istraživanjima koja govore da starenjem izazvano povećanje CMC može predstavljati kompenzatorni mehanizam, odnosno kompenzatorno povećanu kontrolu

mišića iz kore velikog mozga u održavanju izometrijske kontrakcije (Kristeva i sar., 2007; Kamp i sar., 2013), ali i sa dokazima da CMC predstavlja eferentni fenomen, odnosno propagaciju oscilacije od kore velikog mozga do spinalnih motoneurona preko kortiko-spinalnog puta (Ushiyama i sar., 2010; Jung i sar., 2012). S druge strane, farmakološke studije sugerišu da CMC i kortikalne oscilacije predstavljaju zasebne fenomene i ojačavaju hipotezu da CMC odražavaju značajan mehanizam, pre nego prenos kortikalnog fenomena (Baker i Baker, 2003; Riddle i sar., 2004).

Linearne korelacije relativnih amplituda pojedinačnih EEG frekventnih opsega (delta i beta) i njihovih odgovarajućih srednjih CMC vrednosti ukazuju na funkcionalnu vezu u delta i beta EEG frekventnom opsegu motorne kore za vreme REM faze spavanja (**Slika 4.8.**), kao i u EEG delta frekventnom opsegu senzomotorne kore za vreme budnosti (**Slika 4.8.**). Naime, dobijeni rezultati najvećih značajnih vrednosti linearnih korelacija ukazuju da: 1) porast EEG relativne amplitude ne utiče na pojačanje prenosa te oscilacije ka vratnom mišiću (porast CMC vrednosti), niti na jačinu samog korelacionog odnosa; 2) propagacija delta i beta oscilacija iz motorne kore ka dorzalnom vratnom mišiću kao i jačina korelacionog odnosa između delta i beta EEG amplitude i odgovarajućih CMC vrednosti je potencirana (olakšana) samom REM fazom spavanja; 3) pojačana propagacija delta i beta oscilacija iz motorne kore (porast delta CMC i beta CMC) ka dorzalnom vratnom mišiću u toku REM faze spavanja sugeriše postojanje dvostruke i inverzne motorne kontrole u toku ove faze spavanja.

Ovde moramo uzeti u obzir da perfektno funkcionisanje senzornog sistema za vreme budnosti u odnosu na njegovo funkcionisanje za vreme REM faze spavanja, gde je ulaz senzornih informacija blokiran, može biti uzrok različito izmenjene motorne kontrole iz senzomotorne i motorne kore za vreme budnosti i REM faze spavanja. Takođe, obzirom da se registrovanje spavanja odvijalo za vreme normalno neaktivne cirkadijalne faze pacova (od 9 do 15 h),

budna faza u našim istraživanjima predstavlja više pobuđenost nego pravo budno stanje.

Rezultati ove doktorske disertacije su po prvi put pokazali da fiziološko starenje menja arhitekturu spavanja, kao i motornu kontrolu vratnih mišića u toku spavanja već kod 4,5 meseca starih pacova. Takođe, po prvi put smo dokazali da su budnost i REM faza spavanja najosetljivije na promene motorne kontrole u toku fiziološkog starenja, za razliku od NREM faze spavanja koja je stabilna. Fiziološko starenje različito utiče na motornu kontrolu vratnih mišića iz senzomotorne i iz motorne kore u toku spavanja.

## **5.2. Poremećaj spavanja i motorne kontrole u starenju pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona**

U ovoj doktorskoj disertaciji su po prvi put izneti dokazi da su najraniji znaci starenja pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona iskazani kao različite topografske promene EEG mikrostrukture u toku REM faze spavanja. Konzistentno smanjenje delta EEG relativne amplitude u senzomotornoj kori u toku REM faze spavanja (**Slika 4.15.**; **Slika 4.16.**) predstavlja najraniji znak starenja kod NB lediranih pacova (poremećaj kortikalne holinergičke inervacije kore velikog mozga), dok konzistentno povećanje sigma EEG relativne amplitude u motornoj kori u toku REM faze spavanja (**Slika 4.15.**; **Slika 4.17.**) predstavlja najraniji znak starenja kod PPT lediranih pacova (poremećaj talamo-kortikalne holinergičke inervacije kore velikog mozga).

Takođe, pored topografskih promena EEG mikrostrukture za vreme REM faze spavanja, pokazali smo da je u pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona starenje uslovalo istovetne promene u motornoj kontroli dorzalnih vratnih mišića u toku spavanja iz



motorne kore, dok je motorna kontrola iz senzomotorne kore bila različito eksprimirana tokom starenja (**Slika 4.18.**; **Slika 4.19.**; **Slika 4.20.**).

Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put pokazuju veću frekventnost vretena spavanja za vreme REM faze spavanja u motornoj kori pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona PPT jedra, koja su produženog trajanja i manje unutrašnje frekvencije (**Slika 4.21.B.**). Ovaj potpuno nov i patološki REM fenomen objašnjava povećanje EEG sigma relativne amplitude u motornoj kori za vreme REM faze spavanja (**Slika 4.15.**; **Slika 4.17.**), koji ujedno predstavlja i najraniji elektrofiziološki marker početka starenja kod ovih pacova.

U eksperimentima ove doktorske disertacije, kao i u našim predhodnim studijama (Saponjic i sar., 2013; Petrovic i sar., 2013a; 2013b), za bilateralne NB i PPT lezije je korišćen neselektivni ekscitotoksin (0,1 M rastvor IBO u volumenu od 100 nl), koji je ubrizgan stereotaksički navođenom mikroinfuzijom. Ovim metodološkim pristupom izvršene su delimične bilateralne lezije, gde je u slučaju NB lezije deficit holinergičkih neurona u svakoj strani mozga bio veći od  $37,23 \pm 3,37\%$  kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju NB jedra (**Slika 4.10.**), dok je u slučaju PPT lezije deficit holinergičkih neurona u svakoj strani mozga bio veći od  $23,17 \pm 2,74\%$  kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra (**Slika 4.11.**). Takođe, pokazano je da nema progresije gubitka NB, a ni PPT holinergičkih neurona u toku vremenskog perioda koji smo pratili (od 3 do 5,5 meseci starosti), ni u fiziološkim kontrolama, niti kod lediranih pacova (**Slika 4.9.**; **Slika 4.10.**; **Slika 4.11.**). Ovi podaci su u saglasnosti sa studijom koja pokazuje da se nakon mikroinfuzije ibotenične kiseline u *corpus striatum* Wistar pacova, veličina deficita u prvih 48 h povećava tri puta, a zatim do dvanaestog dana postepeno opada do konačnih dimenzija (Pachorn i sar., 1993).

Ovde je bitno napomenuti da su NB i PPT jedra heterogene moždane strukture koje pored holinergičkih neurona, sadrže i GABAerģičke i glutamaterģičke neurone. Kako je u ovoj studiji korišćena ibotenična kiselina,

najčešći i najefikasniji ekscitotoksin za neselektivne lezije neuronskih tela (Inglis i Semba, 1997), nije moguće isključiti eventualna oštećenja neholinergičkih neurona, kao ni njihov uticaj. Takođe, postoje dokazi da IBO smanjuje broj GABAergičkih i holinergičkih neurona za 43% i 23% u NB jedru, a holinergičke neurone u kori velikog mozga za 41%, dok 192IgG-saporin, kao selektivni ekscitotoksin smanjuje GABAergičke neurone za 11% i holinergičke za 69% u NB jedru, a holinergičke neurone u kori velikog mozga za 84% (Kaur i sar., 2008). Dodatno, dok GABAergički neuroni u okviru bazalnog prednjeg mozga predstavljaju interneurone, koji povezuju holinergičke neurone, ili imaju projekcije ka hipokampusu (Schliebs i Arendt, 2006), skoro svi NB neuroni koji se projektuju ka kori velikog mozga su holinergički neuroni (kod primata je to više od 95% neurona, a kod pacova 80 – 90% neurona) (Szymusiak, 1995). Sa druge strane, PPT jedro je podeljeno u dva dela: dorzolateralni, kaudalni deo jedra sa gusto grupisanim neuronima – PPT *pars compacta*, i razređeniji rostromedijalni deo – PPT *pars dissipata*. Naime, oko 50% svih PPT neurona čine holinergički neuroni, dok je oko 40% svih PPT neurona smešteno u okviru *pars compacta* dela PPT jedra (Rye, 1997). Pored toga, dok holinergički neuroni sačinjavaju približno 90% neuronske populacije *pars compacta* PPT jedra, u *pars dissipata* PPT jedra zastupljenost holinergičkih neurona je 25 – 50% (Rye, 1997; Jenkinson i sar., 2009; Alam i sar., 2011). Dodatno, iako je anatomsko i morfološka struktura PPT jedra slična kod pacova, mačaka, primata i ljudi, ipak postoje razlike između vrsta u arhitekturi i aferentno-eferentnim vezama holinergičkih, glutamatergičkih i GABAergičkih neurona sa drugim moždanim strukturama (Alam i sar., 2011). U ovoj studiji, našim metodološkim pristupom za mikroinfuzije, napravljena je nepotpuna lezija u PPT - *pars compacta* sa obe strane mozga, tj. u delu PPT jedra (**Slika 4.11**) koje je dominantno holinergička neuronska subpopulacija.

