

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A cirkadián és homeosztatikus tényezők
alvás-ébrenlétre kifejtett hatásának
vizsgálata különböző fény–sötét körülmények
között tartott patkányokban**

OTDK Dolgozat

Készítette:
Szalontai Örs

Témavezető:

Dr. Hajnik Tünde, tanársegéd
Élettani és Neurobiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	2
1. Irodalmi összefoglaló.....	4
1.1 Az EEG.....	4
1.2 Az alvás fenomenológiája	5
1.3 Az alvás funkciója	6
1.4 Az alvás szabályozása	7
2. Célkitűzés.....	10
3. Anyag és módszer	11
3.1. Állatok	11
3.1 Elektrodok	11
3.2 Műtét.....	11
3.3 Kísérlet.....	12
3.4 Adatok kiértékelése	12
4. Eredmények	14
5. Diskusszió	23
6. Köszönetnyilvánítás	29
7. Irodalomjegyzék	30

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AW – active wakefulness

DP – delta power, delta-teljesítmény

DP/DS-idő – egységnyi mélyalvásra jutó delta-teljesítmény

DS – deep sleep, mélyalvás

EEG – elektroencephalogram

LD1:1 – 1-1 órás fény-sötét körülmények

LD12:12 – természetes, 12-12 órás fény-sötét körülmények

LS – light sleep, felületes alvás

PS – paradoxical sleep, paradox alvás

QW – quiet wakefulness

REM – Rapid Eye Movement, paradox alvás

SCN – nucleus suprachiasmaticus

VLPO – ventrolateralis preopticus area

1. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Az alvás az egyik legjellemzőbb példája a biológiai ritmusoknak. Sokféle hipotézis született már arról, hogy mi az alvás pontos funkciója, ellenben a mai napig nem sikerült ezeket tökéletesen igazolni. Azonban megállapítható, hogy az alvás létszükséglet. Az alvásdeprivációs kísérletek bebizonyították, hogy hosszabb idejű alvásmegvonás halálhoz vezet (Rechtschaffen et al., 1989).

1.1 Az EEG

Az agykéregről, illetve a hajas fejbőről elvezethető néhány μV -os EEG jelek 1 és 200 Hz közötti tartományba esnek. A kérgi piramissejtek dendritjei és sejttestjei apró dipólusokat alkotnak, mert a szinaptikus aktivitás következtében közöttük potenciálkülönbség alakul ki. Egyetlen piramissejt által képzett dipólus még nem elegendő ahhoz, hogy az elektroencefalográf jelet észleljen, azonban az agykéreg funkcionális egységeiben, az agykérgi kolumnákban található mintegy 10000 szabályosan rendezett irányultságú piramissejt együttes aktivitása már elegendően nagy jelet hoz létre. A dipólusok közül, csak azokat tudjuk EEG–vel mérni, melyek a koponya felszínére merőlegesek, az ezzel ellentétes irányultságú jelek az EEG számára „láthatatlanok”.

A következő táblázat foglalja össze az emberi EEG különböző jeleinek konvencionális frekvenciatartományait:

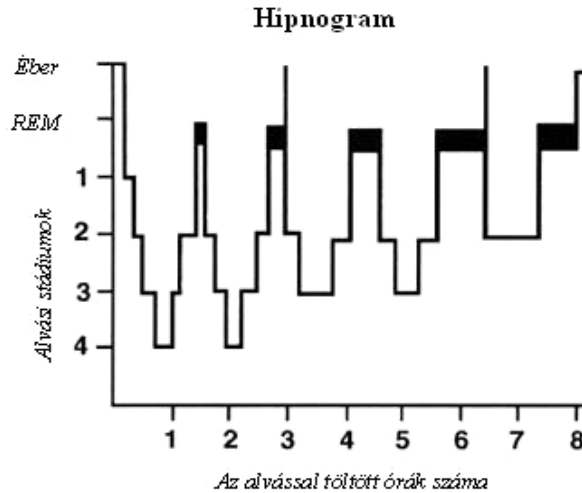
Gamma (γ)	> 35 Hz
Béta (β)	13–35 Hz
Alfa (α)	8–13 Hz
Théta: (θ)	4–8 Hz
Delta (δ)	1–4 Hz
Lassú kérgi ritmus	<1 Hz

1. táblázat
Az EEG jelek frekvenciatartományai (Miller and O'Callaghan, 2006)

Emberben aktív ébrenléténél a gamma és a béta, nyugodt ébrenléténél, illetve csukott szemnél az alfa, az alvás mélyülésével pedig a delta hullámok lesznek dominánsak. A delta hullámok és a lassú kérgi ritmus a mély alvás tipikus jellemzői. A REM fázisban embernél a béta, míg patkánynál főképp théta jeleket mérhetünk. Embernél a théta ritmus ritkán figyelhető meg, gyermekeknél azonban fiziológiásan is előfordulhat.

1.2 AZ ALVÁS FENOMENOLÓGIÁJA

Az alvás alapvetően két stádiumra bontható: lassú hullámú alvásra és REM-re (Halász, P,1982). A két szakasz az alvás során felváltva, szabályos időközönként követi egymást. A lassú hullámú alvás (SWS, slow wave sleep vagy NREM, non-REM) emberben további 4 szakaszra tagolható. A szendergést (NREM1) az alfa hullámok arányának fokozatos csökkenése jellemzi, az ébrenléttől való elhatárolása nehéz. A felületes alvás (NREM2) kezdetét az alfa orsók és K komplexet megjelenése egyértelműen jelzi. A mélyalvás (NREM3 és 4) a delta hullámok folyamatos jelenlétével jellemezhető. A REM stádium nevét a megfigyelhető gyors szemmozgásokról kapta (**R**apid **E**ye **M**ovement), azonban gyakran hívják paradox alvásnak is, hiszen az EEG-n az ébrenlétre jellemző nagyfrekvenciás, kis amplitúdójú béta aktivitás látható, holott a vizsgált alany biztosan alszik. A patkányoknál általában csak 3 különböző alvásfázist különböztetünk meg: felületes és mélyalvást valamint REM fázist (Siegel, 2004). Az NREM–REM párokat egy alvási ciklusnak tekintjük, melynek hossza viszonylag állandó, emberekben 70–90 perc (1. ábra), patkányoknál kb. 10–15 perc. Fontos megemlíteni, hogy a patkányok policiklusos és éjjeli állatok, azaz főképp világosban alszanak és egy nap többször is nyugovóra térnek.



1. ábra
Egy tipikus humán hipnogram, mely az alvási stádiumok ultradián ciklusát illusztrálja egy 8 órás alvás
folyamán [Siegel után módosítva,(Siegel, 2004)]

1.3 AZ ALVÁS FUNKCIÓJA

Az alvás funkcióit illetően vannak evolúciós és homeosztatisz hipotézisek. Az evolúciós hipotézisek egyike az agy ontogenezisét és alvás mennyiségét hozta egymással összefüggésbe. A kísérletekből az derült ki, hogy a fejlődő emlősfaj az ébrenlétre akkor válik képessé, ha a fejlődésének bizonyos szakaszába ért (Nicolau et al., 2000). Mások szerint azonban az összefüggés fordított irányú, miszerint az agy fejlődéséhez az alvás elengedhetetlen (Roffwarg et al., 1966, Halász, 1982).

Az alvás homeosztatisz szükségességét számos kísérlet igazolja. Az immunrendszer megfelelő működéséhez is elengedhetetlen a kellő mennyiségű alvás (Siegel, 2004). Továbbá a memória konszolidáció (Spiegel et al., 2002), a hőháztartás fenntartása (Nakao et al., 1995), a motoros rendszer aktivitásának megőrzése (Jouvet, 1998), az öröklött mozgásmintázatok fenntartása azok kivitelezése nélkül, ritka, adaptív funkciók megőrzése (Kavanau, 1999) és a nem kívánt szinaptikus kapcsolatok “törlése” (Crick and Mitchison, 1983, Benington, 2000) mind – mind lehetséges alvásfunkció.

