

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

Doktori értekezés

Kitka Tamás

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Doktori Iskola



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

Budapest
2012

Tartalom

1 Rövidítések jegyzéke	3
2 Bevezetés	6
2.1 Az alvás fázisai, alapvető jellemzőik	6
2.2 A REM alvás subtelencephalicus szabályzása	9
2.2.1 Korai átmetszéses vizsgálatok	9
2.2.2 A subcoeruleus	12
2.2.3 A nyúltvelői gigantocellularis terület	15
2.2.4 A dorsalis paragigantocellularis mag	16
2.2.5 A kolinerg tegmentum	18
2.2.6 Locus coeruleus	20
2.2.7 Dorsalis raphe	22
2.2.8 A ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány és a dorsalis mély közepagi hálózatos mag	24
2.2.9 Posterior hypothalamus	27
2.2.10 Lateralis hypothalamus	28
2.2.11 A ventrolateralis preopticus area	29
2.2.12 Nucleus suprachiasmaticus	30
2.2.13 A REM-on és REM-off agyterületek áttekintése	31
2.3 A melanin-koncentráló hormon és az orexinek	32
2.3.1 Melanin-koncentráló hormon	32
2.3.2 Orexinek	36
2.4 A „flower pot” REM-megvonásos technika	39
3 Célkitűzések	42
4 Anyagok és módszerek	44
4.1 Felhasznált állatok, műtéti eljárás	44
4.2 Csoportok	45
4.3 REM-megvonás	46
4.4 Felvétel-készítés	46
4.5 A felvételek kiértékelése	47
4.6 Immunhisztokémia	49
4.7 Az immunhisztokémia morfometriás analízise	50

4.8 Statisztikai kiértékelés	51
5 Eredmények	54
5.1 A REM-visszacsapás 24 órás architektúráját vizsgáló kísérlet	54
5.1.1 Alvás-paraméterek	54
5.1.2 Napi ritmusok vizsgálata	64
5.2 A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérlet.....	67
5.2.1 Alvásvizsgálat.....	67
5.2.2 Morfológiai adatok	68
5.2.3 Interindividuális korrelációk.....	76
6 Megbeszélés.....	81
6.1 Az eredmények megtárgyalása	81
6.2 A Célkitűzések részben felvetett kérdések megválaszolása	91
7 Következtetések.....	92
8 Összefoglaló	94
9 Summary.....	95
10 Irodalomjegyzék	96
11 Saját publikációk jegyzéke	125
11.1 Értekezéshez kapcsolódó publikációk	125
11.2 Értekezéshez nem kapcsolódó publikációk	125
12 Köszönetnyilvánítás.....	127

1 Rövidítések jegyzéke

12n: a XII. agyideg magva

3v: 3. agykamra

5-HT: 5-hydroxytryptamine (szerotonin)

7n: a VII. agyideg magva

ACTH: adrenocorticotroph hormone

ANOVA: analysis of variance (variancia-analízis)

Aq: aqueductus cerebri

AW: active wake (aktív ébrenlét)

CART: cocaine- and amphetamine-regulated transcript

cp: cerebral peduncle

DAB: diaminobenzidin

dDpMe: dorsal deep mesencephalic reticular nucleus (mély közepagi hálózatos mag dorsalis része)

DMH: dorsomedialis hypothalamicus area

DMSO: dimetil-szulfoxid

DPGi: dorsal paragigantocellular nucleus

DRN: dorsal raphe nucleus

EEG: elektro-encephalográf, elektro-encephalogram

EMG: elektromiográfia, elektromiogram

f: fornix

fMRI: functional magnetic resonance imaging (funkcionális mágneses magrezonanciás képalkotás)

GABA: gamma amino butyric acid (gamma-aminovajsav)

GAD: glutamic acid decarboxylase (glutamát-dekarboxiláz)

Gi: gigantocellularis terület

GiA: alpha gigantocellular nucleus

GiV: ventral gigantocellular nucleus

HC: home cage (saját ketrec)

Hcrtr: hypocretin receptor

HRP: horse radish peroxidase (tormaperoxidáz)
IR: immunoreaktív
IS: intermediate stage, átmeneti stádium
KO: knockout, génkiütött
LC: locus coeruleus
LDT: laterodorsal tegmental nucleus
LGN: lateral geniculate nucleus
LH: lateral hypothalamus
LP: large platform (nagy porondon tartott)
IPAG: lateral periaqueductal grey (lateralis periaqueductalis szürkeállomány)
LPR: large platform rebound (nagy porondon tartott, alvás-visszacsapásos)
Mc: magnocellular nucleus
MCH: melanin-concentrating hormone (melanin-koncentráló hormon)
MCHR: MCH-receptor
NiDAB: nikkeldiaminobenzidin
NMDA: N-metil-D-aszpartát
NREM: non-REM
opt: optic tract (látópálya)
OXR: orexin receptor
PET: pozitron-emissziós tomográfia
PFA: perifornicalis area
PGO: ponto-geniculo-occipitalis
PH: posterior hypothalamus
PnC: caudal pontine nucleus
PnO: oral pontine nucleus
PPT: pedunculopontine tegmental nucleus
PS: paradoxical sleep (paradox alvás)
PVA: paraventricularis area
PVC: polyvinyl-chloride
PW: passive wake (passzív ébrenlét)
REM: rapid eye movement sleep (gyors szemmozgásos alvás)
SCN: suprachiasmatic nucleus

scp: superior cerebellar peduncle

siRNS: small interfering ribonukleinsav (rövid interferáló ribonukleinsav)

SLC-1: somatostatin-like receptor 1

SLD: sublaterodorsalis mag

sm: stria medullaris

sox: decussatio supraopticus

SP: small platform (kis porondon tartott)

SPR: small platform rebound (kis porondon tartott, alvás-visszacsapásos)

sRA: short REM attempts (rövid REM „próbálkozások”)

SubC: subcoeruleus

SWS: slow wave sleep (lassú hullámú alvás)

SWS2%: az SWS2-ben töltött idő a TSWS százalékában

TMN: tuberomamillary nucleus

TSWS: total SWS (összes lassú hullámú alvás)

TW: total wake (összes ébrenlét)

vIPAG: ventrolateral periaqueductal grey (ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány)

VLPO: ventrolateral preoptic area

VMH: ventromedialis hypothalamus

ZI: zona incerta / subzona incerta

2 Bevezetés

Az alvás, valamint annak neurobiológiai szabályzása régóta és igen intenzíven kutatott tudományterület. A vonatkozó szakirodalom Pieron 1917-es kutyakísérletétől (Piéron, 1917) számos átmetszéses tanulmányon keresztül (Bard és Macht, 1958; Lai és Siegel, 1988; Lavy és Herishanu, 1972; Lindsley és mtsai, 1949; Siegel és mtsai, 1984; Siegel és mtsai, 1986; Villablanca és Riobo, 1970) a modern képalkotó (Dresler és mtsai, 2011) és egysejt-elvezetési (Hassani és mtsai, 2009) technikákig terjed.

A különböző alvásfázisok közül a REM (rapid eye movement, gyors szemmozgásos) alvás, valamint idegi szabályozásának és architektúrájának tanulmányozása is hosszú múltra tekint vissza. Ezt az érdeklődést a tudományos kíváncsiságon túl az is táplálja, hogy számos betegség (pl. narkolepszia, depresszió) esetén a REM alvás ismert módon változik, ezért pontosabb megismerése ezen kórképek jobb megismeréséhez, így gyógyításához is közelebb vihet. A REM alvásban töltött idő befolyásolásához a legkézenfekvőbb módszer ennek megvonása, majd az ezt követő visszacsapás vizsgálata.

Dolgozatom bevezetőjében az alvás fázisainak általános leírását követően ismertetni fogom a gyors szemmozgásos (REM: rapid eye movement) alvás szabályzásában lényegesebb szerepet játszó agyterületek főbb jellemzőit. Ezt követően a kísérletes munkámmal közvetlenül kapcsolódó irodalmat, vagyis a lateralis hypothalamus REM-szabályzásban betöltött szerepét és a REM-megvonás metodikai hátterét tekintem át. Ez utóbbi alfejezetek vezetnek fel a megválaszolni kívánt kérdéseket.

2.1 Az alvás fázisai, alapvető jellemzőik

Lényeges pontok:

- az alvás tanulmányozásának legelterjedtebb eszköze az elektroencephalográfia
- az alvás során lassú hullámú alvás és REM fázisok váltják egymást
- ezen fázisok élettani és elektro-encephalográfiai jellemzőik alapján is jól elkülöníthetőek

Az alvás fázisait alapvetően, de nem kizárólag, elektro-encephalográfiás (EEG) jellemzőik alapján különítik el. Az EEG elektródok, melyeket ember esetén általában a fejbőrön, állatoknál a koponyába építve helyeznek el oly módon, hogy a kemény agyhártyát érintsék, jellemzően a felszínre merőlegesen folyó áramokat érzékelik, természetesen az elhelyezkedésük miatt legérzékenyebben a kérgi áramokat. Amennyiben a kéreg jellemző neurontípusának, a piramissejtnek a kéreg felszínére merőleges apikális dendritje serkentő bemenetet kap, az extracelluláris áram a dendrit egyéb területeiről (source, forrás) a serkentő bemenet, vagyis a depolarizáció helye felé folyik (sink, „lefolyó”). Így ha az apikális dendrit felszín felé eső, distalis része depolarizálódik, akkor annak proximalis része felől fog folyni az áram a distalis rész felé, létrehozva egy felszín felé negatív, a mélyebb rétegek felé pozitív elektromos mezőt. Mivel egy elektród rendkívül sok sejt egyidejű jelét fogja, az EEG regisztrátumon az általa érzékelt sejtek aktivitásának szummációja (mezőpotenciálja) jelenik meg. Emiatt a kapott jel amplitúdója akkor lesz a legnagyobb, ha az elektród által érzékelt területen lévő sejtek szinkrón aktivitást mutatnak, vagyis az EEG nem az egyes neuronok aktivitásáról, hanem egy adott területen lévő neuronok szinkronizációjáról ad információt (Shibasaki, 2008). Az EEG hullámokat általában frekvenciájuk szerint csoportosítják. A sávhatárok nem egyértelműen definiáltak, így a különböző munkacsoportok által használt értékek eltérhetnek, de alapvetően a következő típusokat különíthetjük el: lassú oszcilláció (0,5-1 Hz), delta (1-4 Hz), theta (5-7, vagy 5-9 Hz), alfa (8-13, vagy 10-20 Hz), béta (14-30, vagy 20-30 Hz), gamma (30-60 Hz) hullámok. Ezen kívül az alvási orsókat mind frekvenciájuk (6-15, vagy 7-15 Hz), mind jellegzetes formájuk jellemzi (amplitúdójuk először nő, majd csökken, így az EEG regisztrátumon orsó formát vesznek fel) (Kantor és mtsai, 2002; Kántor és mtsai, 2004; Kantor és mtsai, 2005; Steriade, 2006). Az EEG regisztrátumra általánosan jellemző, hogy az alacsonyabb frekvenciájú jelek nagyobb fokú szinkronicitással járnak és a frekvencia növekedésével a jel amplitúdója csökken.

Az alvást REM alvásra, valamint lassú hullámú alvásra (SWS: slow wave sleep) osztjuk fel. A REM alvás szinonimájaként a paradox alvás (PS: paradoxical sleep) az SWS szinonimájaként a non-REM (NREM) is használható. Különböző fajok közt komoly eltéréseket találunk az alvás szerkezetét illetően: a SWS-REM ciklus hossza nagy vonalakban fordítottan arányos az adott faj testméretével, ez az érték embernél 90,

macskánál 22, míg patkánynál 12 perc körül van (McCarley, 2007). Egy SWS-REM perióduson belül a két alvófázis arányát tekintve fajok között (Siegel, 1995), valamint egy adott fajon belül az eltérő életkorúak között is láthatók eltérések. Az alvással töltött idő előrehaladásával is nő a REM/SWS arány (McCarley, 2007; Siegel, 2005). Jelenlegi tudásunk alapján a SWS-REM fázisok váltakozása a szárazföldi emlősök és a madarak esetében is általánosan megfigyelhető (Siegel, 2008).

Az elalváskor először az SWS fázis jelentkezik, melynek emberek esetén négy, állatoknál pedig két, egyre mélyülő stádiumát különböztetjük meg. A humán NREM 1 és 2 az állatok SWS1-es (felszínes lassú hullámú alvás), a humán NREM 3 és 4 pedig az állatok SWS2-es (mély lassú hullámú alvás) stádiumának feleltethető meg. A felszínes lassú hullámú alvást az izomtónus, vérnyomás, légzésritmus és a bőr vezetőképességének csökkenése mellett az EEG hullámokban az alvási orsók és a K-komplexek (bi- vagy polifázikus lassú hullám és az ez erre tevődő alvási orsó együttesének) megjelenése, valamint az EEG frekvencia csökkenése és állatkísérletekben a stádium nevét (SWS) adó delta-hullámok felbukkanása fémjelzi. Humán vizsgálatokban a 8-12 Hz körüli alfa hullámok eltűnése is árulkodó jel, valamint 4-7,5 Hz közötti theta ritmusok is megfigyelhetőek. Erre az alvászakaszra a lassú, úszó szemmozgások jellemzőek (Bódizs, 2000; Gottesmann, 1992; McCarley, 2007). A következő stádium a mély lassú hullámú alvás, mely alatt az EEG jelet mind emberben, mind állatban a nagy amplitúdójú, lassú delta hullámok dominálják. Ekkor az izomtónus tovább csökken és a lassú, úszó szemmozgások is eltűnnek (Bódizs, 2000). A REM alvás megjelenése előtt sok esetben megfigyelhető az SWS felületesebbé válása (ez a folyamat az alvás mélyülésénél gyorsabban megy végbe), valamint közvetlenül az SWS-REM váltást megelőzően esetenként egy rövid, átmeneti szakasz, az IS (intermediate stage, átmeneti stádium) is megjelenik. Ez utóbbi alvófázis néha a REM-ből való kilépéskor is jelen van, jellemzője a nagy amplitúdójú alvási orsók és alacsony frekvenciájú (5-6 Hz) theta hullámok szokatlan együttese (Gottesmann, 1992; Kántor és mtsai, 2004).

A REM alvás alatt izomatónia figyelhető meg, ez alól az időnként tapasztalható végtágrángások és a stádium nevét adó gyors szemmozgások, valamint a középfül izmainak kontrakciója és a légzőizmok működése jelentenek kivételt. A szív- és légzésritmus felgyorsulása és szabálytalanná válása, az agy hőmérsékletének

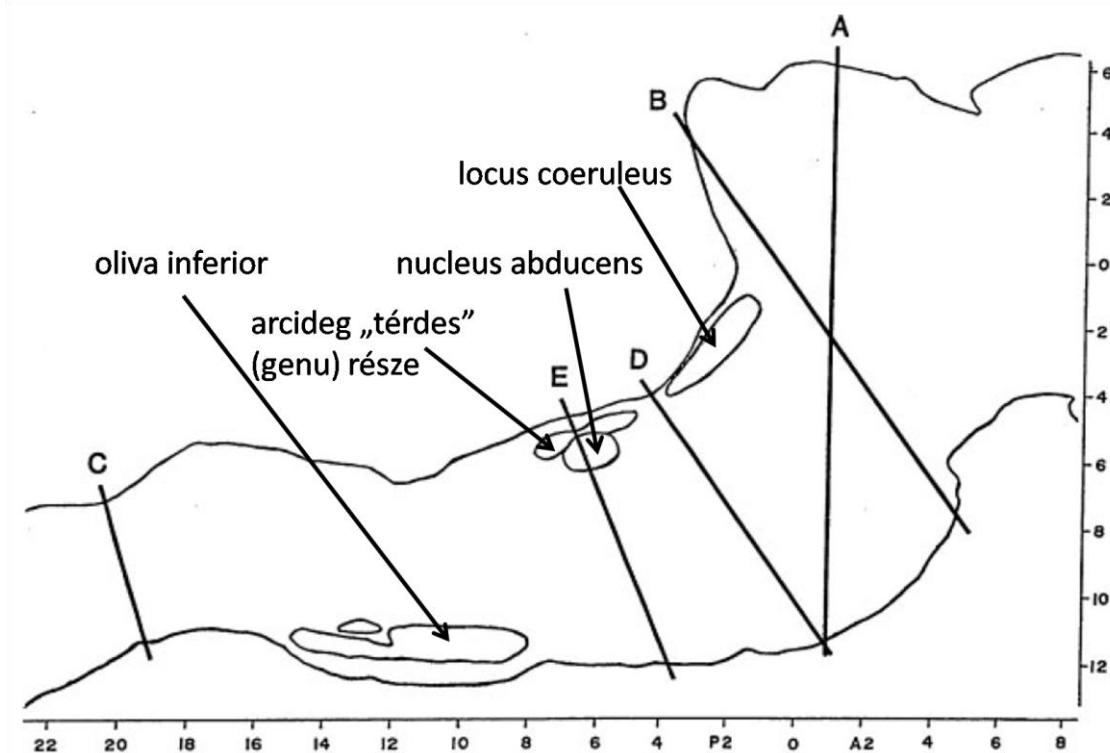
emelkedése, valamint esetenként péniszerekció szintén jellemző erre a stádiumra. Emberekben az álomlátás, ezen belül a filmszerű, cselekményben gazdag álmok megjelenése is alapvetően ekkorra tehető. Az EEG regisztrátumon emberben ilyenkor az ébrenlétire emlékeztető, az SWS-ben tapasztalhatónál nagyobb frekvenciájú és kisebb amplitúdójú hullámok jelennek meg, amikre átmenetileg kis feszültségű theta-hullámok rakódhatnak. Rágcsálókban a REM alatti EEG-t egyértelműen a theta frekvencia dominálja, és a szemmozgásokkal egyidőben PGO (ponto-geniculo-occipitalis) hullámok is elvezethetőek (Bódizs, 2000; Gottesmann, 1992; Kántor és mtsai, 2004).

2.2 A REM alvás subtelencephalicus szabályzása

2.2.1 Korai átmetszéses vizsgálatok

Lényeges pontok:

- a REM szabályzásában résztvevő területek legkorábbi identifikálásához átvágásos technikát használtak
- a REM legtöbb jelét a híd területén elhelyezkedő struktúrák inicializálják, de ezen élettani folyamatok kialakulásához természetesen mind a középagy, mind a nyúltvelő felé intakt kapcsolatok szükségesek



1. ábra Az irodalomban leírt átmetszések lokalizációja patkány agytörzs saggitalis metszetén (Siegel, 2009). Az átmetszési síkok magyarázatát lásd a szövegben.

A REM alvás szabályzását számos módszerrel igyekeztek felderíteni. Ezeket a módszereket alapvetően két típusra lehet osztani: az idegrendszer működését befolyásoló (átvágások, lokalizált léziók, stimulációs és farmakológiai hatások), illetve detektáló (elektrofiziológia, mikrodialízis, immunhisztokémia, in situ hibridizáció, PET: pozitron emissziós tomográfia és fMRI: functional magnetic resonance imaging, vagyis funkcionális mágneses rezonancia képalkotás) eljárásokra.

A REM-mel kapcsolatos egyik legkorábbi felfedezés szerint a decenterált (a colliculus superiorától rostralisán, koronális síkban átvágott agyú, 1. ábra „A” metszési sík) állatok kifeszült végtagjai periodikusan relaxálnak (Bard és Macht, 1958). Bár a REM alvás ekkor még nem volt ismert, ez a megfigyelés tekinthető a REM atónia első detektálásának. A REM alvás macskákban való leírását (Dement, 1958; Jouvet és Michel, 1959) követően Jouvet fel is figyelt arra, hogy ez alatt a stádium alatt az izmok relaxált állapotban vannak (Jouvet, 1962). Ezután kezdte el tanulmányozni ezt az alvástádiumot a korábban már kidolgozott átmetszéses technikák használatával, valamint párhuzamosan az izomtónust, a szemmozgásokat és az EEG-t is vizsgálta. Az agytörzs

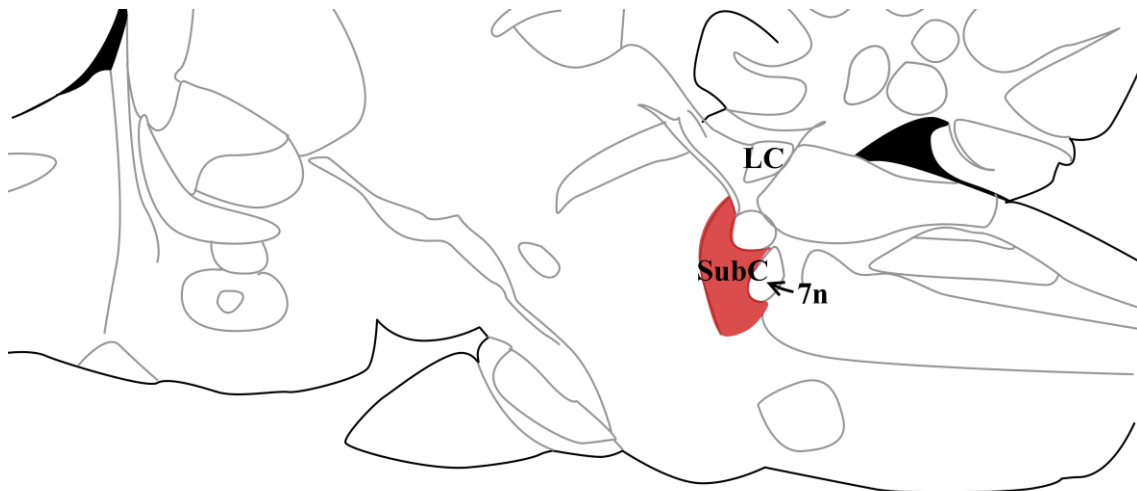
és az előagy elválasztását követően (1. ábra „A” és „B” metszési síkok) a REM jellegzetességeit (pl. a periodikus izomrelaxációval egyidőben a PGO-szerű hullámokat) csak az agytörzsben tudta detektálni. Később olyan emberek EEG-jének tanulmányozásával, akiknél az agytörzs és a gerincvelő közti kapcsolat megszakadt (1. ábra „C” sík), kiderítették, hogy az izomatónia kivételével a REM alvás összes jele megfigyelhető (Adey és mtsai, 1968). Ebből arra lehet következtetni, hogy a caudalis nyúltvelő és a rostralis középagy közti területek felelősek a REM alvás generálásáért. A caudalis híd és a nyúltvelő közti átmetszések (1. ábra „D” és „E” metszési síkok) ennél összetettebb képet eredményeztek: az ilyen állatokban a nyúltvelő területén REM-szerű tüzelési mintázatot nem tapasztaltak (Siegel és mtsai, 1986), és nem volt megfigyelhető REM-atónia sem, pedig a medialis nyúltvelő serkentésével csökkenteni lehetett az izomtónust (Lai és Siegel, 1988). Ezzel szemben az átmetszéstől rostralisán a REM számos jele észlelhető (Siegel és mtsai, 1984). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy bár a REM atóniát a nyúltvelő váltja ki, ehhez a híddal való intakt kapcsolatok is szükségesek. A REM számos más tulajdonságának generálásáért annak ellenére, hogy ezen tulajdonságok az előagyban detektálhatóak, az előagy és híd közti kapcsolatok megléte szükséges. Ezeket a következtetéseket az is alátámasztja, hogy két átmetszés esetén (a középagy és híd, valamint a híd és a nyúltvelő között) PGO-szerű jeleket csak az izolált hídból lehetett elvezetni (Matsuzaki, 1969).

A továbbiakban az egyes agyterületek esetén a REM-on, illetve REM-off kifejezéseket az irodalomban elfogadott jelentésüknek megfelelően a REM alatti aktivitás, illetve inaktivitás jellemzésére fogom használni. A különböző régiókban található neuronok aktivitásának REM alvást kiváltó, illetve gátló hatását a szövegben részletezni fogom. A továbbiakban jellemzett agyterületek REM-on, ill. REM-off hatásait, valamint a köztük lévő kapcsolatokat a 2.2.13 fejezetben foglalom össze.

2.2.2 A subcoeruleus

Lényeges pontok:

- alapvető fontosságú REM-on terület
- glutamáterg neuronjai a nyúltvelő gigantocellularis területén hatva részt vesznek a REM alatti izomatónia kialakulásában
- a subcoeruleus REM-on neuronjai kolinerg, GABA-erg, glutamáterg és noradrenerg szabályzás alatt állnak



2. ábra. A subcoeruleus elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajz. SubC: subcoeruleus, LC: locus coeruleus, 7n: a VII. agyideg magva

A subcoeruleus (SubC), ahogy nevéből is látható, a locus coeruleus (LC) alatti terület (2. ábra), amely a nucleus pontis oralis / caudalis (PnO / PnC) dorsalis részének alterülete (Luppi és mtsai, 2006). Ezt a régiót macskában perilocus coeruleus alpha, rágcsálóban pedig sublaterodorsal nucleus (SLD) néven is említik. Az itt elhelyezkedő neuronok irtása vagy inaktivációja igen hatékonyan csökkenti a REM-ben töltött időt (Carli és Zanchetti, 1965; Lu és mtsai, 2006; Webster és Jones, 1988), valamint az itt található gamma-aminovajsav- (GABA: gamma amino butyric acid) receptorok gátlása elősegíti a REM alvást (Xi és mtsai, 2004). Szabadon mozgó macskákban bizonyították, hogy a SubC területén számos neuron tónusosan tüzel REM alvás alatt (Sakai és mtsai, 2001; Sakai és Koyama, 1996). Ennek a régiónak a szerepét a REM szabályozásában szintén alátámasztja az az eredmény, miszerint REM-megvonást követő visszacsapás alatt a hídnak ezen a részén nagy mennyiségben találtak cFos-pozitív sejteket, és

arányuk korrelált a REM-ben töltött idővel (Verret és mtsai, 2005). A cFos nevű, „immediate early gene” (szabad fordításban: gyorsan kifejeződő gén-termék) kimutatását széleskörűen használják neuronális aktiváció vizsgálatára (Kovacs, 2008). A korábban említett PGO hullámok generálásáért is ez a régió felel. Ezek a hullámok a kolinerg tegmentum és a nucleus geniculatus lateralis érintésével az occipitalis kéreg felé tartanak (Datta, 1997).

A SubC neuronjait két csoportra lehet osztani. Az első csoport tagjainak aktivitása muszkarinerg agonistával (carbachollal) gátolható és a SubC rostradorsalis részén helyezkednek el. Ezek az idegsejtek az intralaminaris thalamus, posterior hypothalamus és bazális előagy területére küldenek rostokat. A második csoport tagjai carbachollal serkenthetőek, a teljes SubC területén megtalálhatóak, és caudalis irányba, a magnocellularis hálózatos mag (Mc), valamint a ventralis és alpha gigantocellularis (GiV és GiA) magok felé küldik axonjaikat (Sakai és mtsai, 1979; Sakai és mtsai, 1981; Sakai és Koyama, 1996), ahol glicinerg neuronokat idegeznek be. Az SubC-be adott GABA_A antagonistá (bicuculline) hatására az említett projekciós területeken megnövekszik a cFos aktivitás (Boissard és mtsai, 2002).

Feltételezhető, hogy a felszálló projekciókat adó REM-on neuronok kolinerg, és a REM alatti kérgi aktivációban játszanak szerepet, míg a leszálló projekciókat adók nem kolinerg, és a REM alatti izomatónia generálásában vehetnek részt (Luppi és mtsai, 1988; Sakai és mtsai, 2001; Sakai és Koyama, 1996). Mindenesetre a kolinerg sejtcsoport REM-ben betöltött szerepét megkérdőjelezi, hogy REM-visszacsapást követően ezen a területen nem találtak aktivált kolinerg (kolin-acetil-transzferáz/cFos kettős jelölt) sejtet (Luppi és mtsai, 2011; Verret és mtsai, 2005). Később hasonló metodikával bizonyították, hogy a SubC REM-on sejtjeinek döntő hányada glutamáterg (Clement és mtsai, 2011). Ezt támasztja alá az is, hogy REM alatt a nyúltvelői gigantocellularis területen megnő az extracelluláris glutamát-szint (Kodama és mtsai, 1998). Az SubC glutamáterg leszálló projekcióinak (Lu és mtsai, 2006) feltételezett szerepét a REM-atónia generálásában az is megerősíti, hogy a gigantocellularis nyúltvelőbe adott non-NMDA (NMDA: N-metil-D-aszpartát) glutamát-receptor agonistával csökkenthető az izomtónus (Lai és Siegel, 1991), míg ennek a területnek (Holmes és Jones, 1994; Lai és Siegel, 1991) és a ventralis SubC-nek az irtásával is csökkenthető a REM-atónia (Lu és mtsai, 2006).

Az SubC kolinerg szabályozását számos eredmény támasztja alá. Erre a környékre adott acetikolin, vagy acetilkolin-receptor agonisták mikroinjekciója REM alvást, vagy izomatóniát vált ki (például decerebrált macskában is). A mikroinjekció pontos hatása, vagyis az, hogy a REM alvás milyen aspektusait váltja ki (izomatóna, PGO-hullámok, stb.) az injekció helyétől függ, például laterálisabban adva PGO hullámokat lehet generálni akár éber állatokon is (Crochet és Sakai, 1999a; Deurveilher és mtsai, 1997; George és mtsai, 1964; Gnadt és Pegram, 1986; Katayama és mtsai, 1984; Mitler és Dement, 1974; Shiromani és Fishbein, 1986; Vanni-Mercier és mtsai, 1989; Velazquez-Moctezuma és mtsai, 1989).

A SubC területére adott GABA_A antagonistával, glutamát-dekarboxiláz (GAD: glutamic acid decarboxylase, GABA-szintetizáló enzim) antiszenz oligonukleotiddal, és kisebb mértékben GABA_B antagonistával REM váltható ki (Boissard és mtsai, 2002; Pollock és Mistleberger, 2003; Sanford és mtsai, 2003; Xi és mtsai, 1999; Xi és mtsai, 2001b). Ez a válasz muszkarinos antagonistával (scopolamine) nem védhető ki (Xi és mtsai, 2004). Megjegyzendő, hogy ez utóbbi kísérletben a carbachol REM-növelő hatása GABA_A agonizmussal kivédhetőnek bizonyult. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a SubC aktivitásának szabályzásában a GABA-erg gátlás legalább akkora szerepet játszik, mint a kolinerg bemenetek. Ennek a gátlásnak a forrása részint a mély középagyi hálózatos mag dorsalis részén (dDpMe, dorsal deep mesencephalic reticular nucleus), részint a PnO területén lévő neuronok lehetnek (Boissard és mtsai, 2003). Ez utóbbi mellett szól, hogy Maloney és munkatársai kimutatták, hogy a PnO területén találhatóak olyan GABA-erg idegsejtek is, amik a REM megvonást követő visszacsapás alatt inaktiválódnak (Maloney és mtsai, 1999).

A kolinerg és GABA-erg szabályozás mellett az irodalomban arra is található bizonyíték, hogy a SubC REM-on neuronjainak aktivitását a glutamát neurotranszmisszió is befolyásolja. Az ide juttatott kainát REM-et vált ki (Onoe és Sakai, 1995) és növeli a REM-on sejtek tüzelési frekvenciáját (Boissard és mtsai, 2002). Ezen kívül lokálisan adott glutamát receptor antagonistával (kynurenate) gátolható a bicuculline-indukált REM-szerű állapot is (Boissard és mtsai, 2002).

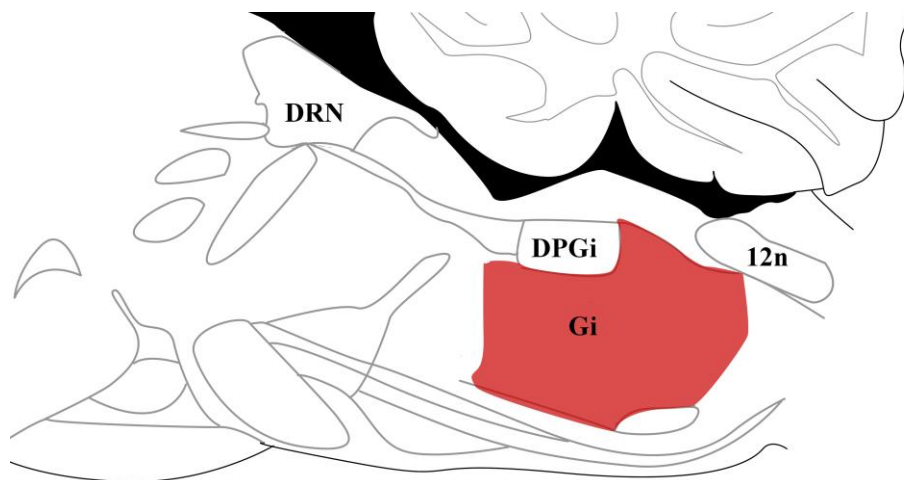
A felsorolt transzmittereken túl a noradrenalin szerepét is vizsgálták. Sakai és munkatársai eredményei alapján a noradrenalin α_2 adrenoceptoron hatva gátolja a nem-kolinerg (feltehetően glutamáterg) REM-on neuronokat, míg a kolinerg sejtek

aktivitását nem befolyásolja. Ugyanebben a cikkben szerotonin adásával egyik sejtsoport aktivitását sem tudták változtatni (Sakai és Koyama, 1996).

2.2.3 A nyúltvelői gigantocellularis terület

Lényeges pontok:

- REM alatt aktív terület, a REM-atónia generálásában játszik szerepet
- glicinerg neuronokat tartalmaz



3. ábra. A gigantocellularis terület elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajz. Gi: gigantocellularis terület, DPGi: dorsal paragigantocellular nucleus, 12n: a XII. agyideg magva, DRN: dorsal raphe nucleus

Ennek a gigantocellularis területnek (3. ábra) az irtása növeli a REM alatti izomtónust (Holmes és Jones, 1994; Lai és Siegel, 1991). REM-megvonást követő visszacsapás alatt a hídnak ezen a részén nagy mennyiségben találtak cFos-pozitív sejteket, és arányuk korrelált a REM-ben töltött idővel (Verret és mtsai, 2005). Később azt is kimutatták, hogy ezek a REM alvás alatt aktív neuronok GABA-ergek (GAD-immunoreaktívok) (Sapin és mtsai, 2009). Ezzel összhangban a medialis nyúltvelő irtásakor az állatok belépnek REM fázisba, de az izomatónia nem alakul ki (Schenkel és Siegel, 1989). Ilyenkor az állatok kivitelezik az álmaikat, vagyis megtámadnak láthatatlan tárgyakat, szokatlan affektív viselkedést és ataxiás mozgást produkálnak. Később kiderült, hogy a REM atóniáért felelős rendszer a medialis nyúltvelőn túl a

ventralis középagyat is magába foglalja (Holmes és mtsai, 1994; Lai és mtsai, 1999; Lai és mtsai, 2008).

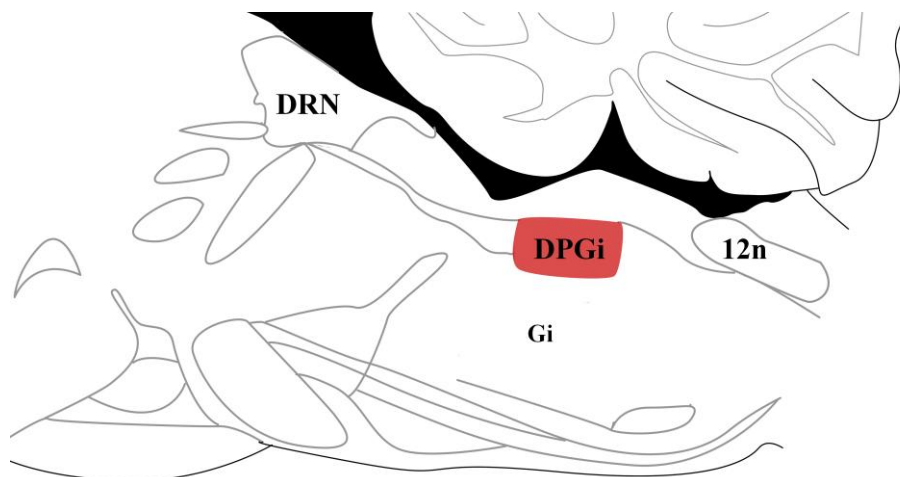
A nyúltvelői gigantocellularis terület a már ismertetett, SubC-ból jövő afferenciáján túl beidegzést kap a posterior hypothalamus (PH) és a ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány (vlPAG: ventrolateral periaqueductal grey) területéről is (Luppi és mtsai, 1988).