Analiza arhitekture spavanja je pokazala prolazne topografske promene samo kod pacovskog modela težeg oblika holinergičke neuropatologije AB.

Naime, kod NB lediranih pacova se javlja samo prolazno smanjenje budnosti i produženje NREM faze spavanja u senzomotornoj kori (**Slika 4.12.A.**), dok se u motornoj kori prolazno smanjuje trajanje budnosti, a produžava trajanje REM faze spavanja (**Slika 4.12.D.**). Međutim, arhitektura spavanja NB lediranih pacova se nije razlikovala od arhitekture spavanja fizioloških kontrola već u narednom terminu, tako da možemo da kažemo da proces starenja generalno ne dovodi do promena arhitekture spavanja kod pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona (**Slika 4.12. B.,C.,E.,F.**). Iako starenje ne dovodi do promena u trajanju budnosti, NREM i REM faze spavanja, starenje remeti dinamiku epizoda REM faze spavanja kod NB lediranih pacova u senzomotornoj kori (**Tabela 4.2.**). Naime, broj REM epizoda kraćeg trajanja se smanjio, ali je došlo do povećanja broja REM epizoda spavanja dužeg trajanja (**Slika 4.14.**).

Za razliku od fiziološkog starenja, starenje pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona uslovljava specifične promene u EEG mikrostrukturi u toku REM faze spavanja, koji predstavljaju najranije znake starenja kod NB (smanjenje delta EEG relativne amplitude u senzomotornoj kori, **Slika 4.15.; Slika 4.16.**) i PPT lediranih pacova (povećanje sigma EEG relativne amplitude u motornoj kori, **Slika 4.15.; Slika 4.17.**).

Pored najranijih znakova promenjene EEG mikrostrukture za vreme REM faze spavanja, koji predstavljaju početak starenja u pacovskim modelima neurodegeneracije funkcionalno različitih holinergičkih neurona, starenje poništava efekte PPT lezije za vreme budnosti u obe kore (poništava povećanje beta relativne amplitude koje indukuje PPT lezija), i za vreme NREM faze spavanja u motornoj kori (poništava smanjenje delta relativne amplitude i povećanje beta relativne amplitude koje indukuje PPT lezija). Sa druge strane, starenje održava efekat PPT lezije za vreme NREM faze (konzistentno povećanje beta relativne amplitude kod PPT lediranih pacova), kao i efekat NB

lezije za vreme REM faze spavanja (konzistentno povećanje teta relativne amplitude kod NB lediranih pacova, **Slika 4.15.**; **Slika 4.16.**) u senzomotornoj kori.

Rezultati koji su izneti u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju postojanje dva različita obrasca REM faze spavanja nastala usled starenja pacova, na osnovu kojih je moguće razlikovati poremećaje u degeneraciji funkcionalno različitih holinergičkih inervacija kore velikog mozga pacova. Naime, sigma aktivnost ( $\sigma = 10,1-15$  Hz) nije tipična za REM fazu, već je obeležje NREM faze spavanja i najčešće predstavlja prisustvo vretena spavanja koja su najzastupljenija na prelazu iz NREM u REM fazu spavanja („light NREM”). Smanjenje sigma aktivnosti je zabeleženo nakon moždanog udara i odražava oštećenje talamokortikalnog sistema (Gottselig i sar., 2002), dok povećana sigma aktivnost reflektuje kompenzatorni mehanizam usled plastičnosti, odnosno reorganizacionih promena (Poryazova i sar., 2015). Na osnovu naših rezultata mi možemo za sada samo pretpostaviti da REM obogaćen vretenima spavanja u motornoj kori, u našem eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije PB, odražava starenjem izazvane promene, koje su posledica kompenzatornih mehanizama (reorganizacija neuronskih mreža ili adaptacija u starenju sa oslabljenom PPT holinergičkom inervacijom). Ove promene u reorganizaciji neuronskih mreža mogu biti posledica toničnog smanjenja holinergičke inhibicije retikularnih talamičkih neurona i ekscitacije talamo-kortikalnih neurona u toku različitih faza spavanja, kao i posledica hronične dezinhibicije, tj. povećanja aktivnosti monoaminergičkih neurona, naročito za vreme REM faze spavanja, kada su oni prirodno neaktivni (tzv. monoaminska tišina). Pored toga, starenjem izazvano smanjenje delta relativne amplitude u našem eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije AB, praćeno već povećanom teta aktivnošću u senzomotornoj kori usled same NB lezije, može biti posledica starenjem izazvanih kompenzatornih promena

(reorganizacija neuronskih mreža ili adaptacija u starenju sa oštećenom NB holinergičkom inervacijom).

Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su po prvi put dokazala da su se tokom starenja promene motorne kontrole vratnih mišića u toku spavanja iz motorne kore iskazale kao povećanje delta CMC za vreme budnosti i istovremeno povećanje delta, teta, sigma i beta CMC u NREM i REM fazi spavanja i kod NB i kod PPT lediranih pacova (**Slika 4.18.**; **Slika 4.19.**; **Slika 4.20.**). Sa druge strane, starenjem izazvane promene motorne kontrole vratnih mišića u toku spavanja iz senzomotorne kore su se manifestovale kao povećanje delta CMC za vreme budnosti i kao istovremeno povećanje delta, teta i sigma CMC u toku NREM faze samo kod PPT lediranih pacova, dok su se kod NB lediranih pacova manifestovale kao smanjenje delta CMC u toku NREM faze i kao povećanje teta i gama CMC u toku REM faze spavanja (**Slika 4.18.**; **Slika 4.19.**; **Slika 4.20.**).

Rezultati koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su u skladu sa istraživanjima koja govore da neurodegeneracija funkcionalno različitih holinergičkih neurona dovodi do specifičnih topografskih promena EEG mikrostrukture i tranzitornih stanja u toku spavanja (Petrovic i sar., 2013b). Takođe, postoje dokazi da se u eksperimentalnom modelu težeg oblika holinergičke neuropatologije PB (Petrovic i sar., 2014) pojavljuju dve funkcionalno različite REM faze spavanja, a koje se karakterišu različitom ukupnom snagom EMG signala, topografski različitim EEG mikrostrukturama spavanja, kao i različitom motornom kontrolom dorzalnih vratnih mišića. U ovom eksperimentalnom modelu prenos oscilacija u beta frekventnom opsegu iz senzomotorne kore je izmenjen u obe REM faze, ali su promene bile izraženije za vreme zdravog REM-a (REM sa atonijom), nego u patološkom REM-u (REM bez atonije) (Petrovic i sar., 2014). Ove dve REM faze su nazvane na osnovu najvećih CMC vrednosti (Petrovic i sar., 2014), kao teta REM (zdrav REM, REM sa atonijom) i sigma REM (patološki REM, REM bez atonije).