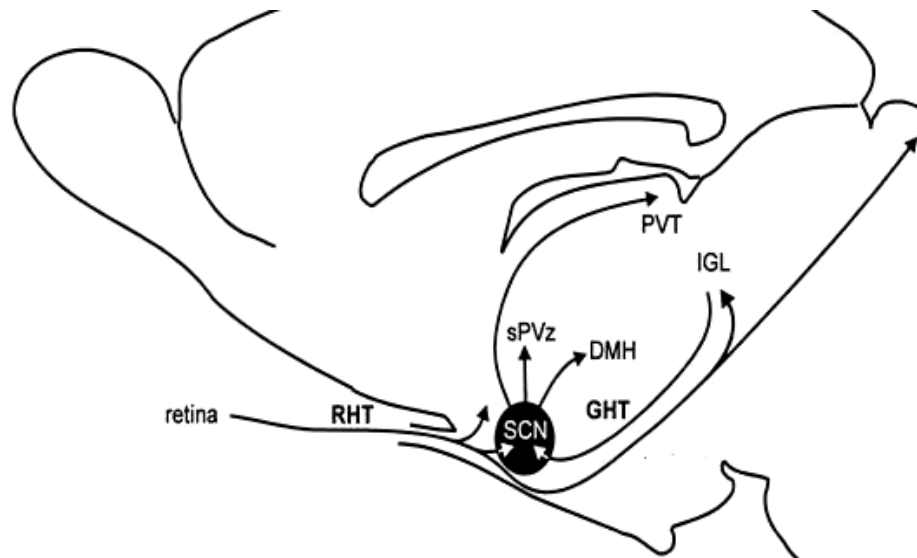
1.4 AZ ALVÁS SZABÁLYOZÁSA

Az alvás szabályozásában homeosztatikus és cirkadián tényezők egyaránt szerepet játszanak.

A homeosztatikus szabályozást a legjobban az alvásmegvonást követő megnövekedett alvásigény bizonyítja. Az alváskutatás korai szakaszában azt feltételezték, hogy létezik egy ún. „hypnotoxin”, melynek a mennyisége ébrenlét alatt növekszik, mennyisége arányos az alvás iránti igénnyel, felhalmozódása egy adott ponton az alvás bekövetkezéséhez vezet, végül alvás alatt mennyisége csökken. Kezdetben a melatoninról hitték, hogy a termelődése alvást vált ki, ez azonban nem teljesen igaz (Claustrat et al., 2005). Piéron 1913-ban alvásdeprivált kutyák liquorját oltotta nem alváshiányos állatok agykamrájába és ez a cerebrospinalis folyadék azonnal elaltatta a beoltott állatokat (Piéron, 1913). Sajnos „univerzális alvásfaktort” nem sikerült azonosítani, bár számos anyagról kiderült, hogy szerepet játszanak az alvás szabályozásában, és az alvást serkenti: pl. DSIP (delta sleep-inducing peptid), uridin, oxidált glutation, muramil peptidek, interleukin-1 (IL-1), tumor-nekrózis faktor (TNF) (Obal and Krueger, 2003). Ezen anyagokat nevezzük általánosan alvásfaktoroknak.

A tartós alvásmegvonásnak igen súlyos következményei lehetnek. Patkányokon végzett kísérletekből kiderül, hogy az alváshiány miatt az állatoknak 80-100% -kal megnő a táplálékigényük, ennek ellenére testsúlyuk folyamatosan csökken. Ennek az ellentmondó élettani folyamatnak legfőbb oka a hypothermia. Sajnos az alvásdeprivációs kísérletek eredményeinél nem egyértelműek az ok-okozati összefüggések, hiszen nehéz kiszűrni a tünetek közül, melyeket okozta csak az alvásmegvonás illetve melyeket egyéb stresszorok (Benington, 2000, Siegel, 2004).

Az alvás sok más élettani folyamathoz hasonlóan 24 órás, azaz cirkadián szerveződésű. A napi ritmusok legfőbb modulátora a látóideg-keresztveződtől dorsalisán elhelyezkedő nucleus suprachiasmaticus (SCN) (2. ábra).



2. ábra

Az SCN afferensei és efferensei [van Esseveldt és mtsai. nyomán (van Esseveldt et al., 2000), módosítva] (RHT: reticulo–hypothalamicus tractus; sPVz: subparaventricularis zóna; PVT: nucleus paraventricularis thalami; DMH: nucleus dorsomedialis hypothalami; GHT: geniculo–hypothalamicus tractus; IGL: „intergeniculate leaflet”; SCN: nucleus suprachiasmaticus)

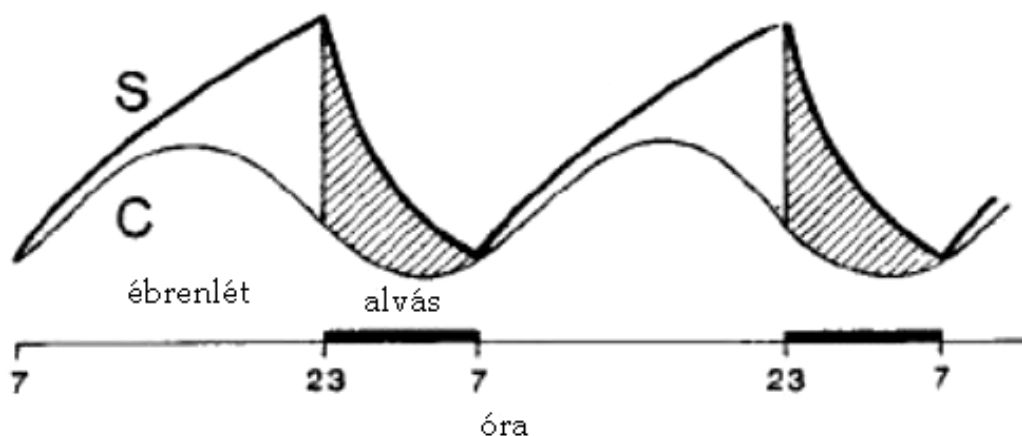
A nucleus suprachiasmaticus morfológiailag két alstruktúrára különíthető: magra (core) és héjra (shell). A két struktúra egymással igen szoros kapcsolatban van, ellenben működésük és neuropeptidtartalmuk különböző. Az egyedi SCN neuronok *in vitro* is cirkadián ritmusú elektromos aktivitást mutatnak. A két terület szinaptikus kapcsolatrendszere még nem tökéletesen felderített, de ez a bonyolult szisztéma az élőlények ritmikus magatartási eleminek szabályozásához elengedhetetlen (van Esseveldt et al., 2000).

Az SCN fő szabályozó jele (‘‘Zeitgeber’’-e) a fény. Alacsonyabb rendű gerincesekben a tobozmirigy is fényérzékeny, így ez is közvetlen hatással lehet a napi ritmusra (Underwood and Groos, 1982). Azonban az emlősöknél fény a központi idegrendszert egyetlen módon, a retinán keresztül éri el. A retina melanopszin tartalmú ganglionsejtjei az SCN-be vetülve meghatározzák a mag cirkadián ritmusának fázisát (Panda et al., 2002, Ruby et al., 2002). A fény-sötét szakaszok váltakozása az SCN-en keresztül tudja kifejteni hatását az élőlények alvás-ébrenléti ciklusára. Az SCN az alvás-ébrenlét mellett számos más fiziológiai folyamat napi ritmusáért felel (van Esseveldt et al., 2000). Szabályozza egyes hormonok (melatonin, prolaktin, cortisol) napi koncentrációingadozásait, és a magatartási folyamatok napi ciklusosságát is, mint például a patkányok ivási és táplálkozási ritmusát (Card et al., 1988, van Esseveldt et al., 2000).

A fénynek napi ritmuson túlmenően, közvetlen hatása is van a viselkedésre. A retina melanopszin tartalmú ganglionsejtjei az SCN-t kikerülve közvetlenül is vetülnek az alvás-ébrenlét szabályozásában szereplő agyi területekre (Lockley et al., 2006, Altimus et al., 2008, Tsai et al., 2009) így közvetlen hatással lehetnek az alvás-ébrenléti ritmusra. Egészséges egerekben a fényimpulzusok alvást váltanak ki az állat sötét periódusában, illetve a sötét-hatás az állat világos periódusában ébredést eredményez. Ezzel szemben mutáns, hibás melanopszinnal rendelkező állatokban ez a hatás nem, vagy csak jelentős késéssel figyelhető meg ((Lockley et al., 2006, Altimus et al., 2008, Tsai et al., 2009).

A normál napi ritmus hirtelen megváltozása jelentős hatással van az élőlényekre, amit remekül megfigyelhetünk az ún. „jet lag” szindróma folyamán. A „jet lag” jelenségét akkor tapasztalhatjuk, ha időzónákat átívelő repülőutat teszünk meg kelet-nyugat irányban. Yamazaki és mtsai. szerint a korábban említett két SCN alterület (mag, héj) eltérő sebességgel alkalmazkodik az új fény-sötét körülményekhez, és ez okozhatja az ideiglenes deszinkronizációt. Megfigyelték továbbá, hogy az SCN és más agyi területek közötti „válaszidő” is eltérő és ez is oka lehet a deszinkronitásnak (Yamazaki et al., 2000, Nagano et al., 2003).