Az itt elhelyezkedő neuronok elektromos serkentése ébrenlét alatt a mérések többségében, alvás alatt minden esetben csökkentette az izomtónust, és a lumbális gerincvelő ventralis szarvában glicin-felszabadulással járt (Lai és mtsai, 2010). Azt, hogy a gigantocellularis terület direkt glicinerg projekcióival gátolja a gerincvelői motoneuronokat, mások is alátámasztották (Chase, 2008)

2.2.4 A dorsalis paragigantocellularis mag

Lényeges pontok:

- REM-on GABA-erg neuronokat tartalmaz
- számos agyterületre, például a locus coeruleus, dorsalis raphe és a ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány felé projiciálva vesz részt a REM generálásában



4. ábra. A dorsalis paragigantocellularis mag elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajz. DPGi: dorsal paragigantocellular nucleus, 12n: XII. agyideg magva, DRN: dorsal raphe nucleus

A DPGi (dorsal paragigantocellular nucleus, 4. ábra) neuronjai a REM-be lépés előtt körülbelül 15 másodperccel kezdenek tüzelni (Goutagny és mtsai, 2008), a REM megvonást követő visszacsapás után emelkedett cFos-immunoreaktivitást írtak le róluk (Verret és mtsai, 2006), és a cFos-immunoreaktív sejtek aránya korrelált a REM-ben töltött idővel (Verret és mtsai, 2005).

Ezek a GABA-erg neuronok a REM szabályzásában betöltött szerepüket többek között a LC noradrenerg sejtjeinek gátlásán keresztül valósítják meg. Ismert, hogy a DPGi alvás-visszacsapás során aktiválódó neuronjai beidegzik a LC-t (Verret és mtsai, 2006). Ezzel egybehangzó módon a DPGi elektromos vagy kémiai ingerlése a LC neuronjainak gátlását okozza (Ennis és Aston-Jones, 1989). Ez a beavatkozás a REM-ben töltött idő növekedését eredményezi, ami LC-ba adott GABA_A antagonistával (picrotoxin) kivédhető, sőt, LC-ba adott picrotoxint követően a DPGi ingerlése csökkenti a REM szakaszok átlagos hosszát (Kaur és mtsai, 2001). A DPGi-LC kapcsolat szerepét a REM indításában még inkább valószínűsíti az az adat, hogy a DPGi neuronjai körülbelül 15 másodperccel a REM megjelenése előtt kezdenek tüzelni és a LC neuronjai nagyjából ugyanekkor, 10-20 másodperccel a REM-be lépés előtt csendesednek el (Aston-Jones és Bloom, 1981; Gervasoni és mtsai, 2000).

Az itt található idegsejtek a LC-on túl még számos, alvásszabályzásban részt vevő területet beidegeznek, például a SubC, nyúltvelői gigantocellularis terület, vlPAG, dDpMe, laterodorsal tegmental nucleus (LDT), pedunculopontine tegmental nucleus (PPT), dorsal raphe nucleus (DRN) és a zona incerta (ZI) felé is küldenek efferenciációt (Goutagny és mtsai, 2008). Ismert, hogy a REM alatt a DRN szerotonerg neuronjainak gátlását GABA-erg mechanizmusok okozzák (Nitz és Siegel, 1997a), így nem kizárható az sem, hogy ebben a folyamatban a DPGi aktivitása is szerepet játszik.

A 2.2.8 fejezetben jellemzett vlPAG területén lévő egyes GABA-erg neuronok aktivitása feltehetően REM-gátló hatású (Boissard és mtsai, 2002; Boissard és mtsai, 2003), ezt irtásos és farmakológiai módszerekkel is alátámasztották (Lu és mtsai, 2006; Sastre és mtsai, 1996). Ezek alapján a DPGi a vlPAG-ba küldött GABA-erg projekcióján keresztül szintén segítheti a REM kialakulását.

2.2.5 A kolinerg tegmentum

Lényeges pontok:

- laterodorsalis és pedunculo pontine tegmentum: REM-on területek
- noradrenalin és szerotonin gátolja
- REM alatt, illetve REM és ébrenlét alatt is aktív neuronok találhatóak itt



5. ábra. A laterodorsalis (A) és pedunculo pontine (B) tegmentum elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajzok. Az előbbi mediálisabban, az utóbbi laterálisabban található. LDT: laterodorsal tegmental nucleus, scp: superior cerebellar peduncle, SubC: subcoeruleus, 7n: a VII. agyideg magva, PPT: pedunculo pontine tegmental nucleus, cp: cerebral peduncle

A tegmentális LDT és PPT az irodalom által széleskörűen elismert REM-on régiók, elhelyezkedésüket az 5. ábra mutatja. Ezek a kolinerg területek ébrenlét és REM alatt is

mutatnak aktivitást (Steriade és mtsai, 1990a). Ismert ugyanakkor, hogy a két REM-gátló hatású monoamin neurotranszmitter, a noradrenalin és a szerotonin gátolja az LDT és PPT neuronjait (Koyama és Kayama, 1993; Leonard és Llinas, 1994; Luebke és mtsai, 1992). Kémiai léziós (Brooks és mtsai, 1972; Jacobs és mtsai, 1972), és DRN-híd közti átmetszéses vizsgálatokkal (Simon és mtsai, 1973) is bizonyították, hogy a DRN szerotonerg neuronjainak aktivitása gátolja a PGO hullámok kialakulását (Sanford és mtsai, 1996). Bár ismert, hogy a szerotonin a tegmentális kolinerg neuronokat 5-HT₁ receptorokon keresztül gátolja (Luebke és mtsai, 1992), de a PPT-be adott 5-HT_{1A} (5-HT: 5-hydroxytryptamine, szerotonin) agonista nem volt hatással a PGO hullámokra (Sanford és mtsai, 1996), aminek több magyarázata is elképzelhető: (1) a szerotonin PGO-gátló hatását az LDT-n keresztül váltja ki, amit az is valószínűsít, hogy ott erősebb a szerotonerg innerváció (Sanford és mtsai, 1996); (2) bár a szerotonin és a kolinerg tegmentum is hatást gyakorol a PGO hullámok keletkezésére, és a szerotonin gátolja a kolinerg neuronokat, de a szerotonin hatását a PGO hullámokra fiziológiás viszonyok közt elsősorban nem a kolinerg tegmentum mediálja; illetve (3) ez a hatás nem 5-HT_{1A}, hanem egyéb, pl. 5-HT_{1B} receptorokon keresztül valósul meg.

Azon túl, hogy a híd területére juttatott kolinerg agonistákkal kiváltható a REM alvás, azt is kimérték, hogy a dorsalis tegmentumban és az LGN (lateral geniculate nucleus, oldalsó térdestest) területén a normál alvás-ébrenlét ciklus során REM alatt mérhető a legmagasabb extracellularis acetilkolin szint (Kodama és mtsai, 1990; Kodama és Honda, 1996).

Az LDT és PPT kolinerg sejtjei két csoportra oszthatóak: REM alatt aktív (REM-on), valamint REM és ébrenlét alatt egyaránt aktív (REM-and-wake-on) neuronokra (Steriade és mtsai, 1990a). Feltételezhetően ezek közül a REM-on neuronok projiciálnak a SubC területére (Greene és mtsai, 1989). Az LDT és PPT kolinerg sejtjeiről azt is kimutatták, hogy közvetlenül a PGO-hullámok előtt figyelhető meg „burst”-aktivitásuk (Datta és Siwek, 2002; Steriade és mtsai, 1990b). Ébrenlét alatt ezek a neuronok feltehetően szerotonerg gátlás alatt állnak (Brooks és Gershon, 1972; Kodama és Honda, 1996; Nunez és mtsai, 1998; Strecker és mtsai, 1999; Wu és Siegel, 1990).

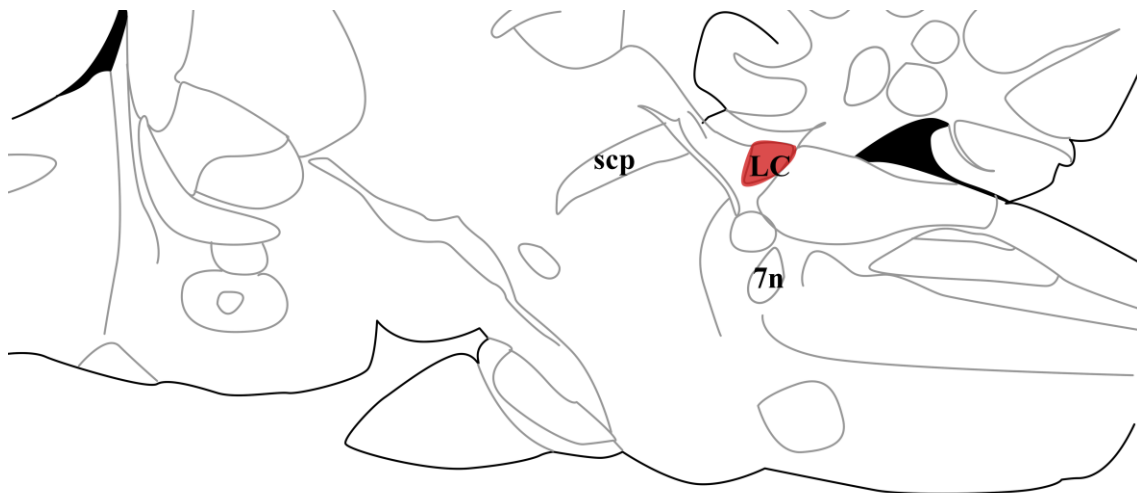
Ezen kívül megemlítendő, hogy bár a REM megvonást követő visszacsapás hatására az LDT és PPT kolinerg sejtjein belül a cFos-immunoreaktív (cFos-IR) száma megnő

(Maloney és mtsai, 1999), de az összes cFos-IR sejten belül a kolinergiek csupán a neuronok egy kis hányadát képviselik (Verret és mtsai, 2005). Ráadásul ennek a két területnek a szerepét a REM szabályozásában megkérdőjelezi az az eredmény, miszerint az LDT irtása nem változtatja, a PPT irtása pedig növeli a REM-ben töltött időt. Ebben a kísérletben REM csökkenést csak a SubC léziójával értek el (Lu és mtsai, 2006), de megjegyzendő, hogy mások a PPT irtásával is csökkenteni tudták a REM-ben töltött időt (Shouse és Siegel, 1992).

2.2.6 Locus coeruleus

Lényeges pontok

- noradrenerg neuronjai ébrenlét alatt érik el aktivitásuk maximumát
- kolinerg, GABA-erg, glicinerg és glutamaterg beidegzést is kap
- REM-gátló hatását feltehetően a SubC, a GiV, LDT és PPT területén fejti ki
- mutatnak eredmények arra is, hogy nem vesz részt a REM szabályzásában, a REM noradrenerg gátlását inkább egyes nyúltvelői területek aktivitása okozza



6. ábra. A locus coeruleus elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajz. LC: locus coeruleus, scp: superior cerebellar pedinckle, 7n: a VII. agyideg magva

Az alvás-ébrenlét szabályzásában fontos szerepet játszó LC (6. ábra) noradrenerg neuronjai aktivitásuk maximumát ébrenlét alatt érik el, REM alatt pedig inaktívak

(Aghajanian és Vandermaelen, 1982; Aston-Jones és Bloom, 1981; Fenik és mtsai, 2002; Hobson és mtsai, 1975). Számos kísérleti bizonyíték támasztja alá, hogy ezen sejtpopuláció aktivitása ébresztő, ill. REM-off hatású (Carter és mtsai, 2010; Pal és Mallick, 2007). Ezen kívül a LC hűtésével növelhető a REM-ben töltött idő (Cespuglio és mtsai, 1982).

Ezen neuronok REM-off profiljához képest meglepő módon az acetilkolin feltehetően $\alpha 7$ alegységet tartalmazó nikotinos receptorokon hatva serkenti a LC egyes sejtjeit, a szerotonin esetében pedig gátló hatást mutattak ki (Bitner és Nikkel, 2002; Guyenet és Aghajanian, 1979; Koyama és Kayama, 1993). A glicin és a GABA gátolja az LC noradrenerg sejtjeit (Darracq és mtsai, 1996; Gervasoni és mtsai, 1998). REM alatt az extracelluláris GABA szintje emelkedik a LC területén, míg a glutamát szintje nem változik a vigilanciafázisok váltakozásával (Nitz és Siegel, 1997b). Mivel az idézett vizsgálatban az extracelluláris neurotranszmitter-szinteket mikrodialízissel állapították meg, nem zárható ki teljesen egyértelműen, hogy a szinaptikus glutamáterg transzmisszió intenzitása valamilyen módon korrelál a vigilancia-fázisok váltakozásával. A REM alatti GABA-szint emelkedés feltehetően a vIPAG és a DPGi területén elhelyezkedő neuronok (Luppi és mtsai, 1999) és egyéb közép- és köztiagi, REM alatt aktív GABA-erg idegsejtek aktivitás-növekedésének hatására következik be (Gervasoni és mtsai, 1998; Maloney és mtsai, 1999; Nitz és Siegel, 1997b; Torterolo és mtsai, 2000).

Régóta ismert, hogy a szerotoninerg és noradrenalinerg neurotranszmissziót erősítő anyagok, például a monoamin-oxidáz inhibitorok és a szerotonin/noradrenalin visszavétel-gátlók csökkentik a REM-ben töltött időt (Gervasoni és mtsai, 2002; Jones, 1991; Jouvet, 1969). Számos kísérletben vizsgálták, hogy ezen anyagok milyen agyterületeken, illetve neuronokon fejtik ki hatásukat, például kimutatták, hogy noradrenalin, adrenalin, illetve $\alpha 2$ adrenoceptor agonista SubC-ba való adásával gátolható a REM, de a szerotoninnak nincs ilyen hatása (Crochet és Sakai, 1999a; Crochet és Sakai, 1999b; Tononi és mtsai, 1991). Az SubC területén a noradrenalin $\alpha 2$ adrenoceptor-mediáltan a nem-kolinerg REM-on neuronokat gátolja, míg a kolinerg neuronokra nincs hatással, valamint a fentebb említett eredményekkel összhangban a szerotonin egyik típusú idegsejtre sem fejt ki hatást (Sakai és Koyama, 1996). Természetesen a noradrenalin nem kizárólag a SubC területén hat, szóba jöhet a

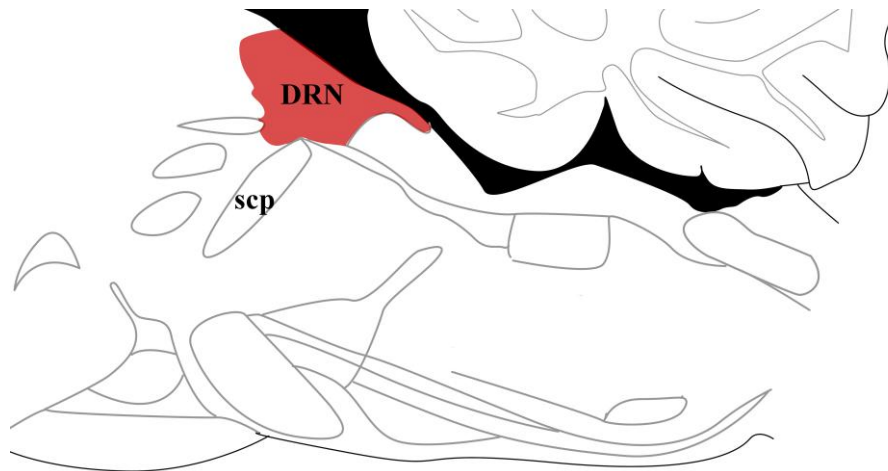
ventralis nyúltvelői gigantocellularis hálózatos mag (GiV) (Luppi és mtsai, 1988) ugyanúgy, mint a tegmentum ismert REM-on területei, a PPT és az LDT (Horner és Kubin, 1999).

Bár számos vizsgálat eredményei támasztják alá a LC szerepét a REM alvás gátlásában, de ennek ellentmondó adatok is találhatóak a szakirodalomban, például ennek a területnek az irtása 6-hydroxydopamine-nal nem változtatja a vigilanciát (Lu és mtsai, 2006). Ezen kívül a REM-megvonás nem aktiválja az itt lévő noradrenerg sejteket, de a nyúltvelői A1 és A2 areában lévő noradrenerg neuronokat igen, ami arra mutat, hogy a REM noradrenerg gátlásában inkább ez utóbbi sejtcsoportok játszhatnak szerepet (Leger és mtsai, 2009).

2.2.7 Dorsalis raphe

Lényeges pontok

- aktivitása maximumát ébrenlét, minimumát REM alatt éri el
- GABA-erg, noradrenerg és kolinerg szabályzás alatt áll



7. ábra. A dorsalis raphe elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajz. DRN: dorsal raphe nucleus, scp: superior cerebellar peduncle

Az alvás-ébrenlét szabályozásában a közepagi DRN is fontos szerepet játszik (7. ábra). Az itt elhelyezkedő szerotonerg neuronok aktivitásuk maximumát ébrenlét alatt érik el, REM alatt pedig inaktívak (Aghajanian és Vandermaelen, 1982; McGinty és Harper, 1976; Sakai, 2011). A fentieket alátámasztja, hogy szelektív szerotonin

visszavétel-gátló fluoxetine LDT-be vagy a medialis hídi hálózatos mag területére adva csökkenti a REM-ben töltött időt, és ez a hatás 5-HT_{1A} antagonistával kivédhető (Monti és Jantos, 2005).

A kolinerg REM-on és aminerg REM-off rendszerek reciprok gátló kölcsönhatását a REM szabályozásában először Hobson vetette fel (Hobson és mtsai, 1975). Ennek a modellnek az alapjait az az ismeret adja, hogy a DRN területén elhelyezkedő szerotonerg és a LC területén található noradrenerg neuronok nem tüzelnek REM alatt, míg ezzel ellentétben a kolinerg REM-on neuronok ekkor érik el aktivitásuk maximumát (Aghajanian és Vandermaelen, 1982; Aston-Jones és Bloom, 1981; Hobson és mtsai, 1975; McGinty és Harper, 1976).

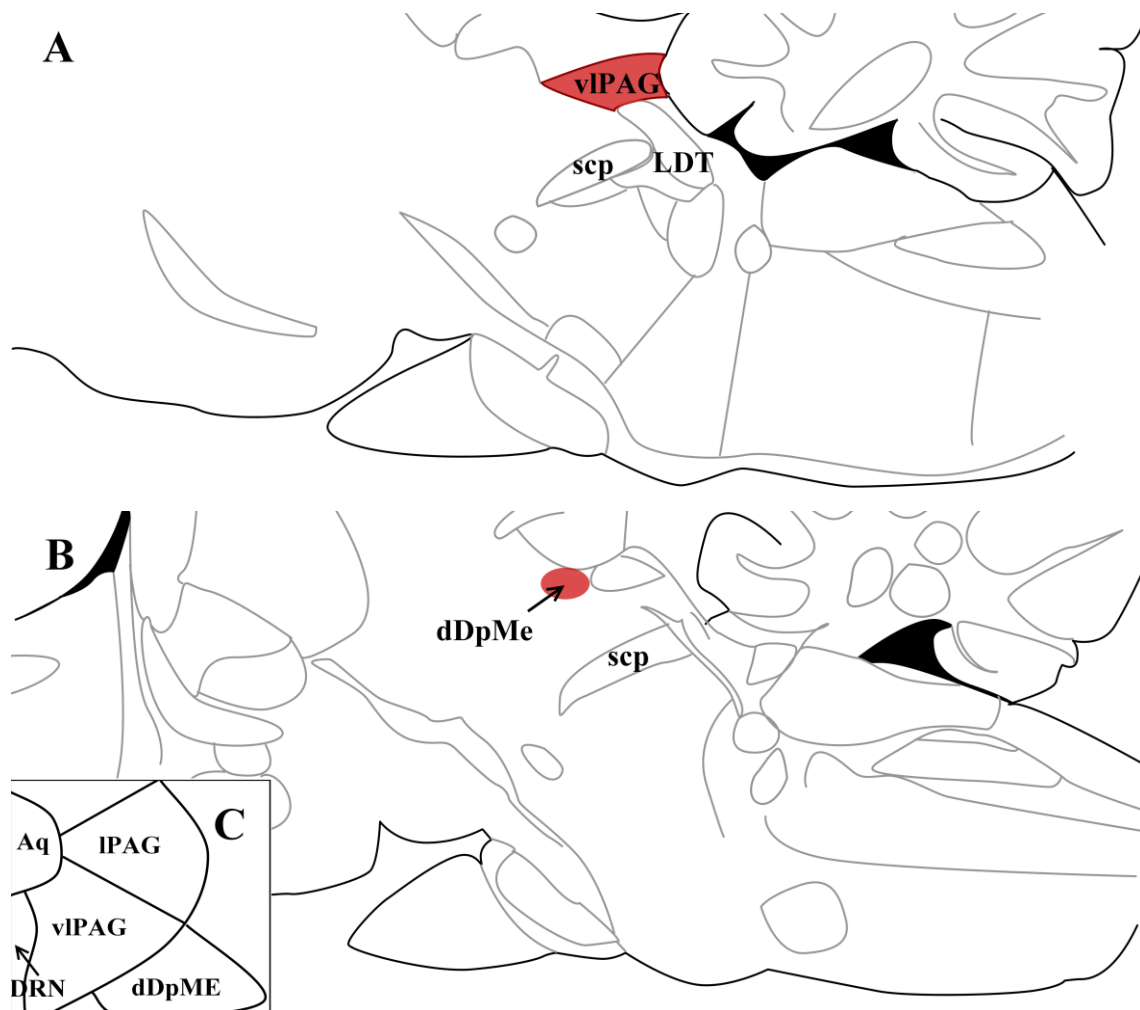
A DRN szerotonerg neuronjai GABA-erg gátló inputot a lateralis preopticus area, a vlPAG, valamint a DPGi területéről kapnak (Gervasoni és mtsai, 2000; Luppi és mtsai, 1999), illetve lokális GABA-erg interneuronokat is leírtak (Gervasoni és mtsai, 2000). A GABA hatását a REM szabályozásában a DRN területén agonista és antagonistá adminisztrációjával is bizonyították (Nitz és Siegel, 1997a).

Meglepő módon a noradrenalin gátolja a DRN egyes sejtjeit (Koyama és Kayama, 1993), az acetilkolin pedig, a LC neuronjai esetén leírthoz hasonló módon, $\alpha 7$ alegységet tartalmazó nikotinos receptorokon hatva serkenti. Mindazonáltal fontosnak tartom megemlíteni, hogy mindkét monoaminerg REM-off terület esetén leírták, hogy nem csak noradrenerg és szerotonerg, hanem egyéb, feltehetően GABA-erg idegsejtjeik is expresszálnak ilyen acetilkolin-receptorokat (Bitner és Nikkel, 2002). Így elképzelhető, hogy az ébrenlét alatt is aktív kolinerg neuronok a direkt monoszínaptikus kapcsolaton keresztül serkentik a monoaminerg idegsejteket, míg a REM-on kolinerg neuronok a raphe és a LC területén található GABA-erg interneuronok serkentésével gátolják a monoaminerg rendszerek aktivitását. Bár ez utóbbi feltételezést irodalmi adatok nem támasztják alá, de az érintett területek aktivitási mintázata és aktivitásuk élettani hatásai alapján nem zárható ki ennek esélye.

2.2.8 A ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány és a dorsalis mély középagyi hálózatos mag

Lényeges pontok:

- az ezeken a területeken található GABA-erg neuronokról REM-on és REM-off hatást is leírtak, de feltételezhetően az utóbbi inkább jellemző
- a monoaminerg REM-off területekre és a SubC területére is indulnak innen projekciók



8. ábra. A ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány (A, medialisabb metszési sík) és a dorsalis mély közepagi hálózatos mag (B, lateralisabb metszési sík) elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitális (A, B) és coronalis (C) metszeti rajzok. Az utóbbi agyterületet az agyatlasz nem tünteti fel, így elhelyezkedését más irodalmi forrás (Sapin és mtsai, 2009) alapján jelöltem be (C). vIPAG: ventrolateral periaqueductal grey (ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány), scp: superior cerebellar peduncle, LDT: laterodorsal tegmental nucleus, dDpME: dorsal deep mesencephalic reticular nucleus (mély közepagi hálózatos mag dorsalis része), DRN: dorsal raphe nucleus, IPAG: lateral periaqueductal grey (lateralis periaqueductalis szürkeállomány), Aq: aqueductus cerebri

A vIPAG és a tőle ventrolateralisan elhelyezkedő dDpMe (8. ábra) REM-off és REM-on GABA-erg neuronokat is tartalmaz (Sapin és mtsai, 2009). Az utóbbi területet macskában dorsocaudal central tegmental fieldnek nevezik. Ezen területek REM-on

hatásának megfelelően a REM-megvonás utáni visszacsapás növeli a dDpMe és vIPAG-ban a GABA-erg sejtek között a cFos-IR arányt (Maloney és mtsai, 1999; Sapin és mtsai, 2009). REM-off hatásuknak megfelelően pedig az ebbe a két régióba injektált GABA_A agonista muscimol növeli a REM-et macskában (Crochet és mtsai, 2006; Sastre és mtsai, 1996; Sastre és mtsai, 2000), patkányban (Boissard és mtsai, 2000; Sapin és mtsai, 2009) és tengerimalacban (Vanini és mtsai, 2007). Ezen területek léziója hasonló eredménnyel jár (Lu és mtsai, 2006). Ez utóbbi eredményekkel összhangban az ide injektált bicuculline csökkentette az alvással töltött időt (Vanini és mtsai, 2007).

A REM alvás elősegítésében a monoaminerg területeket elérő projekciók szerepét több cikk valószínűsíti. A vIPAG GABA-erg neuronjai feltehetően GABA_A receptorokon keresztül gátolják a DRN szerotonerg neuronjait (Liu és mtsai, 2000), valamint ezekről a középagyi területekről induló, LC neuronjait REM alvás alatt gátló projekciókat is leírtak (Verret és mtsai, 2006).

A dDpMe GABA-erg és non-GABA-erg idegsejtjei a SubC neuronjait szintén innerválják (Boissard és mtsai, 2003). Mivel ezekről a területekről nem, vagy nem kizárólag GABA-erg projekciók érik el a SubC sejtjeit, ennek a projekciónak a pontos neurobiológiai háttere nem egyértelmű. Nem kizárható továbbá, hogy az alvás szabályozásában a vIPAG-ból a nyúltvelői gigantocellularis terület felé menő projekciók is szerepet játszanak (Luppi és mtsai, 1988)

2.2.9 Posterior hypothalamus

Lényeges pontok

- a posterior hypothalamus tuberomamilláris területén lévő hisztaminerg neuronok aktivitásuk maximumát ébrenlét alatt mutatják
- a GABA-erg szabályzás szerepe bizonyított



9. ábra. A posterior hypothalamus elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), sagittalis metszeti rajz. PH: posterior hypothalamus, DMH: dorsomedial hypothalamus, 3v: 3. agykamra

A korábban felsorolt területeken kívül fontos megemlíteni egyes hypothalamicus alrégiókat. A PH (9. ábra), azon belül a TMN (tuberomamillary nucleus) területén található hisztaminerg neuronok alvás-ébrenlétre gyakorolt hatása hasonlít a szerotonerg és noradrenerg idegsejtekéhez: aktivitásuk ébrenlét alatt magas, elalváskor csökken, mély lassú hullámú alvás és REM alatt nem tüzelnek (Takahashi és mtsai, 2006; Vanni-Mercier és mtsai, 1984). További hasonlóság a REM-off monoaminerg területekhez, hogy irtásuk növeli a REM-ben és csökkenti az ébrenlétben töltött időt (Thakkar, 2011). Az extracelluláris GABA szintje ezen a területen lassú hullámú alvás alatt megemelkedik és a GABA_A agonista muscimol ide adott mikroinjekciója is növeli az SWS-ben töltött időt. A glutamát extracelluláris szintje ezzel szemben nem változik a vigilancia-fázisok váltakozásával (Nitz és Siegel, 1996). Mindazonáltal ahogy a locus coeruleus glutamáterg szabályzásánál, itt is megjegyzendő, hogy a hivatkozott vizsgálatban használt mikrodialízis technikával nem zárható ki egyértelműen a

glutamáterg szinaptikus transzmisszió intenzitásának esetleges vigilancia fázis-függő váltakozása.

2.2.10 Lateralis hypothalamus



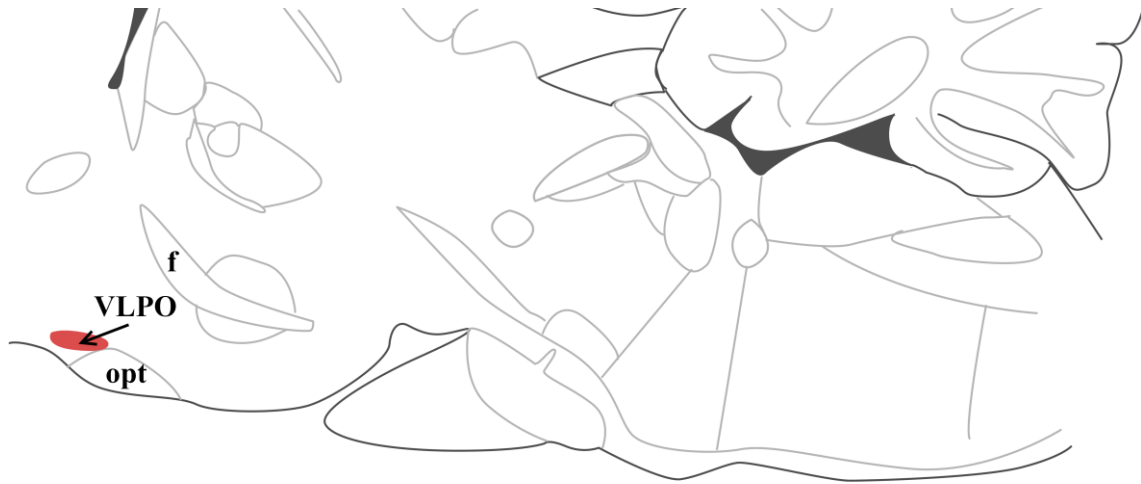
10. ábra. A lateralis hypothalamus elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajz. Az atlaszban egyes alrégióit tüntetik fel, ezek közül a zona incerta, subincertal nucleus, perifornical nucleus és a lateralis hypothalamus perifornicalis területét jelöltem ki. LH: lateral hypothalamus, sm: stria medullaris, opt: optic tract (látópálya)

Kissé rostralisabban, a lateralis hypothalamus (10. ábra) területén orexin- és melanin-koncentráló hormon- (MCH: melanin-concentrating hormone) tartalmú neuronok találhatóak. Ezek közül az orexinergek REM-off, az MCH-ergek pedig REM-on hatásúnak tekinthetők (Peyron és mtsai, 2009; Saper és mtsai, 2005). Az LH alvás-ébrenlétben betöltött szerepét később részletesen kifejtem.

2.2.11 A ventrolateralis preopticus area

Lényeges pontok

- az itt lévő GABA-erg neuronok alvás alatt aktívak
- a monoaminerg ébresztő rendszer tagjaival reciprok gátló kölcsönhatásban van



11. ábra. A ventrolateralis preopticus area elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajz. VLPO: ventrolateralis preopticus area, f: fornix, opt: optic tract (látópálya)

A hypothalamus rostralis pólusán található ventrolateralis preopticus area (VLPO, 11. ábra) irtása insomniát okoz (Nauta, 1946). Ezen a területen főként GABA-erg idegsejtek találhatóak, amelyek alvás alatt aktívak, és aktivitásuk korrelál az alvás mélységével (Szymusiak és mtsai, 1998). Általánosságban kimondható, hogy a VLPO neuronjait gátolják azok a neurotranszmitterek, amelyek ürülése csak az ébrenlétre, vagy az ébrenlétre is jellemző. Ilyen hatással rendelkezik az acetilkolin, noradrenalin és szerotonin, de a hisztamin nem befolyásolja ezen sejtek tüzelési mintázatát (Gallopín és mtsai, 2000). A VLPO az alvás kiváltásában játszott szerepét többek közt az ébresztő hatású noradrenerg (LC) és szerotonerg (DRN) idegsejtek gátlásával valósítja meg (Steininger és mtsai, 2001), de beidegzi az ébrenlét alatt aktív hisztaminerg neuronokat tartalmazó TMN-t is (Sherin és mtsai, 1996). Az ezeken a területeken tapasztalható, alvás alatt megemelkedett extracelluláris GABA-szint, ami ismert módon szerepet

játszik a monoaminerg neuronok gátlásában, valószínűsíthetően részben vagy egészében a VLPO neuronjainak aktivitására vezethető vissza.

2.2.12 Nucleus suprachiasmaticus

Lényeges pontok

- shell (héj) és mag (core) részekre osztható
- a mag direkt retinális inputot kap
- ritmusos óragéneket expresszál, irtásakor az állat endogén cirkadián ritmusa eltűnik



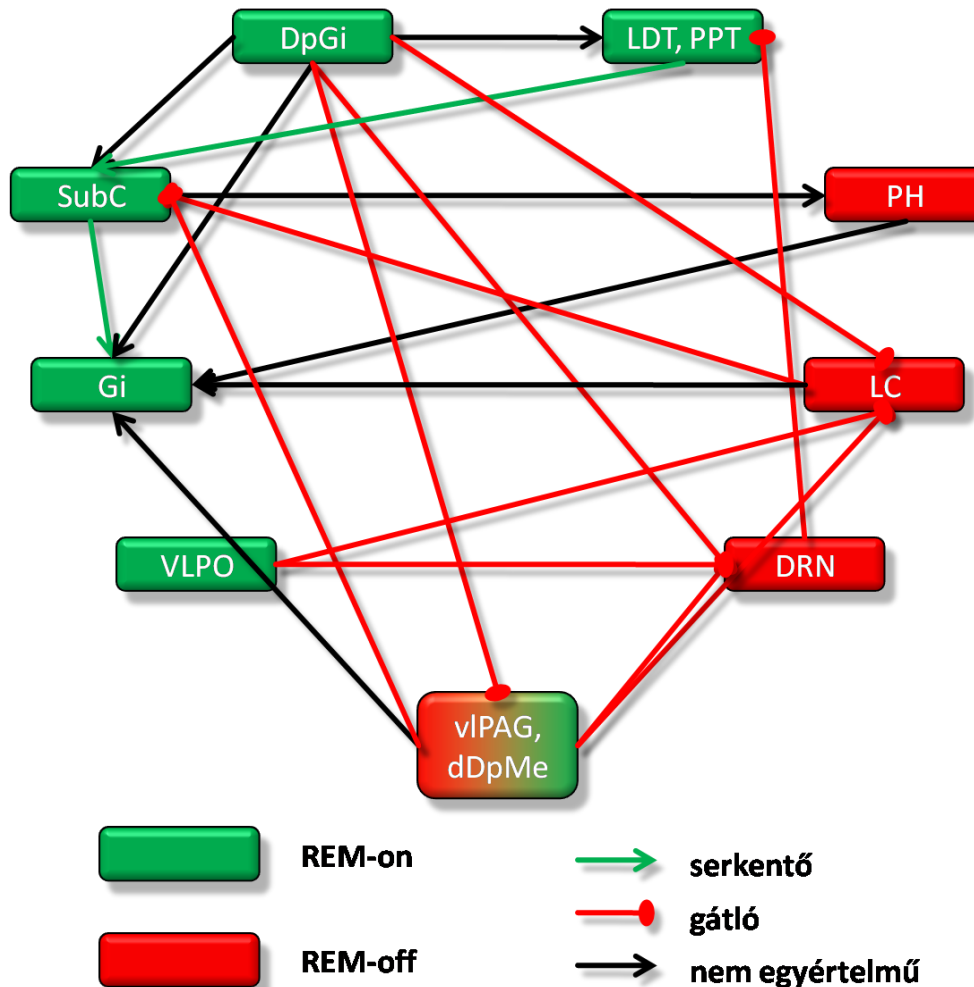
12. ábra. A nucleus suprachiasmaticus elhelyezkedése (Paxinos és Watson, 2007 nyomán), saggitalis metszeti rajz. SCN: suprachiasmatic nucleus, VMH: ventromedialis hypothalamus, sox: decussatio supraopticus

Mivel jelen dolgozat kereteibe szervesen nem illeszkedik, de az alvás-ébrenlét szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszik, csak röviden térnék ki az nucleus suprachiasmaticus (SCN: suprachiasmatic nucleus) szerepére. Ahogy a nevéből is kitűnik, ez a terület a chiasma opticum fölött helyezkedik el (12. ábra) és két alrégióra tagolható, a héjra (shell) és magra (core). Az utóbbi direkt bemenetet fogad a retina fényérzékeny, melanopszin-tartalmú ganglionsejtjeiből (Baver és mtsai, 2008). Ez a kapcsolat biztosítja az alvás-ébrenlét fény-sötét ciklushoz való adaptációját. Az SCN neuronjai ritmusos óragéneket expresszálnak, ennek a magnak az irtásával az állat alvás-ébrenlét szabályozásának fénytől független, endogén ritmusa eltűnik. A két

alrégió között alapvetően egyirányú kapcsolat van: a mag neuronjai beidegzik a héj idegsejtjeit, de fordított irányú projekció csupán kisebb mértékben figyelhető meg (Abrahamson és Moore, 2001; Chiesa és mtsai, 2010).