Ovde treba napomenuti da kortikomuskularna koherencija (CMC) predstavlja: metod za detekciju ranih znakova fiziološkog starenja (Kamp i sar., 2013); neurofiziološki marker funkcionalne veze primarne motorne kore i perifernih mišića; meru koja omogućava kvantifikovanje funkcionalne veze primarne motorne kore i kontralateralnih perifernih mišića u frekventnom domenu (Salenius i sar., 2002; Kristeva i sar., 2007; Kraus i sar., 2014); kao i meru integriteta piramidalnog puta (Mima i Hallett, 1999; Kristeva i sar., 2007). Istovremeno, CMC ima važnu ulogu u integraciji senzomotornih informacija, predstavljajući ključni mehanizam za odgovarajuću motornu kontrolu (Kristeva i sar., 2007; Kamp i sar., 2013). Iako je CMC u beta frekventnom opsegu važna za vreme slabe i srednje izometrijske kontrakcije kod zdravih ljudi (Kristeva i sar., 2007), smanjenje beta koherencije je povezano sa smanjenom visokofrekventnom motornom kontrolom iz motorne kore do kontralateralnih mišića, što doprinosi motornim simptomima PB, kao što su bradikinezija i rigidnost (Salenius i sar., 2002; Kraus i sar., 2014). Sa druge strane, povećanje beta koherencije je dokazano u REM fazi kod pacijenata sa poremećenim ponašanjem u toku REM faze spavanja (Jung i sar., 2012). Rezultati ove doktorske disertacije su u saglasnosti sa dokazima da starenjem uslovljeno povećanje CMC može predstavljati kompenzatorni mehanizam, odnosno jače učešće motorne kore u održavanju izometrijske kontrakcije (Kristeva i sar., 2007; Kamp i sar., 2013), kao i sa dokazima da CMC predstavlja eferentni fenomen, odnosno propagaciju oscilacija od kore velikog mozga do motoneurona putem kortikospinalnog puta (Ushiyama i sar., 2010).

Analiza dinamike vretena spavanja za vreme REM faze u motornoj kori, kod 4,5 meseca starih pacova, je pokazala da su vretena spavanja frekventnija kod pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona PPT jedra. Pored toga što se češće javljaju, ova vretena su i produženog trajanja i manje unutrašnje frekvencije (**Slika 4.21.B.**). Takođe, u ovih pacova je u toku vizuelne detekcije vretena spavanja ustanovljeno prisustvo vretena veoma kompleksnih

oblika, sa mešovitim komponentama unutrašnjih frekvencija, tj. „hibridnih vretena“ (Slika 4.21.A.). Kako vretena spavanja predstavljaju ritmične rastućo-opadajuće oscilacije (eng. „waxing and waning“) u 10-16 Hz frekventnom opsegu (sigma frekventni opseg) (Loomis i sar., 1935; Steriade i sar., 1993), ustanovljena povećana frekvencija pojavljivanja vretena, kao i njihovo produženo trajanje u motornoj kori kod PPT lediranih pacova su bila uzrok novog patološkog REM fenomena, tj. REM faze spavanja obogaćene sigma aktivnošću.

Karakteristike vretena spavanja (frekventnost, amplituda, trajanje i unutrašnja frekvencija) se veoma razlikuju između individua, a dokazana je i njihova topografska specifičnost (De Gennaro i Ferrara, 2003; Nir i sar., 2011; Martin i sar., 2013.). Naime, spora vretena (11 – 13 Hz) se uglavnom javljaju u frontalnim, a brza vretena (13 – 15 Hz) u centro-parijetalnim regionima (De Gennaro i Ferrara, 2003). Takođe, nedavno je dokazano da se većina vretena javlja nezavisno u različitim regionima mozga, dok se samo mali broj vretena javlja simultano, što ukazuje da je vreteno više lokalni nego globalni fenomen (Nir i sar., 2011; Martin i sar., 2013.).

Vretena spavanja nastaju usled recipročnih interakcija neurona retikularnog talamičkog jedra (RT) i talamo-kortikalnih neurona, neurona hipokampusa i kore velikog mozga (Steriade, 2006; Buzaki i sar., 1990). Karakteristike vretena spavanja odražavaju očuvanost ovih neuronskih mreža i mogu imati dijagnostičku vrednost kao biomarkeri u različitim patologijama (Warby i sar., 2014).

Dodatno, ista grupa neurona talamo-kortikalne petlje je generator tri različita tipa ritmičnih oscilacija: vretena spavanja; visoko voltažnih vretena (HVS – „high voltage spindle“), koja se javljaju u imobilisanom budnom stanju, ali i u apsans epilepsiji; kao i šiljak-talas kompleksa koji se javlja za vreme generalizovanog epileptičnog napada (Buzsaki i sar., 1990). Iako se ove oscilacije javljaju u različitim fazama spavanja i osciluju različitim

frekvencijama (Buzsaki i sar., 1990), dokazano je da u određenim uslovima može doći do transformacije vretena spavanja u šiljak-talas kompleks, kao i da se u toku ove transformacije mogu naći različite hibridne forme vretena (Kostopoulos i sar., 1981). Naime, sve je više istraživanja koja se bave promenama vretena spavanja usled različitih patoloških poremećaja kao što su šizofrenija, epilepsija, autizam, neke neurodegenerativne bolesti, ali i u periodu oporavka nakon moždanog udara (Petit i sar., 2004; Urakami i sar., 2012; Ozaki i sar., 2012; Sitnikova i sar., 2016). Tako je na primer primećena smanjena frekventnost vretena kod AB (Petit i sar., 2004), kao i kod šizofrenije (Urakami i sar., 2012, Warby i sar., 2014), dok je povećan broj vretena primećen kod Hantingtonove bolesti (Petit i sar., 2004). Takođe, nedavno su Ozaki i sar. (2012) u pacijenta sa demencijom sa Luvijevim telašcima pokazali da je donepezil, inhibitor acetilholin esteraze, indukovao vretena spavanja u znatno većem broju, a primećeno je i poboljšanje u njegovom mentalnom statusu. Podaci o promenama u broju vretena spavanja u fiziološkom starenju koji su do sada objavljeni nisu konzistentni, (Nicolas i sar., 2001; Crowley i sar., 2002; Fogel i sar., 2012; Lafortune i sar., 2014). Uzrok ovog neslaganja se može potražiti u korišćenju različitih metoda za detekciju vretena spavanja, korišćenju različitih algoritama, ali i parametara kod kojih je izvršena drugačija optimizacija (Warby i sar., 2014).

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije ukazuju da nakon bilateralne lezije PPT jedra, usled smanjene holinergičke inhibicije retikularnih talamičkih neurona i ekscitacije talamo-kortikalnih neurona u različitim fazama spavanja, u starenju može doći do reorganizacije neuronskih veza koje mogu ozbiljno da utiču na talamo-kortikalnu petlju koja je zadužena za generisanje vretena spavanja. Na osnovu ovoga, možemo da spekuliramo da je pojava vretena spavanja u REM fazi spavanja motorne kore, kao i njihova povećana frekventnost, produženo trajanje i smanjena unutrašnja frekvencija, ali i pojava vretena kompleksnih oblika, posledica kompenzatornih mehanizama.



Takođe, kako se vretena spavanja normalno javljaju u NREM fazi spavanja, postavlja se pitanje da li je pojava vretena u REM fazi posledica lošeg diferenciranja NREM i REM faze spavanja u patološkim uslovima u odnosu na kontrolni uslov. Međutim, diferenciranje NREM i REM 10 s epoha na osnovu linearne korelacije relativnih amplituda tipičnih ritmova NREM i REM faze spavanja, tj. sigma i teta relativnih amplituda, i to i kod fizioloških kontrola i kod PPT lediranih pacova (**Slika 3.4.**), je pokazalo da je diferenciranje u našim istraživanjima vršeno na isti način, ili sa istim eventualnim greškama.

## *6. Zaključci*

Na osnovu postavljenih ciljeva i analize rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

### **1. Fiziološko starenje u pacova izaziva sledeće promene u spavanju i motornoj kontroli:**

- » Fiziološko starenje dovodi do promena spavanja koje se topografski različito iskazuju u senzomotornoj kori u odnosu na motornu koru.
- » Promene arhitekture spavanja izazvane fiziološkim starenjem se javljaju od 4,5 meseci starosti pacova i to samo u senzomotornoj kori. Trajanje NREM faze se skraćuje, dominantno zbog skraćanja srednjeg trajanja NREM epizoda, naročito usled smanjenja broja dugih NREM epizoda. Trajanje REM faze spavanja se produžava dominantno zbog povećanja srednjeg broja REM epizoda, naročito usled povećanja broja kratkih REM epizoda.
- » Fiziološko starenje nije dovelo do konzistentnih promena EEG mikrostrukture budnosti, NREM i REM faze spavanja, ni u senzomotornoj ni u motornoj kori.
- » Fiziološko starenje dovodi do topografskih promena motorne kontrole vratnih mišića u toku spontanog spavanja pacova.
- » Starenje izaziva istovremenu povećanu propagaciju delta i beta oscilacija iz motorne kore sa smanjenjem propagacije delta i beta oscilacija iz senzomotorne kore do dorzalnih vratnih mišića, za vreme REM faze spavanja već od 3,5 meseca starosti pacova.
- » Dokazana dvostruka i inverzna motorna kontrola dorzalnih vratnih mišića u REM fazi spavanja, može predstavljati homeostatski mehanizam za održavanje fiziološke motorne kontrole u REM fazi spavanja.