A homeosztatis és cirkadián tényezők együttes hatását legtömörebben a Borbély-féle „two-process modell” foglalja össze (3. ábra). A modell szerint van egy homeosztatis folyamat (S, sleep drive) és van egy cirkadián folyamat (C) és ezek együttesen határozzák meg az ébredési és elalvási időpontot (Borbely and Achermann, 1999). A homeosztatis alvási „nyomás” (S) ébrenlét alatt növekszik, alvás alatt pedig értéke csökken. A cirkadián folyamat pedig az S-től függetlenül szabályozza az alvási hajlandóságot. Ha az S folyamat elér egy felső küszöböt, akkor bekövetkezik az alvás. Az alvás végére S elér egy alsó határt, ekkor a vizsgált alany felébred. Az S folyamat jelzi tehát az alvás szükségességét, míg a határokat a cirkadián folyamat modulálja.



3. ábra
A „two process modell”
[Borbély után (Borbely and Achermann, 1999), módosítva.]

2. CÉLKITŰZÉS

A homeosztatis és cirkadián tényezők együttesen szabályozzák az alvás-ébrenléti ciklust. Az alvásdeprivációt követően az állatok alvásiigénye megnő, amire nemcsak a megvonást követő hosszabb alvásidőből, hanem a megnövekedett delta-teljesítményből (delta-power, DP) is következtethetünk. A megnövekedett DP tehát a homeosztatis nyomás erősségét jellemzi. A cirkadián nyomást legjobban a természetes alvás illetve a pótlás 24 órás eloszlása jellemzi (Borbely and Achermann, 1999). A cirkadián ritmus – normál körülmények között – a fény-sötét váltakozáshoz igazodik. Kísérletünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a fény sötét szakaszok gyors (LD1:1) váltakozása milyen mértékben zavarja meg a napi ritmust, illetve a deprivációt követően az alvás- és aktivitási mintázat hogyan fog alakulni a megváltozott helyzetben. Kísérletünk során tehát a fénynek a homeosztatis alvásszabályozásra vonatkozó közvetlen, illetve a biológiai órán keresztül megvalósuló közvetett szerepét vizsgáltuk, illetve hogy a kétféle szabályozási út hogyan viszonyul egymáshoz.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1.ÁLLATOK

Kísérletünkben hím Wistar patkányokat használtunk (n=5), tömegük 260–290 gramm között változott. Az állatokat plexihengerben tartottunk, hangszigetelt szobában, 21°C-os hőmérsékleten. Megfelelő mennyiségű és minőségű táplálék és víz folyamatosan rendelkezésükre állt. A vizsgálat megkezdése előtt a patkányok egy hétig voltak az 1–1 órás fény-sötét periódushoz szoktatva. Az első sötét szakasz 9:00–kor kezdődött, míg az első világos szakasz 10:00–kor. Az állatok almozása a fényszakaszokban történt, ezáltal nem zavartuk meg az LD1:1 körülményeket.

3.1 ELEKTRÓDOK

Az EEG regisztrálásához rozsdamentes, acél csavarelektrodokat használtunk. Az izomelektrodok műanyag szigetelésű, 250 µm átmérőjű acélhuzalok voltak, ezeket a nyakizomba tettük. Az EEG elektrodokat úgy helyeztük el, hogy a dura mater-hez épp hozzáérjenek.

3.2 MŰTÉT

Az altatáshoz ketamin – xylazin keveréket használtunk. Az állat tömegével arányosan az altató 80 ml/testsúlykg ketamint és 10 ml/testsúlykg xylazint tartalmazott, és ezt intraperitoneálisan adtuk be. Az állat testhőmérsékletének fenntartása érdekében melegítőpadon végeztük el az elektrodák beültetését. A koponya megtisztítása után a csavarelektrodokat a következő pozíciókban helyeztük el: Frontalis elektrodok: a bregmától anterior 2,00 mm, laterálisan 2,00 mm, mindkét oldalon; Occipitalis elektrodok: a bregmától posterior 4,50 mm, laterálisan 2,00 mm, mindkét oldalon; Referencia elektrodok: az állatok homlokürege és kisagya felett. Az elektrodokat elhelyezésük után IC csatlakozóhoz forrasztottuk, majd fogászati cementtel rögzítettük az állat koponyájához. A műtét után egy hét felépülési időt hagytunk az állatoknak.

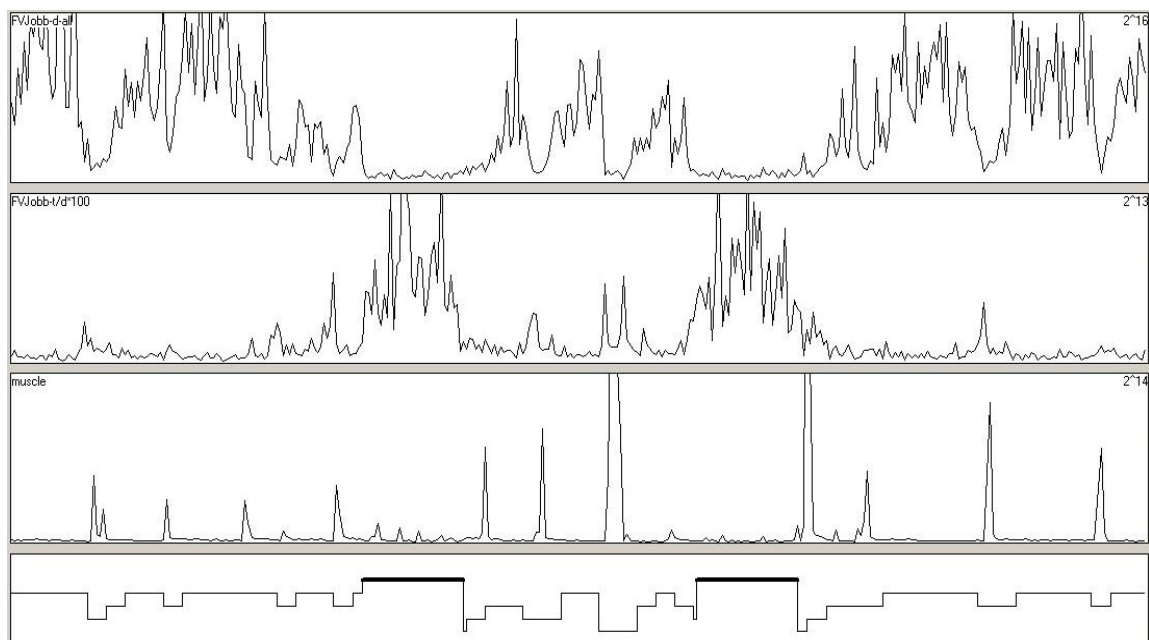
3.3 KÍSÉRLET

A műtét előtti hetekben az állatok normál fény-sötét szakaszt (light-dark conditions, 12–12 hour [LD(12:12)], azaz 12 órát sötétben és 12 órát világosban) biztosító teremben voltak elhelyezve. A műtét után az állatokat 1–1 órás fény-sötét körülmények [LD(1:1)] közé helyeztük. Az egy hetes felépülési és hozzászokási idő eltelte után 24 órás kontrollfelvételt készítettünk. A kontroll felvétel 9:00-kor kezdődött, sötét szakaszban. A deprivációt pár nappal a kontrollmérés után végeztük el. A 6 órás depriváció szintén 9:00–kor kezdődött, azaz sötét szakaszban. A deprivációt a „gentle handling” módszerével hajtottuk végre, azaz nem megszokott táplálékok, más állattól származó alom elhelyezése, vagy számukra „érdekes játékok” elhelyezésével tartottuk őket ébren. Mikor ezek a módszerek már nem voltak elég hatékonyak, akkor finom zörgetéssel, simogatással történt a depriváció. Az ezt követő pótlási (recovery) fázist 18 órán keresztül regisztráltuk. Az EEG és EMG jeleket 500–szoros erősítés és szűrés után (0,3 Hz – 1 KHz) analóg-digitál kártyán keresztül a számítógépen a LabView nevű programmal rögzítettük.

3.4 ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

A mérés során készült fájlokat házilag készített szoftver segítségével elemeztük. Először Fast-Fourier analízist hajtottunk végre, melynek során 4 másodperces EEG szakaszok teljesítmény-spektrumát határoztuk meg a delta, theta, alfa és béta frekvenciasávokban. Az adatokat nagyobb felbontásban is elemeztük, 1 Hz illetve 2 Hz-es tartományokra bontva.