2.2.13 A REM-on és REM-off agyterületek áttekintése

A fentebb tárgyalt agyterületek REM-on és REM-off tulajdonságait, valamint a közöttük lévő ismert kapcsolatokat a 13. ábra szemlélteti.



13. ábra. Az alvás szabályozásában részt vevő legfontosabb, a 2.2 részben tárgyalt agyterületek. A lateralis hypothalamus szerepét a 2.3 fejezetben részletezem. Látható, hogy a REM-on és REM-off területek egymást reciprok módon gátolják. DpGi: dorsal paragigantocellular nucleus, LDT: laterodorsal tegmental nucleus, PPT: pedunculopontine tegmental nucleus, SubC: subcoeruleus, PH: posterior hypothalamus, Gi: gigantocellular nucleus, LC: locus coeruleus, VLPO: ventrolateral preoptic area, DRN: dorsal raphe nucleus, vIPAG: ventrolateral periaqueductal grey, dDpMe: dorsal deep mesencephalic reticular nucleus (mély középagyai hálózatos mag dorsalis része)

2.3 A melanin-koncentráló hormon és az orexinek

2.3.1 Melanin-koncentráló hormon

Lényeges pontok

- az MCH-tartalmú sejtek a laterális hypothalamus területén találhatóak
- két receptora ismert, az MCHR1 és MCHR2, de utóbbi számos állatfajban (például rágcsálókban) nincs jelen, vagy nem funkcionális (pseudogén)
- az MCH-erg neuronok aktivitása növeli a REM-ben töltött időt és a táplálékfelvételt, és egyes eredmények szerint a stresszre adott válaszban is szerepet játszanak
- nem egyértelmű az irodalmi adatok alapján, hogy az MCH-erg neuronok aktivitása a REM szakaszok darabszámát vagy átlagos hosszát befolyásolja
- az MCH-erg neuronoknak cocaine- and amphetamine-regulated transcript- (CART) immunoreaktivitásuk alapján két alpopulációja különíthető el: a CART-ot tartalmazó és a CART-ot nem tartalmazó sejtek csoportja. Ezek az alpopulációk kialakulásuk idejében és projekciós területeikben is eltérnek.
- az ún. „flower pot” módszerrel végzett alvásmegvonást követő visszacsapás mindkét alpopulációt aktiválja (a módszer részletes leírását ld. a 2.4 fejezetben)

Az MCH egy 19 aminosavból álló ciklikus neuropeptid, melyet először a lazac hipofízisében írtak le, mint a bőr világosodását kiváltó hormont (Kawauchi és mtsai, 1983). Ez a peptid egy 165 aminosavból álló prekursor, a prepro-MCH hasítási terméke, amiből az MCH-n túl neuropeptid EI és a neuropeptid GE is keletkezik (Bittencourt és Celis, 2008). Mint hamarosan kiderült, az MCH-t az emlősagy sejtjei is expresszálják, de a bőr pigmentációját ezekben az állatokban nem befolyásolja. Az MCH tartalmú neuronok emlősben alapvetően a tuberális hypothalamus és a zona/subzona incerta területén találhatóak (Bittencourt és mtsai, 1992; Skofitsch és mtsai, 1985).

Az MCH első receptorát 1999-ben nevezte meg egymástól függetlenül több kutatócsoport. Ez a korábban orphan somatostatin-like receptor 1-nek (SLC-1) nevezett G-fehérje csatolt receptor. Mivel az MCH az egyetlen endogén ligandja, ezt a felfedezést követően átnevezték MCHR1-nek (MCH 1 receptor) (Bachner és mtsai,

1999; Chambers és mtsai, 1999; Lembo és mtsai, 1999; Shimomura és mtsai, 1999). Az MCH másik receptorát (MCHR2), mely csupán 38%-os szekvencia-homológiát mutat az MCHR1-gyel, 2001-ben írták le (Hill és mtsai, 2001; Mori és mtsai, 2001; Sailer és mtsai, 2001). Ez utóbbi receptort, legalábbis funkcionális formájában, számos faj egyedei (egér, patkány, hörcsög, tengerimalac, nyúl) nem expresszálják (Tan és mtsai, 2002). Az MCHR1 G_s -, G_i/G_0 - és G_q/G_{11} -csatolt is lehet, vagyis az MCH ezen a receptoron mediáltan serkentő és gátló hatást is képes kifejteni. Ezzel szemben az MCHR2-t csak G_q/G_{11} -csatolt formában mutatták ki, vagyis az MCH ezen a receptoron kötve foszfolipáz C stimuláló hatást válthat ki (Hawes és mtsai, 2000; Pissios és mtsai, 2003; Sailer és mtsai, 2001; Saito és mtsai, 1999; Saito és mtsai, 2001).

Az MCH-erg neuronok számos, alvás-ébrenlét és táplálékfelvétel szabályzásában részt vevő agyterület felé küldenek rostokat. Ezek közül említendők többek között a thalamus, a TMN, a preopticus hypothalamus, a nucleus arcuatus, a ventralis tegmentalis area, a periaqueductalis szürkeállomány, az LC, a PnO, az LDT és PPT, DRN, valamint az agykéreg, amygdala és a trigeminalis motoros magok (Bittencourt és mtsai, 1992; Elias és mtsai, 2008; Griffond és Risold, 2009; McGregor és mtsai, 2005; Torterolo és mtsai, 2009). Az MCH-val kolokalizáltan több peptid, illetve transzmitter jelenlétét kimutatták, például az MCH-erg neuronok túlnyomó része neszfatint és GABA-t is tartalmaz, valamint egy hányadék esetében CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) jelenlétét is kimutatták (Fort és mtsai, 2008; Sapin és mtsai, 2010).

Az MCH szerepét a táplálékfelvétel szabályzásában számos eredmény támasztja alá. Intracerebrálisan adott MCH növeli a tápfelvételt, az éheztetés pedig aktiválja az MCH-tartalmú neuronokat (Qu és mtsai, 1996). Ezzel összhangban az MCH túlexpresszázó állatok elhízottak, az MCH génkiütött (KO: knockout), MCHR1 KO és MCH-erg neuron-irtott állatok pedig soványabbak a kontroll-csoportnál (Alon és Friedman, 2006; Ludwig és mtsai, 2001; Marsh és mtsai, 2002; Shimada és mtsai, 1998). Az MCHR1 antagonistákra általánosan jellemző, hogy csökkentik a testsúlyt és a tápfelvételt (Luthin, 2007; Mendez-Andino és Wos, 2007). Az MCH-erg neuronok ezt a hatásukat többek közt feltehetően a táplálékfelvétel szabályzásában központi szerepet játszó hypothalamicus nucleus arcuatussal való kétirányú kapcsolataikon keresztül fejtik ki (Griffond és Risold, 2009).

Az MCH-tartalmú neuronok aktivációját kis porondos REM-megvonást követően MCH-cFos kettős immunohisztokémia alkalmazásával mutatták ki (Hanriot és mtsai, 2007; Verret és mtsai, 2003), valamint az is ismert, hogy ezek az idegsejtek normál napi ciklus során a tüzelési frekvenciájuk maximumát REM alvás alatt érik el (Hassani és mtsai, 2009). Az MCH alvás-szabályozásban játszott szerepét farmakológiai adatok is alátámasztják: ezt a peptidet az agykamrába, vagy a dorsalis raphe-ba injektálva a REM-ben töltött idő, valamint a REM szakaszok darabszáma is emelkedik (Lagos és mtsai, 2009; Verret és mtsai, 2003). Ezzel egybehangzóan a DRN területén a fiziológiás MCH immunoneutralizációja MCH elleni antitesttel csökkentette a REM-ben töltött időt és a REM szakaszok darabszámát is, míg átlagos hosszuk nem változott (Lagos és mtsai, 2011). Egy másik vizsgálatban az MCH macska nucleus pontis oralisába injektálva a REM-ben töltött idő növekedésén túl a REM szakaszok átlagos hosszát is emelte (Torterolo és mtsai, 2009). Ezzel egybevágóan két, kémiaiailag hasonló MCH 1-es receptor (MCHR1) antagonistáról kimutatták, hogy a REM-ben töltött idő csökkentésén túl a REM szakaszok számát és átlagos hosszát is csökkentik (Ahnaou és mtsai, 2008). Bár ezek az adatok egybehangzóan alátámasztják azt a feltételezést, hogy az MCH a REM alvásban töltött időt növeli, de a REM architektúrájával kapcsolatos információk ellentmondásosak. Ugyanakkor érdemes azt is megjegyezni, hogy a REM-ben töltött idő és az MCH kapcsolatát tekintve is létezik a fentebb felsoroltakkal ellentétes eredmény az irodalomban: Able és munkatársai egy potens, de a korábban ismertektől eltérő kémiai szerkezetű MCHR1 antagonistával nem tudták befolyásolni a REM-ben töltött időt, holott a magas receptor-okkupanciát bizonyították (Able és mtsai, 2009).

Az MCH és alvás kapcsolatát genetikailag módosított állatokon vizsgáló tanulmányok ellentmondásos adatokat hoztak: normál körülmények közt sem az MCH KO, sem az MCHR1 KO állatok sem töltöttek kevesebb időt REM alvásban, mint vad típusú társaik, sőt, a receptor-génkiütött állatok alvással töltött ideje magasabb volt a kontrollnál (Adamantidis és mtsai, 2008; Willie és mtsai, 2008). Megjegyzendő ugyanakkor, hogy éhezés hatására, ami vad típusú állatokban ismert módon növeli az MCH-erg neuronok aktivitását, erőteljes motoros aktivitás-növekedés és REM-csökkenés volt megfigyelhető az MCH KO állatok esetében (Willie és mtsai, 2008). Ez egybevág egy elhízás ellen fejlesztett MCHR1 antagonisták klinikai eredményeivel, ahol

a csökkentett kalóriatartalmú diétán lévő kezelt páciensek romló alvásminőségről, gyakori ébredésről számoltak be (Neurogen, 2008).

Az MCH neuronokat ismert REM-on tulajdonságukkal összhangban az alvást gátló monoaminok (noradrenalin, szerotonin) direkt szinaptikus kölcsönhatással hyperpolarizálják. Az acetilkolin szintén gátló hatást fejt ki ezekre a sejtekre, részint direkt módon, muszkarinerg szinapszisokon keresztül, részint indirekt módon, lokális GABA-erg interneuronok nikotinos receptorokon keresztüli serkentésével (van den Pol és mtsai, 2004). Bár kísérletes eredmények nem támasztják alá, de feltételezhetjük, hogy ez utóbbi hatás fiziológiásan nem a kizárólag REM alatt, hanem az ébrenlét alatt is aktív kolinerg neuronok aktivitásának következményeképp alakulhat ki.

Az MCH-erg sejtek CART-immunreaktivitásuk alapján két alpopulációra oszthatóak: a CART-immunoreaktív (CART-IR), és a CART-ot nem tartalmazó (non-CART-IR) neuronokra. A CART peptid számos idegéletani funkciója ismert (például a táplálékfelvétel csökkentése), de a receptorát máig nem sikerült egyértelműen azonosítani (Rogge és mtsai, 2008). Jelen dolgozat keretei között csupán mint neurokémiai markert kezeljük. Az egyedfejlődés során patkányban az MCH-erg neuronok CART-ot nem tartalmazó alcsoportjának tagjai jelennek meg korábban, a 11. embrionális napon, míg a CART-IR neuronok kicsit később, a 12-13. embrionális nap környékétől figyelhetőek meg. Ezek az alpopulációk projekciós területeiket tekintve is eltérnek: A CART-IR neuronok az agykéreg, a REM alatti hippocampalis theta generálásában ismert módon részt vevő medialis septalis complex (Lerma és Garcia-Austt, 1985), valamint a hippocampus felé küldenek rostokat, de az agytörzs felé, ezen belül a tectum, a dorsolateralis periaqueductalis szürkeállomány és a DRN felé induló projekciókat is leírtak. Az MCH/CART immunopozitív rostoknak ez az ága a legdenzebben a DPGi területét idegzi be. Ezzel szemben az MCH-tartalmú sejtek non-CART-IR alcsoportja az alsó agytörzs és a gerincvelő egyes neuronpopulációit innerválja (Brischoux és mtsai, 2002; Cvetkovic és mtsai, 2004). Ismert, hogy a kis porondon történő REM-megvonást követő visszacsapás alatt az MCH-neuronok mindkét alcsoportja aktiválódik (Hanriot és mtsai, 2007). Mindazonáltal megjegyzendő, hogy ez a protokoll egyértelműen stresszel jár az állatokra nézve (Coenen és van Luijtelaar, 1985; Kovalzon és Tsibulsky, 1984; Suchecki és mtsai, 1998), az MCH emeli a plazma ACTH (adrenocorticotroph hormone) szintet, szerepet játszik a stresszre

adott viselkedési és hőmérséklet-szabályozási válaszokban, valamint számos, stresszre adott válasz gátolható MCHR1 (MCH receptor 1) antagonistával (Smith és mtsai, 2006; Smith és mtsai, 2009). Ezek alapján feltételezhető, hogy az MCH neuronok kis porondos REM-megvonást követő fentebb leírt aktivációjában az alvás-visszacsapáson túl a módszerrel járó stressz is szerepet játszhat.

2.3.2 Orexinek

Lényeges pontok

- kétféle orexin (orexin A és B), illetve kétféle orexin-receptor (OXR-1 és OXR-2) is ismert
- az orexinerg neuronok sejttestjei az MCH-ergékéhez hasonlóan a lateralis hypothalamus területén találhatóak
- ennek a rendszernek a sérülése narkolepsziát, aktivitása ébrenlétet, REM-csökkenést (a szakaszok számának csökkentésén keresztül) és megnövekedett táplálékfelvételt okoz
- az orexinerg és MCH-erg neuronok reciprok, monosynapticus kapcsolatban állnak

Az orexin A-t és B-t (más néven hypocretin 1-t és 2-t) 1998-ban írta le egymástól függetlenül két kutatócsoport (de Lecea és mtsai, 1998; Sakurai és mtsai, 1998), és először a táplálékfelvételre gyakorolt hatásukat fedezték fel. Az orexin név is innen ered (orexis = étvágy), a hypocretin név pedig az ezeket a peptideket kifejező neuronok elhelyezkedésére (hypothalamus) és a fehérjék secretinnel való szekvenciabeli hasonlóságára utal. A két orexin ugyanannak a fehérjének, a prepro-orexinnek a hasítási terméke. Ennek a két peptidnek a neurológiai hatásait két receptor mediálja, az OXR-1 és OXR-2, más néven Hcrtr1 és Hcrtr2. Míg az OXR-1 egy nagyságrenddel nagyobb affinitással köti az orexin A-t, mint az orexin B-t, az OXR-2-höz a két peptidnek ugyanakkora az affinitása (Sakurai és mtsai, 1998). Mindkét receptor G-fehérje-csatolt, de míg az OXR-1-hez kizárólag $G_{q/11}$ kapcsolódik, az OXR-2-t $G_{q/11}$ és G_i csatolt formában is leírták (Zhu és mtsai, 2003). Az orexin-tartalmú neuronok sejttestjei a dorsalis LH, a PFA (perifornicalis area) és a PH területén találhatóak (de Lecea és mtsai, 1998; Nambu és mtsai, 1999; Peyron és mtsai, 1998).

Az orexinerg neuronokat a VLPO alvás alatt aktív neuronjai GABA_A és GABA_B receptorokon keresztül is gátolják (Sakurai és mtsai, 2005; Xie és mtsai, 2006; Yamanaka és mtsai, 2003a; Yoshida és mtsai, 2006). Meglepő módon az ébrenlét alatt aktív DRN és LC szerotonerg és noradrenerg projekciói szintén gátolják az orexinerg idegsejtek aktivitását (Yamanaka és mtsai, 2003b; Yamanaka és mtsai, 2006). Ezeket a neuronokat alapvetően AMPA receptorokon hatva serkenti a glutamát (Alberto és Hirasawa, 2010; Li és mtsai, 2011). Az orexinerg rendszer indirekt módon lokális glutamaterg interneuronokon hatva, valamint direkt módon, az orexinerg neuronokon lévő OXR-2 által mediálva képes serkentenit saját idegsejtjei aktivitását (Li és mtsai, 2002; Yamanaka és mtsai, 2010). Az acetilkolin szintén serkenti az orexinerg neuronokat (Yamanaka és mtsai, 2003b).

Ezek a neuronok projekcióikkal szinte a teljes központi idegrendszert behálózzák, de terminálisaik legsűrűbben a thalamus paraventricularis magjában, a nucleus arcuatus, a TMN, a LC, a DRN és az LDT/PPT területén találhatóak meg (Date és mtsai, 1999; Nambu és mtsai, 1999; Peyron és mtsai, 1998), vagyis a táplálékfelvétellel és autonóm szabályzással, illetve az alvás-ébrenlét szabályzásával összefüggésbe hozható agyterületeken. Az orexin az ismert monoaminerg, ébresztő hatású rendszerek sejttestjeit, vagyis a LC noradrenerg, a DRN szerotonerg és a TMN hisztaminerg neuronjait is serkenti (Brown és mtsai, 2002; Hagan és mtsai, 1999; Horvath és mtsai, 1999; Liu és mtsai, 2002; Yamanaka és mtsai, 2002). A tegmentum területén feltehetően a REM alvás és ébrenlét alatt is aktív kolinerg neuronokat direkt módon serkenti, a kizárólag REM alatt aktívakat pedig lokális GABA-erg interneuronok serkentésén keresztül gátolja (Burlet és mtsai, 2002; Mieda és mtsai, 2011; Takahashi és mtsai, 2002; Takakusaki és mtsai, 2005). Az orexinerg neuronok egy része glutamátot is expresszál (Rosin és mtsai, 2003), valamint a TMN és a LC területén is kimutatták, hogy az orexinerg axonvégzódések glutamátot is használnak neurotranszmitterként (Henny és mtsai, 2010; Torrealba és mtsai, 2003).

Az orexinek élettani szerepével kapcsolatban nem lehet elfelejtkezni a narkolepszia jelenségéről. Ebben a betegségben szenvedők nagymértékű alvásnyomást éreznek, gyakran az ébrenlétbe átmenet nélkül betörő REM epizódok jelentkeznek, és a REM latencia drasztikus csökkenése is megfigyelhető (Sakurai és Mieda, 2011). Az orexinerg rendszer sérülésének szerepét ebben a kórképben elsőként állatmodelleken írták le

(Chemelli és mtsai, 1999; Lin és mtsai, 1999), majd később humán post mortem szövetekben is igazolták (Peyron és mtsai, 2000; Thannickal és mtsai, 2000).

Az orexinerg neuronok alvás alatt nem tüzelnek, ez alól kivételt a REM alatti végtagrágások jelentik (Lee és mtsai, 2005; Mileykovskiy és mtsai, 2005). Ezzel összhangban az agykamrába injektált orexin A csökkenti a REM alvásban töltött időt, és ez a hatás az orexin 1-es receptor antagonistá SB-334867A adásával kivédhető (Smith és mtsai, 2003). Az antagonistá hatásához hasonlóan a prepro-orexin csendesítése rövid interferáló ribonukleinsavval (siRNA: small interfering ribonucleic acid) növeli a REM alvásban töltött időt (Chen és mtsai, 2006a). Az orexin REM-architektúrára való hatását is vizsgálták: az orexin KO és prepro-orexin-csendesített állatok esetén a REM szakaszok száma nőtt a vad típusú állatokhoz képest (Chen és mtsai, 2006b; Hunsley és mtsai, 2006), valamint macskák tegmentumába injektált orexin-A csökkentette a REM epizódok és az SWS-REM átmenetek számát is (Moreno-Balandran és mtsai, 2008; Xi és mtsai, 2001a).

Az orexin- és MCH-tartalmú sejtek reciprok monosynapticus kapcsolatban állnak (Guan és mtsai, 2002; Torterolo és mtsai, 2006). Az MCH-tartalmú neuronok orexin 1 receptort expresszálnak (Backberg és mtsai, 2002), és ezzel összhangban az orexin A és B is serkenti az MCH-tartalmú idegsejteket (van den Pol és mtsai, 2004). Az orexin-tartalmú neuronok orexin A-val való ingerelhetősége MCH adásával gátolható, és ez a hatás MCHR1 KO egerekben nem figyelhető meg (Rao és mtsai, 2008).

Az MCH-erg és orexinerg rendszer élettani szerepét ismertetve röviden kitérnék a szakirodalomban legalaposabban feldolgozott funkciójukra, a táplálékfelvételre való hatásukra. Bár az alvás-ébrenlét szabályzásában ellentétes szerepet töltenek be, a táplálékfelvételt mindkét transzmitter növeli (Della-Zuana és mtsai, 2002; Yamanaka és mtsai, 1999), és ezzel összhangban az éhezés mindkét neuroncsoport aktivitását is emeli (Bertile és mtsai, 2003; Cai és mtsai, 1999). A korábban említett vizsgálatok alapján, ahol azt találták, hogy az MCH-erg rendszer gátlása akkor okoz változást az alvásmintázatban, ha táplálékmegevonással kombináljuk, adja magát a feltételezés, hogy az MCH-orexin rendszer az alvás-ébrenlét és a táplálékfelvétel szabályzásának interakcióját irányítja. Ez alapján az éhezés esetén adott választ (táplálék intenzívebb keresése, szimpatikus túlsúly, vagy ellenkezőleg, csökkentett motoros aktivitás, megnövelt alvásidő, az energiavesztés minimalizálása) e két rendszer aktuális

egyensúlya befolyásolja. Az előbbi megoldást az orexinerg, az utóbbit pedig az MCH-erg rendszer aktivitásának túlsúlya esetén választja az állat nagyobb valószínűséggel. Természetesen ennek a hipotézisnek az igazolása vagy cáfolata további kísérleteket igényelne.

2.4 A „flower pot” REM-megvonásos technika

Lényeges pontok:

- a REM alatti izomatónia jelenségét használja ki
- régóta alkalmazott metodika, sok variáns
- az SWS csökkenése és az okozott stressz a technika inherens negatív tulajdonságai
- nagy platform mint stressz-kontroll: az SWS és a stressz tekintetében is kielégítő kontroll, csak a REM megvonás hatékonyságában különbözik

Az ún. „flower pot” („virágcserep”) vagy más néven „platform on water” (szabad fordításban „porond a víz fölött”) módszert Jouvet és mtsai írták le először 1964-ben (Jouvet és mtsai, 1964), mint egy egyszerű és hatékony módszert a REM alvás megvonására. Jouvet ezt a protokollt macskákra dolgozta ki, de mások egy évvel később alkalmazták patkányon is (Cohen és Dement, 1965). A módszer lényege az, hogy az állatot egy kisméretű, kerek porondra helyezzük, amit víz vesz körbe. A nevért onnan kapták, hogy először egy felfordított virágcserepet helyeztek vízbe úgy, hogy a talpa a víz színe fölött legyen. (Később az agyag átnedvesedése miatt műanyag felületre tértek át.) A porond mérete elégséges ahhoz, hogy az állat rajta meg tudjon állni, de ráfeküdni még összegömbölyödve sem tud. Az izomtónus megmaradása és a környezeti hatások miatt ugyan csökkent mértékben, de megfigyelhető lassú hullámú alvás a porondon lévő állaton. Viszont amint belép a REM fázisba, az izomatónia miatt beleesik a vízbe és felébred (Machado és mtsai, 2004). Általában két különböző méretű porondot használnak egy ilyen kísérletben: a fentebb jellemzett kisebbet, valamint kontrollként egy nagyobbat. Ez utóbbi már alkalmas arra, hogy az állat összegömbölyödve aludjon rajta, így lehetővé válik a REM alvás, de egyéb körülmények tekintetében megegyezik a kisebbel.

A módszer leírása óta eltelt időben számos metodikai problémát és megoldási javaslatot írtak le a szakirodalomban. Például Hicks és munkatársai rámutattak arra, hogy az állat mérete alapvetően befolyásolja egy adott átmérőjű porond hatását az alvásmintázatra (Hicks és mtsai, 1977). Bár Grahnstedt és Ursin úgy találták, hogy az SWS-t is befolyásolja a porondos alvásmegvonás (Grahnstedt és Ursin, 1985), de később bizonyítást nyert, hogy a kis és a nagy porondon lévő állatok alvásmintázatában az alapvető különbség a REM alvásban töltött időben mutatkozik, az SWS-ben töltött idő tekintetében a két porond hatásai megegyeznek (Machado és mtsai, 2004). Ezek alapján bár szelektív REM-megvonásra egyik porond sem alkalmas, a két porond hatásainak összehasonlításával a szelektív REM-megvonás által okozott változások jól tanulmányozhatóak. Így a dolgozat további részeiben a szelektív REM-megvonás hatásaként a két porond összehasonlításából származó eredményekre fogok hivatkozni.

Számos vizsgálatban bizonyítást nyert, hogy ez a módszer igen komoly stresszt okoz az állatoknak (Coenen és van Luijteleaar, 1985; Kovalzon és Tsibulsky, 1984; Suchecki és mtsai, 1998). Ez utóbbi probléma elkerülésére számos megoldási javaslat született. Az ún. multiple platform technique (többszörös porond-technika) lényege az, hogy a több, egymás közelében elhelyezett porond lehetőséget biztosít az állatnak a mozgásra, ugyanakkor a REM alvás továbbra sem lehetséges (van Hulzen és Coenen, 1981; van Luijteleaar és Coenen, 1986). Az ún. modified multiple platform technique (módosított többszörös porond-technika) során több, korábban is együtt tartott állatot helyeznek a porondokra. Ennek a módszernek a célja a szociális izolációból fakadó stressz elkerülése oly módon, hogy nem kell új hierarchiát kiépítenie az állatoknak, vagyis ezt a stresszort is elkerülik (Suchecki és Tufik, 2000). Tekintetbe véve azt, hogy az alvásmegvonás, a porond körül lévő víz, amelybe a módszer lényegéből fakadóan időnként beleesik az állat, az alom hiánya és maga az új környezet is óhatatlanul mind-mind stresszforrást jelentenek, egyik megoldás sem tudta ezt a faktort tökéletesen kiiktatni. Mindazonáltal ezek a hatások mind kontrollálhatóak a nagy porond használatával. Azon túl, hogy a nagy és a kis porondon lévő állatok alvásmintázatában az alapvető különbség a kis porondon a REM teljes hiánya (Machado és mtsai, 2004), a stresszhatások tekintetében nagyon hasonlóan mutatkoznak (Coll-Andreu és mtsai, 1989). Ez utóbbi bizonyítást nyert a klasszikus Selye indexek vizsgálatával, plazma ACTH és kortikoszteron szintek, valamint a frontális agykéregben detektálható oxidatív

stressz mérésével is (Coenen és van Luijtelaar, 1985; D'Almeida és mtsai, 1997; Kovalzon és Tsibulsky, 1984; Suchecki és mtsai, 1998). Ezek alapján kijelenthető, hogy a módszer által okozott SWS-változások és a stresszhatások is szűrhetőek olyan kísérleti elrendezés felállításával, ahol a kis porondon lévő állat kontrollja a nagy porondon lévő állat, így tanulmányozhatóvá válnak a REM alvás teljes megvonása következtében fellépő biológiai változások.

3 Célkitűzések

A „flower pot” módszer alvásmintázatra gyakorolt hatását (Gandolfo és mtsai, 1996; Grahnstedt és Ursin, 1985; Machado és mtsai, 2004; Suchecki és mtsai, 2000; van Luijtelaar és Coenen, 1986) valamint az ezzel a módszerrel végzett ismételt alvásmegvonás – alvás-visszacsapás hatásait is (Machado és mtsai, 2005; Machado és mtsai, 2006) számos kutatócsoport vizsgálta a technika többféle, fentebb ismertetett altípusának felhasználásával. Ennek ellenére a kis és a nagy (stressz-kontroll) porondon töltött alváshiányos időszakot követő 24 óra alatt a két csoport alvás-mintázatának részletes összehasonlítását egyik kutatócsoport sem írta le. Így nem különítették el a REM-megvonás hatásait a módszerrel együtt járó stressz hatásaitól, és az alvás-visszacsapás időbeli lefutása sem ismert. A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletünk célja ennek az összehasonlításnak a megtétele, és így a REM alvás teljes, szelektív megvonása eredményeképp létrejövő alvásmintázati változások leírása.

A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletünk a hypothalamus egyes neuropeptidjei, valamint a REM-megvonást követő visszacsapás architektúrája közti kapcsolat leírását célozta. Annak ellenére, hogy az MCH és orexin hatása a REM alvásra jól ismert és több oldalról bizonyított, az ezeket az átvivőanyagokat kifejező neuronok endogén aktivációja és a REM alvás részletes architektúrája közti kapcsolat leírása hiányzik az irodalomból. Ezen kívül az sem volt tisztázva, hogy az MCH sejtek CART-immunreaktivitás alapján elkülönített alpopulációi egyenlő, vagy eltérő mértékben hozhatók kapcsolatba a REM alvás architektúrájával. Kísérletünkben részlegesen megismételtünk és kiterjesztettünk egyes irodalmi vizsgálatokat, melyek az orexin- és MCH-tartalmú idegsejtek és a REM alvás közti kapcsolat felderítését célozták. Az irodalomban más munkacsoportok által publikált kísérletek döntő többségétől eltérően méréseinkhez nagy porondos kontroll-csoportot is használtunk, hogy elkülönítsük a REM-megvonás hatásait a „flower-pot” módszerrel óhatatlanul együtt járó stresszfaktorok hatásaitól. Ezen túl kvantifikáltuk az orexin-tartalmú, ill. MCH-tartalmú/non-CART-IR és MCH-tartalmú/CART-IR sejtek aktivációját kettős, ill. hármas immunohisztokémiával (orexin-cFos, MCH-cFos és MCH-CART-cFos) az alvásmegvonást követő visszacsapás során. A kettős immunohisztokémiát és az

alvászvizsgálatokat ugyanazokon az állatokon végeztük, hogy a részletes REM-architektúra és ezen sejtek aktivációja közötti kapcsolatot felderítsük.

A két kísérlet céljai összefoglalva:

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

4 Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált állatok, műtéti eljárás

Mindkét kísérlet során hím Wistar patkányokat használtunk, melyek tömege a REM megvonás kezdetekor $347,7 \pm 4,8$ g (a REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérlet esetén), illetve $269,2 \pm 6,8$ g volt (a REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérlet esetén) (átlag \pm átlag szórása). Az állatkísérleteket az Állatkísérletes Tudományos Etikai Tanács 22.1/2655/001/2007 iktatószámú engedélye alapján végeztük.

A műtét során EEG és EMG (elektromiográfiás) elektródokat ültettünk be. A beavatkozás pontos leírását laboratóriumunk korábban publikálta (Kántor és mtsai, 2004). Röviden, a frontoparietális EEG jel elvezetéséhez az elektródokat (rozsdamentes csavarok) a dura mater fölé ültettük a bal frontális agykéreg (2 mm-rel előre és 2 mm-rel balra a bregmához képest), valamint a bal parietális agykéreg fölé (2 mm-rel előre és 2 mm-rel balra a lambdához képest). A föld-elektrodokat a kisagy fölé, medialisan ültettük. Az EMG elektródok szilikongumiba ágyazott rozsdamentes acélszálból készült, 50 mm hosszú, a szilikongumival együtt 1,2 mm vastag tekercsek voltak (Plastics One, Inc, Roanoke, VA, USA). Ezeket a nyakizmok közé varrtuk be mindkét oldalon. A műtétek alatt a Kopf sztereotaxikus készülékben rögzített állatokat 2%-os halotánnal altattuk Fluotec 3 altatóberendezéssel.

A műtétet követően az állatokat egyenként izolálva a mérőszobában tartottuk 12-12 órás fény-sötét ciklusban. A lámpák 10 órától 22 óráig világítottak (kb. 150 lux), a hőmérséklet 21 ± 1 °C, a páratartalom 40-50% volt. A legalább 7 napos felépülést követően az állatokat habituáltuk a mérési körülményekhez (az elektródokat tartalmazó ún. koronát egy forgócsatlakozóhoz rögzített hajlékony kábelhez kapcsoltuk, mely nem akadályozta az állatok szabad mozgását). A mérés során ugyanilyen kábel és forgócsatlakozó segítségével vezettük el a jeleket. Az állatok motoros aktivitását úgy monitoroztuk, hogy a kábelt egy tekercsen vezettük át, és ennek a tekercsnek a belsejében a kábelhez egy mágneset rögzítettünk. Ez a mágnes az állat mozgásakor elektromos áramot indukált a tekercsben (Kántor és mtsai, 2004). A habituációs időszak szintén 7 napig tartott.

4.2 Csoportok

A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérlet során az állatokat véletlenszerűen kiválasztva 3 csoportba osztottuk:

- HC (home cage, saját ketrecben tartott) csoport (n=8): 23 órás polisznográfias felvétel készült az állatokról saját ketrecükben, zavartalan körülmények között.
- SPR (small platform, sleep rebound, kis porondon tartott, alvás-visszacsapásos) csoport (n=7): 23 órás polisznográfias felvétel készült az állatokról saját ketrecükben, miután 72 órát a kis porondon töltöttek.
- LPR (large platform, sleep rebound, nagy porondon tartott, alvás-visszacsapásos) csoport (n=8): 23 órás polisznográfias felvétel készült az állatokról saját ketrecükben, miután 72 órát a nagy porondon töltöttek.