- » Budnost i REM faza spavanja su najsenzitivnije na promene motorne kontrole u toku fiziološkog starenja.

**2. Starenje pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona izaziva sledeće promene u spavanju i motornoj kontroli:**

- » Starenje pacova sa neurodegeneracijom holinergičkih neurona dovodi do topografskih promena EEG mikrostrukture u toku REM faze spavanja.
- » Konzistentno smanjenje delta EEG relativne amplitude u senzomotornoj kori, već od 3,5 meseca starosti pacova, predstavlja najraniji znak starenja kod NB lediranih pacova. Konzistentno povećanje sigma EEG relativne amplitude u motornoj kori, već od 3,5 meseca starosti pacova, predstavlja najraniji znak starenja kod PPT lediranih pacova.
- » Starenje pacova sa neurodegeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih neurona dovodi do topografskih promena motorne kontrole vratnih mišića u toku spontanog spavanja od 4,5 meseci starosti pacova.
- » Promene kontrole dorzalnih vratnih mišića u toku spavanja iz motorne kore su se iskazale kao: povećanje propagacije delta oscilacija za vreme budnosti i istovremeno povećanje propagacije delta, teta, sigma i beta oscilacija u NREM i REM fazi spavanja kako kod NB tako i kod PPT lediranih pacova.
- » Starenjem izazvane promene kontrole dorzalnih vratnih mišića, u toku spavanja, iz senzomotorne kore kod PPT lediranih pacova su se manifestovale kao: povećanje propagacije delta oscilacija za vreme budnosti i istovremeno povećanje propagacije delta, teta i sigma oscilacija u toku NREM faze spavanja.

- » Starenjem izazvane promene kontrole dorzalnih vratnih mišića, u toku spavanja, iz senzomotorne kore kod NB lediranih pacova su se manifestovale kao: smanjenje propagacije delta oscilacija za vreme NREM faze i istovremeno povećanje propagacije teta i gama oscilacija za vreme REM faze spavanja.
- » Pojava vretena spavanja za vreme REM faze spavanja u motornoj kori PPT lediranih pacova predstavlja po prvi put dokazan, potpuno nov i patološki REM fenomen. Ova vretena su: raznolikih oblika, frekventnija, produženog trajanja i manje unutrašnje frekvencije u PPT lediranih pacova u odnosu na kontrolne pacove.
- » Ovaj nov i patološki REM fenomen, koji se javlja već od 3,5 meseca starosti pacova (patološka pojava vretena spavanja u toku REM faze), objašnjava povećanje REM EEG sigma relativne amplitude u motornoj kori i predstavlja najraniji elektrofiziološki marker početka starenja kod PPT lediranih pacova.

Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put dokazuju rane elektrofiziološke znake starenja u eksperimentalnim modelima neurodegeneracije funkcionalno različitih holinergičkih neurona.

Starenje u ovim eksperimentalnim modelima prouzrokuje topografski specifične promene EEG mikrostrukture i motorne kontrole u toku spavanja, posebno u REM fazi spavanja. Ova kompenzatorna, starenjem izazvana plastičnost, je različito izražena kroz mišićnu kontrolu iz senzomotorne kore, a istovremeno i istovetno izražena iz motorne kore u toku svih faza spavanja.

U eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije PB po prvi put je dokazan patološki REM fenomen kao rani znak starenja. Ovaj potpuno nov REM fenomen je zapravo REM faza spavanja obogaćena sigma aktivnošću,

koja je prouzrokovana patološkom, i povećanom učestalošću vretena spavanja, posebno „hibridnih“ formi vretena spavanja, koja su bila produženog trajanja i manje unutrašnje frekvencije.

## ***7. Literatura***

1. Abbott, A. 2005. While you were sleeping. *Nature* 437, 1220-1222.
2. Adamczyk, M., Genzel, L., Dresler, M., Steiger, A., Friess, E. 2015. Automatic Sleep Spindle Detection and Genetic Influence Estimation Using Continuous Wavelet Transform. *Front Hum Neurosci* 9, 1-20.
3. Alam, M., Schwabe, K., Krauss, J. K. 2011. The pedunculo-pontine nucleus area: critical evaluation of interspecies differences relevant for its use as a target for deep brain stimulation. *Brain* 134, 11-23.
4. American Academy of Sleep Medicine. 2005. International Classification of Sleep Disorders 2nd edition: Diagnostic and coding manual.
5. Aravamuthan, B. R., Muthusamy, K. A., Stein, J. F., Aziz, T. Z., JohansenBerg, H. 2007. Topography of cortical and subcortical connections of the human pedunculo-pontine and subthalamic nuclei. *Neuroimage* 37, 694-705.
6. Arendash, G. W., Millard, W. J., Dunn, A. J., Meyer, E. M. 1987. Long-term neuropathological and neurochemical effects of nucleus basalis lesions in the rat. *Science* 238, 952-956.
7. Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A., Tennstedt, A. 1983. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol* 61, 101-108.
8. Baker, M. R., Baker, S. N. 2003. The effect of diazepam on motor cortical oscillations and corticomuscular coherence studied in man. *J Physiol* 546, 931-942.
9. Bartus, R. T. 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163, 495-529.



10. Beatty, W. W., Butters, N., and Janowsky, D. S. 1986. Patterns of memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypotheses of dementia. *Behav Neural Biol* 45, 196-211.
11. Benarroch, E. E, Schmeichel, A. M. 2002 Depletion of cholinergic mesopontine neurons in multiple system atrophy: a substrate for REM behavior disorder? *Neurology* 59, 944-946.
12. Berger-Sweeney, J. 2003. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neurosci Behav Rev* 27, 401-411.
13. Bjelobaba, I., Saponjic, J. 2013. High volume microinfusion suppresses local astrocytes response within the nucleus basalis of rat. *Arch Ital Biol* 151, 24-32.
14. Boeve, B. F. 2013. Idiopathic REM sleep behaviour disorder in the development of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 12, 469-482.
15. Boeve, B.F., Silber, M. H., Saper, C. B., Ferman, T. J., Dickson, D. W., Parisi, J. E., Benarroch, E. E., Ahlskog, J. E., Smith, G. E., Caselli, R. C., Tippman-Peikert, M., Olson, E. J., Lin, S. C., Young, T., Wszolek, Z., Schenck, C. H., Mahowald, M. W., Castillo, P. R., Del Tredici, K., Braak, H. 2007. Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain* 130, 2770-2788.
16. Bohnen, N. I., Albin, R. L. 2011. The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav Brain Res* 221, 564-573.
17. Bohnen, N. I., Müller, M. L, Kotagal, V., Koeppe. R. A., Kilbourn, M. R., Gilman, S., Albin, R. L., Frey, K. A. 2012. Heterogeneity of cholinergic denervation in Parkinson's disease without dementia. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1609-1617.

18. Bohnen, N. I., Müller, M. L., Koeppe, R. A., Studenski, S. A., Kilbourn, M. A., Fey, K. A., Albin, R. L. 2009. History of falls in Parkinson disease is associated with reduced cholinergic activity. *Neurology* 73, 1670-1676.
19. Boucetta, S., Salimi A., Dadar, M., Jones, B., Collins, D. L., Dang-Vu. T. T. 2016. Structural Brain Alterations Associated with Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder in Parkinson's Disease. *Sci Rep* 6, 1-11.
20. Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Braak, E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol aging* 24, 197-211.
21. Brody, H. 1955. Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 102, 511-516.
22. Brooks, D. J. 1995. The role of the basal ganglia in motor control: contributions from PET. *J Neurol Sci* 128, 1-13.
23. Brown, P. 2000. Cortical drives to human muscle: the Piper and related rhythms. *Prog Neurobiol* 60, 97-108.
24. Burke S. N., Barnes, C. A. 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7, 30-40.
25. Buzaki, G. A., Smith, S, Bercher, L. J., Fisher, J., Gage, F. H. 1990. Petit mal epilepsy and Parkinsonian tremor: hypothesis of a common pacemaker. *Neuroscience* 36, 1-14.
26. Chase, M. H. 1980. The motor functions of the reticular formation are multifaceted and state-determined. In: *The reticular formation revisited* (Eds. Hobson, J. A., Brazier, M. A. B.), 449-472, Raven Press, New York.
27. Chase, M. H. 2013. Motor control during sleep and wakefulness: Clarifying controversies and resolving paradoxes. *Sleep Med Rev* 17, 299-312.