Az alvás – ébrenléti fázisok meghatározása a delta teljesítmény, a theta/delta arány és az izomvariancia adatok alapján történt. Az elemzés alkalmával először a paradox alvási szakaszokat jelöltük be manuálisan, alacsony DP, magas theta/delta arány és alacsony izomaktivitás esetén (4. ábra). A többi ébrenléti–alvási fázist a szoftver automatikusan osztotta be 25, 50 és 75%-os DP-limitek alapján, az így kapott hipnogramban tehát megkülönböztettünk aktív ébrenlétet (active wakefulness, AW), nyugodt ébrenlétet (quiet wakefulness, QW), felületes alvást (light sleep, LS), mélyalvást (deep sleep, DS) és paradox alvást (paradoxical sleep, PS).



4. ábra

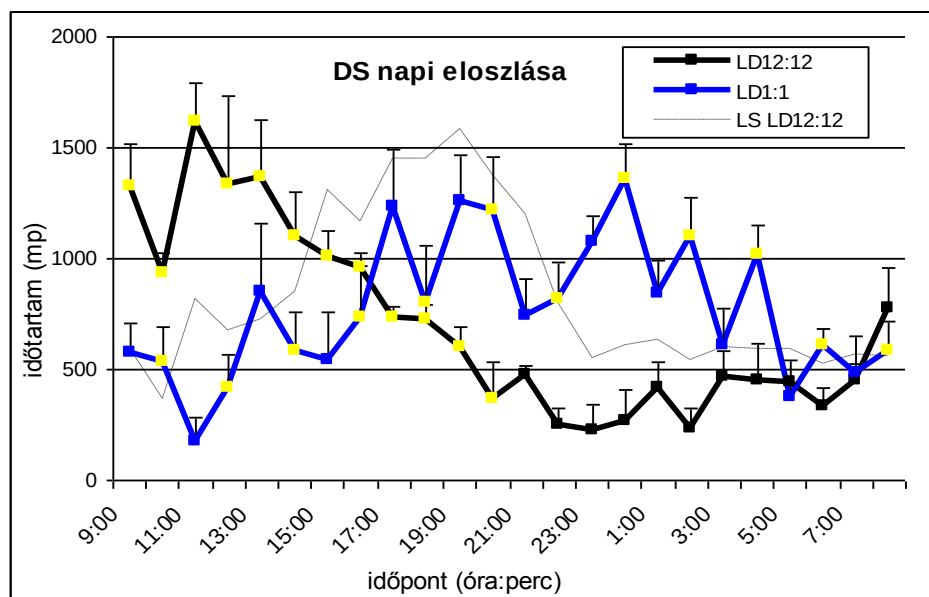
Hipnogram készítése. 1. sor: delta teljesítmény; 2. sor: θ /delta teljesítmény aránya;
3. sor: izomvariancia; 4. sor: hipnogram

A különböző fázisokban töltött időt és a különböző frekvenciasávok teljesítményértékeit egy órás bontásban összegeztük, az adatsorokat Excel táblázatba helyeztük, a teljesítményértékeket állatonként normalizáltuk, átlagot és szórást számítottunk, és statisztikai elemzéseket (ANOVA split-plot, ill. kétmintás t próba) végeztünk rajtuk.

Célkitűzéseink közé tartozott, hogy a rövid fény-sötét periódusban tartott állatok kontroll és deprivációs méréseiből származó adatokat nem csak egymással, hanem normál fény-sötét viszonyok (LD12:12) között tartott állatok megfelelő adataival is összevetjük. Ehhez egy a laborunkban korábban végrehajtott deprivációs kísérlet adatait használtuk fel. Ebben a korábbi kísérletben részt vett állatok a mostanihoz hasonlóan voltak műtve, és a regisztráció egyéb körülményei (erősítés, szűrés stb.) is azonosak voltak, egyedül a fény-sötét periódusuk volt eltérő. A depriváció ebben a kísérletben a fényszakasz első felében történt (a mostani kísérletünkhöz hasonlóan 9–15 óra között).

4. EREDMÉNYEK

[1.] Az egy hetes hozzászokási periódus alatt az állatok alvás – ébrenléti ritmusa nem veszítette le cirkadián jellegét, ellenben a napi ritmus eltolódott 7–8 órával (5. ábra).

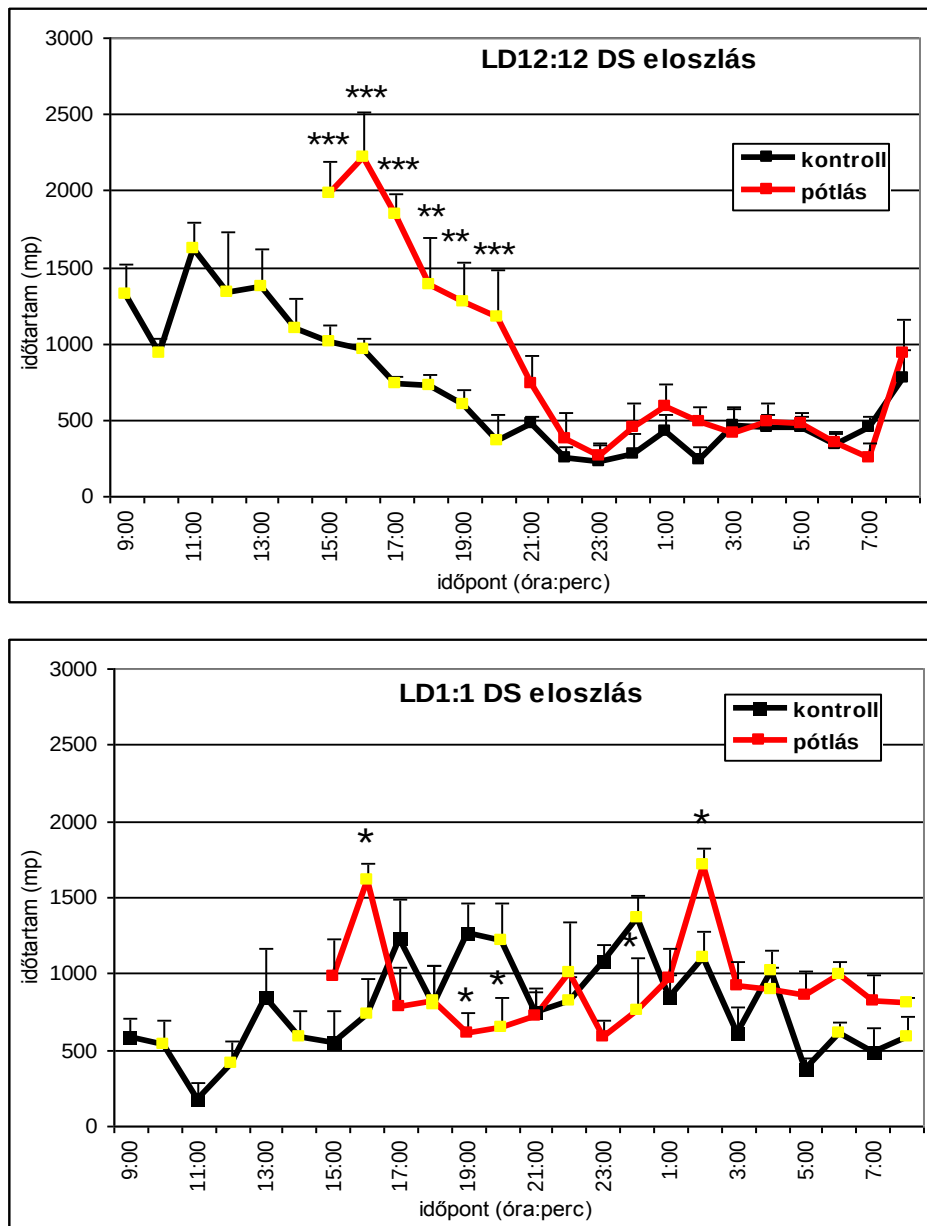


5. ábra

LD12:12 és LD1:1 tartott állatok mélyalvásának napi eloszlása. A sárga négyzetek jelölik a világos órákat. A szaggatott fekete vonal az LD12:12 körülmények között tartott állatok felületes alvásának napi eloszlását mutatja. Jól látható, hogy a fényszakasz elején a mélyalvás, végén a felületes alvás dominál, valamint, hogy egyheti LD1:1 körülmények hatására a napi ritmus eltolódott.

[2.] A napi ritmus eltolódása miatt a kísérletünk során megvalósított depriváció az állatok aktív periódusára esett. Ennek következtében jelentős pótlás sem figyelhető meg – szemben a LD12:12 között tartott és a nyugalmi periódusuk alatt deprivált állatokkal (6-7. ábra).