A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérlet során, szintén véletlenszerűen kiválasztva, öt csoportba osztottuk az állatokat:

- HC (home cage, saját ketrecben tartott) csoport (n=7): az alvás megvonás ideje alatt saját ketrecükben tartott állatok; ennek a csoportnak a tagjait az alvás megvonás végével egyidőben perfundáltuk
- SP (small platform, kis porondon tartott) csoport (n=8): 72 órát töltöttek a kis porondon, ezt követően a csoport tagjait rögtön perfundáltuk
- LP (large platform, nagy porondon tartott) csoport (n=8): 72 órát töltöttek a nagy porondon, ezt követően a csoport tagjait rögtön perfundáltuk
- SPR (small platform, sleep rebound, kis porondon tartott, alvás-visszacsapásos) csoport (n=9 az alvás vizsgálatok és a korrelációk, n=13 a kettős immunohisztokémia, n=8 a hármas immunohisztokémia esetén): 72 órát töltöttek a kis porondon, a csoport tagjait az ezt követő három órás polisznográfias felvétellel követett alvás-visszacsapás után perfundáltuk
- LPR (large platform, sleep rebound, nagy porondon tartott, alvás-visszacsapásos) csoport (n=6 az alvás vizsgálatok, n=7 a kettős immunohisztokémia, n=5 a hármas immunohisztokémia esetén): 72 órát töltöttek a nagy porondon, a csoport tagjait az ezt követő három órás polisznográfias felvétellel követett alvás-visszacsapás után perfundáltuk

A víz és a táp az állatok számára mindkét kísérlet folyamán végig korlátlanul elérhető volt.

4.3 REM-megvonás

A habituációs időszakot követően az állatokat (a HC csoport tagjainak kivételével) a fény felkapcsolásakor lecsatlakoztattuk a kábelről, majd átvittük egy másik helyiségbe, ahol minden állatot különálló víztartály közepén elhelyezkedő porondra helyeztünk. Ebben a helyiségben a körülmények megegyeztek a mérőszoba körülményeivel. A porondok kialakítása az irodalmi standardok figyelembevételével történt. (A víztartály belső átmérője 41 cm volt, a kis porond átmérője 6,5 cm, a nagy porondé 13 cm. A vízmagasság 18 cm, a porond e fölött helyezkedett el 0,5 cm-rel.) A kihűlést megakadályozandó a porond felszínét PVC-vel borítottuk. Mivel a módszer beállítása során azt tapasztaltuk, hogy egyes állatok nehezen tudnak visszakapaszkodni a vízből a porondra, a porond körül, a vízfelszín alá 4 cm-rel egy PVC gyűrűt helyeztünk. Így minden állat könnyen vissza tudott mászni a porondra, de a gyűrűn állva a kijutáshoz szükségesnél nem töltöttek több időt. Az állatok a porondokon 72 órát töltöttek, a HC csoport tagjai ez idő alatt a ketrecükben voltak. A 72 órát követően közvetlenül a fény felkapcsolódása után mindkét kísérletben az SPR és LPR csoport tagjait visszavittük a mérőszobába és újracsatlakoztattuk a kábelhez. A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben a HC, SP és LP csoport tagjait a porondról való levételt követően perfundáltuk.

4.4 Felvétel-készítés

Mivel az állatok porondról való levétele, visszaszállítása a mérőszobába és kábelhez való csatlakoztatása a fény felkapcsolásakor kezdődött, a REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérlet első órája hiányos volt, így azt nem értékeltük. (Ebben az esetben a felvétel egész óráinak kezdetének igazodnia kellett az órák kezdetéhez, hogy minden rögzített óra teljes egészében világos, vagy sötét fázisban legyen felvéve.) Mivel a patkányok sötétben aktív állatok, az alvás-visszacsapás kezdete így a passzív fázis kezdetére esett. Ezzel az időbeli beosztással kerültük el azt, hogy mesterséges fáziseltolást hozunk létre, ami az eredményeket befolyásolhatta volna. Az EEG, EMG és motoros mintázatot a REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérlet során 23

órán, a REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben három órán keresztül rögzítettük. A felvétel indítása a REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérlet esetén egy órával a fényfelkapcsolás után, a REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérlet esetén rögtön az újracsatlakoztatást követően kezdődött. A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletben mindhárom, a REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben csak az SPR és LPR csoportokról készítettünk felvételt; a HC, SP és LP csoport tagjait a felvétel indításával egyidőben perfundáltuk (részletek a 4.6 fejezetben). Az időzítés oka az volt, hogy a HC-SP és HC-LP összehasonlítással az alvásmegvonás hatásait, az SP-SPR és LP-LPR összehasonlítással pedig az alvás-visszacsapás hatásait tudjuk vizsgálni. A felvétel készítése közben az állatokat nem zavartuk.

4.5 A felvételek kiértékelése

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

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

- REM (rapid eye movement, gyors szemmozgásos) alvás: szabályos theta ritmusok (5-9 Hz) jellemzik, EMG és motoros aktivitás nincs, kivéve az időnkénti rángásokat (Kántor és mtsai, 2004)

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

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

A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben csak a REM alvás mintázatát értékeltük ki (REM-ben töltött idő, REM szakaszok átlagos hossza, REM szakaszok darabszáma).

Az ún. sRa-kat (short REM attempts, rövid REM „próbálkozások”) nem tekintettük valódi, különálló REM szakaszoknak, mivel ekkor a REM jeleinek megjelenése után a stabil REM szakasz kialakulása helyett az állat pár másodperc után más vigilancia-fázisba lép át. Ehhez hasonlóan a fenti eset fordítottját, amikor a REM fázis EEG mintázatát csak rövid időre szakítják meg más vigilancia-fázisra jellemző jelek, szintén nem tekintettük két különálló REM-szakasznak, hiszen egy ilyen jelenség az alvás szerkezetét tekintve nehezen tekinthető két teljes REM-SWS ciklusnak. Ezek alapján egy összefüggő REM szakasznak azt az időszakot definiáltuk, ami legalább 16 másodpercig tart, és nem szakítja meg 16 másodperces, vagy annál hosszabb egyéb vigilancia-fázis (Gandolfo és mtsai, 1996; Vyazovskiy és mtsai, 2007). Ezt a típusú értékelést csak a REM szakaszok darabszámának és átlagos hosszának megadásakor használtuk, így az sRa-kat az összes REM alvásban töltött időbe beleszámoltuk.

4.6 Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai vizsgálatot csak a REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben végeztünk. A HC, LP és SP csoportokat a fény felkapcsolásakor, az SPR és LPR állatokat három órával később, a felvétel elkészítését követően Napentobarbitallal (Nembutal, 35 mg/kg intraperitonealisan, CEVA-Phylaxia) altattuk, majd 4% paraformaldehid, 0,1 M foszfát-puffer (pH=7,4) oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyakat eltávolítottuk, majd egy napos posztfixálást (ugyanilyen oldatban, 4 °C) és egy napos krioprotekciós inkubálást (20%-os szukróz-oldat 0,1 M foszfát-pufferban, 4 °C) követően a hypothalamusokból 4 párhuzamos sorozat 50 µm vastag metszetet készítettünk (Frigomobile, Reichert-Jung, Bécs, Ausztria).

Az immunhisztokémia során az oldatokat foszfát-pufferben készítettük, az elsődleges antitestekkel 2 napos inkubációt végeztünk 4 °C-on, míg a másodlagos antitestekkel való inkubáció szobahőmérsékleten zajlott. Az inkubációs lépések között minden esetben 3 x 10 perces foszfát pufferes kimosást végeztünk.

A kettős immunhisztokémiát megelőzően a metszeteket 0,5%-os Triton X-100-ban permeabilizáltuk egy órán keresztül, majd az endogén peroxidáz-aktivitást 3%-os hidrogén-peroxiddal (15 perc), végül a nem specifikus antigén-kötőhelyeket 10% normál kecske-szérummal blokkoltuk (1 óra). Ezután a metszeteket nyúl anti-cFos antitestben inkubáltuk (1:30 000, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg, Németország). Ezt biotinizált kecske anti-nyúl IgG (1:1000), majd avidin-biotin peroxidáz-komplex (1:500) inkubáció követte (mindkettő 1 óra hosszan, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Ezt követően a jelölést nikkeldiaminobenzidinnel (NiDAB) vizualizáltuk. A második immunhisztokémia az elsőhöz hasonlóan zajlott, kivéve azt, hogy az elsődleges antitest nyúl anti-MCH (1:10 000), ill nyúl anti-orexin A (1:5000) volt (mindkettő 3% marha szérum albumin és 0,5% Triton X-100 oldatban, Phoenix Europe GMBH, Karlsruhe, Németország), ill. a vizualizációhoz diaminobenzidint (DAB) használtunk. Végül a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, dehidráltuk, és DPX Mountant-ban (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) fedtük.

Az MCH/cFos/CART hármas immunhisztokémiához a metszeteket 3% hidrogén-peroxidos kezelést követően 5%, 10% és 20% dimetil-szulfoxid (DMSO, 10-10 perc) oldatban inkubáltuk (krioprotekció). Ez után 10-szer fagyasztottuk le és olvasztottuk fel

a metszeteket folyékony nitrogénben, hogy elősegítsük az antitest-penetrációt, a nem specifikus antigén-kötődést pedig 3%-os marha szérumban albumin-oldattal blokkoltuk (1 óra hosszan). A nyúl anti-cFos antitest (1:20 000) alkalmazását követően anti-nyúl Poly-HRP-vel (horse radish peroxidase, tormaperoxidáz) (2 óra, Millipore Kft, Budapest, Magyarország) és FITC-Tyramide-dal (Invitrogen, Budapest, Magyarország) hívtuk elő a jelölést. Az antitest-keresztreakció megakadályozásához és a HRP (horse radish peroxidase, tormaperoxidáz) enzim blokkolásához mikrohullámú kezelést alkalmaztunk 0,1 M citrát-pufferben (pH=6.0) (Toth és mtsai, 2008). Ezt követően a metszeteket 2% normál szamár szérumban inkubáltuk egy órán keresztül, majd nyúl anti-CART (1:5000, 5% normál szamár szérumban) antitestet alkalmaztunk. Ezt a jelölést Alexa 594-konjugált szamár anti-nyúl antitesttel (1:500, 1 óra, Invitrogen) hívtuk elő. Az utolsó jelöléshez 10% normál ló szérumban utána kecske anti-MCH antitestet használtunk (1:100, 10% normál ló szérumban). Ezt az utolsó jelölést biotinizált ló anti-kecske antitesttel (1:1000, 1 óra, Vector) és Streptavidin-Pacific Blue-val (1:500, 2 óra, Invitrogen) vizualizáltuk. Végül a metszeteket bevonat nélküli tárgylemezre húztuk, Aqua-Poly/Mount-tal (Polysciences Europe GMBH, Eppelheim, Németország) fedtük és Nikon Eclipse E 8000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

4.7 Az immunhisztokémia morfológiai analízise

Az MCH-immunoreaktív (MCH-IR) sejteket elhelyezkedésük alapján négy csoportra osztottuk: (1) ZI, (2) LH, (3) paraventricularis area (PVA), (4) PFA (Paxinos és Watson, 2007). A cFos-immunoreaktív (cFos-IR), MCH-IR/non-cFos-IR és MCH-IR/cFos-IR neuronokat mind a négy terület esetén legalább öt, 50 µm vastag metszeten, a hypothalamus mindkét oldalán számoltuk. Ehhez vizopán mikroszkópot (Reichert, Ausztria, No. 361977) használtunk. Minden metszet mindegyik területén négy-négy véletlenszerűen választott, nem átfedő területet választottunk (összesen 0,64 mm²), ahol a sejteket 40x objektív használatával számoltuk meg. Az összes számolást ugyanaz a megfigyelő végezte. Végül a jelölt neuronok denzitását sejt/mm² formában adtuk meg.

A hypothalamicus orexin-immunoreaktív (orexin-IR) sejteket elhelyezkedésük alapján szintén négy csoportra osztottuk: (1) LH, (2) PFA, (3) dorsomedialis hypothalamicus area (DMH), és PH. A cFos-IR, orexin-IR/non-cFos-IR és orexin-

IR/cFos IR sejtek számát az MCH-tartalmú sejtek számához hasonló módon állapítottuk meg.

Az MCH/cFos/CART hármass festés kvantifikációjához nyolc SPR és öt LPR állat hypothalamusának 2-3 metszetét használtuk. Az MCH-IR/CART-IR, MCH-IR/non-CART-IR és non-MCH-IR/CART-IR sejtsoportokon belül a cFos-IR és non-cFos-IR idegsejteket a ZI, PFA és LH területeken vettük számba a hypothalamus mindkét oldalán. Két, optikai metszetekre bontott felvételt készítettünk mindhárom területről agyféltekénként egy Nikon Eclipse E 8000 konfokális mikroszkóppal. Mindegyik felvétel négy-hét darab, 5 µm vastag optikai metszetet tartalmazott, 20-szoros objektívvel és 1,5-szeres optikai zoommal készült. Ezt követően az optikai metszeteket Confocal Assistant v. 4.2 szoftverrel olvastottuk össze (University of Minnesota honlapjáról ingyenesen letölthető). A képek fényerejét, kontrasztját és élességét esetenként kis mértékben módosítottuk Adobe Photoshop 7.0 programmal. A sejtek számát az összes esetben ugyanaz a megfigyelő állapította meg.

4.8 Statisztikai kiértékelés

A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletben az előre definiált időintervallumokra vonatkozó statisztikai vizsgálathoz ismétléses variancia-analízist (ANOVA: analysis of variance) végeztünk egy nem ismétléses és egy ismétléses faktorról. (Nem ismétléses faktor: kezelési csoport, ismétléses faktor: idő.) A vizsgált időintervallumok: 2-24 óra, 2-6 óra, 7-12 óra, 2-12 óra, valamint 13-24 óra voltak. A passzív fázis első és második felét több okból kifolyólag vizsgáltuk külön is. Egyrészt a REM visszacsapás erre az időszakra bizonyult jellemzőnek, így az időbeli lefutásának pontosabb leírásához ezt láttuk szükségesnek. Másrészt az alvásmegvonás után a mérőhelyre való visszahelyezés esetleges átmeneti hatásaitól a passzív fázis második fele mentesül. Ezen kívül minden egyes óra eredményeit külön-külön kiértékeltek egyutas ANOVA-val (faktor: kezelési csoport). Mindkét típusú ANOVA-t követően (szignifikáns kezelés-hatás esetén) Tukey post hoc tesztet végeztünk egy faktorról (kezelési csoport). Egy szakasz, ill. vizsgált óra esetén a szignifikáns hatást a post hoc teszt alapján, $p < 0,05$ esetén állapítottunk meg.

A napi ritmusok detektálásához cosinor analízist végeztünk a Time Series Analysis Serial Cosinor 6.0 Lab View program (Expert Soft Technologie) felhasználásával

(Nelson és mtsai, 1979). Ez a statisztikai módszer periodikusan változó értékek jellemzésére használható. A cosinor analízis a legkisebb négyzetek elvének felhasználásával egy sinusoid görbét illeszt az adatokra. A periódusidőt a kiértékelő személy adja meg, a görbe többi paraméterét, valamint ezen paraméterek konfidencia-intervallumát a program számolja ki. Az eljárás nullhipotézise az, hogy az illesztett görbének nincs amplitúdója, vagyis a vizsgált változó nem mutat ritmicitást. Az analízis eredménye három adat, melyek az illesztett görbét írják le:

1. Mező, vagyis az illesztett görbe átlagos értéke: változása a mért jellemző értékének fenntartott növekedéséről vagy csökkenéséről tájékoztat. Megjegyzendő, hogy periodikusan változó értékek esetén ez a módszer a többi, általánosan használt statisztikai módszernél (ANOVA, post hoc tesztek) jóval érzékenyebb, így kisebb eltéréseket is szignifikánsnak hozhat ki.
2. Amplitúdó: az illesztett görbe amplitúdója.
3. Akrofázis, vagyis az illesztett görbe maximumának időpontja: változása a mért érték napi ritmusának eltolódásáról tájékoztat.

A periódusidő minden esetben 24 órára volt állítva. Az alvásvizsgálatból származó adatokra a fentebb felsorolt értékeket, valamint a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia-intervallumokat számoltuk ki. A REM szakaszok átlagos hosszára nem lehetett cosinor analízist végezni, mivel azokban az órákban, ahol az egyes állatok egyáltalán nem töltöttek időt REM fázisban, ez a mérőszám nem értelmezhető, és az algoritmus hiányzó értékek esetén nem tudott görbét illeszteni az adatokra. Szignifikáns eltérésnek azt tekintettük, ha a két kezelési csoport 95%-os konfidencia-intervallumai nem fedtek át.

A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben az immunohisztokémiai adatok agyterületek szerinti bontást nem tartalmazó statisztikai analíziséhez a jelölt sejtek számát állatonként összegeztük, és a kettős-, illetve hármas-jelölt sejtek számát ennek százalékában állapítottuk meg.

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

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

Mindkét kísérlet statisztikai vizsgálatát a cosinor analízis kivételével STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA) programmal végeztük. ZT (Zeitgeber time) 0 órának a fény felkapcsolását tekintettük. Az adatokat az összes ábrán átlag \pm átlag szórása formában ábrázoltuk.

5 Eredmények

5.1 A REM-visszacsapás 24 órás architektúráját vizsgáló kísérlet

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

5.1.1 Alvás-paraméterek

A három vizsgált csoport alvásmintázata között számos különbség volt látható a teljes mérési nap folyamán. Általánosságban tekintve az SPR csoport eredményei gyakorlatilag a teljes vizsgált nap folyamán eltértek a HC csoport eredményeitől. Az LPR csoport adatai a passzív fázisban inkább SPR csoport adataival szemben, míg az aktív fázisban inkább HC csoport adataival szemben mutattak több eltérést (1. táblázat). A kísérlet eredményeihez tartozó p értékeket a könnyebb áttekinthetőség kedvéért táblázatos formában (1. és 2. táblázat) tüntettem fel.

5.1.1.1 Ismétléses variancia-analízis eredmények

A variancia-analízis (ANOVA, analysis of variance) vizsgálat eredményeit a teljes vizsgált időszakban (2-24 óra) tájékoztató jelleggel az 1. táblázatban mutatom be. Mivel a napi ciklusok értékelésére a 5.1.2 fejezetben ismertetett cosinor analízis a megfelelőbb módszer, itt csak a csoport-hatások, illetve a csoport-idő interakciós eredmények bemutatkozására szorítkozom.

1. táblázat. Az ismétléses variancia-analízis eredményeként kapott p-értékek a teljes vizsgált időszakra (2-24 óra). Az elemzésbe mindhárom (home cage, small platform rebound, large platform rebound) csoport adatait bevontam.

	AW	PW	SWS1	SWS2	IS	REM	REM db	REM hossz	TSWS	TW	SWS2%
csoport	0,021	0,333	0,029	0,119	0,138	0,000	0,000	0,003	0,834	0,000	0,107
csoport x idő interakció	0,000	0,370	0,000	0,007	0,082	0,000	0,001	0,193	0,000	0,005	0,163

5.1.1.2 SPR és LPR csoportok összehasonlítása

A két csoport alvásmintázata között csak a passzív fázisban voltak kimutatható különbségek. A vizsgált vigilancia-fázisok közül a REM alvás volt az egyetlen,

amelyben az SPR csoport állatai több időt töltöttek, mint az LPR csoport állatai. A REM szakaszok alaposabb vizsgálatából az derült ki, hogy a REM-ben töltött idő különbsége a két csoport között alapvetően a REM-szakaszok átlagos hosszának különbségéből származik: minden olyan vizsgált időintervallumban, ahol az SPR csoport állatai több időt töltöttek REM-ben, mint az LPR csoport állatai, ugyanez a különbség a REM szakaszok átlagos hosszában is kimutatható volt. Ezzel szemben a REM szakaszok darabszámát tekintve a két csoport egyik vizsgált időintervallumban sem különbözött.

A passzív fázis első felében a felszínes és az összes lassú hullámú alvásban az SPR csoport állatai kevesebb időt töltöttek, mint az LPR csoport állatai. Ezen kívül a teljes vizsgált napot tekintve az SPR csoport állatai ébren is kevesebb időt töltöttek, mint az LPR csoportéi (2. táblázat, 14. és 15. ábra).

5.1.1.3 SPR és HC csoportok összehasonlítása

Az SPR csoport állatai több időt töltöttek REM alvásban, valamint a REM szakaszaik átlagos hossza és darabszáma is magasabb volt, mint a HC csoport állatainak. Ez a megállapítás minden vizsgált időintervallumra igaz, kivételt egyedül a REM szakaszok átlagos hossza esetén látunk, ahol az aktív fázisban nem volt különbség a csoportok között. Az SPR csoport ezt a REM-növekedést a passzív fázis első felében a lassú hullámú alvás, második felében pedig az ébrenlét rovására valósította meg. A teljes passzív fázist tekintve a REM növekedés a lassú hullámú alvás csökkenésével járt együtt. Ezzel szemben a teljes aktív fázist tekintve a REM-ben töltött idő növekedésével párhuzamosan a lassú hullámú alvásban töltött idő is nőtt, így az ébrenlétben (és ezen belül az aktív ébrenlétben) töltött idő erőteljesen csökkent. Ezen változások összegeként a teljes vizsgált napot tekintve a REM-ben töltött idő intenzív növekedésével az ébren töltött idő csökkenése volt megfigyelhető, míg a lassú hullámú alvásban töltött idő a passzív és aktív fázisban látható ellentétes hatások kiegyenlítődése miatt nem változott (2. táblázat, 14. és 15. ábra).

5.1.1.4 LPR és HC csoportok összehasonlítása

Érdekes módon ennek a két csoportnak az alvásmintázata között a passzív fázisban nem láttunk különbséget. Az aktív fázisban a REM-ben töltött idő és a REM szakaszok darabszáma emelkedett volt az LPR csoportban a HC csoporthoz képest. Ez a változás

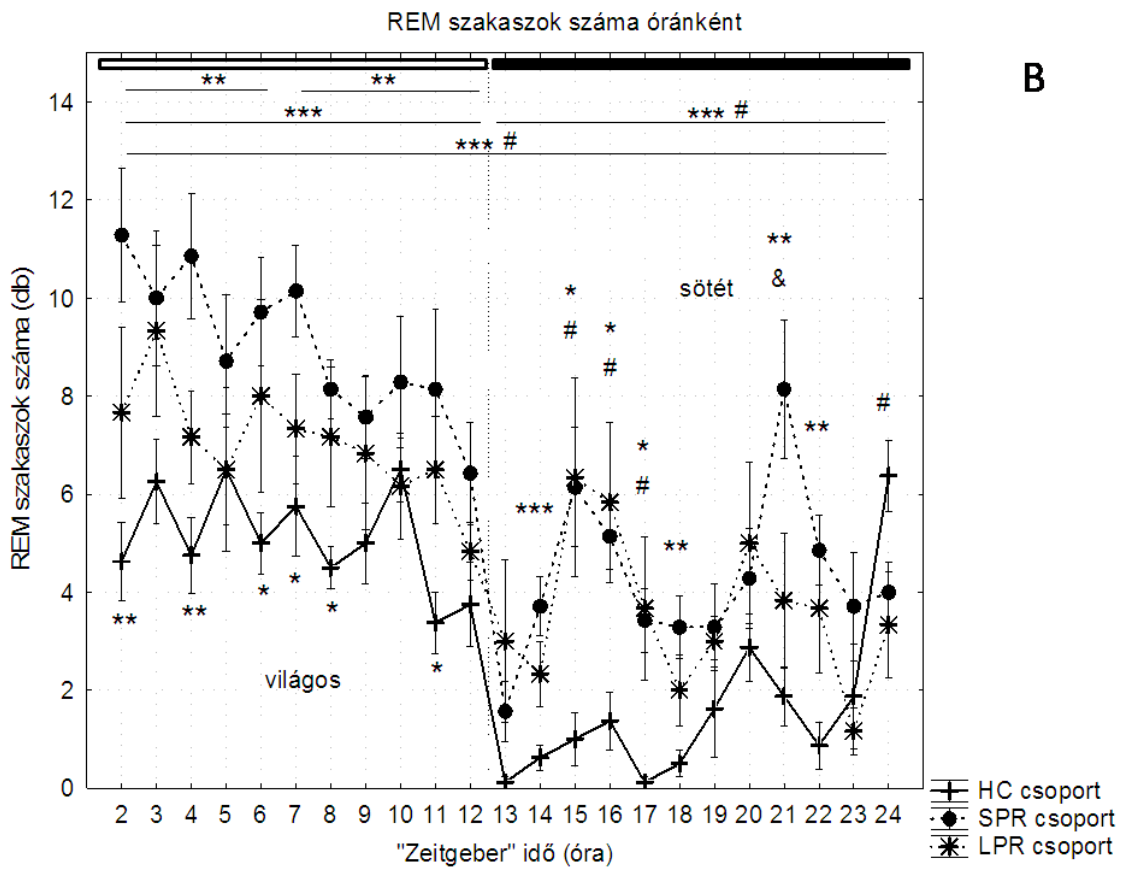
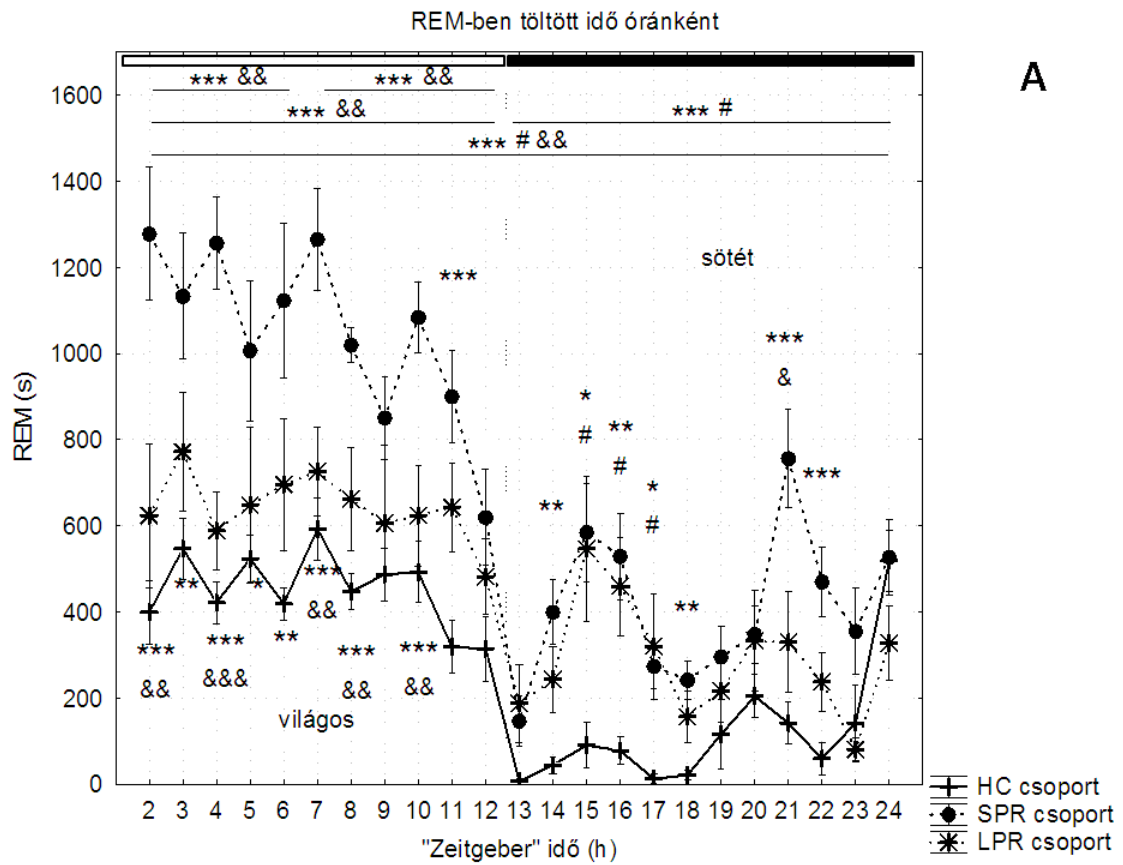
az ébren, valamint a mély lassú hullámú alvásban töltött idő csökkenésével, valamint a felszínes lassú hullámú alvásban töltött idő növekedésével, így a lassú hullámú alvás felszínesezésével járt. A teljes vizsgált napot tekintve is javarészt szignifikánsnak bizonyultak ezek az eltérések, kivételt csupán a mély lassú hullámú alvás csökkenése és a lassú hullámú alvás felszínesezése jelent: ezen hatások csak az aktív fázisban voltak szignifikánsak (2. táblázat, 14. és 15. ábra).

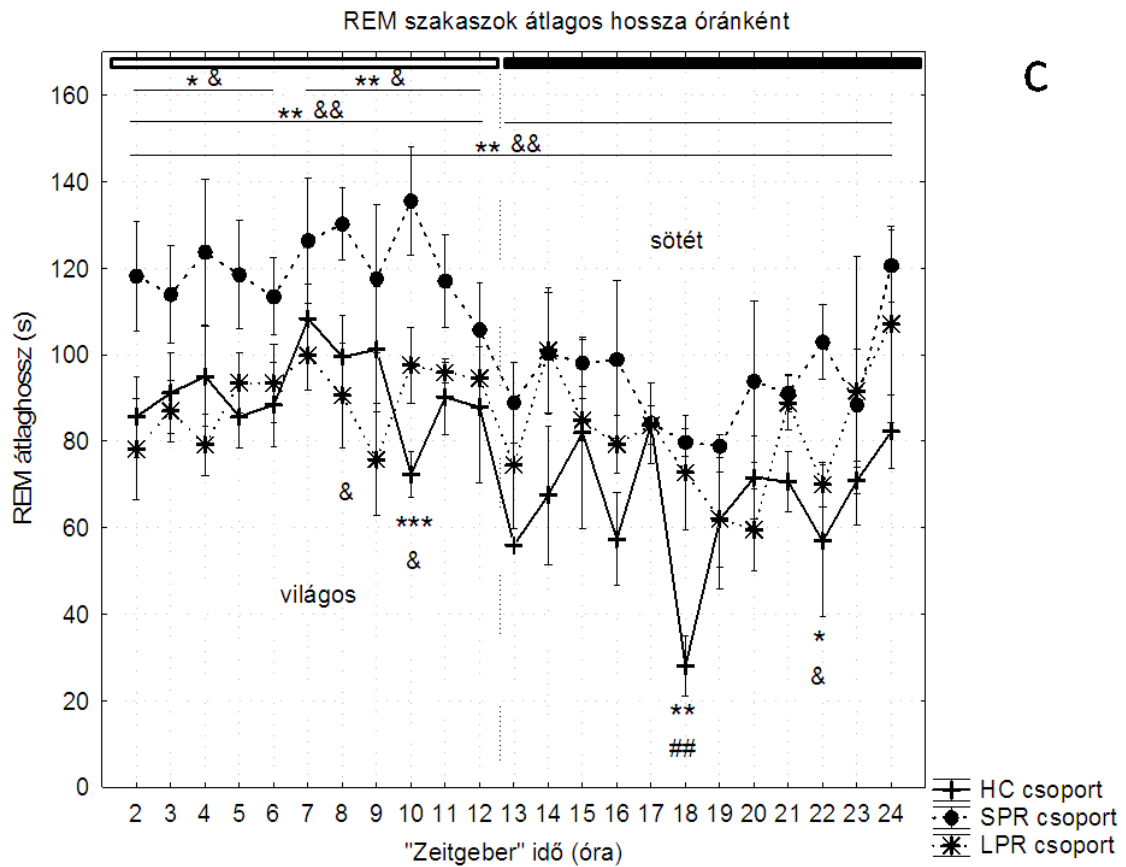
2. táblázat (következő oldal). A HC (home cage, saját ketreces), SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos) és LPR (large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos) csoportok különbségei egyes alvás-paraméterek tekintetében. AW: active wake, aktív ébrenlét;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

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

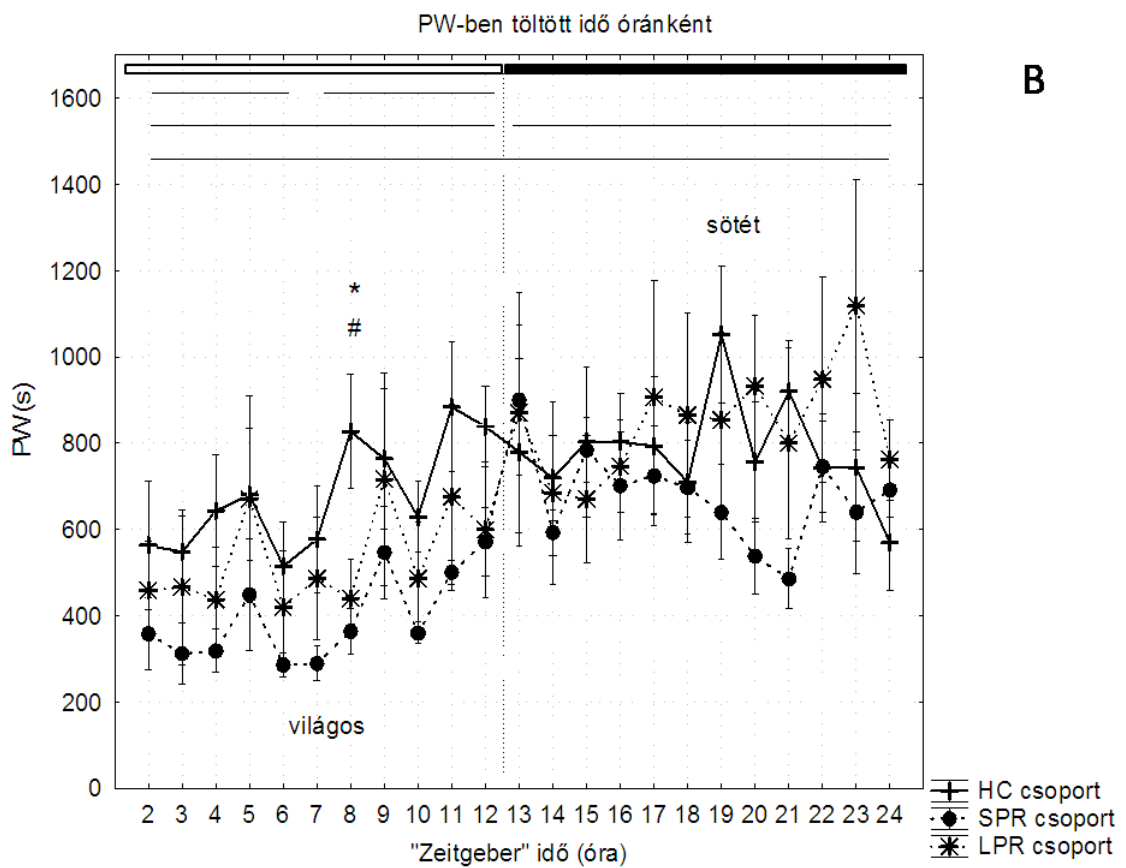
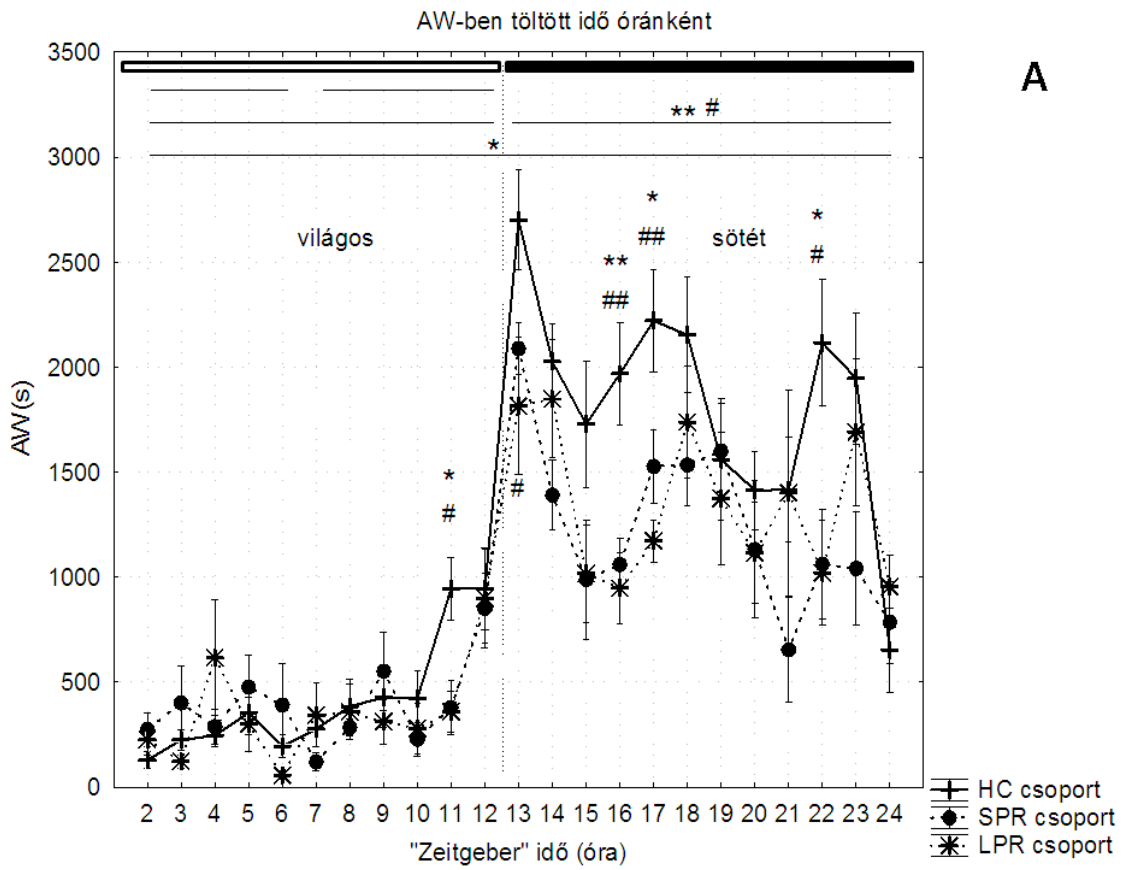
	SPR csoport eredményei a HC csoportéhoz képest				
	2-24 h	2-6 h	7-12 h	2-12 h	13-24 h
AW	▼				▼▼
PW					
SWS1					▲▲
SWS2					
IS					
REM	▲▲▲	▲▲▲	▲▲▲	▲▲▲	▲▲▲
REM db	▲▲▲	▲▲	▲▲	▲▲▲	▲▲▲
REM hossz	▲▲	▲	▲▲	▲▲	
REM db (sRa-kkal)	▲▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲
REM hossz (sRa-kkal)	▲▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲
TSWS		▼▼▼		▼	▲▲
TW	▼▼▼	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