28. Chase, M. H., Morales, F. R. 2005. Control of Motoneurons during Sleep. In: Principles and Practice of Sleep Medicine, 3rd ed. (Eds. Kryger, M., Roth, T., Dement, W. C.), 154-168. WB Saunders, Philadelphia.
29. Chung, K. A., Lobb, B. M., Nutt, J. G., Horak, F. B. 2010. Effects of a central cholinesterase inhibitor on reducing falls in Parkinson disease. *Neurology* 75, 1263-1269.
30. Ciric, J., Lazic, K., Petrovic, J., Kalauzi, A., Saponjic, J. 2015. Aging induced cortical drive alterations during sleep in rats. *Mech Ageing Dev* 146-148, 12-22.
31. Ciric, J., Lazic, K., Petrovic, J., Kalauzi, A., Saponjic, J. 2016. Age-related disorders of sleep and motor control in the rat models of functionally distinct cholinergic neuropathology. *Behav Brain Res* 301, 273-286.
32. Crow, T. J., Grove-White, L. G. 1973. An analysis of the learning deficit following hyoscine administration to man. *Br J Pharmacol* 49, 322-327.
33. Crowley, K. 2011. Sleep and Sleep Disorders in Older Adults. *Neuropsychol Rev* 21, 41-53.
34. Crowley, K., Trinder, J., Colrain, I. M. 2002. An examination of evoked K-complex amplitude and frequency of occurrence in the elderly. *J Sleep Res* 11, 129-140.
35. Datta, S. 1997 Cellular basis of pontine ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 17, 341-365.
36. Datta, S., MacLean, R. R. 2007. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 775-824.

37. Datta, S., Spoley E. E., Patterson E. H. 2001. Microinjection of glutamate into pedunculo pontine tegmentum induces REM sleep and wakefulness in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, 752-759.
38. De Gennaro, L., Ferrara, M. 2003. Sleep spindles: an overview. *Sleep Med Rev* 7, 423-440.
39. Drachman, D., Leavitt, J. 1974. Human memory and the cholinergic system: A relationship to aging? *Arch Neurol* 30, 113-121.
40. Dringenberg, H. C. 2000. Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' – evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res* 115, 235-249.
41. Dringenberg, H. C., Olmstead, M. C. 2003. Integrated contributions of basal forebrain and thalamus to neocortical activation elicited by pedunculo pontine tegmental stimulation in urethane-anesthetized rats. *Neuroscience* 119, 839-853.
42. Feinberg, I., Campbell, I. G., Schoepp, D. D., Anderson, K. 2002. The selective group mGlu2/3 receptor agonist LY379268 suppresses REM sleep and fast EEG in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 467-474.
43. Fogel, S., Martin, N., Lafortune, M., Barakat, M., Debas, K., Laventure, S, Latreille, V., Gagnon, J. F., Doyon, J., Carrier, J. 2012. NREM sleep oscillations and brain plasticity in aging. *Front Neurol* 3, 1-7.
44. Garcia-Rill, E. 1986. The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res* 396, 47-63.
45. Garcia-Rill, E. 1991. The pedunculo pontine nucleus. *Prog Neurobiol* 36, 363-389.
46. Garcia-Rill, E., Charlesworth, A., Heister, D., Ye, M., Hayar, A. 2008. The developmental decrease in REM sleep: the role of transmitters and electrical coupling. *Sleep* 31, 673-690.

47. Garcia-Rill, E., Hyde, J., Kezunovic, N., Urbano, F. J., Petersen, E. 2015. The physiology of the pedunculopontine nucleus: implications for deep brain stimulation. *J Neural Transm* 122, 225-235.
48. Genzel, L., Dresler, M. 2012. Sleep-more local and complex than previously thought. *Front Neurol* 3, 1-2.
49. Georgopoulos, A. P., Grillner, S. 1989. Visuomotor coordination in reaching and locomotion. *Science* 245, 1209-1210.
50. Gottselig, J. M., Bassetti, C. L., Achermann, P. 2002. Power and coherence of sleep spindle frequency activity following hemispheric stroke. *Brain* 125, 373-383.
51. Greene, R. W., Carpenter, D. O. 1985. Actions of neurotransmitters on pontine medial reticular formation neurons of the cat. *J Neurophysiol* 54, 520-531.
52. Grillner, S. 1981. Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. In: *The nervous system II* (Edt. Brooks, V. B.), 1179-1236, Am Physiol Soc Press, Bethesda.
53. Hobson, J. A., McCarley, R. W., Wyzinski, P. W. 1975. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189, 55-58.
54. Inglis, W. L., Semba, K. 1997. Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid, AMPA, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Res* 755, 17-27.
55. Iranzo, A., Molinuevo, J. L., Santamaria, J., Serradell, M., Marti, M. J., Valldeoriola, F, Tolosa, E. 2006. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol* 5, 572-577.
56. Iranzo, A., Tolosa, E., Gelpi, E., Molinuevo, J. L., Valldeoriola, F., Serradell, M., Sanchez-Valle, R., Vilaseca, I., Lomena, F., Vilas, D., Llado, A., Gaig, C.,

- Santamaria, J. 2013. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 12, 443-453.
57. Jenkinson, N., Nandi, D., Muthusamy, K., Ray, N. J., Gregory, R., Stein, J. F., Aziz, T. Z. 2009. Anatomy, physiology, and pathophysiology of the pedunculopontine nucleus. *Mov Disord* 24, 319-328.
58. Jones, B. E. 2004. Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145, 157-169.
59. Jouvet, M., Michel, F. 1959. Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate and esencephalic cat. *C R Seances Soc Biol Fil* 153, 422-425.
60. Jouvet-Mounier, D., Astic, L., Lacote, D. 1970. Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol* 2, 216-239.
61. Jung, K. Y., Cho, J. H., Ko, D., Seok, H. Y., Yoon, H. K., Lee, H. J., Kim, L., Im, C. H. 2012. Increased corticomuscular coherence in idiopathic REM sleep behavioral disorder. *Front Neurol* 3, 1-6.
62. Kamp, D., Krause, V., Butz, M., Schnitzler, A., Pollok, B. 2013. Changes of cortico-muscular coherence: an early marker of healthy aging. *Age* 35, 49-58.
63. Karachi, C., Grabli, D., Bernard, F. A., Tande, D., Wattiez, N., Belaid, H., Bardinet, E., Prigent, A., Nothacker, H. P., Hunot, S., Hartmann, A., Leheicy, S., Hirsh, E. C., Francois, C. 2010. Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *J Clin Invest* 120, 2745-54.
64. Kaur, S., Junek, A., Black, M. A., Semba, K. 2008. Effects of ibotenate and 192IgG-saporin lesions of the nucleus basalis magnocellularis/substantia innominata on spontaneous sleep and wake states and on recovery sleep after sleep deprivation in rats. *J Neurosci* 28, 491-504.

65. Kirov, R., Moyanova, S. 2002. Distinct sleep-wake stages in rats depend differentially on age. *Neurosci Lett* 322, 134-136.
66. Kitai, S. T. 1998. Afferent control of substantia nigra compacta dopamine neurons: anatomical perspective and role of glutamatergic and cholinergic inputs. *Adv Pharmacol* 42, 700-702.
67. Kostopoulos, G., Gloor, P., Pellegrini, A., Gotman, J. 1981. A study of the transition from spindles to spike and wave discharge in feline generalized penicillin epilepsy: microphysiological features. *Exp Neurol* 73, 55-77.
68. Kotagal, V., Albin, R. L., Müller, M. L., Koeppe, R. A., Chervin, R. D., Frey, K. A., Bohnen, N. I. 2012a. Symptoms of rapid eye movement sleep behavior disorder are associated with cholinergic denervation in Parkinson disease. *Ann Neurol* 71, 560-568.
69. Kotagal, V., Muller, M. L., Kaufer, D. I., Koeppe, R. A., Bohnen, N. I. 2012b. Thalamic cholinergic innervation is spared in Alzheimer disease compared to parkinsonian disorders. *Neurosci Lett* 514, 169-172.
70. Krause, V., Wach, C., Südmeyer, M., Ferrea, S., Schnitzler, A., Pollok, B. 2014. Cortico-muscular coupling and motor performance are modulated by 20 Hz transcranial alternating current stimulation (tACS) in Parkinson's disease. *Front Hum Neurosci* 7, 1-10.
71. Kristeva, R., Patino, L., Omlor, W. 2007. Beta-range cortical motor spectral power and corticomuscular coherence as a mechanism for effective corticospinal interaction during steady-state motor output. *Neuroimage* 36, 785-792.
72. Krueger, J. M., Rector, D. M., Roy, S., Van Dongen, H. P., Belenky, G., Panksepp, J. 2008. Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. *Nat Rev Neurosci* 9, 910-919.