Az alvás– ébrenlét napi ritmusát viszont megzavartuk, az állatok a nap további részében is aktívabbak voltak. A mélyalvás hossza mindössze két órában (a pótlás 2. és 12. órájában) volt szignifikánsan a kontrol érték fölött, mindkét időszak a világos órák közé tartozott. Az egységnyi alvásidőre eső delta teljesítmény egyetlen órában sem mutatott szignifikáns eltérést.

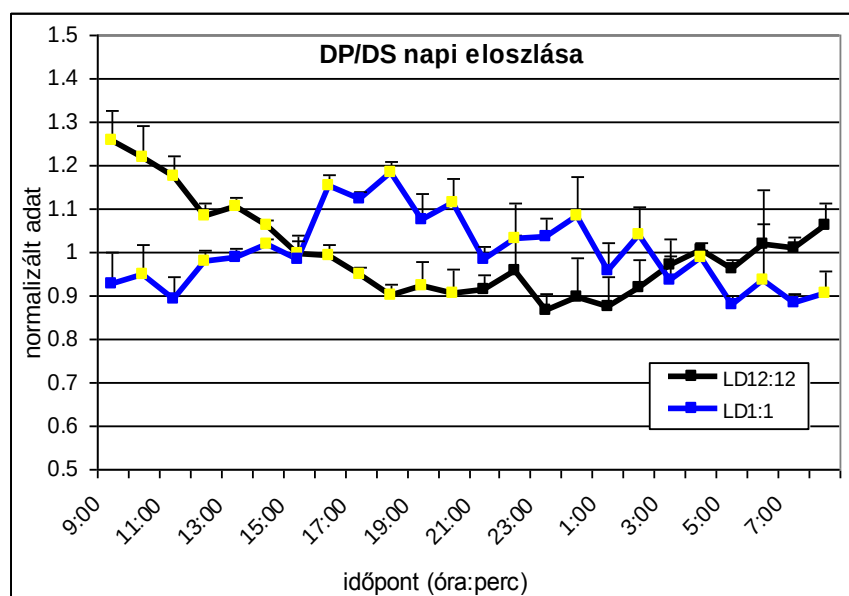


6-7. ábra

LD12:12 és LD1:1 tartott állatok mélyalvásának napi eloszlása kontroll körülmények között, illetve deprivációt követően. A felső oldali ábra az LD12:12, az alsó ábra az LD1:1 körülmények között tartott állatok adatait tartalmazza. A sárga négyzetek jelölik a világos órákat. Egyértelmű pótlás csak az LD12:12 esetében figyelhető meg.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

[3.] Az alvás-ébrenlét cirkadián jellege nemcsak a mélyalvás hosszában, hanem az egységnyi mélyalvásra eső delta teljesítmény értékében is megmutatkozott (8. ábra). Ennek napi eloszlása a mélyalváshoz hasonló, maximumát a nyugalmi, minimumát az aktív szakasz elején éri el. A világos órákban mindig nagyobb volt a DP/DS, mint az azt megelőző sötét órában.



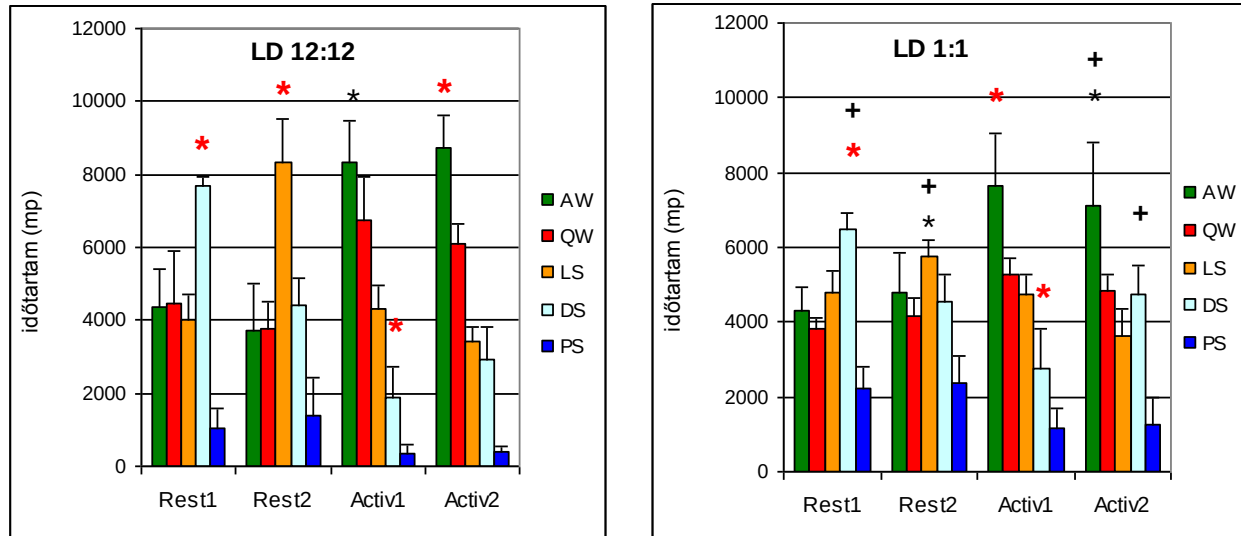
8. ábra

LD12:12 és LD1:1 tartott állatok egységnyi mélyalvás-hosszra eső delta teljesítményének napi eloszlása. A sárga négyzetek jelölik a világos órákat. Jól látható, hogy az LD1:1 körülmények között tartott állatok esetében a delta teljesítmény változásának cirkadián periódusára ultradián periódus tevődik: a világos órákban mindig nagyobb a delta teljesítmény, mint a megelőző sötét órában.

[4.] Az LD12:12 között tartott állatok napi ritmusa a 12 órás nyugalmi (fény) és 12 órás aktív (sötét) szakaszon belül tovább osztható. A nyugalmi periódusok első felében (rest1) a mélyalvás, második felében (rest2) a felületes alvás dominál. Az aktív periódus első felében a mélyalvás minimum értéke körül mozog (activ1), majd elkezd lassan nőni (activ2). Ugyanezek a fázisok az LD1:1 között tartott állatok esetében is elkülöníthetőek voltak, de az adott szakaszokra jellemző fáziseloszlások „tompultak”. Például a rest1-es szakaszban a mélyalvás időtartama szignifikánsan magasabb volt bármelyik egyéb fázishoz képest, mind LD12:12, mind LD1:1 között tartott állatok esetében, de LD1:1 – ben ez az időtartam mégis szignifikánsan kisebbnek adódott, mint LD12:12 – ben (9-10. ábra).

[5.] Az alvás-ébrenlét fázisai közül egyedül a felületes alvás esetében kaptunk szignifikáns eltérést a világos és sötét szakaszok között, a többi fázis hossza nem függött szignifikánsan a fény jelenlététől (11-12. ábra). A paradox alvás LD1:1 esetében sötétben volt gyakoribb, míg LD12:12 esetében világosban – bár ez utóbbi különbség nem volt szignifikáns.

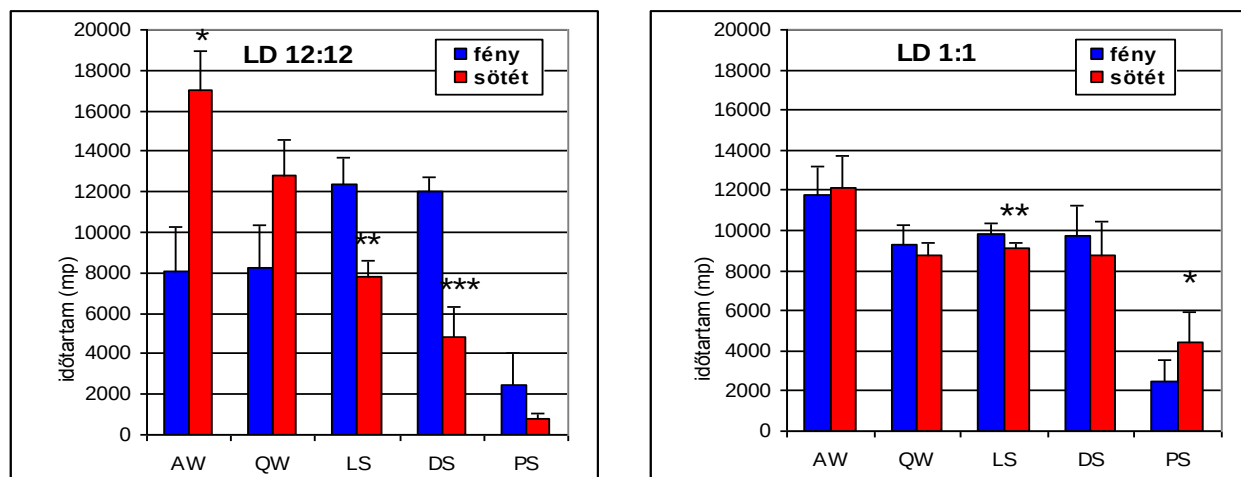
A paradox alvási szakaszok többsége nem csak áttevődött a sötét órákra, hanem abszolút mennyiségében is növekedett az LD12:12 körülmények között tartott állatokéhoz képest (13-14. ábra).