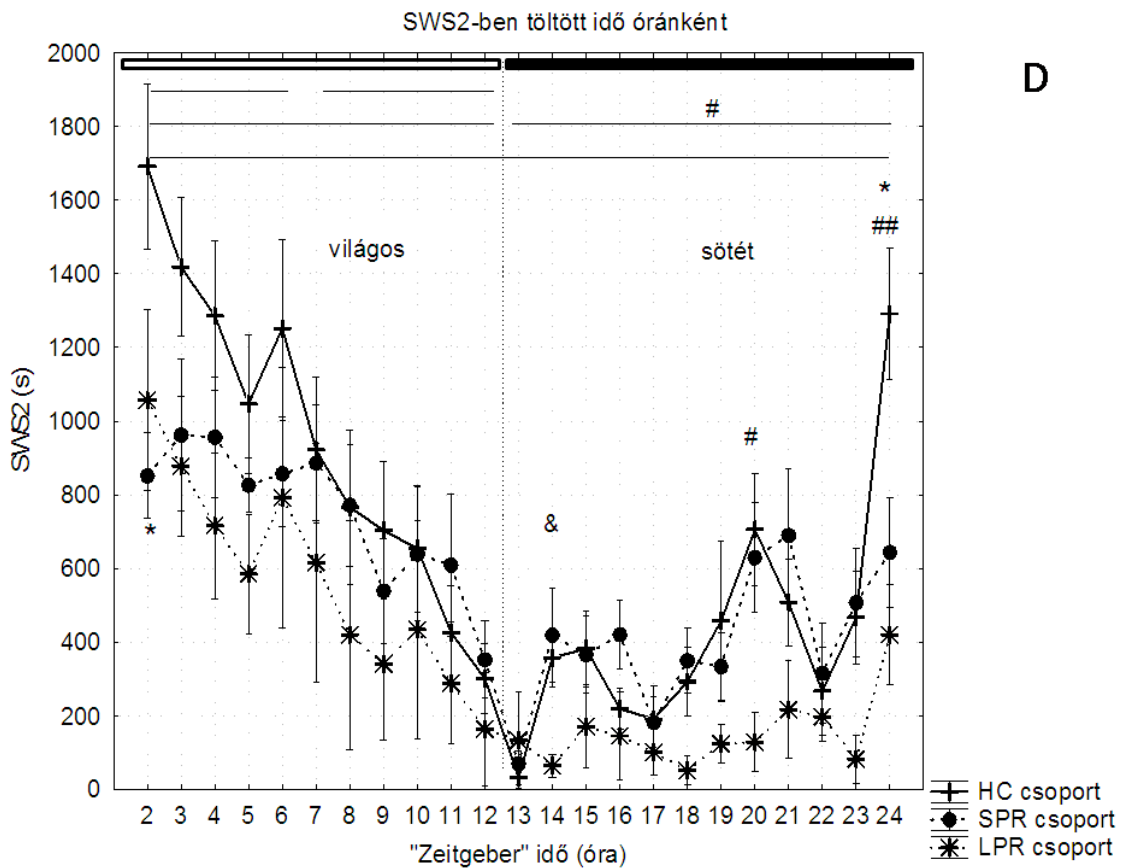
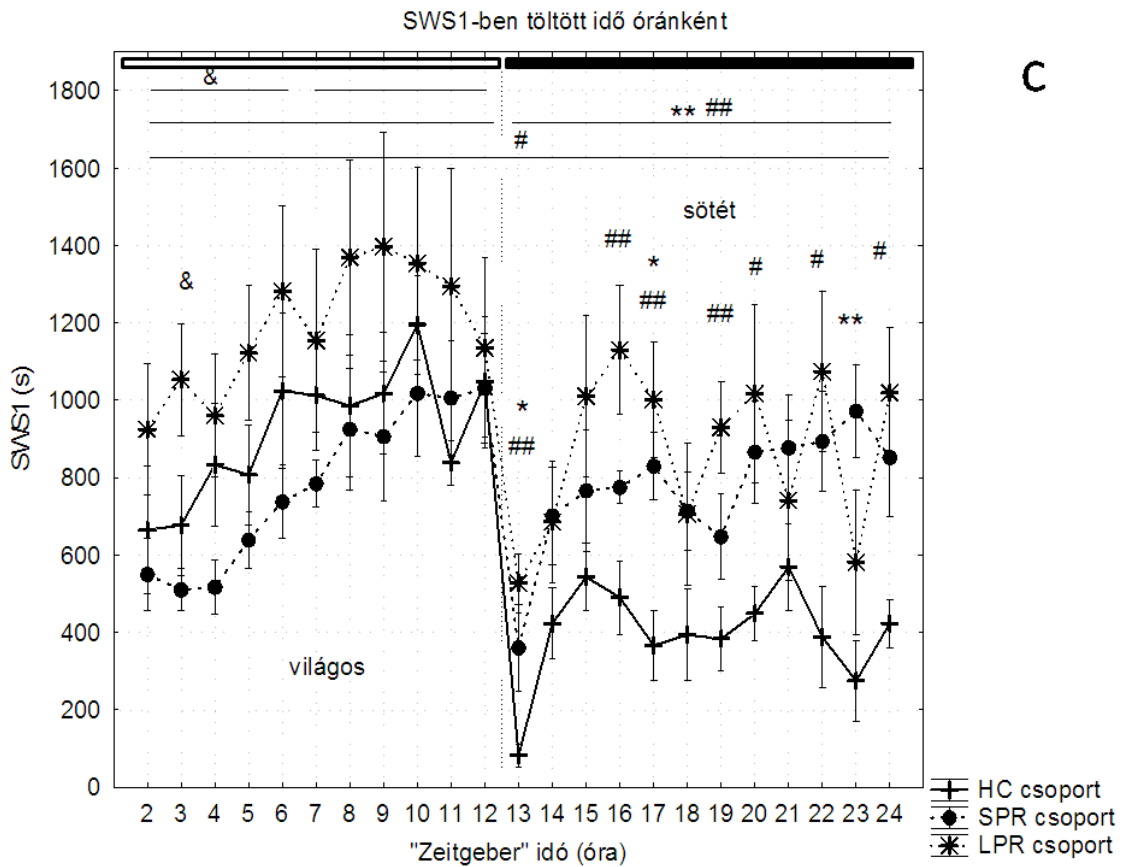
	LPR csoport eredményei a HC csoportéhoz képest				
	2-24 h	2-6 h	7-12 h	2-12 h	13-24 h
AW					▼
PW					
SWS1	▲				▲▲
SWS2					▼
IS					
REM	▲				▲
REM db	▲				▲
REM hossz					
REM db (sRa-kkal)	▲				▲
REM hossz (sRa-kkal)					
TSWS					
TW	▼▼▼				▼▼
SWS2%					▼

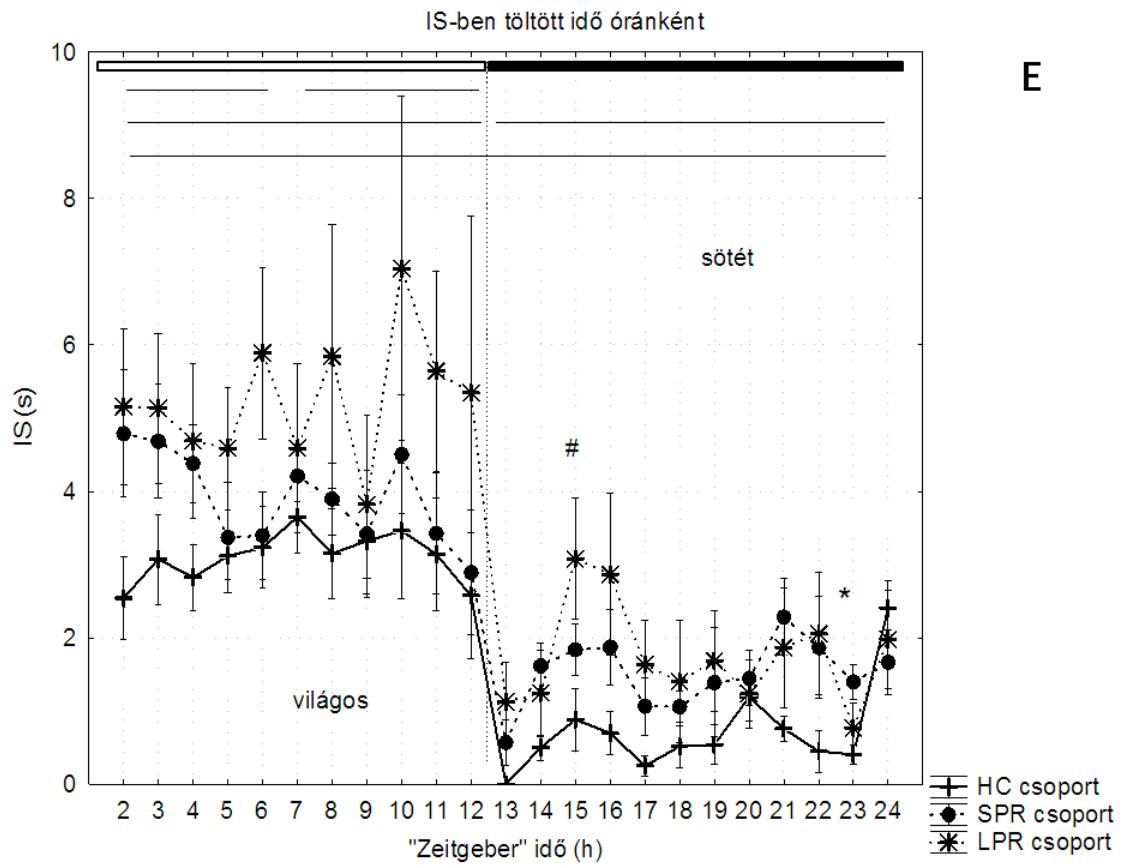




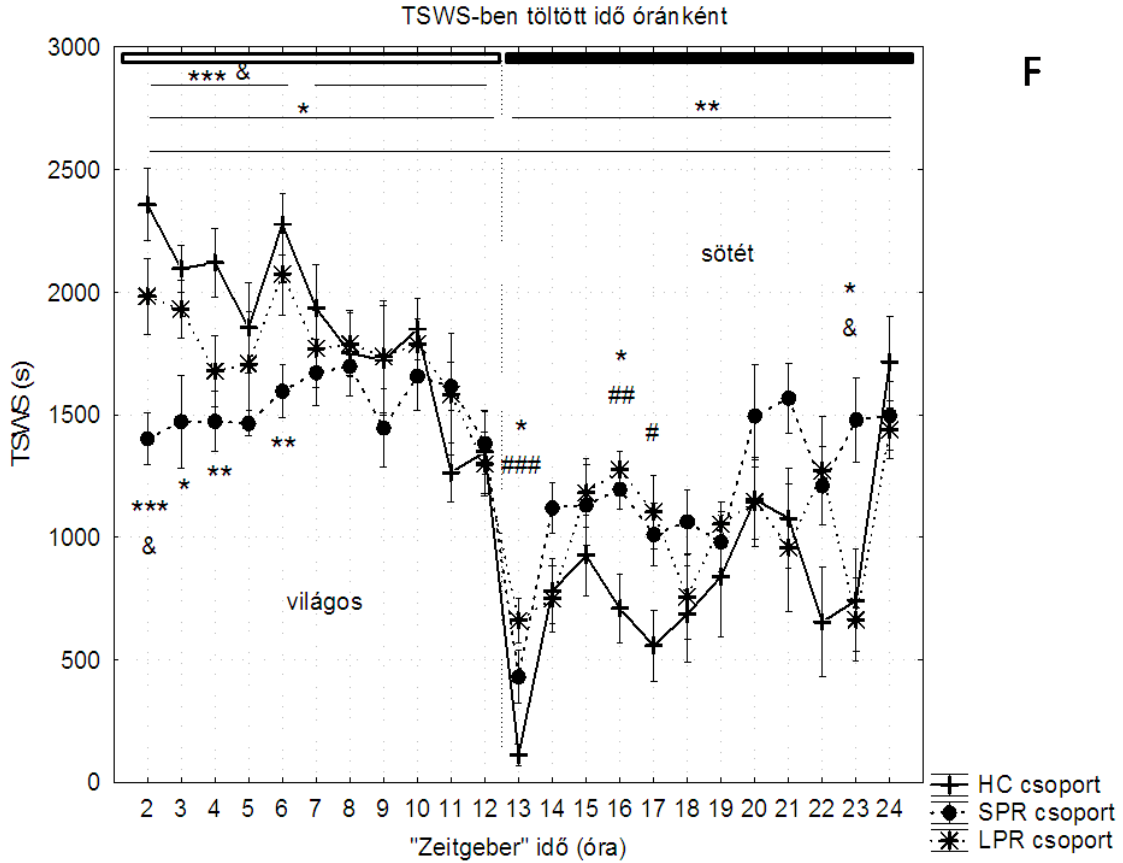
14. ábra. REM-ben töltött idő (A), REM szakaszok darabszáma (B) és átlagos hossza (C) a három napos alvásmegvonást követő napon. HC: home cage (saját ketreces), SPR: small platform sleep rebound (kis porondos, alvás-visszacsapásos csoport), LPR: large platform, sleep rebound (nagy porondos, alvás-visszacsapásos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



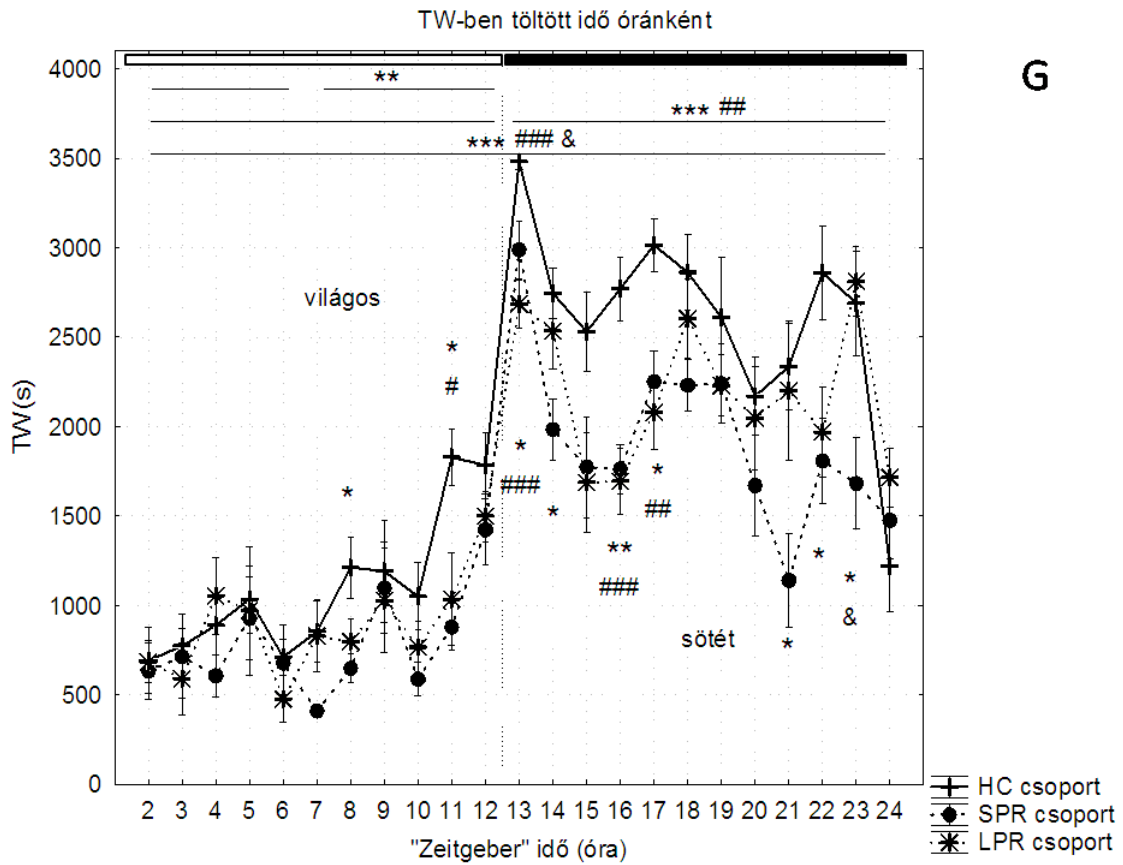




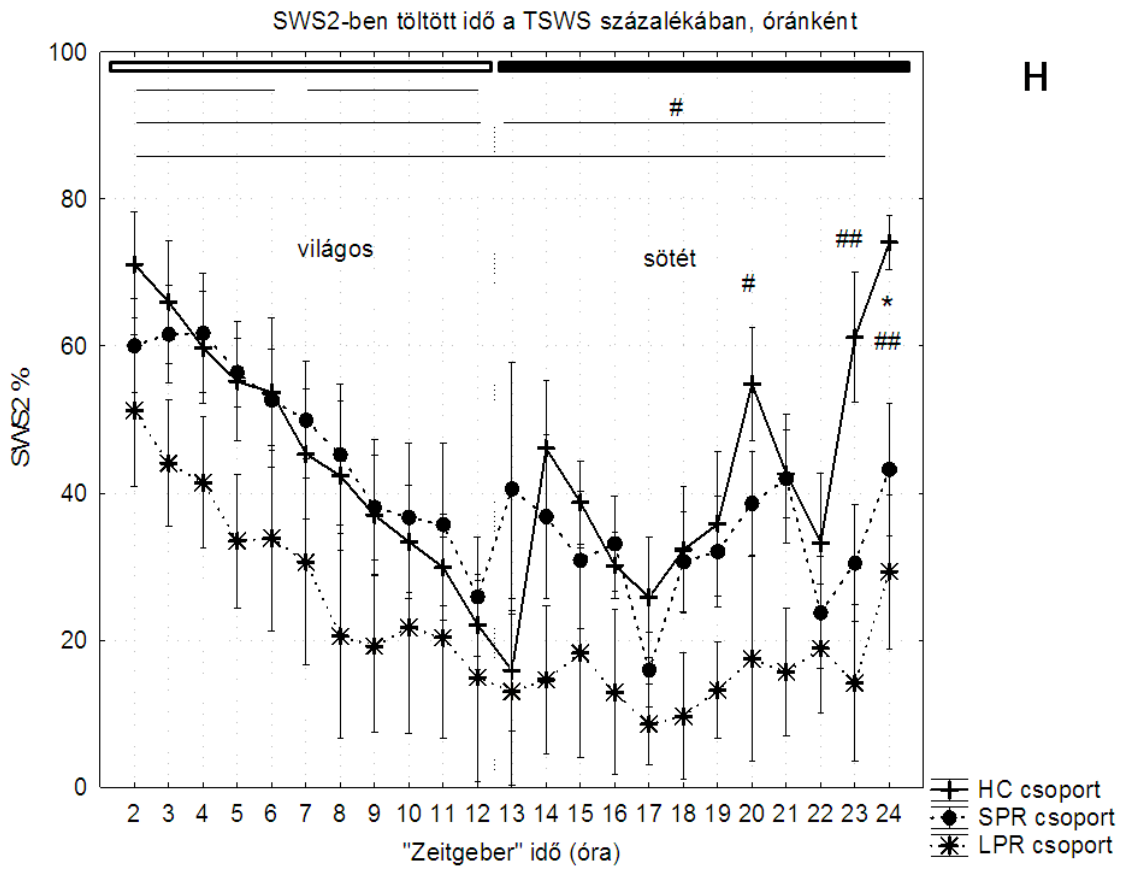
E



F



G



H

15. ábra (előző oldalak). Az egyes alvásfázisokban töltött idő óránként a HC (home cage, saját ketreces), SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos) és LPR (large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos) csoportok esetén a három napos alvásmegvonást követő napon. AW: active wake, aktív ébrenlét (A); PW: passive wake, passzív ébrenlét (B); SWS1: slow wave sleep 1, felszínes lassú hullámú alvás (C); SWS2: slow wave sleep 2, mély lassú hullámú alvás (D); IS: intermediate stage, átmeneti szakasz (E); TSWS: total slow wave sleep, összes lassú hullámú alvás (F); TW: total wake, összes ébrenlét (G); SWS2%: SWS2 a TSWS százalékában (H). *: különbség a HC és SPR, #: különbség a HC és LPR, &: különbség az SPR és LPR csoportok között; egy jel: $p < 0,05$, két jel: $p < 0,01$, három jel: $p < 0,001$.

5.1.2 Napi ritmusok vizsgálata

Az összes csoport esetén minden vizsgált alvásfázis és számított érték szignifikáns napi ritmust mutatott ($p < 0,05$, H_0 : az illesztett szinuszoid görbe amplitúdója 0), kivéve az SPR csoport állatainak SWS1-ben töltött idejét. Az akrofázis (az illesztett görbe maximumhelye) tekintetében semmilyen alvás-paraméter esetén sem találtunk eltérést a csoportok között, vagyis szignifikáns fáziseltolást nem láttunk. Így a továbbiakban az illesztett görbe amplitúdója és a mezor (az illesztett görbe átlagos értéke) változásainak bemutatkozására szorítkozom (3. táblázat).

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

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

5.1.2.1 SPR és LPR csoportok összehasonlítása

Az SPR csoport mezor-értékei csökkenést mutattak az LPR csoport adataihoz képest a PW, SWS1 és IS stádiumokban, és növekedést mutattak az SWS2 és REM stádiumokban töltött időt, valamint a lassú hullámú alvás mélységét (SWS2%) tekintve. Ugyanakkor a TSWS-ben töltött idő amplitúdója csökkent, míg a REM alvásban töltött idő amplitúdója nőtt az SPR csoportban az LPR csoportéhoz képest.

5.1.2.2 SPR és HC csoportok összehasonlítása

Az adatok mezejára alapján minden ébrenléti fázisban töltött idő csökkent, és az SWS2 és a TSWS kivételével minden alvási stádiumban töltött idő nőtt az SPR csoportban a HC csoportéhoz képest. Az ébren (TW és AW), valamint lassú hullámú alvásban (SWS1, SWS2, TSWS) töltött idő amplitúdója csökkent, míg a REM-ben töltött idő amplitúdója nőtt az SPR csoportban a HC csoportéhoz képest.

5.1.2.3 LPR és HC csoportok összehasonlítása

A mezejára alapján az LPR csoport AW, TW, SWS2 és SWS2% értékei csökkentek, míg az SWS1, IS, REM és REM epizódyszám-értékei nőttek a HC csoportéhoz képest. Ugyanakkor az LPR csoport AW, SWS2 és TSWS értékeinek amplitúdója csökkent a HC csoportéhoz képest (2. táblázat)

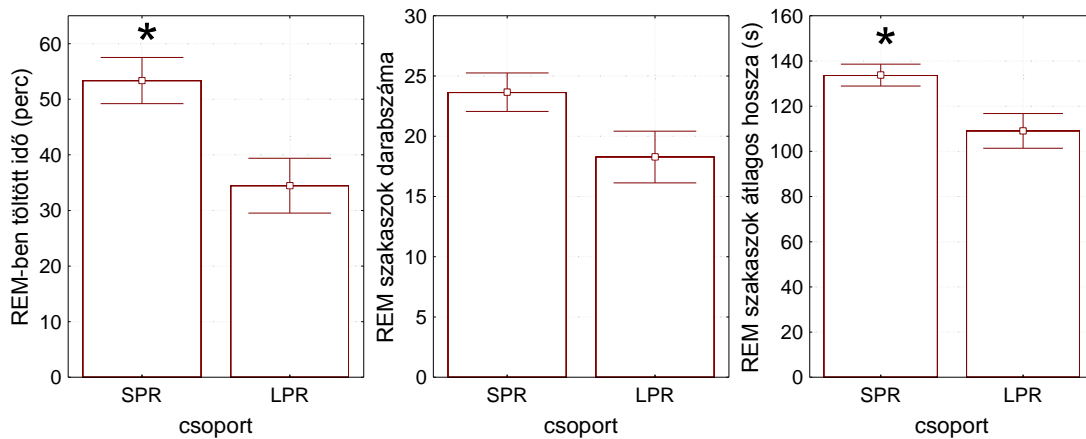
5.2 A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérlet

Ebben a vizsgálatban a REM-visszacsapás architektúrája és egyes neuropeptideket kifejező hypothalamicus neuronok aktivációja közti összefüggéseket vizsgáltuk (Kitka és mtsai, 2011).

5.2.1 Alvásvizsgálat

Az előző kísérlethez hasonlóan a 72 órás REM-megvonást követő alvás-visszacsapás során az SPR csoport állatai több időt töltöttek REM alvásban, mint az LPR csoportéi ($p=0,011$). Emellett a REM szakaszok átlagos hossza is nagyobbak bizonyult ($p=0,017$), míg a REM szakaszok darabszáma tekintetében a két csoport között nem volt szignifikáns különbség (16. ábra). Az átlagok \pm átlagok szórásai a három óra alatt a következőképpen alakultak:

- REM-ben töltött idő:
 - SPR: $53,36 \pm 4,16$ perc
 - LPR: $34,46 \pm 4,93$ perc
- REM szakaszok darabszáma:
 - SPR: $23,67 \pm 1,6$
 - LPR: $18,29 \pm 2,15$
- REM szakaszok átlagos hossza:
 - SPR: $133,78 \pm 4,87$ s
 - LPR: $109,04 \pm 7,7$ s



16. ábra. Az SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos) és LPR (large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos) csoportok különbségei a REM (rapid eye movement sleep, gyors szemmozgásos) alvás mintázata tekintetében a 72 órás alvás-megvonást követő 3 órás visszacsapás alatt. *:p<0,05

5.2.2 Morfológiai adatok

5.2.2.1 MCH/cFos kettős jelölés

Az MCH jelölt sejtek között szinte nem találtunk cFos immunoreaktívot a HC csoportban, és ezen sem a kis, sem a nagy porondos alvás-megvonás sem változtatott. Ehhez a három csoporthoz képest mindkét visszacsapásos csoportban magasabb volt az MCH/cFos kettős jelöltek aránya az MCH-immunoreaktív sejteken belül (LPR: p<0,005, SPR: p<0,001 mindhárom másik csoporthoz képest). Ez az arány magasabb volt az SPR, mint az LPR csoportban (p=0,0001) (17. és 18. ábra). Az átlagok \pm átlagok szórásai a következőképpen alakultak:

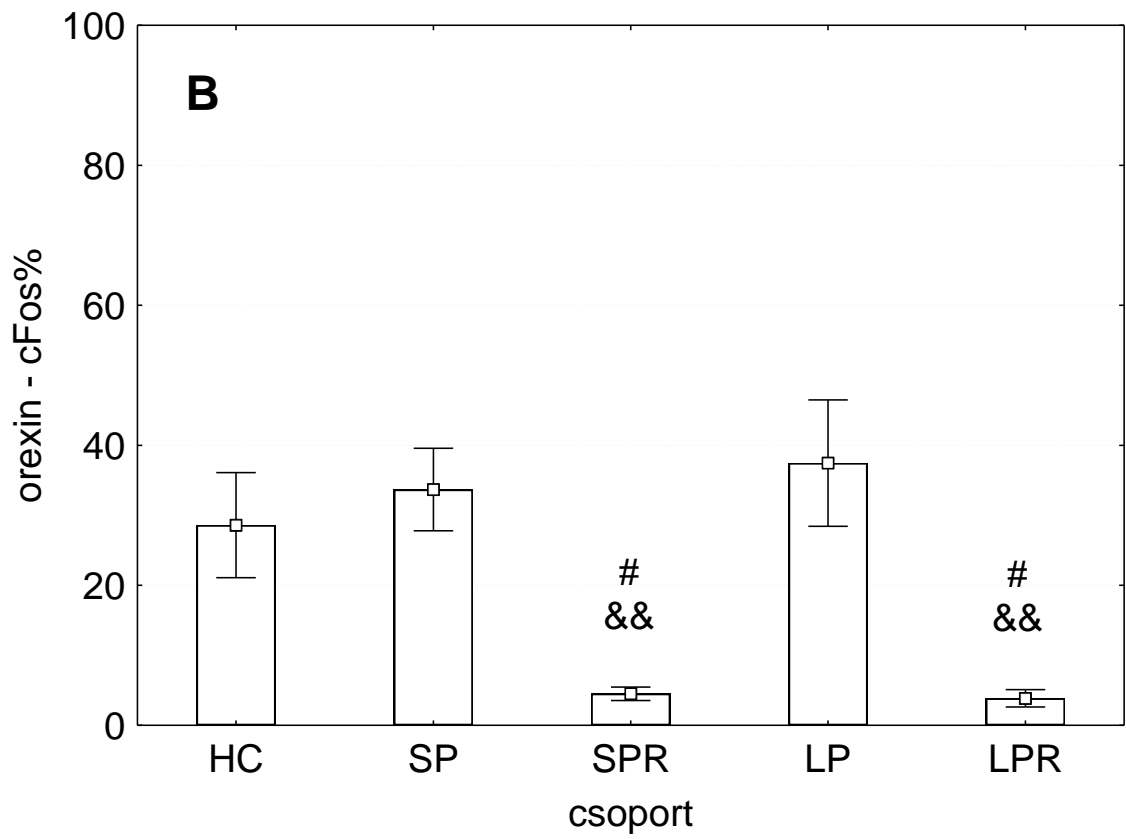
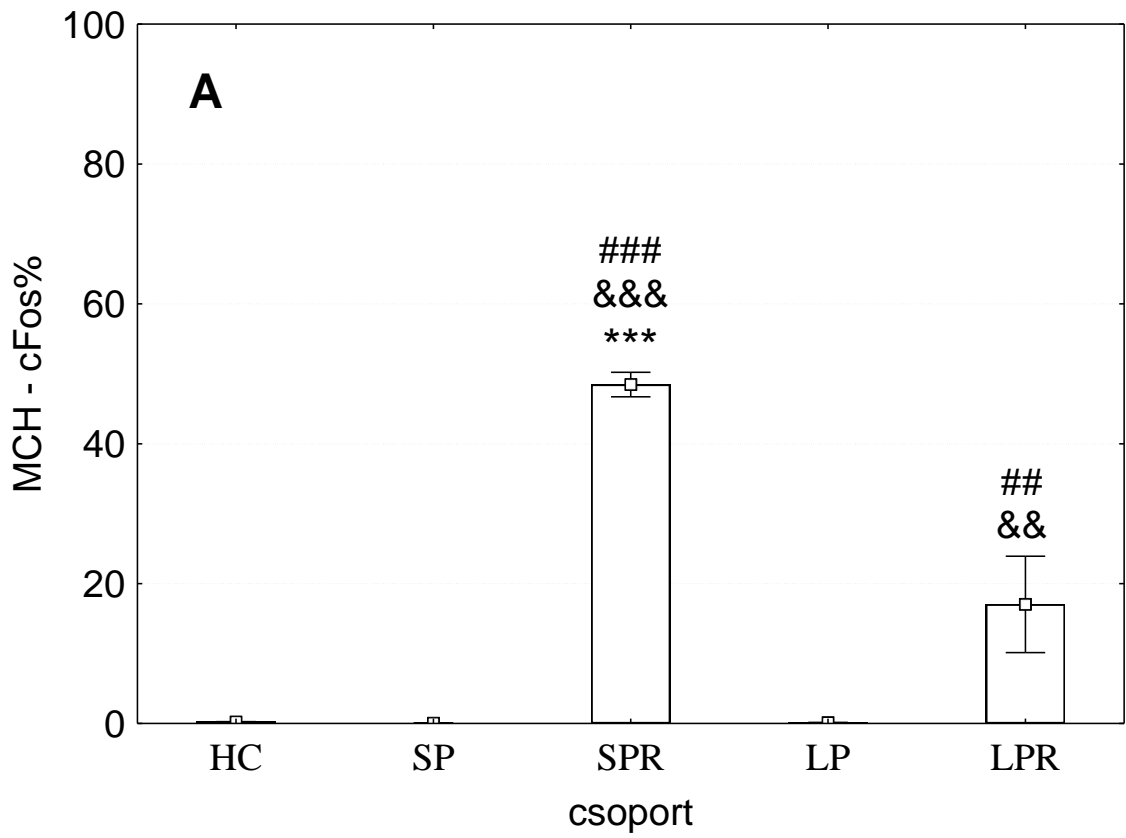
- HC: $0,22 \pm 0,05$ %
- SP: $0,06 \pm 0,03$ %
- LP: $0,13 \pm 0,03$ %
- SPR: $48,47 \pm 1,76$ %
- LPR: $17,03 \pm 6,88$ %

5.2.2.2 Orexin/cFos kettős jelölés

Az MCH/cFos kettős jelöléssel szemben az orexin/cFos kettős jelölt sejtek aránya az orexin-immunoreaktív neuronokon belül viszonylag magas volt a HC csoportban, és ezen sem a kis, sem a nagy porondos alvás-megvonás sem változtatott. Az alvás-

visszacsapás mindkét porond esetében lecsökkentette ezt az arányt ($p < 0,05$ a HC csoporthoz képest, $p < 0,001$ a megfelelő alvásmegvont csoportokhoz képest mindkét porond esetében). A két alvás-visszacsapásos csoport között nem volt szignifikáns különbség (17. és 19. ábra). Az átlagok \pm átlagok szórásai a következőképpen alakultak:

- HC: $28,59 \pm 7,5$ %
- SP: $33,68 \pm 5,89$ %
- LP: $37,46 \pm 9,03$ %
- SPR: $4,5 \pm 0,97$ %
- LPR: $3,86 \pm 1,24$ %