73. Lafortune, M., Gagnon, J. O., Martin, N., Latreille, V., Dubé, J., Bouchard, M., Bastien, C., Carrier, J. 2014. Sleep spindles and rapid eye movement sleep as predictors of next morning cognitive performance in healthy middle-aged and older participants. *J Sleep Res* 23, 159-167.
74. Lee, M. G., Jones, B. E. 2004. Role of Basalo-Cortical System in Modulating Cortical Activity and Sleep-Wake States. In: *Sleep: Circuits and Functions* (Eds. Luppi, P. H.), 24-40, CRC Press.
75. Loomis, A. L., Harvey, E. N., Hobart, G. 1935. Potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science* 81, 597-598.
76. Losier, B. J., Semba, K. 1993. Dual projections of single cholinergic and aminergic brainstem neurons to the thalamus and basal forebrain in the rat. *Brain research* 604, 41-52.
77. Lu, J., Sherman, D., Devor, M., Saper, C. B. 2006. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441, 589-594.
78. Mallat, S. 2009. *A Wavelet Tour of Signal Processing, The Sparse Way*, 3rd ed., Academic Press, Elsevier Inc.
79. Martin, N., Lafortune, M., Godbout, J., Barakat, M., Robillard, R., Poirier, G., Bastien, C., Carrier, J. 2013. Topography of age-related changes in sleep spindles. *Neurobiol Aging* 34, 468-476.
80. McCarley, R. W. 2007. Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep med* 8, 302-330.
81. McCarley, R. W., Hobson, J. A. 1975. Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* 189, 58-60.
82. Mena-Segovia, J., Bolam, J. P., Magill, P. J. 2004. Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci* 27, 585-588.



83. Mendelson, W. B., Bergmann, B. M. 1999a. Age-related changes in sleep in the rat. *Sleep* 22, 145-150.
84. Mendelson, W. B., Bergmann, B. M. 1999b. EEG delta power during sleep in young and old rats. *Neurobiol Aging* 20, 669-673.
85. Mendelson, W. B., Bergmann, B. M., 2000. Age-dependent changes in recovery sleep after 48 hours of sleep deprivation in rats. *Neurobiol Aging* 21, 689-693.
86. Mima, T., Hallett, M. 1999. Corticomuscular coherence: a review. *J Clin Neurophysiol* 16, 501-511.
87. Mori, F., Okada, K., Nomura, T., Kobayashi, Y. 2016. The Pedunculopontine Tegmental Nucleus as a Motor and Cognitive Interface between the Cerebellum and Basal Ganglia. *Front Neuroanat* 10, 1-8.
88. Mori, S. 1987. Integration of posture and locomotion in acute decerebrate cats and in awake, free moving cats. *Prog Neurobiol* 28, 161-196.
89. Moriizumi, T., Hattori, T. 1992. Separate neuronal populations of the rat globus pallidus projecting to the subthalamic nucleus, auditory cortex and pedunculopontine tegmental area. *Neuroscience* 46, 701-710.
90. Moritani, T., Stegeman, D., Merletti, R. 2004. Basic physiology and biophysics of EMG signal generation. In: *Electromyography: physiology, engineering and noninvasive applications* (Eds. Merletti, R., Parker, P.), 1-26, Wiley IEEE Press, New Jersey.
91. Moyanova, S. G., Kirov, R. K., Kortenska, L. V. 2002. Age-related changes in neocortical high-voltage spindles and alpha EEG power during quiet waking in rats. *Int J Neurosci* 112, 473-487.
92. Müller, M. L., Albin, R. L., Kotagal, V., Koeppe, R. A., Scott, P. J., Frey, K. A., Bohnen, N. I. 2013. Thalamic cholinergic innervation and postural sensory integration function in Parkinson's disease. *Brain* 136, 3282-3289.

93. Newman, E. L., Gupta, K., Climer, J. R., Monaghan, C. K., Hasselmo, M. E., 2012. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Front Behav Neurosci* 6, 1-19.
94. Nicolas, A., Petit, D., Rompre, S., Montplaisir, J. 2001. Sleep spindle characteristics in healthy subjects of different age groups. *Clin Neurophysiol* 112, 521-527.
95. Nir, Y., Staba, R. J., Andrillon, T., Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C., Fried, I., Tononi, G. 2011. Regional slow waves and spindles in human sleep. *Neuron* 70, 153-169.
96. Nobili, L., De Gennaro, L., Proserpio, P., Moroni, F., Sarasso, S., Pigorini, A., De Carli, F., Ferrara, M. 2012. Local aspects of sleep: observations from intracerebral recordings in humans. *Prog Brain Res* 199, 219-232.
97. Nordberg, A. 2001. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 49, 200-210.
98. Nussbaum, R. L., Ellis, C. E. 2003. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348, 1356-1364.
99. Ohayon, M. M., Carskadon, M. A., Guilleminault, C., Vitiello, M. V. 2004. Metaanalysis of quantitative sleep parameters from childhood to old age in healthy individuals: Developing normative sleep values across the human lifespan. *Sleep* 27, 1255-1273.
100. Ozaki, A., Nishida, M., Koyama, K., Ishikawa, K., Nishikawa, T. 2012. Donepezil-induced sleep spindle in a patient with dementia with Lewy bodies: a case report. *Psychogeriatrics* 12, 255-258.
101. Pace-Schott, E. F., Hobson, J. A. 2002. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci* 3, 591-605.
102. Pace-Schott, E. F., Hobson, J. A., Stickgold, R. 2008. Sleep, Dreaming, and Wakefulness. In: *Fundamental Neuroscience*, 3rd ed. (Eds. Squire, L., Berg, D.,

- Bloom, F., du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N.), 959-985, Elsevier, Academic Press, London UK.
103. Pachorn, U., Körperich, H., Heymans, L., Subramanian, S., Kuhn, W. 1993. MRI and MRS studies on the time course of rat brain lesions and the effect of drug treatment: volume quantification and characterization of tissue heterogeneity by parameter selection. *Magnet Reson Med* 30, 174-182.
  104. Paxinos, G., Watson, C. 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego, US.
  105. Paxinos, G., Watson, C., Carrive, P., Kirkcaldie, M., Ashwell, K. W. S. 2009. *Chemoarchitectonic Atlas of The Rat Brain*, 2nd ed. Academic Press, London, UK.
  106. Peever, J., Luppi, P. H., Montplaisir, J. 2014. Breakdown in REM sleep circuitry underlies REM sleep behavior disorder. *Trends Neurosci* 37, 279-288.
  107. Petit, D., Gagnon, J. F., Fantini, M. L., Ferini-Strambi, L., Montplaisir, J. 2004. Sleep and quantitative EEG in neurodegenerative disorders. *J Psychosom Res* 56, 487-496.
  108. Petrovic, J., Ciric, J., Lazic, K., Kalauzi, A., Saponjic, J. 2013a. Lesion of the pedunculo pontine tegmental nucleus in rat augments cortical activation and disturbs sleep/wake state transitions structure. *Exp Neurol* 247, 562-571.
  109. Petrovic, J., Lazic, K., Ciric, J., Kalauzi, A., Saponjic, J. 2013b. Topography of the sleep/wake states related EEG microstructure and transitions structure differentiates the functionally distinct cholinergic innervation disorders in rat. *Behav Brain Res* 256, 108-118.
  110. Petrovic, J., Lazic, K., Kalauzi, A., Saponjic, J. 2014. REM sleep diversity following the pedunculo pontine tegmental nucleus lesion in rat. *Behav Brain Res* 271, 258-268.