9-10. ábra

Az alvás-ébrenléti fázisok eloszlása 6 órás bontásban. A bal oldali ábra az LD12:12 a jobb oldali az LD1:1 körülmények között tartott állatok adatait tartalmazza. *: szignifikánsan eltér a többi alvási fázis értékétől; *: egyetlen fázis kivételével szignifikánsan eltér a többi alvási fázis értékétől; +: szignifikáns eltérés az LD1:1 és LD12:12 megfelelő adatai között.

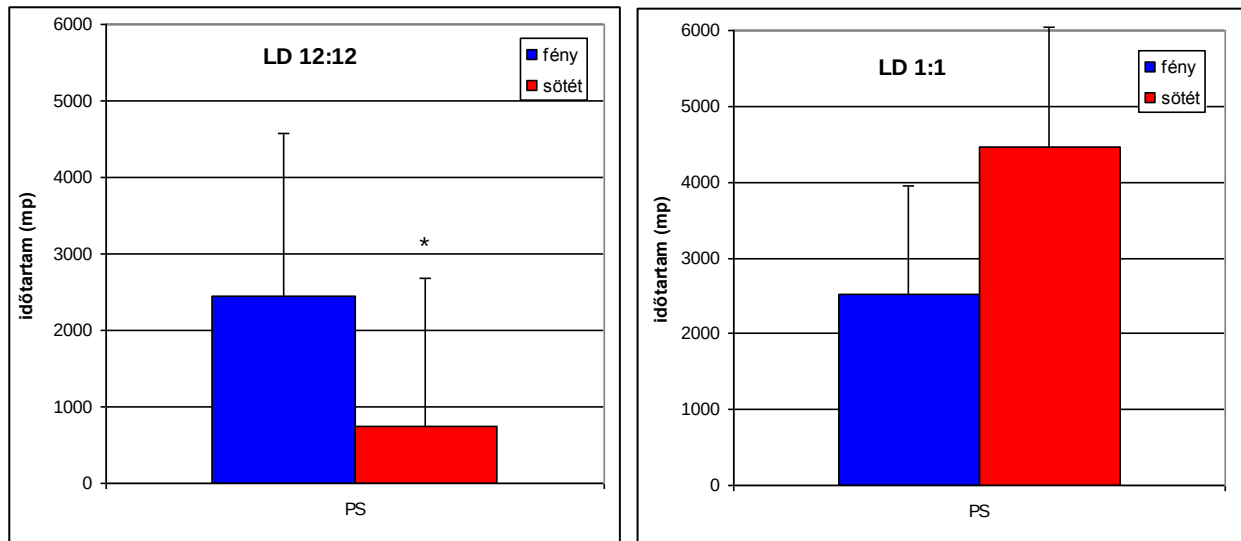
,,+: $p < 0.05$



11-12. ábra

Az alvás-ébrenléti fázisok megoszlása a világos és sötét órák között. A bal oldali ábra az LD12:12 a jobb oldali az LD1:1 körülmények között tartott állatok adatait tartalmazza. Míg az LD12:12 között tartott állatok szignifikánsan többet voltak aktívak sötétben és többet aludtak világosban, addig az LD1:1 között tartott állatok esetében az eltérések minimálisak. A paradox alvási szakaszok többsége a rövid fényperiódus hatására áttolódott a sötét órákra.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$



13-14. ábra

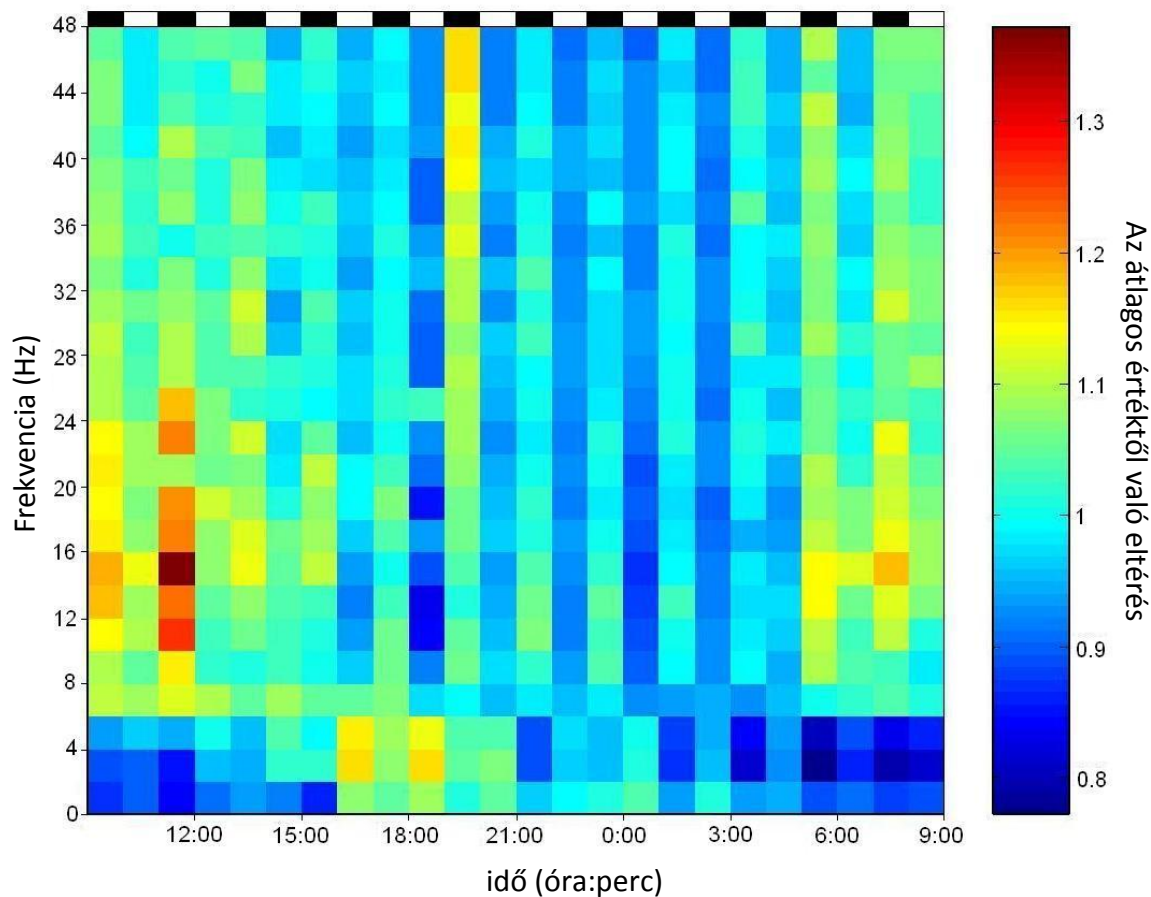
Az alvás-ébrenléti fázisok megoszlása a világos és sötét órák között. A bal oldali ábra az LD12:12 a jobboldali az LD1:1 körülmények között tartott állatok adatait tartalmazza. Az LD12:12 között tartott állatok szignifikánsan többet voltak paradox alvásban, világosban. Addig az LD1:1 között tartott állatok esetében ez pont fordított. *: $p < 0.05$

[6.] Az EEG spektrális összetevőinek változását részletesebb (1, ill. 2 Hz-es) bontásban is megvizsgáltuk. A cirkadián fázis és a fény-sötét váltakozás függvényében, 2 Hz-es bontásban. A fény az EEG spektrum alacsony frekvenciájú összetevőinek (0-6 Hz) teljesítményét növelte az öt megelőző sötét órához képest, a magasabb frekvenciákra (10-24 Hz) éppen ellentétes hatással volt (15. ábra). Különösen a béta hullámokra jellemző, hogy teljesítményük a fényviszonyokat követve ingadozik. A cirkadián ritmus 7-8 órás eltolódását ebben az esetben is megfigyelhetjük, hisz pl. a delta-teljesítmény maximuma a délutáni órákra esett, a normál kora délelőtti órák helyett.

[7.] Nemcsak a megvilágítás abszolút mértéke, hanem annak hirtelen megváltozása is hatással van az EEG spektrális összetevőire. A fény fel- illetve leoltásának akut hatása az éberségi szint függvényében eltérően befolyásolta a különböző frekvenciatartományokat.