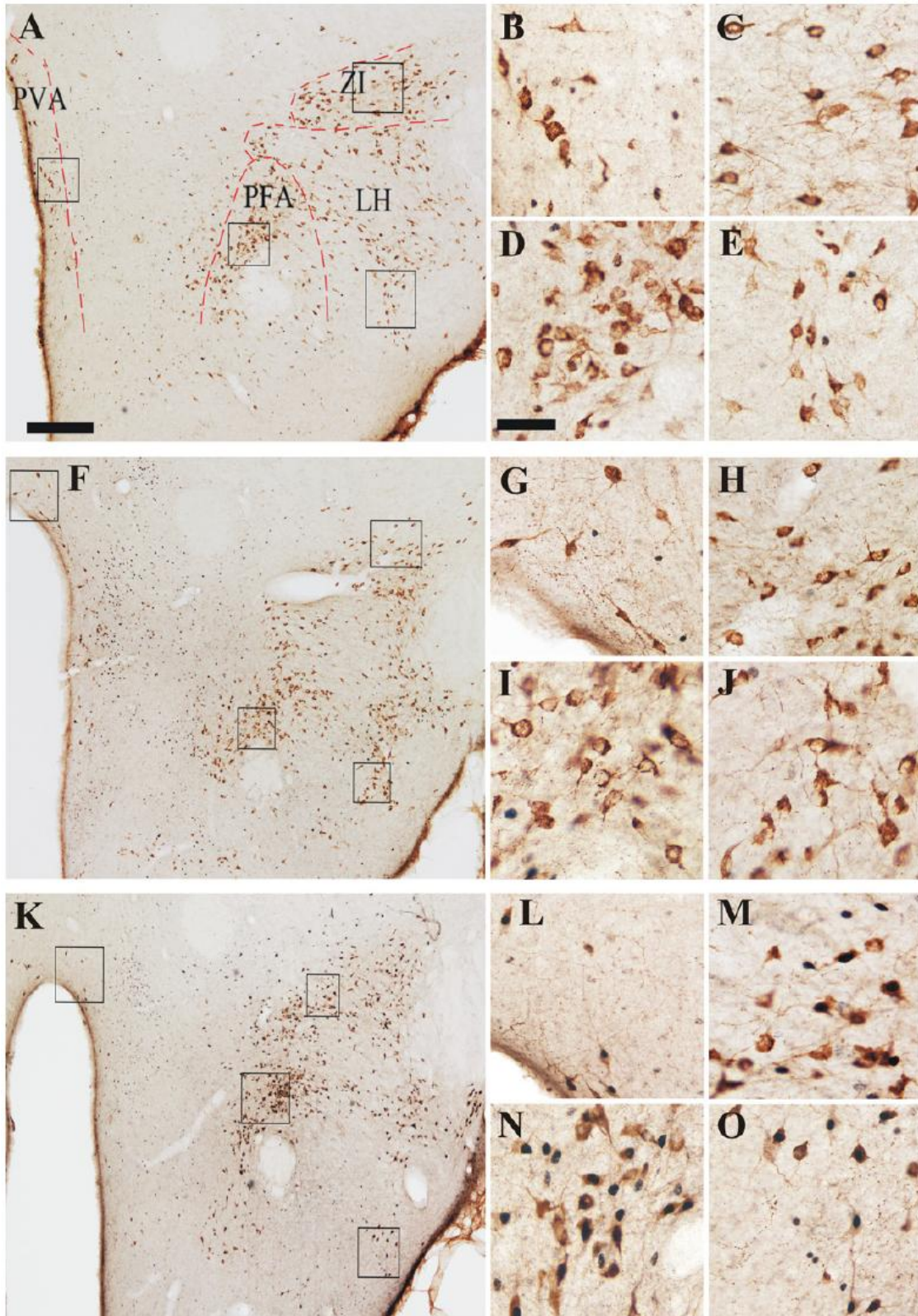


17. ábra (előző oldal). A cFos immunopozitív sejtek aránya az MCH- (melanin-koncentráló hormon-) immunoreaktív (A) és orexin-immunoreaktív (B) neuronok között az összes vizsgált agyterületen a 72 órás alvás-megvonást követő 3 órás visszacsapás után. HC (home cage, saját ketreces), SP (small platform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

5.2.2.3 MCH/CART/cFos hármas jelölés

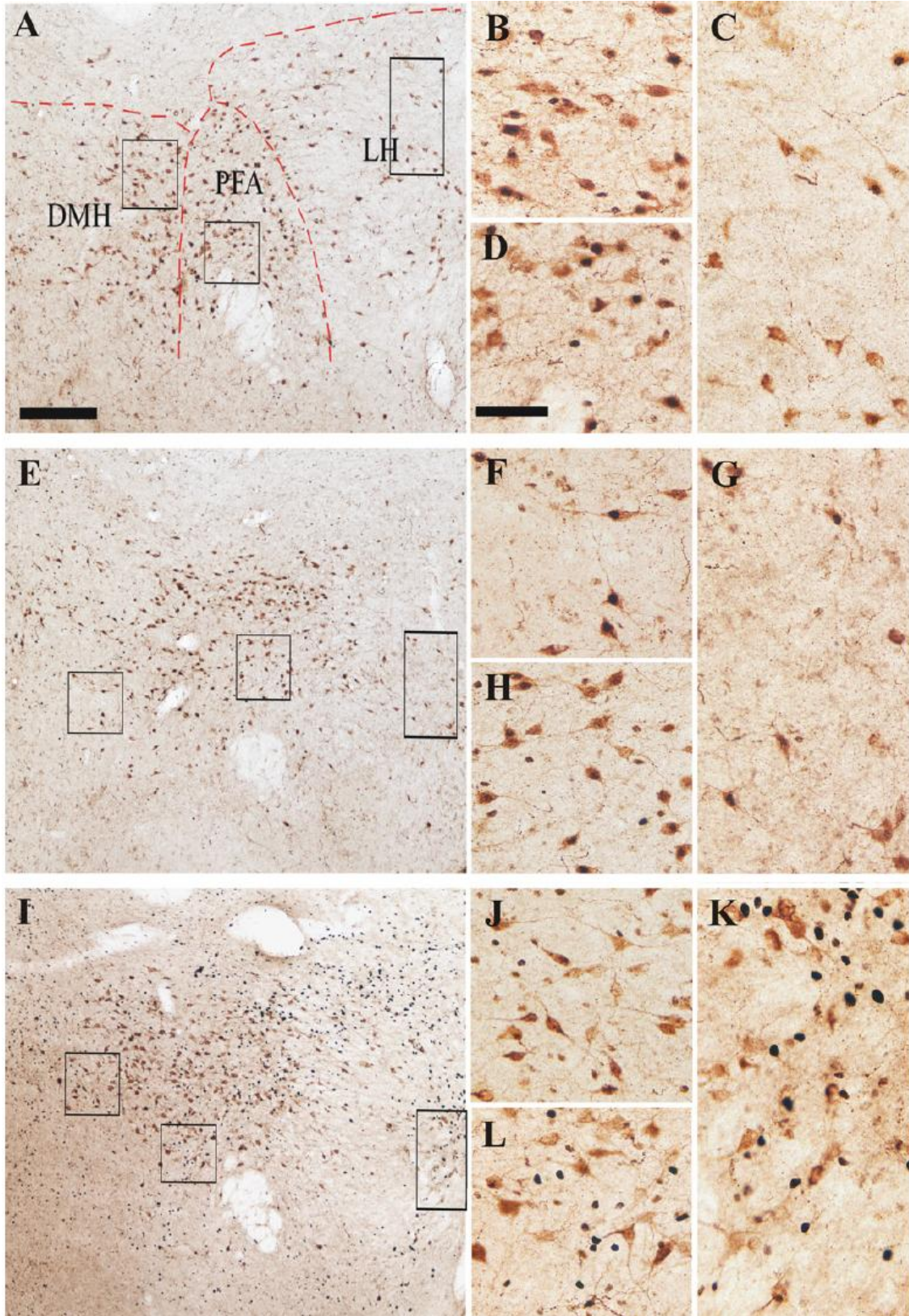
Az MCH-IR neuronokat CART-immunopozitivitásuk alapján két (CART-IR és non-CART-IR) alpopulációra osztottuk. A faktoriális ANOVA mindkét faktorra (csoport, CART-immunoreaktivitás). szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,001$), valamint az interakció is közel szignifikáns volt ($p = 0,0579$). A cFos-jelölt sejtek aránya az MCH-IR neuronokon belül csak a CART-immunopozitív alpopuláció esetén volt nagyobb az SPR, mint az LPR csoportban ($p < 0,001$). Ehhez hasonlóan csak az SPR csoportban lehetett megfigyelni, hogy a CART-IR alpopuláció neuronjai jobban aktiválódtak (cFos immunopozitivitás aránya alapján), mint a non-CART-IR alpopuláció neuronjai ($p = 0,0004$) (20. és 21. ábra). Az átlagok \pm átlagok szórásai (cFos-jelölt sejtek aránya) a következőképpen alakultak:

- SPR CART-IR: $75,55 \pm 3,94$ %
- SPR non-CART-IR: $30,28 \pm 1,97$ %
- LPR CART-IR: $30,77 \pm 15,68$ %
- LPR non-CART-IR: $14,53 \pm 7,49$ %



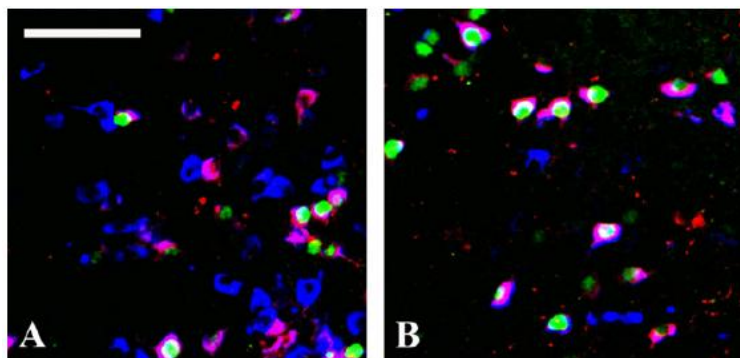
18. ábra. MCH/cFos DAB/NiDAB kettős immunohisztokémia eredménye egy-egy HC (home cage, saját ketreces; A-E), SP (small platform sleep deprived, kis porondos alvásmegvont; F-J) és SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-

visszacsapásos; K-O) állat hypothalamusán. Az A, F és K ábrák bekeretezett részei a B-E, G-J és L-O ábrákon láthatók kinagyítva (ebben a sorrendben). ZI: zona incerta / subzona incerta, PFA: perifornical area, LH: lateralis hypothalamus, PVA: paraventricularis area. Lépték: 200 μm az A ábrán (az A, F és K ábrák nagyítása megegyezik), 40 μm a D ábrán (a B-E, G-J és L-O ábrák nagyítása megegyezik).

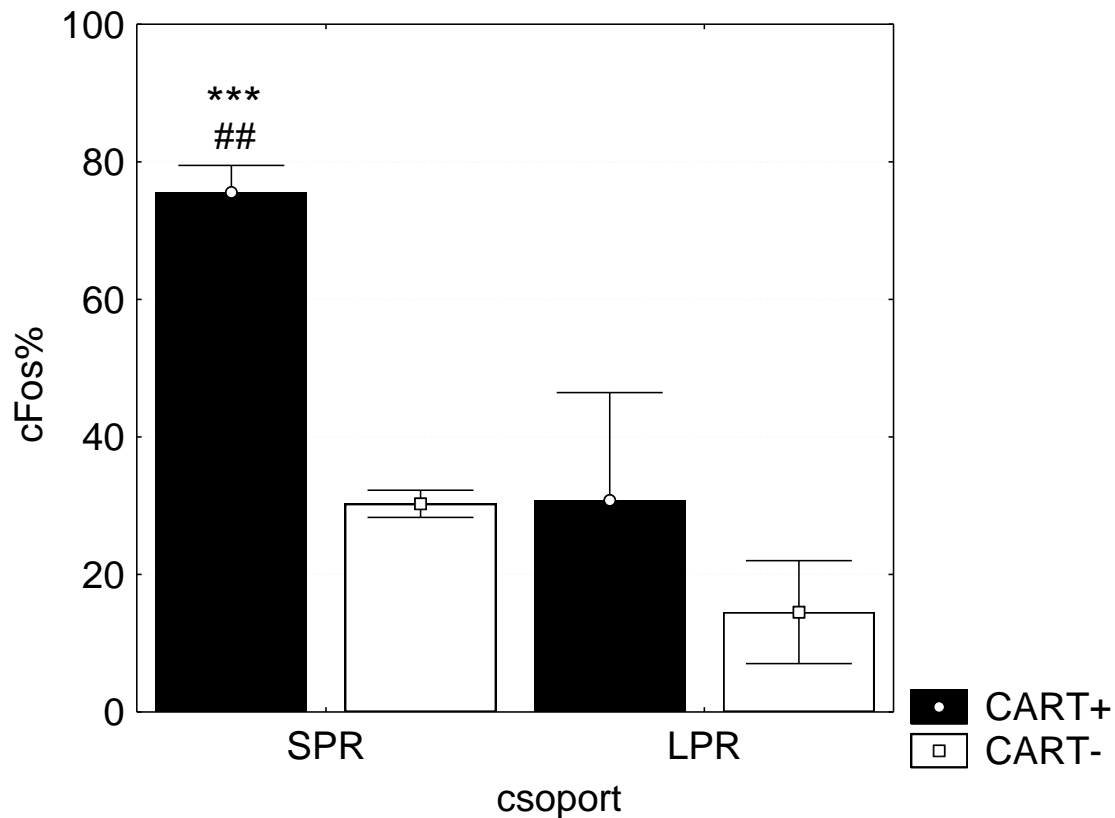


19. ábra. Orexin/cFos DAB/NiDAB kettős immunohisztokémia eredménye egy-egy HC (home cage, saját ketreces; A-D), SP (small platform sleep deprived, kis porondos alvásmegvont; E-G) és SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-

visszacsapásos; I-K) állat hypothalamusán. Az A, E és I ábrák bekeretezett részei a B-C, F-G és J-K ábrákon láthatók kinagyítva (ebben a sorrendben). DMH: dorsomedialis hypohalamus, PFA: perifornical area, LH: lateralis hypothalamus. Lépték: 300 μm az A ábrán (az A, E és I ábrák nagyítása megegyezik), 70 μm a D ábrán (a B-C, F-G és J-K ábrák nagyítása megegyezik).



20. ábra. MCH/CART/cFos hármas festés. Az ábra egy LPR (large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos) (A) és egy SPR (small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos) (B) állat perifornicalis areaját mutatja. Kék: MCH, piros: CART, zöld: cFos. Lépték: 100 μm .



21. ábra. A cFos immunoreaktív sejtek aránya az MCH-tartalmú neuronok CART-IR és non-CART-IR alpopulációin belül a 72 órás alvás-megvonást követő 3 órás visszacsapás után. SPR: small platform sleep rebound, kis porondos alvás-visszacsapásos csoport; LPR: large platform sleep rebound, nagy porondos alvás-visszacsapásos csoport. ***: $p < 0,001$ az SPR non-CART-IR sejtcsoportéhoz, ##: $p < 0,01$ az LPR CART-IR sejtcsoportéhoz képest.

5.2.3 Interindividuális korrelációk

Az alvásmintázat és az MCH-, illetve orexin-tartalmú neuronok aktivációja közötti kapcsolat felderítéséhez lineáris regressziót végeztünk az SPR csoport állatainak adatain. Számos korrelációt találtunk (22. ábra):

5.2.3.1 REM-ben töltött idő

Az MCH/cFos kettős jelölt sejtek aránya az MCH-IR neuronokon belül pozitívan korrelált a REM-ben töltött idővel ($R^2 = 0,779$, $p = 0,002$; 22/A ábra).

Ezzel szemben az orexin/cFos kettős jelölt sejtek aránya az orexin-IR neuronokon belül negatívan korrelált a REM-ben töltött idővel ($R^2 = 0,734$, $p = 0,003$; 22/B ábra).

5.2.3.2 REM szakaszok száma

Az MCH/cFos kettős jelölt sejtek aránya az MCH-IR neuronokon belül pozitívan korrelált a REM szakaszok számával ($R^2=0,769$, $p=0,002$; 22/C ábra).

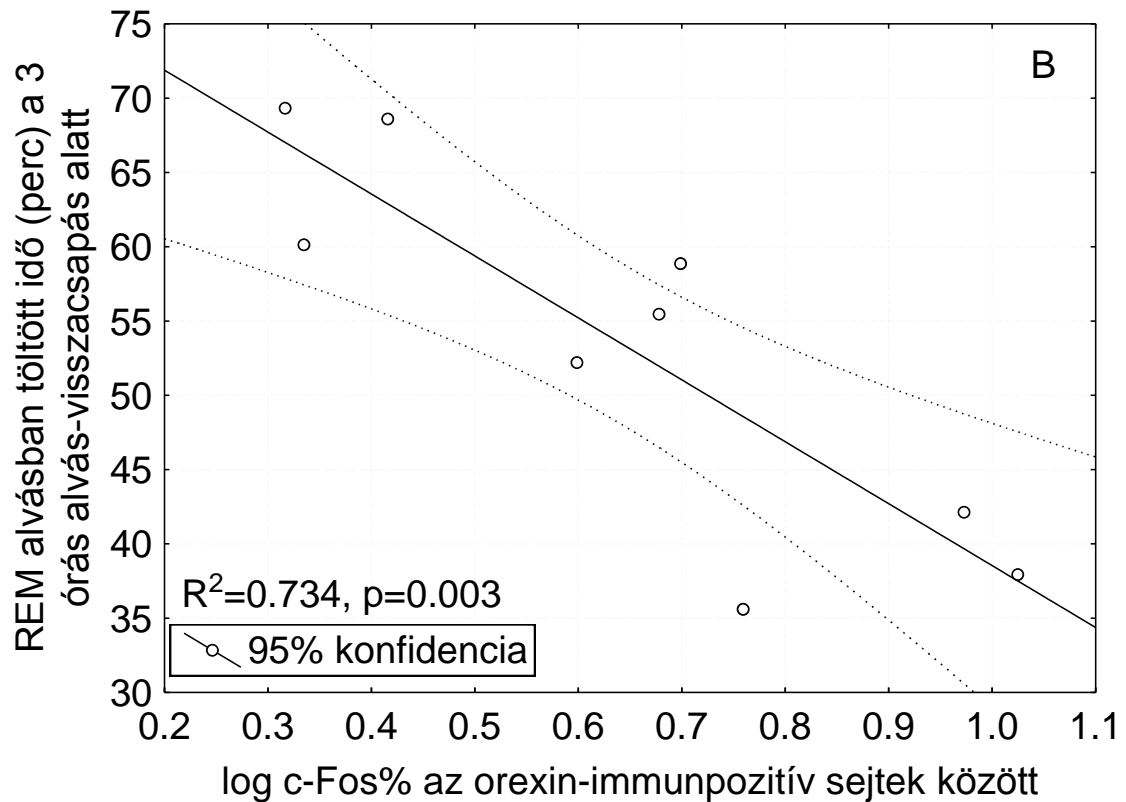
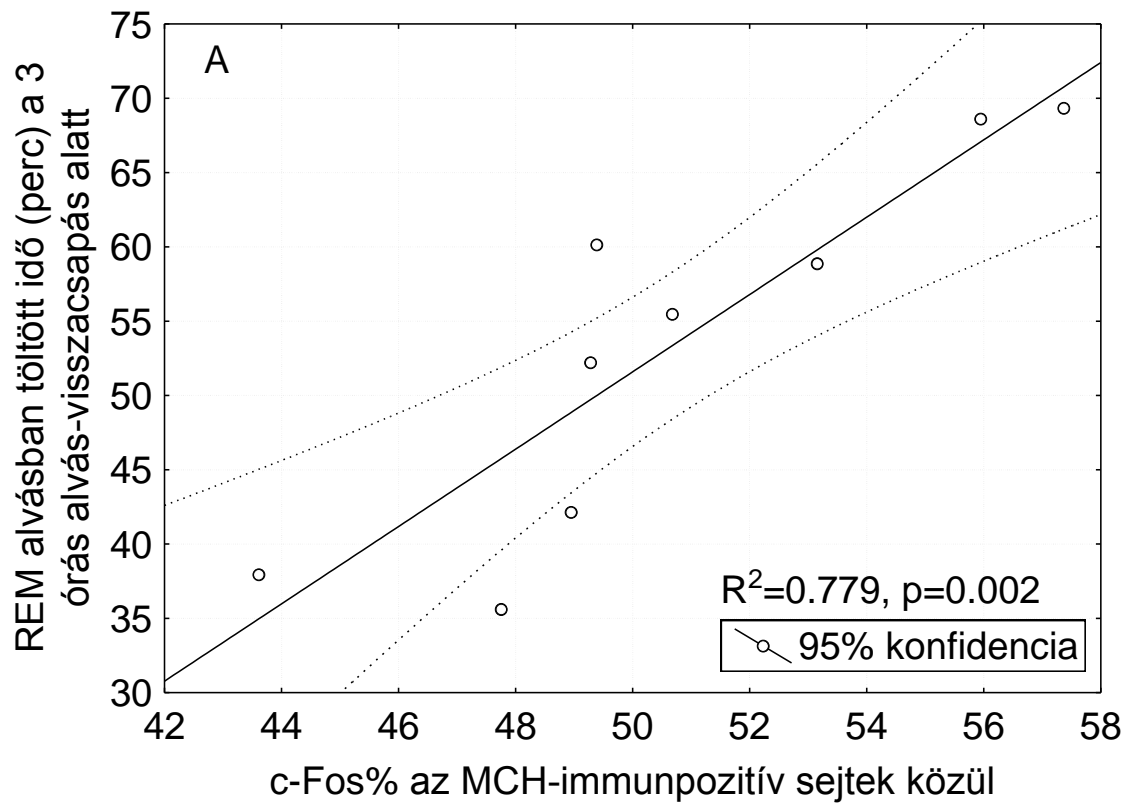
Ezzel szemben az orexin/cFos kettős jelölt sejtek aránya az orexin-IR neuronokon belül negatívan korrelált a REM szakaszok számával ($R^2=0,569$, $p=0,0019$; 22/D ábra).

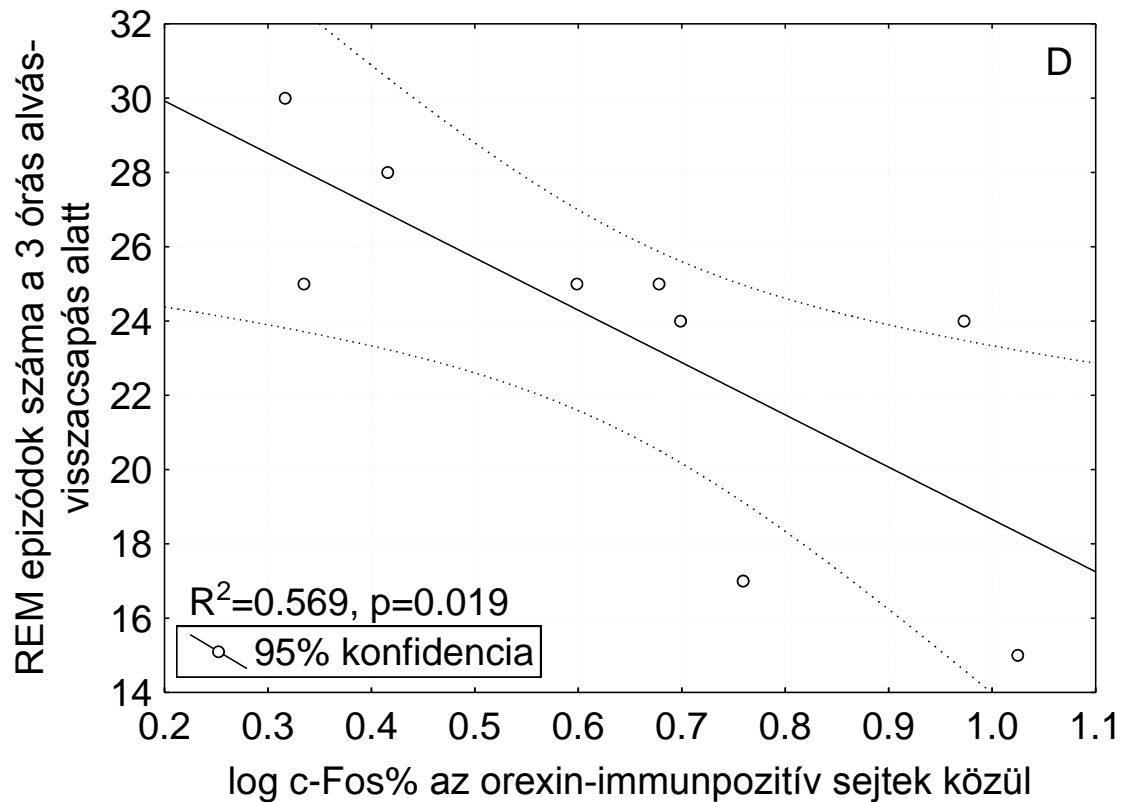
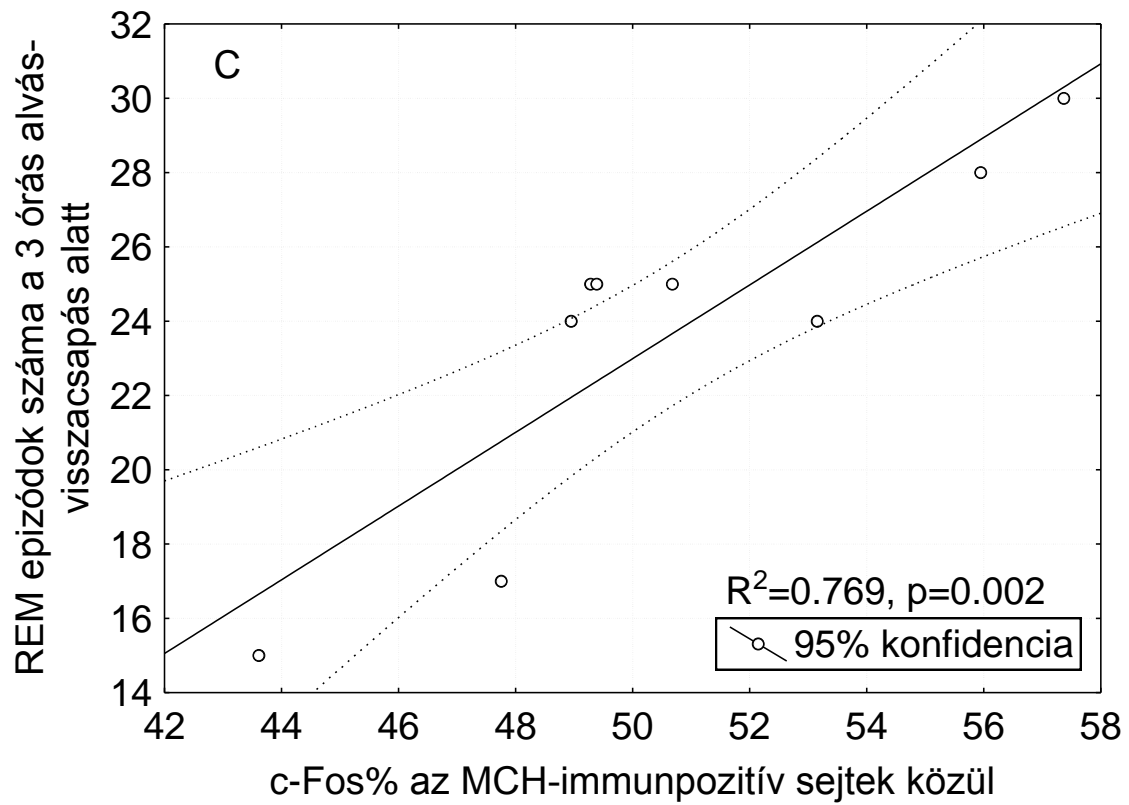
5.2.3.3 REM szakaszok átlagos hossza

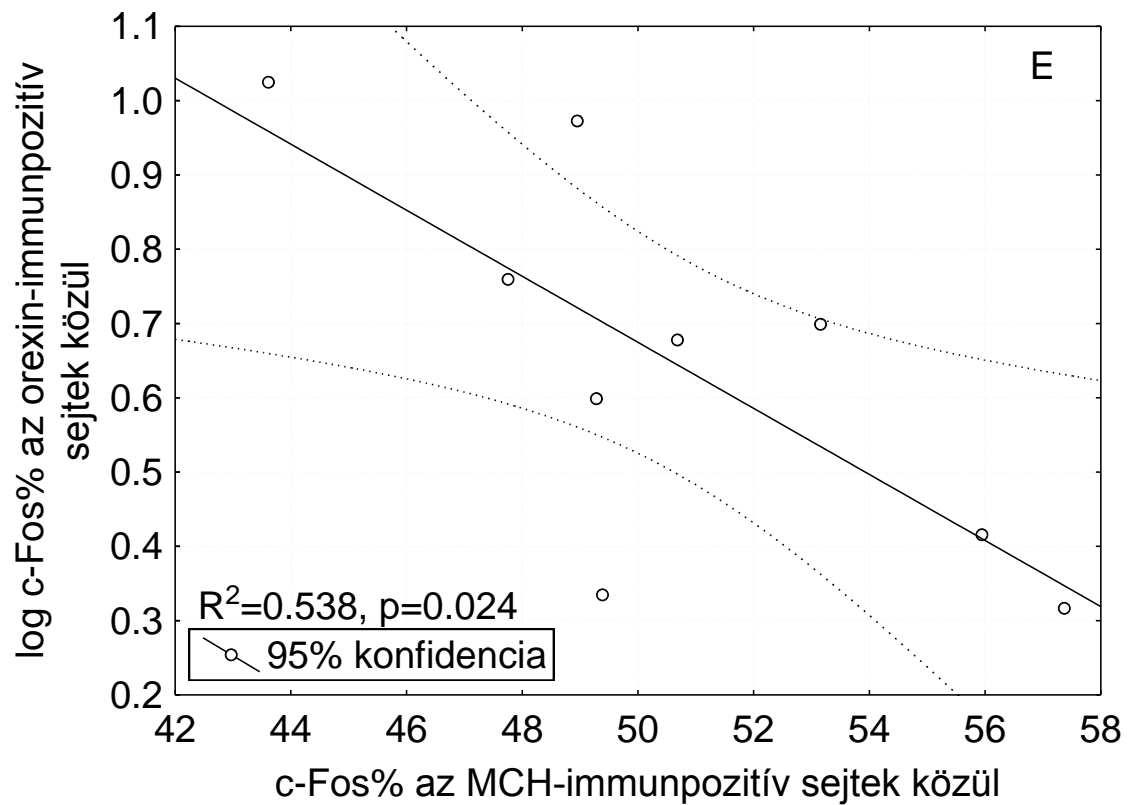
Sem az MCH/cFos kettős jelölt sejtek aránya az MCH-IR neuronokon belül, sem az orexin/cFos kettős jelölt sejtek aránya az orexin-IR neuronokon belül nem mutatott korrelációt a REM szakaszok átlagos hosszával.

5.2.3.4 Az orexin-IR és MCH-IR neuronokon belül a cFos-kettős jelölések aránya

Az aktivált sejtek aránya (cFos immunopozitivitás alapján) az orexin-IR és MCH-IR neuronokon belül negatívan korrelált egymással ($R^2=0,538$, $p=0,024$; 22/E ábra).







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

6 Megbeszélés

6.1 Az eredmények megtárgyalása

A kísérleteinkben alkalmazott flower pot technika, melyben egy kis porond mellett egy nagyot alkalmaznak stressz-kontrollként, széleskörűen elfogadott metodika az alváskutatásban (Bignotto és mtsai, 2006; Coll-Andreu és mtsai, 1989; Tufik és mtsai, 1978). Számos kísérletben bizonyították, hogy a két porond nem különbözik egymástól szignifikánsan az okozott stressz tekintetében (Coenen és van Luijtelea, 1985; D'Almeida és mtsai, 1997; Kovalzon és Tsibulsky, 1984; Suchecki és mtsai, 1998). A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletben vizsgálva mi sem találtunk különbséget sem a CRF- (corticotropin-releasing factor) tartalmú rostok denzitásában a substantia innominata és az amygdala területén, sem a c-Fos immunopozitív sejtek denzitásában az amygdala és az area amygdalahippocampalis területén ugyanezen két csoport között. Ezen kívül a testsúly változásában és a tápfelvételben sem találtunk különbséget az SPR és LPR csoport között a kísérletek alatt (nem közölt adatok). Mivel az állatok lassú hullámú alvásban ugyanannyit töltenek a két porondon, de a kis porondon teljesen hiányzik a REM-alvás (Machado és mtsai, 2004), az SPR és LPR csoportok összehasonlítása megfelelő módszer arra, hogy a szelektív REM-megvonást követő alvás-visszacsapás architektúráját tanulmányozzuk.

A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérlet eredményei alapján az SPR csoport alvásmintázata számos jellemzőjét tekintve különbözött a HC csoportétól minden vizsgált időintervallumban. Ezzel szemben az LPR csoport alvásmintázata eltérően alakult a passzív és az aktív periódusban: a passzív fázisban az LPR csoport alvásmintázata inkább a HC csoportéra, az aktív fázisban pedig inkább az SPR csoportéra hasonlított. Más szavakkal: a nagy porond által okozott stressz és alváshiány következtében előálló változások döntő többségükben a megfigyelt időszak második felére, az aktív fázisra voltak jellemzők. A passzív fázisban, ahol az SPR és LPR csoportok alvásmintázatainak különbözősége leginkább látható volt, a legfontosabb eltérés a két csoport között az volt, hogy az SPR csoport több időt töltött REM fázisban. A passzív fázis második felében mind a felszínes lassú hullámú alvásban, mind az összes lassú hullámú alvásban csökkenést mutatott az SPR csoport az LPR csoporthoz

képest, vagyis a porondon töltött idő alatt felhalmozott REM-hiányt ebben az időszakban a lassú hullámú alvás terhére pótolta be. Az alvás-visszacsapás architektúrájának időben változó lefutását az is mutatja, hogy a teljes vizsgált időszakra végzett ismétléses ANOVA a legtöbb vizsgált paraméterre szignifikáns csoport-idő interakciót mutatott.

Fontos felhívni a figyelmet arra, hogy az SPR csoportban az LPR csoporttal szemben megfigyelhető REM-növekedés minden intervallumban a REM szakaszok átlagos hosszának növekedésével járt együtt. Ezzel szemben a REM szakaszok darabszámát tekintve a két csoport semmilyen vizsgált intervallumban sem különbözött egymástól, vagyis kimondhatjuk, hogy a szelektív REM-megvonást követő visszacsapás alapvetően a REM szakaszok átlagos hosszának növekedésén keresztül növeli a REM-ben töltött időt.

Ezzel együtt azt is érdemes figyelembe venni, hogy mind az SPR, mind az LPR csoport REM szakaszainak száma növekedett a HC csoporthoz képest az összes olyan intervallumban, ahol a REM-ben töltött idő is nőtt. Ez utóbbi eredmény arra enged következtetni, hogy a REM-szakaszok számának növekedése a módszerrel járó összes hatás (általános alváshiány és számos egyéb stresszfactor, többek között az új környezet, a nedvesség és az immobilizáció) kevert következményének tekinthető.

Ez utóbbi feltételezést az is alátámasztja, hogy irodalmi adatok szerint két óras immobilizációs stresszt követően mind a REM-ben töltött idő, mind a REM szakaszok száma megnő, miközben a REM szakaszok átlagos hossza nem változik (Rampin és mtsai, 1991). Ezt a hatást krónikus gyenge stresszt követően is kimutatták (Gronli és mtsai, 2004). A kis porondos alvásmegvonást követő négy órában a REM szakaszok számának növekedését a HC csoporthoz képest mások is kimutatták (van Luijteleaer és Coenen, 1986). Eredményeink az irodalomban fellelhető adatokkal összevetve is egyértelműen azt támasztják alá, hogy ez a változás nem a REM megvonás, hanem a módszerrel együtt járó egyéb stresszorok következménye.