111. Petrović, J. 2014. Spavanje i elektroencefalografski ritmovi kao indikatori poremećaja funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
112. Poryazova, R., Huber, R., Khatami, R., Werth, E., Brugger, P., Barath, K., Baumann, C. R., Bassetti, C. L. 2015. Topographic sleep EEG changes in the acute and chronic stage of hemispheric stroke. *J Sleep Res* 24, 54-65.
113. Postuma, R. B., Gagnon, J. F., Montplaisir, J. Y. 2012. REM sleep behavior disorder: from dreams to neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 46, 553-558.
114. Rapp, P. R., Bachevalier, J. 2008. Cognitive Development and Aging. In: *Fundamental Neuroscience*, 3rd ed. (Eds. Squire, L., Berg, D., Bloom, F., du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N.), 959-985, Elsevier, Academic Press, London UK.
115. Riddle, C. N., Baker, M. R., Baker, S. N. 2004. The effect of carbamazepine on human coritcomuscular coherence. *Neuroimage* 22, 333-340.
116. Ringman, J., Simmons, J. 2000. Treatment of REM sleep behavior disorder with donepezil: a report of three cases. *Neurology* 55, 870-871.
117. Rinne, J. O., Ma, S. Y., Lee, M. S., Collan, Y., Roytta, M. 2008. Loss of cholinergic neurons in the pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease is related to disability of the patients. *Parkinsonism Relat Disord* 14, 553-557.
118. Romero, D. H., Stelmach, G. E. 2001. Motor function in neurodegenerative disease and aging. In: *Handbook of Neuropsychology* (Eds. Boller, F., Cappa, S. F.), 163-191, Elsevier Science.
119. Rosenberg, R. S., Zepelin, H., Rechtschaffen, A. 1979. Sleep in young and old rats. *J Gerontol* 34, 525-532.
120. Rossignol, S. 1996. Neural control of stereotypic limb movements. In: *Handbook of physiology* (Eds. Rowell, L. B., Shepherd, J. T.), 173-216, Oxford University Press, New York.

121. Rugg, E. L., Dunbar, J. S., Latimer, M., Winn, P. 1992. Excitotoxic lesions of the pedunclopontine tegmental nucleus of the rat. I. Comparison of the effects of various excitotoxins, with particular reference to the loss of immunohistochemically identified cholinergic neurons. *Brain Res* 589, 181-193.
122. Ruggiero, D. A., Anwar, M., Golanov, E. V., Reis, D. J. 1997. The pedunclopontine tegmental nucleus issues collaterals to the fastigial nucleus and rostral ventrolateral reticular nucleus in the rat. *Brain Res* 760, 272-276.
123. Rye, D. B. 1997. Contributions of the pedunclopontine region to normal and altered REM sleep. *Sleep* 20, 757-788.
124. Sabbatini, M., Bronzetti, E., Felici, L., Fringuelli, Ch., Sagratella, S., Amenta, F. 1999. NADPH-diaphorase histochemistry in the rat cerebral cortex and hippocampus: effect of electrolytic lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Mech Ageing Dev* 107, 147-157.
125. Salenius, S., Avikainen, S., Kaakkola, S., Hari, R., Brown, P. 2002. Defective cortical drive to muscle in Parkinson's disease and its improvement with levodopa. *Brain* 125, 491-500.
126. Sapin, E., Lapray, D., Berod, A., Goutagny, R., Leger, L., Ravassard, P., Clement, O., Hanriot, L., Fort, P., Luppi, P. H. 2009. Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PloS One* 4, e4272.
127. Saponjic, J., Cvorovic, J., Radulovacki, M., Carley, D. W. 2005a. Serotonin and noradrenaline modulate respiratory pattern disturbances evoked by glutamate injection into the pedunclopontine tegmentum of anesthetized rats. *Sleep* 28, 560-570.
128. Saponjic, J., Petrovic, J., Kalauzi, A., Ciric, J., Lazic, K., Radulovacki, M., Carley, D. W. 2013. Sleep-state related EEG amplitude distribution in the rat model of cortical cholinergic innervation disorder. *Sleep Biol Rhythms* 11, 105-115.

129. Saponjic, J., Radulovacki, M., Carley, D. W. 2003. Respiratory pattern modulation by the pedunculopontine tegmental nucleus. *Respir Physiol Neurobiol* 138, 223-237.
130. Saponjic, J., Radulovacki, M., Carley, D. W. 2005b. Injection of glutamate into the pedunculopontine tegmental nuclei of anesthetized rat causes respiratory dysrhythmia and alters EEG and EMG power. *Sleep Breath* 9, 82-91.
131. Sarter, M., Bruno, J. P. 2000. Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents, *Neuroscience* 95, 933-952.
132. Sarter, M., Parikh, V., Howe, W. M. 2009. Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat Rev Neurosci* 10, 383-390.
133. Scheibel, A. B. 1979. The hippocampus: organizational patterns in health and senescence. *Mech Ageing Dev* 9, 89-102.
134. Scheibel, M. E., Lindsay, R. D., Tomiyasu, U., Scheibel, A. B. 1976. Progressive dendritic changes in the aging human limbic system. *Exp Neurol* 53, 420-430.
135. Schenck, C. H. 2013. Rapid eye movement sleep behavior disorder: current knowledge and future directions. *Sleep Med* 14, 699-702.
136. Schliebs, R., Arendt, T. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113, 1625-1644.
137. Seidler, R. D., Bernard, J. A., Burutolu, T. B., Fling, B. W., Gordon, M. T., Gwin, J. T., Kwak, Y., Lipps, D. B. 2010. Motor control and aging: Links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neurosci Biobehav Rev* 34, 721-733.

138. Semba, K. 1993. Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 330, 543-556.
139. Semba, K., Fibiger, H. C. 1989. Organization of central cholinergic systems. *Prog Brain Res* 79, 37-63.
140. Semba, K., Fibiger, H. C. 1992. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunclopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 323, 387-410.
141. Simic, G., Stanic, G., Mladinov, M., Jovanov-Milosevic, N., Kostovic, I., Hof, P. R. 2009. Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathol Appl Neurobiol* 35, 532-554.
142. Sitnikova, E., Hramov, A. E., Grubovb, V., Koronovsky, A. A. 2016. Rhythmic activity in EEG and sleep in rats with absence epilepsy. *Brain Res Bull* 120, 106-116.
143. Steriade, M. 2006. Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* 137, 1087-1106.
144. Steriade, M., McCormick, D. A., Sejnowski, T. J. 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262, 679-685.
145. Szymusiak, R. 1995. Magnocellular nuclei of the basal forebrain: substrates of sleep and arousal regulation. *Sleep* 18, 478-500.
146. Šaponjić, J. 2009. Neurohemijski mehanizmi regulacije spavanja. *Glas Srpske akademije nauka i umetnosti*, 50, 97-109.
147. Šaponjić, J. 2011. Selektivne stimulacije i lezije moždanih jedara pacova kao modeli u istraživanjima mehanizama humane patologije spavanja. *Glas Srpske akademije nauka i umetnosti* 51, 85-97.

148. Takakusaki, K. 2013. Neurophysiology of gait: from the spinal cord to the frontal lobe. *Mov Disord* 28,1483-1491.
149. Takakusaki, K., Chiba, R., Notu, T., Okumura, T. 2016. Brainstem control of locomotion and muscle tone with special reference to the role of the mesopontine tegmentum and medullary reticulospinal systems. *J Neural Transm* 123, 695-729.
150. Takakusaki, K., Habaguchi, T., Saitoh, K., Kohyama, J. 2004. Changes in the excitability of hindlimb motoneurons during muscular atonia induced by stimulating the pedunculopontine tegmental nucleus in cats. *Neuroscience* 124, 467-480.
151. Toledano, A., Alvarez, M. I. 2004. Lesions and dysfunctions of the nucleus basalis as Alzheimer's disease models: general and critical overview and analysis of the long-term changes in several excitotoxic models. *Curr Alzheimer Res* 1, 189-214.
152. Ujma, P. P., Gombos, F., Genzel, L., Konrad, B. N., Simor, P., Steiger, A., Dresler, M., Bodizs, R. 2015. A comparison of two sleep spindle detection methods based on all night averages: individually adjusted vs. fixed frequencies. *Front Hum Neurosci* 9, 1-11.
153. Urakami, Y., Ioannides, A. A., Kostopoulos, G. K. 2012. Sleep Spindles – As a Biomarker of Brain Function and Plasticity. In: *Advances in Clinical Neurophysiology* (Eds. Ajeena, I. M.), 73-108, InTech, Rijeka.
154. Urbano, F. J., D'Onofrio, S. M., Luster, B. R., Beck, P. B., Hyde, J. R., Bisagno, V., Garcia-Rill, E. 2014. Pedunculopontine nucleus gamma band activity-preconscious awareness, waking, and REM sleep. *Front Neurol* 5, 1-12.
155. Ushiyama, J., Takahashi, Y., Ushiba, J., 2010. Muscle dependency of corticomuscular coherence in upper and lower limb muscles and training-