Mélyalvás során a lámpa felkapcsolása növelte az alacsony és csökkentette a magas frekvenciák teljesítményét (16. ábra). Az akut hatás főleg a középső tartományban (8-28 Hz) jelentős: A fény megjelenése drasztikus teljesítménycsökkenést okoz az első 15 percben, majd a hatás enyhül a további világos időszakban. Az alacsony frekvenciák esetében a teljesítmény a

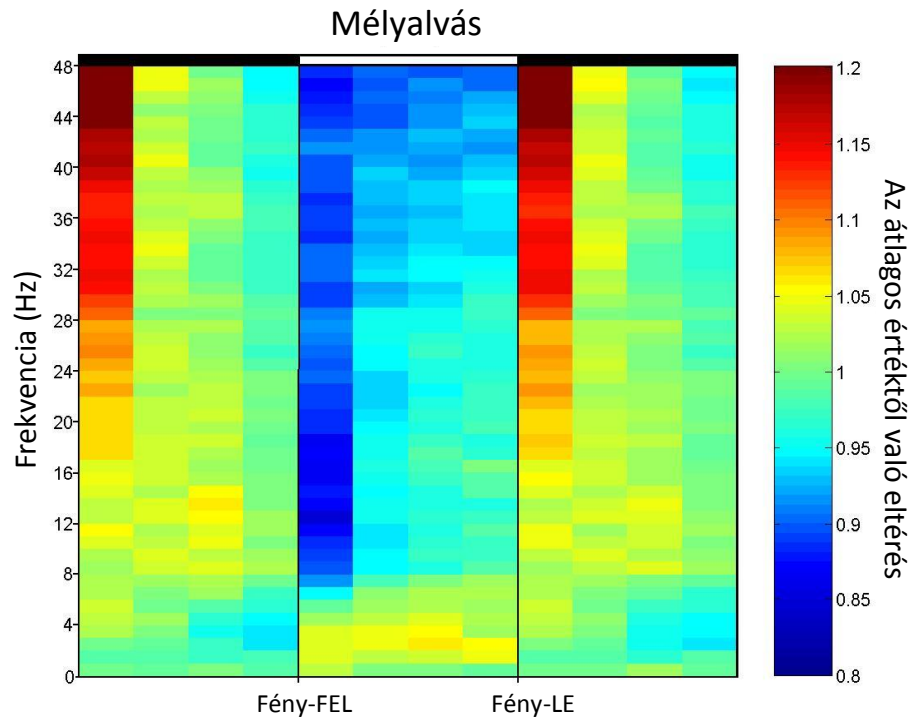
fény felkapcsolásakor azonnal jelentkezik, de a teljes órában magas marad. A nagyon magas frekvenciák esetében szintén tartós a teljesítménycsökkentő hatás.



15. ábra
A mélyalvás alatti EEG spektrális összetevőinek változása a cirkadián fázis és a fény-sötét váltakozás függvényében. A teljesítmény értékei minden frekvenciasávban külön, saját átlagukhoz képest normalizáltak. A fenti fekete-fehér szalag jelzi a fény-sötét szakaszokat.

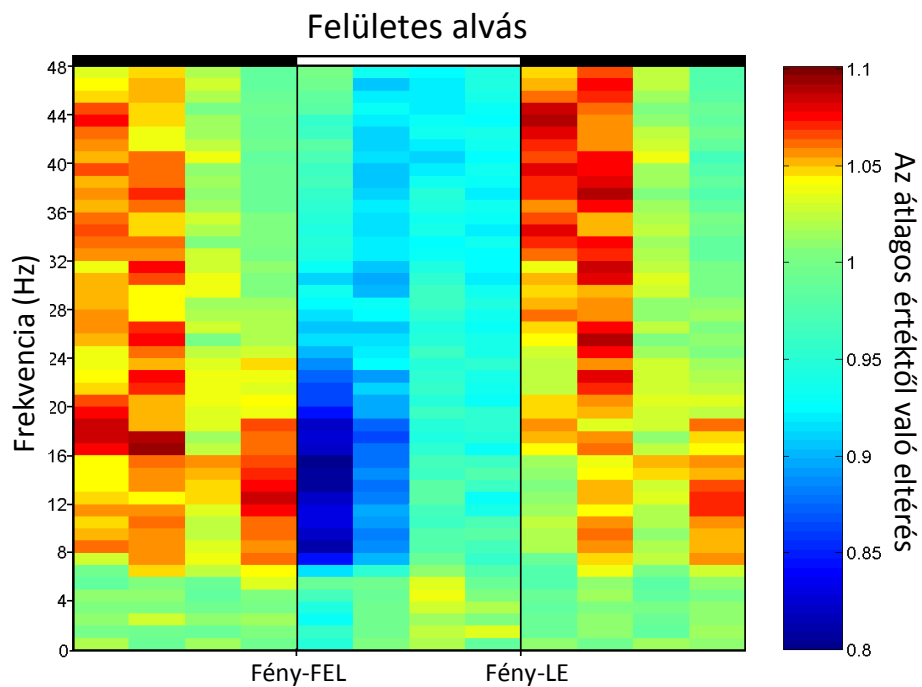
A lámpa leoltása tartósan – a teljes sötét időszakra – lecsökkentette az alacsony és megnövelte a magas frekvenciák teljesítményét. Ebben az esetben az akut hatás a legmagasabb (40 Hz feletti) frekvenciák esetében volt nagymértékű.

Felületes alvás és nyugodt ébrenlét során hasonló változásokat tapasztalhatunk a magasabb frekvenciaértékeknél. (17-18. ábra) (Mivel az alvási stádiumok határait a delta teljesítmény alapján definiáltuk, ebben a frekvenciatartományban nem vártunk – és nem is kaptunk – szignifikáns eltéréseket.) A lámpa felkapcsolása növelte a 8-24 Hz-es EEG komponensek teljesítményét, a hatás a mély alváshoz hasonlóan az első negyed órában a legerősebb.



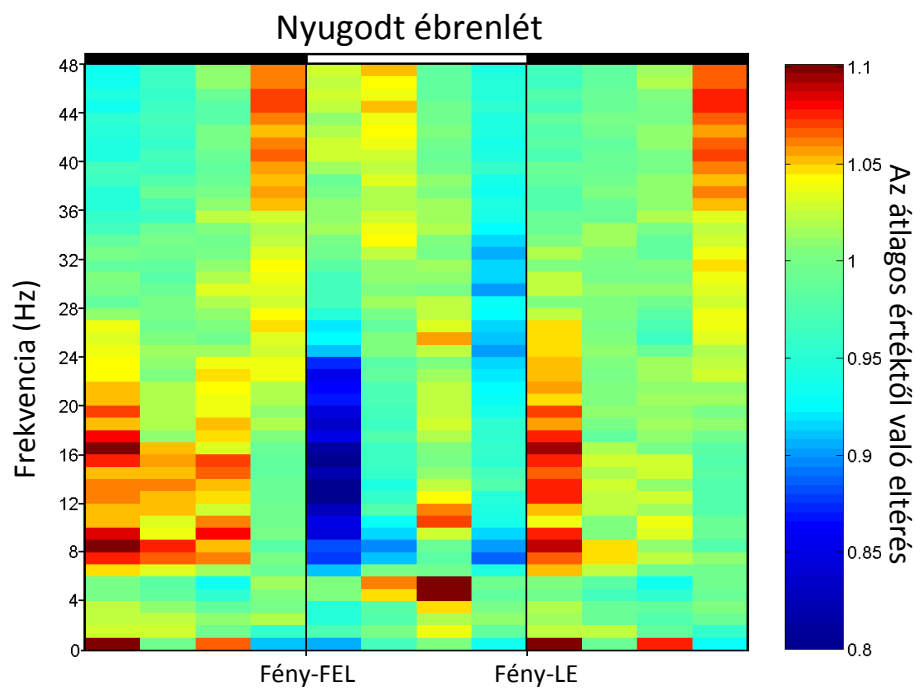
16. ábra

Az EEG spektrális összetevőinek vizsgálata mélyalvás során az egymást követő világos és sötét órákat csoportosan ábrázolva, 1 Hz-es bontásban. A fenti fekete-fehér szalag jelzi a fény-sötét szakaszokat.