A visszacsapás időbeli lefutását illetően számos különbséget találtunk az alvásfázisok között. A felszínes lassú hullámú alvásban töltött idő növekedése mindkét alvásmegvonáson átesett csoport esetén az aktív fázisra volt jellemző. Ezzel szemben a mély lassú hullámú alvás egyáltalán nem mutatott visszacsapást, sőt, az LPR csoport esetén még csökkenést is találtunk a HC csoporttal szemben az aktív fázisban. Ez az

emelkedett SWS1-gyel együtt a lassú hullámú alvás mélységének (SWS2%) csökkenését eredményezte. Hasonló eredményeket az irodalomban már leírtak: 24 órás teljes alvásmegvonás az ezt követő aktív fázisban csökkentette az alvás mélységét (Feinberg és Campbell, 1993; Franken és mtsai, 1991), valamint krónikus gyenge stresszt követően is mutattak ki hasonló változást (Gronli és mtsai, 2004). Míg az LPR csoport a HC csoporttal szemben az összes lassú hullámú alvás mennyiségében nem, csak annak mélységében mutatott különbséget, az SPR csoport tagjainak TSWS mintázata bifázikus mintázatot mutatott: ezen állatok a passzív fázisban kevesebb, az aktív fázisban pedig több időt töltöttek lassú hullámú alvással, mint a HC csoport állatai. Ez arra mutat, hogy az SPR csoport tagjai a felhalmozódott REM-hiányt a passzív fázisban a lassú hullámú alvás, az aktív fázisban pedig az ébrenlét terhére pótolták.

A napi ritmusok kiértékelését cosinor analízissel végeztük. Az akrofázisban semmilyen vizsgált paraméter esetén nem találtunk változást, vagyis az alvásmegvonás utáni visszacsapás szignifikáns fáziseltolást nem okozott. Ez az eredmény érthető és a kísérlet időbeli beosztása miatt várható is volt, hiszen az alvászvisszacsapás kezdete a passzív fázis kezdetéhez volt igazítva, hogy mesterségesen ne okozzunk fáziseltolást.

A mezőrban (az illesztett görbe átlagos értékében) tapasztalt változások egybehangzanak az ANOVA és post hoc tesztek eredményeivel: a REM alvásban töltött idő az SPR csoportban növekedett az LPR csoporthoz képest, a REM epizódok számát tekintve pedig nem láttunk különbséget e két csoport között. Ugyanakkor mindkét alvás-visszacsapásos csoport esetén a REM-ben töltött idő és a REM szakaszok számának növekedését tapasztaltuk a HC csoporthoz képest. Bár az ún. sRa-kat is beleszámolva szignifikáns különbség látszik a REM szakaszok darabszámát tekintve a két alvás-visszacsapásos csoport között, ennek az eredménynek az értékelésekor érdemes több tényezőt is figyelembe venni. Egyrészt a REM szakaszokat ilyen módon számolva komoly hibalehetőséget viszünk a rendszerbe: egy 4-8 másodperces REM-szerű szakasz ugyanúgy nem vehető teljes REM fázisnak, mint ahogy egy olyan, 1-2 perces, összefüggő REM fázis, melynek EEG jele egy 4-8 másodperces időszakban a REM-re jellemzőtől eltér, nem tekinthető két különálló REM szakasznak. Amennyiben a REM szakaszokat úgy definiáljuk, hogy legalább 16 másodperc hosszúak, és nem szakítja meg őket 16 másodperces, vagy ennél hosszabb egyéb vigilancia-fázis, a két

alvás-visszacsapásos csoport között semmilyen különbség sem mutatható ki a REM szakaszok számát tekintve. Ráadásul, ahogy a cosinor analízis ismertetésekor említettem, ez a módszer rendkívül érzékenyen jelzi a mezőr változását, így kisebb eltérések is szignifikánsnak adódhatnak. Ezen okok miatt a fentebb tárgyalt eltérésekből messzemenő következtetéseket semmiképp sem vonnék le. Mindazonáltal ez az eredmény arra is felhívja a figyelmet, hogy az REM mintázatának kiértékelésekor kiemelten fontos a szakasz hosszára, illetve összefüggő voltára vonatkozó kikötéseket megtenni. A REM szakaszok átlagos hosszát módszertani okok miatt ezzel a statisztikai módszerrel nem vizsgáltuk (hiányzó érték azokban az órákban, ahol az állat egyáltalán nem töltött REM-ben időt, és hiányos adatsorra a szoftver nem tud görbét illeszteni).

A REM amplitúdójának növekedése az SPR csoportban az LPR-hez képest azt jelzi, hogy a szelektív REM-megvonást követő REM visszacsapás túlnyomó része a passzív fázisra tehető, amikor az állat amúgy is több időt tölt REM-ben. Ez az eredmény is összhangban áll a variancia-analízis eredményeivel.

A mezőr változásaiból az is látszik, hogy mindkét alvásmegvonáson átesett csoport esetén megfigyelhető az SWS1 és IS emelkedése a HC csoporthoz képest, míg az AW és TW értékek csökkennek. Az SWS2 visszacsapásának hiányát irodalmi adatok is alátámasztják (Feinberg és Campbell, 1993; Franken és mtsai, 1991). Ezen kívül az SWS2% mezőrjának csökkenése az LPR csoportban mind a HC, mind az SPR csoporttal szemben jelzi a lassú hullámú alvás mélységének csökkenését. Az SPR csoportban az SWS1 napi ritmusának eltűnését kisebb mértékben a passzív fázis alatti, nem szignifikáns SWS1-csökkenés, nagyobb mértékben az aktív fázis alatti SWS1-emelkedés okozta. Ezzel egybeesik, hogy ebben a csoportban a TSWS amplitúdója is csökkent mindkét másik csoporthoz képest, amit feltehetően az okoz, hogy a REM visszacsapása passzív fázisban a lassú hullámú alvás, aktív fázisban pedig az ébrenlét terhére történik (ezalatt lehetőség van a lassú hullámú alvás, leginkább az SWS1 hiányának pótlására is).

Az akrofázis semmilyen mért változó esetében sem mutatott eltérést bármelyik két csoport között, vagyis a napi ritmus eltolódásáról nem beszélhetünk. Ez az eredmény nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy az állatok a teljes kísérlet során változatlan fény-sötét ciklusban voltak tartva, és az alvásmegvonást követő visszaalvás kezdete is a passzív periódus kezdetére volt időzítve.

Összefoglalva a REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletünk eredményeit, a három napos REM-megvonást követő változások követésére a flower pot módszer abban az esetben megfelelő eszköz, amennyiben a kis porond mellé stressz-kontrollnak egy nagyobb porondot használunk. Ez a kísérleti elrendezés lehetőséget biztosít arra, hogy a nem specifikus stresszorok hatásait elkülönítsük a szelektív REM-megvonás következményeitől. Bár az irodalomban számos esetben végeznek ilyen kísérleteket nagy porondos kontroll nélkül, az ilyen elrendezéssel végzett vizsgálatokból csupán korlátozott módon lehet következtetéseket levonni, hiszen a REM-megvonáson túl a lassú hullámú alvásban töltött idő csökkenése és az okozott igen intenzív stressz hatásai is tükröződnek az eredményekben.

Legfontosabb következtetésünk a következő: a szelektív REM-megvonás az emelkedett REM-mennyiségen túl a REM szakaszok átlagos hosszának növekedését vonja maga után. Ezzel szemben a REM szakaszok darabszámának növekedése, valamint az alvásmegvonást követő nap aktív fázisában a felszínes lassú hullámú alvás mennyiségének emelkedése feltehetően a nem specifikus alvásmegvonás és számos stressztényező együttes hatásának tudható be.

A REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletünkben az alvásmegvonás és –visszacsapás hatásait vizsgáltuk az orexin- és MCH-tartalmú idegsejtekre és alpopulációikra, valamint ezen sejtek aktivitása és az REM-mintázat közti korrelációkat tanulmányoztuk. Ezen túl e két átvivőanyagot kifejező idegsejtek aktivitása közti kapcsolatot is vizsgáltuk az alvás-visszacsapást követően.

Általánosságban megállapíthatjuk, hogy sem a kis-, sem a nagy porondos alvásmegvonás nem befolyásolta az MCH-IR és orexin-IR neuronok aktivitását a HC csoporthoz képest (cFos immunoreaktivitás alapján). Ez az eredmény ellentétben áll egy irodalmi adattal: Verret és mtsai szerint az alvásmegvonás növeli az orexin-IR neuronok aktivitását a HC csoporthoz képest (Verret és mtsai, 2003). Ezt a különbséget a két kísérlet eltérő időzítése magyarázhatja. A mi vizsgálatunkban az állatokat az aktív fázist követően perfundáltuk, így ezt megelőzően mind az alvásmegvont, mind a HC csoport tagjai javarészt ébren lehettek. Az idézett cikkben pedig a passzív fázis vége előtt egy órával történt a perfúzió, így valószínűleg a HC csoport állatai jóval nagyobb arányban aludtak a perfúzió előtt, mint az alvásmegvont csoport állatai (Balogh és mtsai, 2004; Kitka és mtsai, 2009). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az irodalmi adat szerinti

különbség nem a 3 napos alvásmegvonás hatásait, hanem inkább a perfúziót megelőző időszak akut hatásait, vagyis a HC állatok normál napszaki ritmusának hatását tükrözi.

Eredményeink alapján mind a kis, mind a nagy porondon történő alvásmegvonást követő visszacsapás növeli az MCH-IR, és csökkenti az orexin-IR sejtek aktivitását. Ez az eredmény összecseng az irodalmi adatokkal (Verret és mtsai, 2003). Ezen túl megállapíthatjuk, hogy az SPR csoport állataiban az MCH-IR neuronok nagyobb hányada aktiválódott, mint az LPR (stressz-kontroll) csoport állataiban. E szerint az MCH-IR idegsejtek aktivációjában a szelektív REM-megvonást követő alvás-visszacsapás komoly szerepet játszik. Ezzel együtt az LPR-csoport esetén is megnövekedett aktivációt láttunk, ami felveti a lehetőségét annak, hogy ennek a neuroncsoportnak a serkentésében a nem szelektív alváshiányt követő visszacsapáson túl a módszerrel együtt járó stresszfaktorok is szerepet játszanak.

Az MCH/CART/cFos hármás immunohisztokémiai eredmények alapján funkcionális különbség rajzolódik ki a két MCH-IR alpopuláció (CART-IR és non-CART-IR) között. Eredményeink szerint az alvás-visszacsapás után csak a kis porondos csoport esetén látható különbség a CART-IR és non-CART-IR alpopuláció aktivitása között, valamint csak a CART-IR alpopuláció esetén mutatható ki különbség az SPR és LPR csoport között. Az előbbi két kijelentés biológiai értelmezése nem teljesen ekvivalens: az előbbi szerint a REM teljes megvonása szükséges ahhoz, hogy a visszacsapás során a két alpopuláció cFos immunoreaktivitása eltérjen; az utóbbi szerint pedig a REM-megvonás intenzitásának változása kizárólag a CART-IR alpopuláció aktivitását változtatja a visszacsapás alatt. Bár az eredmények alapján felvetülhet a gyanú, hogy a két faktor (SPR/LPR, illetve CART-IR/non-CART-IR) egymástól független hatásának egyszerű additivitása jelenik meg az SPR csoport CART-IR alpopulációjának kiemelt aktivitásában, a faktoriális ANOVA a szignifikanciahatár közelében lévő interakciós p érték miatt ezt nem valószínűsíti. Így joggal feltételezhetjük, hogy bár mindkét (CART-IR és non-CART-IR) alpopuláció serkentődik e nem specifikus alváshiánnyal és erős stresszel járó procedúrát követő visszaalvás alatt, a szelektív REM-megvonást követő visszacsapás elsősorban a CART-IR alpopulációt serkenti. Ez az eredmény azt valószínűsíti, hogy az MCH-tartalmú neuronok közül elsődlegesen a CART-IR alpopuláció játszik szerepet a REM alvás szabályozásában.

A non-CART-IR alpopuláció szerepét tekintve nem zárhatjuk ki azt a feltételezést, hogy ebben a kísérleti rendszerben a stresszre adott választ befolyásolja. Arra, hogy az MCH neurológiai szerepe hasonló funkcióra is kiterjedhet, az irodalomban találni utalást (Smith és mtsai, 2006; Smith és mtsai, 2009), de a különböző stresszhatásokat követő REM-emelkedés jelensége (Gronli és mtsai, 2004; Rampin és mtsai, 1991) arra is figyelmeztet, hogy ezt a két funkciót nem lehet teljesen elkülönítve vizsgálni.

Bár korábbi eredmények (Hanriot és mtsai, 2007) mutatnak arra, hogy az alvásmegvonást követően a CART-IR alpopuláció tagjainak nagyobb hányada lesz cFos-immunoreaktív, mint a non-CART-IR alpopulációé, az ezt leíró cikkben a nagy porondos csoport hiánya miatt a szelektív REM-megvonás hatása nem különíthető el a nem szelektív alváshiány és a módszerből fakadó stressz hatásaitól, és erre az adatra ez eredmények tárgyalásakor sem térnek ki. A CART-IR alpopuláció szerepét ugyanez a munkacsoport egy későbbi összefoglaló cikkében sem emeli ki: a gerincvelőbe projiciáló non-CART-IR alpopuláció REM alatti aktivációját is tárgyalják, mint az MCH REM-atóniában betöltött potenciális szerepének neuroanatómiai hátterét. Ezzel szemben, bár a CART-IR alpopuláció legfontosabb agytörzsi projekciós területe a DPGi, ezt a kapcsolatot nem is említik (Peyron és mtsai, 2009).

A fentebb részletezett eredmények alapján feltételezhető, hogy az MCH-IR/CART-IR neuronok a medialis septumot és a hippocampust innerváló projekcióik révén szerepet játszanak a REM alvás alatti hippocampalis theta ritmusok generálásában. Ezen túl ismert, hogy ugyanezen neuroncsoport projekcióinak létezik egy fentebb említett leszálló ága is, és ennek az ágnak a rostjai legintenzívebben a DPGi neuronjait innerválják (Cvetkovic és mtsai, 2004). Ez a terület a bevezetőben részletezett módon facilitálja a REM-alvás kialakulását. Az ún. REM-on GABA-tartalmú (gamma-aminobutyric acid, gamma-aminovajsav) neuronok a DPGi területén körülbelül 15 másodperccel a REM alvás megjelenése előtt kezdenek tüzelni és számos REM-szabályzásban résztvevő területre küldenek projekciókat, például SubC, nyúltvelői gigantocellularis terület, vlPAG, dDpMe, LDT, PPT, DRN, LC és zona incerta idegsejtjeihez (Goutagny és mtsai, 2008; Verret és mtsai, 2006). Tekintetbe véve azt, hogy eredményeink alapján az MCH-IR sejtek aktivitása korrelál a REM szakaszok darabszámával, valamint ezen sejtek közül elsősorban a DPGi-t innerváló, CART-IR alpopuláció aktivitása hozható összefüggésbe a REM alvással, feltételezhető, hogy az

MCH-IR/CART-IR neuronok szerepet játszhatnak a REM indításában a DPGi felé küldött rostjaikon keresztül. A képet ugyanakkor árnyalja az, hogy az MCH postsynapticus hatása döntően inhibitoros és az MCH-erg neuronok nagy hányada GABA-t koexpresszál (Hawes és mtsai, 2000; Pissios és mtsai, 2003; Sapin és mtsai, 2010), valamint a DPGi neuronjainak aktivitása egyértelműen REM-on hatású. Ezek alapján két potenciális neurobiológiai mechanizmust tudunk feltételezni: (1) elképzelhető egy indirekt kapcsolat útján kiváltott diszinhibíció, melyben GABA-erg neurotranszmisszió is szerepet játszhat (az MCH-erg sejtek döntő többsége GABA-kolokalizált); valamint (2) tekintetbe véve azt az információt, hogy az MCHR1 receptor G_q -csatolt is lehet, nem zárható ki egyértelműen egy direkt serkentő hatás sem (Hawes és mtsai, 2000). Ezt a kérdést a jövőben immunohisztokémiai, pályakövetéses és egysejt-elektrofiziológiai módszerek felhasználásával lehetne tisztázni.

Az interindividuális korrelációk alapján az MCH-IR neuronok aktivitása és a REM-ben töltött idő, valamint a REM epizódok száma között pozitív asszociációt mutattunk ki. Az MCH és a REM alvás közti kapcsolatot több kutatócsoport is vizsgálta, és mind a REM epizódok száma, mind azok átlagos hossza és az MCH jelátvitel között írtak le kapcsolatot. A REM szakaszok számát mind az agykamrába, mind a dorsalis raphe-ba injektált MCH növeli (Lagos és mtsai, 2009; Verret és mtsai, 2003), illetve a DRN területén fiziológiásan felszabaduló MCH immunoneutralizációja is a REM szakaszok darabszámának csökkentését eredményezte (Lagos és mtsai, 2011).

Ezzel szemben a hídi nucleus pontis oralisba injektált MCH a REM szakaszok átlagos hosszát növelte meg (Tortorolo és mtsai, 2009), és az éhezés által kiváltott átlagos REM szakaszhossz-növekedés is hiányzik MCH KO egerekben (Willie és mtsai, 2008). Eredményünk, miszerint az MCH-erg neuronok aktivitása a REM szakaszok darabszámával korrelál, azon kísérletek eredményeit támasztja alá, ahol úgy találták, hogy az MCH-erg rendszer aktivitása elsősorban a REM szakaszok számának változásával áll összefüggésben. Felhívnam a figyelmet arra, hogy a fentebb leírt kísérletek közül kizárólag az immunoneutralizációs vizsgálat esetében mondható ki egyértelműen, hogy fiziológiás körülmények között vizsgálták az állatot, hiszen a mikroinjekció során a transzmitter koncentrációja és szövetbeli eloszlása nagyban eltérhet a természetes körülmények közt megfigyelhetőtől, valamint a KO állatok esetében is számos kompenzatórikus mechanizmus módosíthatja a fenotípust.

Kísérletünkben az MCH-erg rendszer fiziológias aktivitását regisztráltuk, így nem zárható ki, hogy azokban a vizsgálatokban, ahol az MCH és a REM szakaszok átlagos hossza közt találtak kapcsolatot, ez valamilyen mesterséges tényező, illetve kompenzatórikus mechanizmus hatását tükrözi. A fentebb részletezett eredményeinket feltehetően nem befolyásolta a tápfelvétel, mert az állatok a teljes kísérlet folyamán szabadon hozzáférhettek a táphoz, és a tápfelvételt nem befolyásolta a porond mérete (nem publikált adat).

Az MCH-val szemben az orexinerg aktivitás egyértelműen a REM szakaszok számával áll összefüggésben. Az orexin KO és prepro-orexin-csendesített állatok esetén a REM szakaszok száma csökkent a vad típusú állatokhoz képest (Chen és mtsai, 2006b; Hunsley és mtsai, 2006). Ezen kívül macskák tegmentumába injektált orexin-A csökkentette a REM epizódok és az SWS-REM átmenetek számát (Moreno-Balandran és mtsai, 2008; Xi és mtsai, 2001a). Eredményeink összhangban vannak ezekkel az adatokkal: az orexin-IR sejtek aktivitása (cFos immunoreaktivitás alapján) negatív korrelációt mutatott a REM-ben töltött idővel és a REM szakaszok darabszámával.

Az MCH- és orexin-tartalmú neuronok közti reciprok kapcsolat ismert az irodalomból (Gao, 2009; Guan és mtsai, 2002; Rao és mtsai, 2008; van den Pol és mtsai, 2004), és azt is leírták, hogy e két sejtcsoport tüzelési mintázatának napi ciklusa fordított arányban áll egymással (Hassani és mtsai, 2009; Lee és mtsai, 2005). Eredményeink, miszerint az SPR csoportban e sejtcsoportok aktivitása egymással negatív lineáris összefüggésben áll, újabb bizonyítékot szolgáltatnak erre a kapcsolatra, valamint felvetik annak lehetőségét is, hogy ez a kapcsolat szerepet játszhat a hosszú REM megvonást követő rebound szabályozásában.

Összefoglalva a REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérlet eredményeit, adataink alátámasztják az MCH- és orexin-tartalmú sejtek közti élettani kapcsolat szerepét a REM megvonását követő alvás-visszacsapásban. Ezen kívül valószínűsíthetjük azt is, hogy ez a kapcsolat inkább a REM szakaszok darabszámát, és nem a REM szakaszok átlagos hosszát befolyásolhatja. Legfontosabb következtetésünk szerint az MCH-tartalmú sejtek közül alapvetően a CART-IR alpopuláció tagjai játszhatnak szerepet a szelektív REM-megvonást követő REM-visszacsapás szabályozásában.

A kísérletek eredményeinek összevetéséből kiderül, hogy bár a szelektív REM-megvonást követő alvás-visszacsapás során a REM szakaszok átlagos hossza és az MCH-tartalmú idegsejtek aktivitása is nő, a két jelenség feltehetően nem áll egymással összefüggésben. Erre az eredményre több elképzelhető magyarázat is kínálkozik:

- Irodalmi adatok szerint a lateralis hypothalamus területén a REM alvás alatt tüzelési maximumukat elérő neuronok jelentős része nem tartalmaz MCH-t (Hassani és mtsai, 2010). Így a legkézenfekvőbb magyarázatnak az ígérkezik, hogy bár az MCH-tartalmú sejtek tüzelési frekvenciája megnő REM alvás alatt, és aktivitásuk a REM szakaszok darabszámával korrelál (ebben nem zárható ki az MCH-erg LH-DPGi projekció szerepe), de a szelektív REM-megvonás által okozott növekedés a REM szakaszok átlagos hosszában egyéb sejtpopulációk aktivitásának eredménye.
- Az orexinerg neuronok aktivitása több módszerrel bizonyított módon a REM-szakaszok darabszámának csökkenésével is jár, és az MCH- és orexin-tartalmú neuronok egymással anatómiailag és idegélettanilag is reciprok kapcsolatban állnak. Ezeket az adatokat a mi kísérletünk is alátámasztja. Így elképzelhető, hogy az MCH-tartalmú neuronok és a REM szakaszok darabszáma közti összefüggés részben az orexin-tartalmú idegsejtek aktivitására vezethető vissza. E mellett a feltételezés mellett szól, hogy REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletben a kis és nagy porondos csoportok orexinerg neuronjainak aktivitása között nem találtunk különbséget sem közvetlenül az alvás-megvonást, sem a visszaalvást követően. Ez hozzájárulhat ahhoz, hogy a REM szakaszok darabszámát tekintve nem különböztek a kis és nagy porondos alvás-visszacsapásos csoportok.
- Az előbbi két feltételezés nem zárja ki egymást. Amennyiben mindkét magyarázat egyszerre lenne igaz, az azt jelentené, hogy a két alvás-visszacsapásos csoport között, a REM szakaszok átlagos számában mutatkozó különbség egyéb, MCH-t nem tartalmazó idegsejtek aktivitására vezethető vissza. Az MCH-erg neuronok aktivitása bár növeli a REM szakaszok számát, de ahhoz, hogy a két csoport között szignifikáns különbség mutakozzon ezt a változót tekintve, az orexinerg neuronok

aktivitása tekintetében is különbségnek kellene lennie a két alvász-visszacsapásos csoport között.

6.2 A Célkitűzések részben felvetett kérdések megválaszolása

A két kísérlet eredményei alapján a dolgozat elején feltett kérdésekre a következő válasz adódik:

1. A szelektív REM-megvonás következtében kialakuló REM-visszacsapás jellemzője alapvetően REM szakaszok átlagos hosszának növekedése. Hasonló összefüggést a REM szakaszok számának növekedésére vonatkozóan az alkalmazott statisztikai módszerek nem igazoltak.
2. A REM alvásban töltött idő szelektív REM-megvonás miatti növekedése leginkább a megvonás után rögtön következő passzív fázisra jellemző. Ezzel szemben a felszínes lassú hullámú alvásban töltött idő növekedése az ezt követő aktív fázis alatt figyelhető meg, ahol az LPR (stressz-kontroll) csoport esetében a lassú hullámú alvás felszínesedése is megjelenik.
3. Eredményeink szerint a kis- illetve nagy porondos alvásmegvonást követő visszacsapás hatására a CART-ot nem tartalmazó alpopuláció statisztikailag nem eltérő mértékben aktiválódik. Ezzel szemben a CART-ot tartalmazó alpopuláció aktivitása a kis porondos alvásmegvonás utáni visszacsapás hatására nagyobb lesz, mint a nagy porond esetében, vagyis feltehetően ennek a neuroncsoportnak az aktivitása állhat kapcsolatban a szelektív REM-megvonás indukálta REM-visszacsapással.
4. Annak ellenére, hogy eredményeink alapján a szelektív REM-megvonás miatti visszacsapás során a REM-szakaszok átlagos hossza növekszik, és ugyanakkor az MCH-tartalmú idegsejtek aktivitásának fokozódása is megállapítható, a két jelenség közt nem találtunk interindividuális korrelációt. Ezzel szemben a REM-szakaszok darabszáma és az MCH-, illetve orexin-tartalmú neuronok aktivitása között szignifikáns korrelációt találtunk, mely a REM-re való ismert hatásukkal összhangban az MCH esetén pozitív, az orexin esetén negatív irányú volt. Ezek az adatok nem támasztják alá a vizsgált neuronpopulációk szerepét a REM-megvonást követő REM-visszacsapás architektúrájának kialakításában.

7 Következtetések

Bár mind a kis- mind a nagy- (stressz-kontroll-) porondon végzett alvásmegvonást követő visszacsapás a REM szakaszok számának növekedésével járt, a két alvás-visszacsapásos csoport között ebben a tulajdonságukban nem találtunk szignifikáns eltérést. Ezzel szemben a REM szakaszok átlagosan hosszabbak voltak a kis, mint a nagy porondos alvásmegvonást követően. Ebből az a következtetés adódik, hogy a REM szakaszok számának növekedése a „flower pot” módszerből fakadó stressz (új környezet, nedvesség, immobilizáció, stb.), esetleg az általános alváshiány következménye. A módszerrel inherens módon együttjáró stressz ezen kívül a felszínes lassú hullámú alvásban töltött időt is növeli, és akár a lassú hullámú alvás felszínesedését is magával hozhatja. Ezzel szemben a szelektív REM-megvonás következtében kialakuló REM-visszacsapás a REM szakaszok hosszabbodását váltja ki, a lassú hullámú alváásra pedig viszonylag csekély hatással van.

Ezzel párhuzamosan a hypothalamicus MCH-erg neuronok aktivitásának fokozódása is megfigyelhető, de itt is különbség mutatkozik az általános alváshiány és stressz, valamint a specifikus REM-megvonás által kiváltott hatásokban: az MCH-erg neuronok neurokémiaileg, fejlődéstanilag és projekciós területeikben is eltérő két alpopulációja erre a két hatásra eltérően reagál. A CART-ot tartalmazó alpopuláció a szelektív REM-megvonást követő visszacsapás alatt magasabb aktivitást mutat, mint a CART-ot nem tartalmazó alpopuláció. Ennek a különbségnek a pontosabb megértéséhez további vizsgálatok lennének szükségesek.

A stresszhatásokat és a szelektív REM-megvonást követően megfigyelhető visszacsapás a lassú hullámú és REM alvásban jól látható időbeli lefutást követ: a REM visszacsapás inkább a megvonást követő passzív, a lassú hullámú alvás visszacsapása pedig az ezután aktív fázisra tehető. Ezek a különbségek felhívják a figyelmet arra, hogy az alvásmegvonással kiváltott alvás-visszacsapás tanulmányozásakor a felvétel időzítése (világos vagy sötét fázis) és hossza alapvetően befolyásolhatja a kapott eredményeket.

Bár eredményeink alapján a szelektív REM-megvonás miatti visszacsapás során a REM-szakaszok átlagos hossza növekszik, és ugyanakkor az MCH-tartalmú idegsejtek

aktivitásának fokozódása is megállapítható, a két jelenség közt nem találtunk interindividuális korrelációt. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy nem az MCH-erg neuronok REM-visszacsapás alatti aktivációja alakítja ki az erre az időszakra jellemző REM-mintázatot, vagyis a REM szakaszok átlagos hosszának növekedését. Így megállapíthatjuk, hogy ennek a jelenségnek a neurobiológiai háttere továbbra sem ismert, így ennek feltérképezése is további vizsgálatokat igényel.

8 Összefoglaló

A „flower pot” igen elterjedt módszer a REM alvás megvonására. Nem tisztázott azonban, hogy az ezzel kiváltott alvás-hatások a módszerrel együtt járó stressz, vagy a REM-megvonás következményei, illetve hogy a REM-megvonást követő visszacsapás a REM alvás melyik paraméterét befolyásolja. Ezen kívül az MCH- és orexin-tartalmú neuronok aktivációját is nyomon követtük az alvásmegvonás és az ezt követő visszacsapás után. Kísérleteinkben stressz-kontrollként az alvásmegvonáshoz használt kis porond mellett egy nagyobbat is használtunk, amely az okozott stressz és a lassú hullámú alvásban töltött idő tekintetében is megegyezik a kisebbel, de kialakulhat rajta REM alvás.

A REM-visszacsapás architektúráját vizsgáló kísérletünkben a 72 órás REM-megvonást követő 23 óra alvás-architektúráját tanulmányoztuk, míg a REM-visszacsapás neurobiológiai hátterét vizsgáló kísérletünkben 3 órás alvás-visszacsapást alkalmaztunk. Ez utóbbi vizsgálatban az MCH- és orexin-tartalmú neuronok aktivitását cFos-immunhisztokémiával vizsgáltuk, valamint az MCH-tartalmú neuronok CART-ot tartalmazó és nem tartalmazó alpopulációit külön is vizsgáltuk.

A kísérletek eredményeiből levonható legfontosabb következtetések: (1) a szelektív REM-megvonás utáni visszacsapás a REM szakaszok átlagos hosszának növekedésével jár, a REM szakaszok számának növekedése a módszerrel okozott stressz és egyéb hatások következménye; (2) a REM-visszacsapás inkább az alvásmegvonást követő passzív fázisra jellemző, míg a lassú hullámú alvásban töltött idő ezután, az aktív fázisban emelkedik meg; (3) a szelektív REM-megvonást követő visszacsapás az MCH-tartalmú neuronok CART-immunoreaktív alpopulációját serkenti; (4) az MCH-tartalmú sejtek aktivitása a REM-szakaszok számának növekedését okozhatja, így a REM szakaszok visszacsapás alatt látható hosszabbodása egyéb neuroncsoportok aktivitásának lehet a következménye.

Eredményeink a szelektív REM-megvonást követő alvás-visszacsapás architektúrájáról és a REM szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszó MCH-, valamint orexin-tartalmú neuronok fentiekben játszott szerepéről szolgáltatnak új adatokat.

9 Summary

The „flower pot” or „platform on water” method is frequently used to deprive REM sleep. However, it is still not clarified whether the sleep effects evoked by this procedure are the consequences of the loss of REM sleep, or other stress effects. It is also unknown that which parameter of REM sleep is affected by the REM rebound following REM deprivation. Furthermore, we studied the activation of MCH- and orexin-containing neurons after the sleep deprivation and rebound. Beyond the small platform used for REM deprivation, we used a larger one as a stress-control in our experiments. This platform is similar to the smaller one in terms of stress and slow wave sleep deprivation, but the animal can reach REM sleep on it.

In our experiments we studied the REM architecture during 23 hours following 72 hours of REM sleep deprivation as well as the neurophysiological effects of a 3-hour-long sleep rebound. In this latter experiment we studied the activation of MCH- and orexin-immunoreactive neurons using cFos immunohistochemistry. We also studied the activation of CART-immunoreactive and non-CART immunoreactive MCH-ergic neurons separately.

The most important conclusions of these experiments are: (1) the rebound following selective REM deprivation increases the average length of REM episodes, while the elevation of the number of REM episodes is a consequence of stress and other nonspecific effects of this method; (2) the REM-rebound is characteristic for the passive phase following REM-deprivation, while the increased time spent in slow wave sleep can be basically detected during the subsequent active phase; (3) the rebound following selective REM deprivation selectively activates the CART-immunopositive subpopulation of MCH-containing neurons; (4) the activation of the MCH-containing neurons would cause the elevation of the number of REM episodes, thus the lengthening of REM episodes during the rebound may be the consequence of the activation of other neuronal elements.

Our results provide new data regarding the architecture of REM-rebound following REM sleep deprivation, as well as regarding the role of MCH- and orexin-containing neurons in this phenomenon.

10 Irodalomjegyzék

Able SL, Ivarsson M, Fish RL, Clarke TL, McCourt C, Duckworth JM, Napier C, Katugampola SD. (2009) Localisation of melanin-concentrating hormone receptor 1 in rat brain and evidence that sleep parameters are not altered despite high central receptor occupancy. *Eur J Pharmacol* 616(1-3): 101-106.

Abrahamson EE, Moore RY. (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916(1-2): 172-191.

Adamantidis A, Salvert D, Goutagny R, Lakaye B, Gervasoni D, Grisar T, Luppi PH, Fort P. (2008) Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. *Eur J Neurosci* 27(7): 1793-1800.

Adey WR, Bors E, Porter RW. (1968) EEG sleep patterns after high cervical lesions in man. *Arch Neurol* 19(4): 377-383.

Aghajanian GK, Vandermaelen CP. (1982) Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* 2(12): 1786-1792.

Ahnaou A, Drinkenburg WH, Bouwknecht JA, Alcazar J, Steckler T, Dautzenberg FM. (2008) Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. *Eur J Pharmacol* 579(1-3): 177-188.

Alberto CO, Hirasawa M. (2010) AMPA receptor-mediated miniature EPSCs have heterogeneous time courses in orexin neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 400(4): 707-712.

Alon T, Friedman JM. (2006) Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *J Neurosci* 26(2): 389-397.

Aston-Jones G, Bloom FE. (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1(8): 876-886.

Bachner D, Kreienkamp H, Weise C, Buck F, Richter D. (1999) Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1). *FEBS Lett* 457(3): 522-524.

Backberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B. (2002) Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci* 15(2): 315-328.

Balogh B, Molnar E, Jakus R, Quate L, Olverman HJ, Kelly PA, Kantor S, Bagdy G. (2004) Effects of a single dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on circadian patterns, motor activity and sleep in drug-naive rats and rats previously exposed to MDMA. *Psychopharmacology (Berl)* 173(3-4): 296-309.

Bard P, Macht MB. The Behaviour of Chronically Decerebrate Cats. In: Wolstenholme, G. E. W and O'Connor, C. M. (szerk) *Ciba Foundation Symposium - Neurological Basis of Behaviour*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK 1958: 55-75.

Baver SB, Pickard GE, Sollars PJ, Pickard GE. (2008) Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur J Neurosci* 27(7): 1763-1770.

Bertile F, Oudart H, Criscuolo F, Maho YL, Raclot T. (2003) Hypothalamic gene expression in long-term fasted rats: relationship with body fat. *Biochem Biophys Res Commun* 303(4): 1106-1113.

Bignotto M, de Andrade UJ, de Carvalho JG, Benedito MA. (2006) Rapid eye movement sleep deprivation induces changes in the high-affinity binding of [3H]-ouabain to the rat cortical membranes. *Neurosci Lett* 396(2): 143-147.

Bitner RS, Nikkel AL. (2002) Alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Res* 938(1-2): 45-54.

Bittencourt J, Celis ME. (2008) Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). *Peptides* 29(8): 1441-1450.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319(2): 218-245.

Bódizs R. *Alvás, álom, bioritmusok. Medicina, Budapest 2000: 83-89.*

Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B, Luppi PH. (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci* 18(6): 1627-1639.

Boissard R, Gervasoni D, Fort P, Henninot V, Barbagli B, Luppi PH. (2000) Neuronal networks responsible for paradoxical sleep onset and maintenance in rats: a new hypothesis. *Sleep* 23(Suppl.): 107-

Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH. (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 16(10): 1959-1973.