- related alterations in ballet dancers and weightlifters. *J Appl Physio* 109, 1086-1095.
156. Vincent, S. R., Satoh, K., Armstrong, D. M., Fibiger, H. C. 1983. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation. *Neurosci Lett* 143, 31-36.
157. Vitale, F., Mattei, C., Capozzo, A., Pietrantonio, I., Mazzone, P., Scarnati, E. 2016. Cholinergic excitation from the pedunculo-pontine tegmental nucleus to the dentate nucleus in the rat. *Neuroscience* 317, 12-22.
158. Vitiello, M.V. 2006. Sleep in normal aging. *Sleep Med Clin* 1, 171-176.
159. Warby, S. C., Wendt, S. L., Welinder, P., Munk, E. G. S., Carrillo, O., Sorensen, H. B., Jennum, P., Peppard, P. E., Perona, P., Miqnot, E. 2014. Sleep-spindle detection: crowdsourcing and evaluating performance of experts, non-experts and automated methods. *Nat Methods* 11, 385-392.
160. Wenk, G. L. 1993. A primate model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 57, 117-122.
161. Whitwell, J. L., Weigand, S. D., Shiung, M. M., Boeve, B. F., Ferman, T. J., Smith, G. E., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Benarroch, E. E., Josephs, K. A., Jack, C. R. 2007. Focal atrophy in dementia with Lewy bodies on MRI: a distinct pattern from Alzheimer's disease. *Brain* 130, 708-719.
162. Woolf, N. J., Butcher, L. L. 1989. Cholinergic systems in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res Bull* 23, 519-540.

# *Prilozi*



Dear Jelena Ciric

We hereby grant you permission to reproduce the material detailed below at no charge **in your thesis, in print and on E-theses of University of Belgrade** and subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:  
  
"This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year)."
3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. This permission is granted for non-exclusive world **Serbian** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than as specified above. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
6. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely

Jennifer Jones  
Permissions Specialist

**Elsevier Limited, a company registered in England and Wales with company number 1982084, whose registered office is The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom.**

**From:** [jelenaciric@ibiss.bg.ac.rs](mailto:jelenaciric@ibiss.bg.ac.rs) [<mailto:jelenaciric@ibiss.bg.ac.rs>]

**Sent:** 31 January 2017 17:42

**To:** Rights and Permissions (ELS)

**Subject:** Obtain Permission – Book request

**Title:** M.S. Jelena Ciric

Institute/company: Institute for Biological Research - Sinisa Stankovic, University of Belgrade

Address: Despot Stefan Blvd. 142

Post/Zip Code: 11060

City: Belgrade

State/Territory:

Country: Serbia

Telephone: +381 11 2078 426

Email: [jelenaciric@ibiss.bg.ac.rs](mailto:jelenaciric@ibiss.bg.ac.rs)

**Type of Publication:** Book

Book Title: Fundamental Neuroscience, third edition

Book ISBN: 978-0-12-374019-9

Book Author: Larry Squire, Darwin Berg, Floyd Bloom, Sascha du Lac, Anirvan Ghosh and Nicholas Spitzer

Book Year: 2008

Book Pages: 959 to 985

Book Chapter number: 42

Book Chapter title: Sleep, Dreaming, and Wakefulness

**I would like to use:** Figure(s)

**Quantity of material:** 3 figures: FIGURE 42.3 Portions of a 24-h day that are devoted to waking, REM sleep, and non-REM (NREM) sleep change over a lifetime. FIGURE 42.4 Electroencephalograms showing electrical activity of the human brain during different stages of sleep. FIGURE 42.10 Structural and dynamic models of activation in REM sleep.

**Excerpts:**

**Are you the author of the Elsevier material?** No

**If not, is the Elsevier author involved?** No

**If yes, please provide details of how the Elsevier author is involved:**

**In what format will you use the material?** Print and Electronic

**Will you be translating the material?** Yes, including English language

**If yes, specify language:** serbian

**Information about proposed use:** Reuse in a thesis/dissertation

**Proposed use text:** posting in a repository

**Additional Comments / Information:** Please, may I get the permissions for reuse of these figures ASAP. Thanks for understanding.

---

Elsevier Limited. Registered Office: The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom, Registration No. 1982084, Registered in England and Wales.

## NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 08, 2017

---

This Agreement between Jelena Ciric ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

|  |  |
|--|--|
| License Number                         | 4044310359497  |
| License date                           |  |
| Licensed Content Publisher             | Nature Publishing Group  |
| Licensed Content Publication           | Nature   |
| Licensed Content Title                 | A putative flip-flop switch for control of REM sleep   |
| Licensed Content Author                | Jun Lu, David Sherman, Marshall Devor, Clifford B. Saper   |
| Licensed Content Date                  | May 10, 2006   |
| Licensed Content Volume                | 441  |
| Licensed Content Issue                 | 7093   |
| Type of Use                            | reuse in a dissertation / thesis   |
| Requestor type                         | academic/educational   |
| Format                                 | print and electronic   |
| Portion                                | figures/tables/illustrations   |
| Number of figures/tables/illustrations | 1  |
| High-res required                      | no   |
| Figures                                | Figure 3 The interrelationship of the two halves of the REM switch.  |
| Author of this NPG article             | no   |
| Your reference number                  |  |
| Title of your thesis / dissertation    | Early electrophysiological markers of the sleep and motor control disorders during aging in rats with neurodegeneration of the cholinergic neurons |
| Expected completion date               | Jun 2017   |
| Estimated size (number of pages)       | 150  |
| Total                                  | 0.00 USD   |

### Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested

indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)  
**Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.**  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)
6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:  
Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
**Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**  
Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:  
Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).  
**Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**  
Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:v1.1

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

---

## NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 08, 2017

This Agreement between Jelena Ciric ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

|  |  |
|--|--|
| License Number                         | 4044320859105  |
| License date                           |  |
| Licensed Content Publisher             | Nature Publishing Group  |
| Licensed Content Publication           | Nature   |
| Licensed Content Title                 | Neuroscience: While you were sleeping  |
| Licensed Content Author                | Alison Abbott  |
| Licensed Content Date                  | Oct 26, 2005   |
| Licensed Content Volume                | 437  |
| Licensed Content Issue                 | 7063   |
| Type of Use                            | reuse in a dissertation / thesis   |
| Requestor type                         | academic/educational   |
| Format                                 | print and electronic   |
| Portion                                | figures/tables/illustrations   |
| Number of figures/tables/illustrations | 1  |
| High-res required                      | no   |
| Figures                                | A fresh view of Parkinson's disease  |
| Author of this NPG article             | no   |
| Your reference number                  |  |
| Title of your thesis / dissertation    | Early electrophysiological markers of the sleep and motor control disorders during aging in rats with neurodegeneration of the cholinergic neurons |
| Expected completion date               | Jun 2017   |
| Estimated size (number of pages)       | 150  |
| Total                                  | 0.0 USD  |

### Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from

another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

**Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.**

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

**Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

**Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:v1.1

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

---



## Biografija autora

Jelena Ćirić je rođena 20.04.1983. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na studijskoj grupi biologija, završila je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,53 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na smeru Neurobiologija, modul Neurofiziologija sa biofizikom upisala je 2010. godine. Od 2011. godine zaposlena je na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Zvanje istraživač saradnik stiče 2012. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja“ (projekat OI 173022), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom dr Jasne Šaponjić, naučnog savetnika.

U toku dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada Jelena Ćirić je publikovala 8 radova u časopisima međunarodnog značaja, 1 poglavlje u međunarodnoj monografiji, 8 radova štampanih u izvodu kao saopštenja sa međunarodnih i 7 radova štampanih u izvodu kao saopštenja sa domaćih kongresa.