Brischoux F, Cvetkovic V, Griffond B, Fellmann D, Risold PY. (2002) Time of genesis determines projection and neurokinin-3 expression patterns of diencephalic neurons containing melanin-concentrating hormone. *Eur J Neurosci* 16(9): 1672-1680.

Brooks DC, Gershon MD. (1972) An analysis of the effect of reserpine upon ponto-geniculo-occipital wave activity in the cat. *Neuropharmacology* 11(4): 499-510.

Brooks DC, Gershon MD, Simon RP. (1972) Brain stem serotonin depletion and ponto-geniculo-occipital wave activity in the cat treated with reserpine. *Neuropharmacology* 11(4): 511-520.

Brown RE, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL. (2002) Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *J Neurosci* 22(20): 8850-8859.

Burlet S, Tyler CJ, Leonard CS. (2002) Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci* 22(7): 2862-2872.

Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G. (1999) Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48(11): 2132-2137.

Carli G, Zanchetti A. (1965) A study of pontine lesions suppressing deep sleep in the cat. *Arch Ital Biol* 103(4): 751-788.

Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, Deisseroth K, de Lecea L. (2010) Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci* 13(12): 1526-1533.

Cespuglio R, Gomez ME, Faradji H, Jouvet M. (1982) Alterations in the sleep-waking cycle induced by cooling of the locus coeruleus area. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 54(5): 570-578.

Chambers J, Ames RS, Bergsma D, Muir A, Fitzgerald LR, Hervieu G, Dytko GM, Foley JJ, Martin J, Liu WS, Park J, Ellis C, Ganguly S, Konchar S, Cluderay J, Leslie R, Wilson S, Sarau HM. (1999) Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature* 400(6741): 261-265.

Chase MH. (2008) Confirmation of the consensus that glycinergic postsynaptic inhibition is responsible for the atonia of REM sleep. *Sleep* 31(11): 1487-1491.

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98(4): 437-451.

Chen L, Thakkar MM, Winston S, Bolortuya Y, Basheer R, McCarley RW. (2006a) REM sleep changes in rats induced by siRNA-mediated orexin knockdown. *Eur J Neurosci* 24(7): 2039-2048.

Chen L, Thakkar MM, Winston S, Bolortuya Y, Basheer R, McCarley RW. (2006b) REM sleep changes in rats induced by siRNA-mediated orexin knockdown. *Eur J Neurosci* 24(7): 2039-2048.

Chiesa JJ, Cambras T, Carpentieri AR, Diez-Noguera A. (2010) Arrhythmic rats after SCN lesions and constant light differ in short time scale regulation of locomotor activity. *J Biol Rhythms* 25(1): 37-46.

Clement O, Sapin E, Berod A, Fort P, Luppi PH. (2011) Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep* 34(4): 419-423.

Coenen AM, van Luijtelaar EL. (1985) Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiol Behav* 35(4): 501-504.

Cohen HB, Dement WC. (1965) Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science* 150(701): 1318-1319.

Coll-Andreu M, Ayora-Mascarell L, Trullas-Oliva R, Morgado-Bernal I. (1989) Behavioral evaluation of the stress induced by the platform method for short-term paradoxical sleep deprivation in rats. *Brain Res Bull* 22(5): 825-828.

Crochet S, Onoe H, Sakai K. (2006) A potent non-monoaminergic paradoxical sleep inhibitory system: a reverse microdialysis and single-unit recording study. *Eur J Neurosci* 24(5): 1404-1412.

Crochet S, Sakai K. (1999a) Alpha-2 adrenoceptor mediated paradoxical (REM) sleep inhibition in the cat. *Neuroreport* 10(10): 2199-2204.

Crochet S, Sakai K. (1999b) Effects of microdialysis application of monoamines on the EEG and behavioural states in the cat mesopontine tegmentum. *Eur J Neurosci* 11(10): 3738-3752.

Cvetkovic V, Brischoux F, Jacquemard C, Fellmann D, Griffond B, Risold PY. (2004) Characterization of subpopulations of neurons producing melanin-concentrating hormone in the rat ventral diencephalon. *J Neurochem* 91(4): 911-919.

D'Almeida V, Hipolide DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VB, Tufik S. (1997) Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett* 235(1-2): 25-28.

Darracq L, Gervasoni D, Souliere F, Lin JS, Fort P, Chouvet G, Luppi PH. (1996) Effect of strychnine on rat locus coeruleus neurones during sleep and wakefulness. *Neuroreport* 8(1): 351-355.

Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M. (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2): 748-753.

Datta S. (1997) Cellular basis of pontine ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 17(3): 341-365.

Datta S, Siwek DF. (2002) Single cell activity patterns of pedunculopontine tegmentum neurons across the sleep-wake cycle in the freely moving rats. *J Neurosci Res* 70(4): 611-621.

de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1): 322-327.

Della-Zuana O, Presse F, Ortola C, Duhault J, Nahon JL, Levens N. (2002) Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(10): 1289-1295.

Dement W. (1958) The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 10(2): 291-296.

Deurveilher S, Hars B, Hennevin E. (1997) Pontine microinjection of carbachol does not reliably enhance paradoxical sleep in rats. *Sleep* 20(8): 593-607.

Dresler M, Koch SP, Wehrle R, Spoormaker VI, Holsboer F, Steiger A, Samann PG, Obrig H, Czisch M. (2011) Dreamed Movement Elicits Activation in the Sensorimotor Cortex. *Curr Biol*

Elias CF, Sita LV, Zambon BK, Oliveira ER, Vasconcelos LA, Bittencourt JC. (2008) Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. *J Chem Neuroanat* 35(2): 188-201.

Ennis M, Aston-Jones G. (1989) GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. *J Neurosci* 9(8): 2973-2981.

Feinberg I, Campbell IG. (1993) Total sleep deprivation in the rat transiently abolishes the delta amplitude response to darkness: implications for the mechanism of the "negative delta rebound". *J Neurophysiol* 70(6): 2695-2699.

Fenik V, Marchenko V, Janssen P, Davies RO, Kubin L. (2002) A5 cells are silenced when REM sleep-like signs are elicited by pontine carbachol. *J Appl Physiol* 93(4): 1448-1456.

Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jego S, Shimizu H, Hashimoto K, Mori M, Luppi PH. (2008) The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 155(1): 174-181.

Franken P, Dijk DJ, Tobler I, Borbely AA. (1991) Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am J Physiol* 261(1 Pt 2): R198-R208.

Gallopín T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Muhlethaler M, Serafin M. (2000) Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404(6781): 992-995.

Gandolfo G, Gauthier P, Arnaud C, Gottesmann C. (1996) Influence of paradoxical sleep deprivation on the intermediate stage of sleep in the rat. *Neurosci Res* 25(2): 123-127.

Gao XB. (2009) Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus. *Peptides* 30(11): 2025-2030.

George R, Haslett WL, Jenden DJ. (1964) A cholinergic mechanism in the brainstem reticular formation: induction of paradoxical sleep. *Int J Neuropharmacol* 3: 541-552.

Gervasoni D, Darracq L, Fort P, Souliere F, Chouvet G, Luppi PH. (1998) Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur J Neurosci* 10(3): 964-970.

Gervasoni D, Panconi E, Henninot V, Boissard R, Barbagli B, Fort P, Luppi PH. (2002) Effect of chronic treatment with milnacipran on sleep architecture in rats compared with paroxetine and imipramine. *Pharmacol Biochem Behav* 73(3): 557-563.

Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH. (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 20(11): 4217-4225.

Gnadt JW, Pegram GV. (1986) Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. *Brain Res* 384(1): 29-41.

Gottesmann C. (1992) Detection of seven sleep-waking stages in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 16(1): 31-38.

Goutagny R, Luppi PH, Salvert D, Lapray D, Gervasoni D, Fort P. (2008) Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. *Neuroscience* 152(3): 849-857.

Grahnstedt S, Ursin R. (1985) Platform sleep deprivation affects deep slow wave sleep in addition to REM sleep. *Behav Brain Res* 18(3): 233-239.

Greene RW, Gerber U, McCarley RW. (1989) Cholinergic activation of medial pontine reticular formation neurons in vitro. *Brain Res* 476(1): 154-159.

Griffond B, Risold PY. (2009) MCH and feeding behavior-interaction with peptidic network. *Peptides* 30(11): 2045-2051.

Gronli J, Murison R, Bjorvatn B, Sorensen E, Portas CM, Ursin R. (2004) Chronic mild stress affects sucrose intake and sleep in rats. *Behav Brain Res* 150(1-2): 139-147.

Guan JL, Uehara K, Lu S, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Yanagizawa M, Shioda S. (2002) Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(12): 1523-1532.

Guyenet PG, Aghajanian GK. (1979) ACh, substance P and met-enkephalin in the locus coeruleus: pharmacological evidence for independent sites of action. *Eur J Pharmacol* 53(4): 319-328.

Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19): 10911-10916.

Hanriot L, Camargo N, Courau AC, Leger L, Luppi PH, Peyron C. (2007) Characterization of the melanin-concentrating hormone neurons activated during paradoxical sleep hypersomnia in rats. *J Comp Neurol* 505(2): 147-157.

Hassani OK, Henny P, Lee MG, Jones BE. (2010) GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur J Neurosci* 32(3): 448-457.

Hassani OK, Lee MG, Jones BE. (2009) Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7): 2418-2422.

Hawes BE, Kil E, Green B, O'Neill K, Fried S, Graziano MP. (2000) The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 141(12): 4524-4532.

Henny P, Brischox F, Mainville L, Stroh T, Jones BE. (2010) Immunohistochemical evidence for synaptic release of glutamate from orexin terminals in the locus coeruleus. *Neuroscience* 169(3): 1150-1157.

Hicks RA, Okuda A, Thomsen D. (1977) Depriving rats of REM sleep: the identification of a methodological problem. *Am J Psychol* 90(1): 95-102.

Hill J, Duckworth M, Murdock P, Rennie G, Sabido-David C, Ames RS, Szekeres P, Wilson S, Bergsma DJ, Gloger IS, Levy DS, Chambers JK, Muir AI. (2001) Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *J Biol Chem* 276(23): 20125-20129.

Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW. (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189(4196): 55-58.

Holmes CJ, Jones BE. (1994) Importance of cholinergic, GABAergic, serotonergic and other neurons in the medial medullary reticular formation for sleep-wake states studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience* 62(4): 1179-1200.

Holmes CJ, Mainville LS, Jones BE. (1994) Distribution of cholinergic, GABAergic and serotonergic neurons in the medial medullary reticular formation and their projections studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience* 62(4): 1155-1178.

Horner RL, Kubin L. (1999) Pontine carbachol elicits multiple rapid eye movement sleep-like neural events in urethane-anaesthetized rats. *Neuroscience* 93(1): 215-226.

Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, van den Pol AN. (1999) Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol* 415(2): 145-159.

Hunsley MS, Curtis WR, Palmiter RD. (2006) Behavioral and sleep/wake characteristics of mice lacking norepinephrine and hypocretin. *Genes Brain Behav* 5(6): 451-457.

Jacobs BL, Henriksen SJ, Dement WC. (1972) Neurochemical bases of the PGO wave. *Brain Res* 48: 406-411.

Jones BE. (1991) Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 40(3): 637-656.

Jouvet D, Vimont P, Delorme F, Jouvet M. (1964) [Study of selective deprivation of the paradoxical sleep phase in the cat]. *C R Seances Soc Biol Fil* 158: 756-759.

Jouvet M. (1962) [Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep]. *Arch Ital Biol* 100: 125-206.

Jouvet M. (1969) Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163(862): 32-41.

Jouvet M, Michel F. (1959) [Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat]. *C R Seances Soc Biol Fil* 153(3): 422-425.

Kántor S, Jakus R, Balogh B, Benko A, Bagdy G. (2004) Increased wakefulness, motor activity and decreased theta activity after blockade of the 5-HT_{2B} receptor by the subtype-selective antagonist SB-215505. *Br J Pharmacol* 142(8): 1332-1342.

Kantor S, Jakus R, Bodizs R, Halasz P, Bagdy G. (2002) Acute and long-term effects of the 5-HT₂ receptor antagonist ritanserin on EEG power spectra, motor activity, and sleep: changes at the light-dark phase shift. *Brain Res* 943(1): 105-111.

Kantor S, Jakus R, Molnar E, Gyongyosi N, Toth A, Detari L, Bagdy G. (2005) Despite similar anxiolytic potential, the 5-hydroxytryptamine 2C receptor antagonist SB-242084 [6-chloro-5-methyl-1-[2-(2-methylpyrid-3-yloxy)-pyrid-5-yl carbamoyl] indoline] and chlordiazepoxide produced differential effects on electroencephalogram power spectra. *J Pharmacol Exp Ther* 315(2): 921-930.

Katayama Y, DeWitt DS, Becker DP, Hayes RL. (1984) Behavioral evidence for a cholinceptive pontine inhibitory area: descending control of spinal motor output and sensory input. *Brain Res* 296(2): 241-262.

Kaur S, Saxena RN, Mallick BN. (2001) GABAergic neurons in prepositus hypoglossi regulate REM sleep by its action on locus coeruleus in freely moving rats. *Synapse* 42(3): 141-150.

Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI. (1983) Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature* 305(5932): 321-323.

Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, Papp RS, Toth ZE, Bagdy G. (2011) Association between the activation of MCH and orexin immunoreactive neurons and REM sleep architecture during REM rebound after a three day long REM deprivation. *Neurochem Int* 59(5): 686-694.

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

Kodama T, Honda Y. (1996) Acetylcholine releases of mesopontine PGO-on cells in the lateral geniculate nucleus in sleep-waking cycle and serotonergic regulation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20(7): 1213-1227.

Kodama T, Lai YY, Siegel JM. (1998) Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res* 780(1): 176-179.

Kodama T, Takahashi Y, Honda Y. (1990) Enhancement of acetylcholine release during paradoxical sleep in the dorsal tegmental field of the cat brain stem. *Neurosci Lett* 114(3): 277-282.

Kovacs KJ. (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* 20(6): 665-672.

Kovalzon VM, Tsibulsky VL. (1984) REM-sleep deprivation, stress and emotional behavior in rats. *Behav Brain Res* 14(3): 235-245.

Koyama Y, Kayama Y. (1993) Mutual interactions among cholinergic, noradrenergic and serotonergic neurons studied by iontophoresis of these transmitters in rat brainstem nuclei. *Neuroscience* 55(4): 1117-1126.

Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM. (2009) Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 1265: 103-110.

Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Monti JM. (2011) Immunoneutralization of melanin-concentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: effects on sleep and wakefulness. *Brain Res* 1369: 112-118.

Lai YY, Hsieh KC, Nguyen D, Peever J, Siegel JM. (2008) Neurotoxic lesions at the ventral mesopontine junction change sleep time and muscle activity during sleep: an animal model of motor disorders in sleep. *Neuroscience* 154(2): 431-443.

Lai YY, Kodama T, Schenkel E, Siegel JM. (2010) Behavioral response and transmitter release during atonia elicited by medial medullary stimulation. *J Neurophysiol* 104(4): 2024-2033.

Lai YY, Shalita T, Hajnik T, Wu JP, Kuo JS, Chia LG, Siegel JM. (1999) Neurotoxic N-methyl-D-aspartate lesion of the ventral midbrain and mesopontine junction alters sleep-wake organization. *Neuroscience* 90(2): 469-483.

Lai YY, Siegel JM. (1988) Medullary regions mediating atonia. *J Neurosci* 8(12): 4790-4796.

Lai YY, Siegel JM. (1991) Pontomedullary glutamate receptors mediating locomotion and muscle tone suppression. *J Neurosci* 11(9): 2931-2937.

Lavy S, Herishanu Y. (1972) The effect of thoracic spinal cord transection on alertness in cats. *Epilepsia* 13(2): 287-293.

Lee MG, Hassani OK, Jones BE. (2005) Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25(28): 6716-6720.

Leger L, Goutagny R, Sapin E, Salvert D, Fort P, Luppi PH. (2009) Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J Chem Neuroanat* 37(3): 149-157.

Lembo PM, Grazzini E, Cao J, Hubatsch DA, Pelletier M, Hoffert C, St Onge S, Pou C, Labrecque J, Groblewski T, O'Donnell D, Payza K, Ahmad S, Walker P. (1999) The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat Cell Biol* 1(5): 267-271.

Leonard CS, Llinas R. (1994) Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 59(2): 309-330.

Lerma J, Garcia-Austt E. (1985) Hippocampal theta rhythm during paradoxical sleep. Effects of afferent stimuli and phase relationships with phasic events. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 60(1): 46-54.

Li FW, Deurveilher S, Semba K. (2011) Behavioural and neuronal activation after microinjections of AMPA and NMDA into the perifornical lateral hypothalamus in rats. *Behav Brain Res* 224(2): 376-386.

Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN. (2002) Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron* 36(6): 1169-1181.

Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98(3): 365-376.

Lindsley DB, Bowden JW, Magoun HW. (1949) Effect upon the EEG of acute injury to the brain stem activating system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1(4): 475-486.

Liu R, Jolas T, Aghajanian G. (2000) Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 873(1): 34-45.

Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. (2002) Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci* 22(21): 9453-9464.

Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441(7093): 589-594.

Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E. (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107(3): 379-386.

Luebke JI, Greene RW, Semba K, Kamondi A, McCarley RW, Reiner PB. (1992) Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(2): 743-747.

Luppi PH, Clement O, Sapin E, Peyron C, Gervasoni D, Leger L, Fort P. (2011) Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. *Pflugers Arch*

Luppi PH, Gervasoni D, Verret L, Goutagny R, Peyron C, Salvert D, Leger L, Fort P. (2006) Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J Physiol Paris* 100(5-6): 271-283.

Luppi PH, Peyron C, Rampon C, Gervasoni D, Barbagli B, Boissard R, Fort P. Inhibitory Mechanisms in the Dorsal Raphe Nucleus and Locus Coeruleus During

Sleep. In: Lydic, R. and Baghdoyan, H. A. (szerk) Handbook of Behavioral State Control. CRC Press, Boca Raton 1999: 195-211.

Luppi PH, Sakai K, Fort P, Salvert D, Jouvet M. (1988) The nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat nucleus reticularis magnocellularis: a double-labeling study with cholera toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol* 277(1): 1-20.

Luthin DR. (2007) Anti-obesity effects of small molecule melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) antagonists. *Life Sci* 81(6): 423-440.

Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. (2004) Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 1004(1-2): 45-51.

Machado RB, Suchecki D, Tufik S. (2005) Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behav Brain Res* 160(2): 356-364.

Machado RB, Suchecki D, Tufik S. (2006) Comparison of the sleep pattern throughout a protocol of chronic sleep restriction induced by two methods of paradoxical sleep deprivation. *Brain Res Bull* 70(3): 213-220.

Maloney KJ, Mainville L, Jones BE. (1999) Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 19(8): 3057-3072.

Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S. (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 3240-3245.

Matsuzaki M. (1969) Differential effects of sodium butyrate and physostigmine upon the activities of para-sleep in acute brain stem preparations. *Brain Res* 13(2): 247-265.

McCarley RW. (2007) Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med* 8(4): 302-330.

McGinty DJ, Harper RM. (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* 101(3): 569-575.

McGregor R, Damian A, Fabbiani G, Torterolo P, Pose I, Chase M, Morales FR. (2005) Direct hypothalamic innervation of the trigeminal motor nucleus: a retrograde tracer study. *Neuroscience* 136(4): 1073-1081.

Mendez-Andino JL, Wos JA. (2007) MCH-R1 antagonists: what is keeping most research programs away from the clinic? *Drug discovery today* 12(21-22): 972-979.

Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton CM, Yanagisawa M, Sakurai T. (2011) Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J Neurosci* 31(17): 6518-6526.

Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM. (2005) Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* 46(5): 787-798.

Mitler MM, Dement WC. (1974) Cataplectic-like behavior in cats after micro-injections of carbachol in pontine reticular formation. *Brain Res* 68(2): 335-343.

Monti JM, Jantos H. (2005) A study of the brain structures involved in the acute effects of fluoxetine on REM sleep in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol* 8(1): 75-86.

Moreno-Balandran E, Garzon M, Bodalo C, Reinoso-Suarez F, de Andres I. (2008) Sleep-wakefulness effects after microinjections of hypocretin 1 (orexin A) in cholinceptive areas of the cat oral pontine tegmentum. *Eur J Neurosci* 28(2): 331-341.

Mori M, Harada M, Terao Y, Sugo T, Watanabe T, Shimomura Y, Abe M, Shintani Y, Onda H, Nishimura O, Fujino M. (2001) Cloning of a novel G protein-coupled

receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 283(5): 1013-1018.

Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827(1-2): 243-260.

Nauta WJ. (1946) Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study. *J Neurophysiol* 9: 285-316.

Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F. (1979) Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6(4): 305-323.

Neurogen. (2008) NGD-4715 Phase I press release. <http://www.reuters.com/article/2008/01/08/idUS17992+08-Jan-2008+BW20080108>

Nitz D, Siegel J. (1997a) GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2): R451-R455.

Nitz D, Siegel JM. (1996) GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *Am J Physiol* 271(6 Pt 2): R1707-R1712.

Nitz D, Siegel JM. (1997b) GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience* 78(3): 795-801.

Nunez A, Buno W, Reinoso-Suarez F. (1998) Neurotransmitter actions on oral pontine tegmental neurons of the rat: an in vitro study. *Brain Res* 804(1): 144-148.

Onoe H, Sakai K. (1995) Kainate receptors: a novel mechanism in paradoxical (REM) sleep generation. *Neuroreport* 6(2): 353-356.

Pal D, Mallick BN. (2007) Neural mechanism of rapid eye movement sleep generation with reference to REM-OFF neurons in locus coeruleus. *Indian J Med Res* 125(6): 721-739.

Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego 2007

Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E. (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6(9): 991-997.

Peyron C, Sapin E, Leger L, Luppi PH, Fort P. (2009) Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides* 30(11): 2052-2059.

Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18(23): 9996-10015.

Piéron H. *Le Probleme Physiologique du Sommeil*. Masson, Paris 1917

Pissios P, Trombly DJ, Tzamelis I, Maratos-Flier E. (2003) Melanin-concentrating hormone receptor 1 activates extracellular signal-regulated kinase and synergizes with G(s)-coupled pathways. *Endocrinology* 144(8): 3514-3523.

Pollock MS, Mistlberger RE. (2003) Rapid eye movement sleep induction by microinjection of the GABA-A antagonist bicuculline into the dorsal subcoeruleus area of the rat. *Brain Res* 962(1-2): 68-77.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380(6571): 243-247.

Rampin C, Cespuglio R, Chastrette N, Jouvet M. (1991) Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. *Neurosci Lett* 126(2): 113-118.

Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, Wang AH, Picciotto MR, Gao XB. (2008) Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 28(37): 9101-9110.

Rogge G, Jones D, Hubert GW, Lin Y, Kuhar MJ. (2008) CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci* 9(10): 747-758.

Rosin DL, Weston MC, Sevigny CP, Stornetta RL, Guyenet PG. (2003) Hypothalamic orexin (hypocretin) neurons express vesicular glutamate transporters VGLUT1 or VGLUT2. *J Comp Neurol* 465(4): 593-603.

Sailer AW, Sano H, Zeng Z, McDonald TP, Pan J, Pong SS, Feighner SD, Tan CP, Fukami T, Iwaasa H, Hreniuk DL, Morin NR, Sadowski SJ, Ito M, Ito M, Bansal A, Ky B, Figueroa DJ, Jiang Q, Austin CP, MacNeil DJ, Ishihara A, Ihara M, Kanatani A, Van der Ploeg LH, Howard AD, Liu Q. (2001) Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7564-7569.

Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O. (1999) Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* 400(6741): 265-269.

Saito Y, Wang Z, Hagino-Yamagishi K, Civelli O, Kawashima S, Maruyama K. (2001) Endogenous melanin-concentrating hormone receptor SLC-1 in human melanoma SK-MEL-37 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289(1): 44-50.

Sakai K. (2011) Sleep-waking discharge profiles of dorsal raphe nucleus neurons in mice. *Neuroscience* 197: 200-224.

Sakai K, Crochet S, Onoe H. (2001) Pontine structures and mechanisms involved in the generation of paradoxical (REM) sleep. *Arch Ital Biol* 139(1-2): 93-107.

Sakai K, Kanamori N, Jouvet M. (1979) [Neuronal activity specific to paradoxical sleep in the bulbar reticular formation in the unrestrained cat]. *C R Seances Acad Sci D* 289(6): 557-561.

Sakai K, Koyama Y. (1996) Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons? *Neuroreport* 7(15-17): 2449-2453.

Sakai K, Sastre JP, Kanamori N, Jouvet M. State-specific neurones in the ponto-medullary reticular formation with special reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. In: Pompeiano, O. and Marsan, C. A. (szerk) *Brain Mechanisms of Perceptual Awareness and Purposeful Behavior*. Raven Press, New York 1981: 405-429.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92(4): 573-585.

Sakurai T, Mieda M. (2011) Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. *Trends Pharmacol Sci*

Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M. (2005) Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron* 46(2): 297-308.

Sanford LD, Tang X, Xiao J, Ross RJ, Morrison AR. (2003) GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *J Neurophysiol* 90(2): 938-945.

Sanford LD, Tejani-Butt SM, Ross RJ, Morrison AR. (1996) Elicited PGO waves in rats: lack of 5-HT_{1A} inhibition in putative pontine generator region. *Pharmacol Biochem Behav* 53(2): 323-327.

Saper CB, Scammell TE, Lu J. (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437(7063): 1257-1263.

Sapin E, Berod A, Leger L, Herman PA, Luppi PH, Peyron C. (2010) A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS One* 5(7): e11766-

Sapin E, Lapray D, Berod A, Goutagny R, Leger L, Ravassard P, Clement O, Hanriot L, Fort P, Luppi PH. (2009) Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS One* 4(1): e4272-

Sastre JP, Buda C, Kitahama K, Jouvet M. (1996) Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat. *Neuroscience* 74(2): 415-426.

Sastre JP, Buda C, Lin JS, Jouvet M. (2000) Differential c-fos expression in the rhinencephalon and striatum after enhanced sleep-wake states in the cat. *Eur J Neurosci* 12(4): 1397-1410.

Schenkel E, Siegel JM. (1989) REM sleep without atonia after lesions of the medial medulla. *Neurosci Lett* 98(2): 159-165.

Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271(5246): 216-219.

Shibasaki H. (2008) Human brain mapping: hemodynamic response and electrophysiology. *Clin Neurophysiol* 119(4): 731-743.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396(6712): 670-674.

Shimomura Y, Mori M, Sugo T, Ishibashi Y, Abe M, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Sumino Y, Fujino M. (1999) Isolation and identification of melanin-concentrating hormone as the endogenous ligand of the SLC-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 261(3): 622-626.

Shiromani PJ, Fishbein W. (1986) Continuous pontine cholinergic microinfusion via mini-pump induces sustained alterations in rapid eye movement (REM) sleep. *Pharmacol Biochem Behav* 25(6): 1253-1261.

Shouse MN, Siegel JM. (1992) Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res* 571(1): 50-63.

Siegel JM. (1995) Phylogeny and the function of REM sleep. *Behav Brain Res* 69(1-2): 29-34.

Siegel JM. (2005) Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437(7063): 1264-1271.

Siegel JM. (2008) Do all animals sleep? *Trends Neurosci* 31(4): 208-213.

Siegel JM. (2009) The neurobiology of sleep. *Semin Neurol* 29(4): 277-296.

Siegel JM, Nienhuis R, Tomaszewski KS. (1984) REM sleep signs rostral to chronic transections at the pontomedullary junction. *Neurosci Lett* 45(3): 241-246.

Siegel JM, Tomaszewski KS, Nienhuis R. (1986) Behavioral states in the chronic medullary and midpontine cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 63(3): 274-288.

Simon RP, Gershon MD, Brooks DC. (1973) The role of the raphe nuclei in the regulation of ponto-geniculo-occipital wave activity. *Brain Res* 58(2): 313-330.

Skofitsch G, Jacobowitz DM, Zamir N. (1985) Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull* 15(6): 635-649.

Smith DG, Davis RJ, Rorick-Kehn L, Morin M, Witkin JM, McKinzie DL, Nomikos GG, Gehlert DR. (2006) Melanin-concentrating hormone-1 receptor modulates neuroendocrine, behavioral, and corticolimbic neurochemical stress responses in mice. *Neuropsychopharmacology* 31(6): 1135-1145.

Smith DG, Hegde LG, Wolinsky TD, Miller S, Papp M, Ping X, Edwards T, Gerald CP, Craig DA. (2009) The effects of stressful stimuli and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation are reversed by the melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist SNAP 94847 in rodents. *Behav Brain Res* 197(2): 284-291.

Smith MI, Piper DC, Duxon MS, Upton N. (2003) Evidence implicating a role for orexin-1 receptor modulation of paradoxical sleep in the rat. *Neurosci Lett* 341(3): 256-258.

Steininger TL, Gong H, McGinty D, Szymusiak R. (2001) Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. *J Comp Neurol* 429(4): 638-653.

Steriade M. (2006) Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* 137(4): 1087-1106.

Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro Dossi RC. (1990a) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10(8): 2541-2559.

Steriade M, Pare D, Datta S, Oakson G, Curro DR. (1990b) Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves. *J Neurosci* 10(8): 2560-2579.

Strecker RE, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Dauphin LJ, Bjorkum AA, McCarley RW. (1999) Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the pedunculopontine tegmental nucleus: a microdialysis study in freely moving animals. *Sleep Res Online* 2(2): 21-27.

Suchecki D, Duarte PB, Tufik S. (2000) Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Brain Res* 875(1-2): 14-22.

Suchecki D, Lobo LL, Hipolide DC, Tufik S. (1998) Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res* 7(4): 276-281.

Suchecki D, Tufik S. (2000) Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 68(3): 309-316.

Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D. (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 803(1-2): 178-188.

Takahashi K, Koyama Y, Kayama Y, Yamamoto M. (2002) Effects of orexin on the laterodorsal tegmental neurones. *Psychiatry Clin Neurosci* 56(3): 335-336.

Takahashi K, Lin JS, Sakai K. (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci* 26(40): 10292-10298.

Takakusaki K, Takahashi K, Saitoh K, Harada H, Okumura T, Kayama Y, Koyama Y. (2005) Orexinergic projections to the cat midbrain mediate alternation of emotional behavioural states from locomotion to cataplexy. *J Physiol* 568(Pt 3): 1003-1020.

Tan CP, Sano H, Iwaasa H, Pan J, Sailer AW, Hreniuk DL, Feighner SD, Palyha OC, Pong SS, Figueroa DJ, Austin CP, Jiang MM, Yu H, Ito J, Ito M, Ito M, Guan XM, MacNeil DJ, Kanatani A, Van der Ploeg LH, Howard AD. (2002) Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics* 79(6): 785-792.

Thakkar MM. (2011) Histamine in the regulation of wakefulness. *Sleep Med Rev* 15(1): 65-74.

Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM. (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27(3): 469-474.

Tononi G, Pompeiano M, Cirelli C. (1991) Suppression of desynchronized sleep through microinjection of the alpha 2-adrenergic agonist clonidine in the dorsal pontine tegmentum of the cat. *Pflugers Arch* 418(5): 512-518.

Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB. (2003) Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119(4): 1033-1044.

Tortorolo P, Sampogna S, Chase MH. (2009) MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Res* 1268: 76-87.

Tortero P, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. (2006) MCH-containing neurons in the hypothalamus of the cat: searching for a role in the control of sleep and wakefulness. *Brain Res* 1119(1): 101-114.

Tortero P, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. (2000) GABAergic neurons of the cat dorsal raphe nucleus express c-fos during carbachol-induced active sleep. *Brain Res* 884(1--2): 68-76.

Toth ZE, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Varnai P, Mezey E, Makara GB, Palkovits M. (2008) Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain. *J Neurochem* 104(3): 653-666.

Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. (1978) Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 16(2): 98-105.

van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK. (2004) Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron* 42(4): 635-652.

van Hulzen ZJ, Coenen AM. (1981) Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. *Physiol Behav* 27(4): 741-744.

van Luijckelaar EL, Coenen AM. (1986) Electrophysiological evaluation of three paradoxical sleep deprivation techniques in rats. *Physiol Behav* 36(4): 603-609.

Vanini G, Tortero P, McGregor R, Chase MH, Morales FR. (2007) GABAergic processes in the mesencephalic tegmentum modulate the occurrence of active (rapid eye movement) sleep in guinea pigs. *Neuroscience* 145(3): 1157-1167.

Vanni-Mercier G, Sakai K, Jouvet M. (1984) [Specific neurons for wakefulness in the posterior hypothalamus in the cat]. *C R Acad Sci III* 298(7): 195-200.

Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M. (1989) Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol* 127(3): 133-164.

Velazquez-Moctezuma J, Gillin JC, Shiromani PJ. (1989) Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res* 503(1): 128-131.

Verret L, Fort P, Gervasoni D, Leger L, Luppi PH. (2006) Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol* 495(5): 573-586.

Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH. (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 4: 19-

Verret L, Leger L, Fort P, Luppi PH. (2005) Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* 21(9): 2488-2504.

Villablanca J, Riobo F. (1970) Electroencephalographic and behavioral effects of harmaline in intact cats and in cats with chronic mesencephalic transection. *Psychopharmacologia* 17(4): 302-313.

Vyazovskiy VV, Achermann P, Tobler I. (2007) Sleep homeostasis in the rat in the light and dark period. *Brain Res Bull* 74(1-3): 37-44.

Webster HH, Jones BE. (1988) Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* 458(2): 285-302.

Willie JT, Sinton CM, Maratos-Flier E, Yanagisawa M. (2008) Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. *Neuroscience* 156(4): 819-829.

Wu MF, Siegel JM. (1990) Facilitation of the acoustic startle reflex by pontogeniculo-occipital waves: effects of PCPA. *Brain Res* 532(1-2): 237-241.

Xi MC, Morales FR, Chase MH. (1999) Evidence that wakefulness and REM sleep are controlled by a GABAergic pontine mechanism. *J Neurophysiol* 82(4): 2015-2019.

Xi MC, Morales FR, Chase MH. (2001a) Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res* 901(1-2): 259-264.

Xi MC, Morales FR, Chase MH. (2001b) The motor inhibitory system operating during active sleep is tonically suppressed by GABAergic mechanisms during other states. *J Neurophysiol* 86(4): 1908-1915.

Xi MC, Morales FR, Chase MH. (2004) Interactions between GABAergic and cholinergic processes in the nucleus pontis oralis: neuronal mechanisms controlling active (rapid eye movement) sleep and wakefulness. *J Neurosci* 24(47): 10670-10678.

Xie X, Crowder TL, Yamanaka A, Morairty SR, Lewinter RD, Sakurai T, Kilduff TS. (2006) GABA(B) receptor-mediated modulation of hypocretin/orexin neurones in mouse hypothalamus. *J Physiol* 574(Pt 2): 399-414.

Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. (2003a) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38(5): 701-713.

Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T. (2006) Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol* 96(1): 284-298.

Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. (2003b) Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun* 303(1): 120-129.

Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K. (1999) Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 849(1-2): 248-252.

Yamanaka A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Fukazawa Y, Tominaga M. (2010) Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci* 30(38): 12642-12652.

Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T. (2002) Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 290(4): 1237-1245.

Yoshida K, McCormack S, Espana RA, Crocker A, Scammell TE. (2006) Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 494(5): 845-861.

Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K. (2003) Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *Journal of pharmacological sciences* 92(3): 259-266.

11 Saját publikációk jegyzéke

11.1 Értekezéshez kapcsolódó publikációk

Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, Papp RS, Toth ZE, Bagdy G. (2011) Association between the activation of MCH and orexin immunoreactive neurons and REM sleep architecture during REM rebound after a three day long REM deprivation. *Neurochem Int* 59(5): 686-694.

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

11.2 Értekezéshez nem kapcsolódó publikációk

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

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

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

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

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

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

12 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani témavezetőmnek, Dr. Bagdy Györgynek, szerzőtársaimnak, Dr. Ádori Csabának, Kátai Zitának, Molnár Eszternek, Pap Dorottyanak, Papp Rege Sugárkának, Dr. Tóth Zsuzsannának és Vas Szilviának a munkámhoz nyújtott segítségért, valamint családomnak.