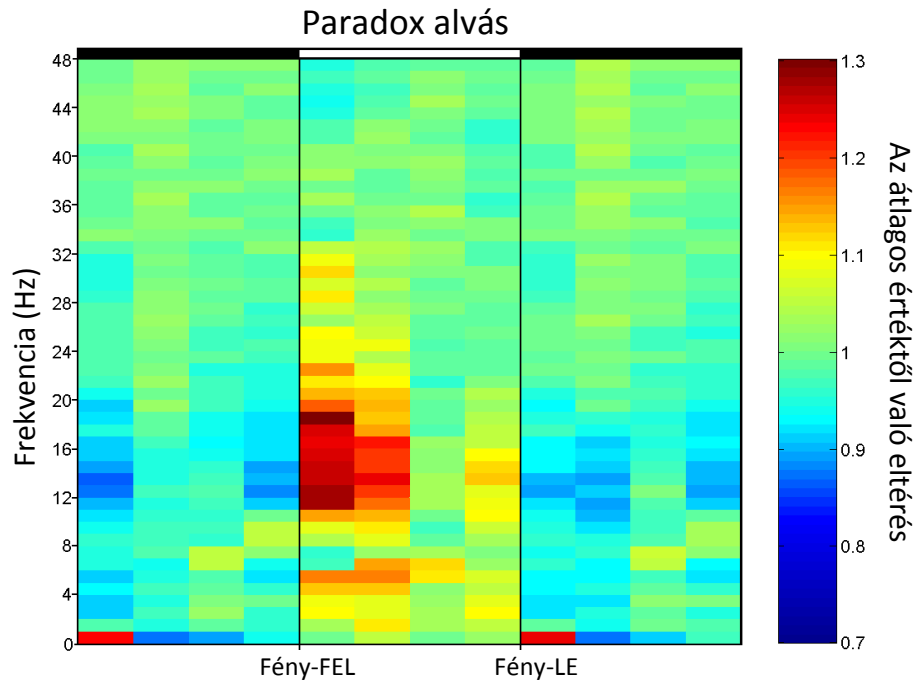
17. ábra

Az EEG spektrális összetevőinek vizsgálata felületes alvás során az egymást követő világos és sötét órákat csoportosan ábrázolva, 1 Hz-es bontásban. A fenti fekete-fehér szalag jelzi a fény-sötét szakaszokat.



18. ábra

Az EEG spektrális összetevőinek vizsgálata nyugodt ébrenlét során az egymást követő világos és sötét órákat csoportosan ábrázolva, 1 Hz-es bontásban. A fenti fekete-fehér szalag jelzi a fény-sötét szakaszokat.



19. ábra

Az EEG spektrális összetevőinek vizsgálata paradox alvás során az egymást követő világos és sötét órákat csoportosan ábrázolva, 1 Hz-es bontásban. A fenti fekete-fehér szalag jelzi a fény-sötét szakaszokat.

A legnagyobb frekvenciák a mélyalvásban tapasztaltakhoz képest kevésbé változtak a fényfelkapcsolást követően. Felületes alvás során a gátló hatás némi késéssel jelenik meg és kismértékű. Nyugodt ébrenlétben a nagyfrekvenciák teljesítménye a fény-sötét váltás határán éri el a minimumát.

A fény lekapcsolása felületes alvás során valamennyi nagyfrekvenciás összetevőre serkentően hatott. A nyugodt ébrenlétben a nagyfrekvenciák teljesítménye a sötét-fény váltás során éri el a maximumát.

Paradox alvás alatt regisztrálható EEG spektrális összetevőire a fény a többi éberségi szinthez képes éppen ellentétes hatással volt. A fényimpulzus a legalacsonyabb frekvenciák kivételével minden frekvenciatartomány teljesítményét növelte. A legerősebb növekedés a béta és théta frekvenciáinál tapasztalhatunk (19. ábra). Ez a két frekvenciatartomány alapvetően is jellemző a paradox alvásra. Tehát amíg a paradox alvásban töltött idő kevesebb a világos, mint a sötét órákban, a paradox alvás alatti théta és béta teljesítmény növekedése tapasztalható.

5. DISZKUSSZIÓ

Az alvás szabályozásában homeosztatikus és cirkadián tényezők egyaránt szerepet játszanak. A két tényező néha ellent mond egymásnak. Hosszabb ébrenlétet, a homeosztatikus szabályozás elve szerint, hosszabb alvás követ. Azonban a cirkadián szabályozás a folyamatokat 24 órás korlátok közé szorítja, eszerint a hosszabb ébrenlét után csak rövidebb alvásra marad idő. A kísérleteinkben alkalmazott rövid fényperiódus mindkét hatást megzavarja: a rövid sötétszakasz alatt nem nő számottevően az alvásigény, emellett a fény megjelenése túl gyakori, elveszti (cirkadián) Zeitgeber szerepét.

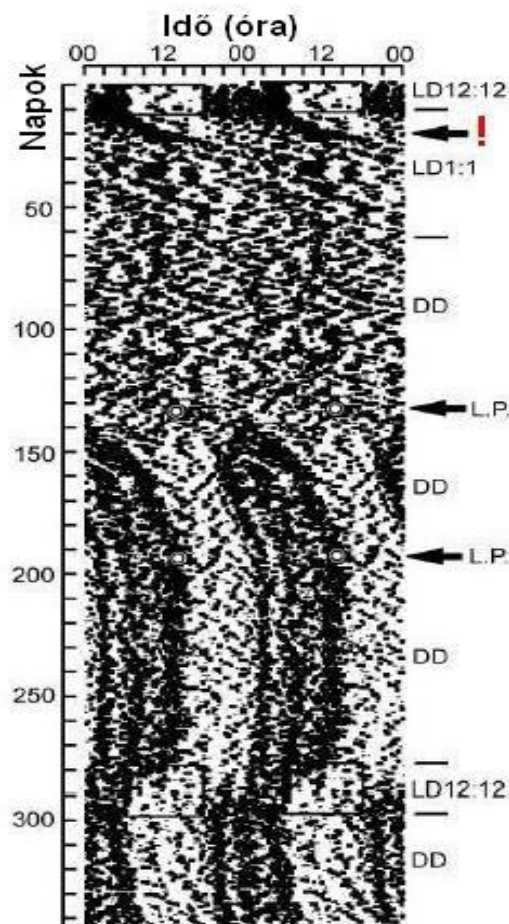
[1.] Az rövid fényperiódus hatására a cirkadián ritmus szabadonfutóvá válik, és periódusideje megnő (Borbely et al., 1975), tehát a 24 órás cirkadián ritmushoz képest az alvás ébrenléti ciklus fázisának lassú eltolódása figyelhető meg. A rövid fény-sötét periódus hosszú távon a napi ritmus megszűnéséhez vezet (Usui et al., 2003) (18. ábra). Usui és munkatársai által végzett kísérletsorozatban a patkányok aktivitásának napi ritmusa kb. 10-15 nappal az LD1:1 körülmények közé helyezésüket követően szűnt meg. (Vizsgálatuk, több mint 300 napon keresztül tartott, az vizsgálták, hogy LD1:1, majd DD körülmények közé helyezett, napi ritmust nem mutató állatok napi ritmusa hogyan áll helyre egyetlen fényimpulzus hatására.)

A kísérletünkben alkalmazott egy hetes hozzászokási periódus a napi ritmus megszüntetéséhez nem volt elegendő, de a napi ritmus eltolódása tisztán megfigyelhető. A fáziseltolódás „sebességére” ugyan nem végeztünk pontos méréseket, de az 5. ábra alapján körülbelül egy óra lehet naponta. Hasonló értékre lehet következtetni Usui és mtsai. kísérletsorozata alapján is (18. ábra). Kísérleteinket tovább folytatva valószínűleg tapasztalhattuk volna a napi ritmus teljes felborulását.

[2.] A deprivációt a rövid fényperiódus bevezetését követő tizedik napon végeztük. Ez azt jelenti, hogy a kísérletünk során megvalósított depriváció jórészt az állatok aktív periódusára esett. Mivel ilyenkor az állatok egyébként is többnyire ébren vannak, a homeosztatikus alvásigényük nem nőtt számottevően, ennek következtében jelentős pótlást sem tapasztaltunk.

Figyelemre méltó azonban, hogy mindkét olyan órában, amikor a deprivált állat szignifikánsan többet aludt, világos volt.

A depriváció – bár a minimális stresszt okozó ún. „gentle handling” módszerrel végeztük – valószínűleg növelte az állatok élénkségét, hiszen az időnkénti alomcsere kivételével kevés „érdekes” vagy „szokatlan” dolog történik velük. A folyamatos fáziseltolódás mellett ez lehet a másik oka annak, hogy a depriváció befejeződése után még több órán keresztül kevesebbet aludtak a kontrol megfelelő órájához képest, és csak a felvétel utolsó pár órájában figyelhető meg némi növekedés. Ezek a változások azonban nem szignifikánsak, így végeredményben azt mondhatjuk, a bár az állatok napi ritmusát zavartuk, a depriváció hatástalan volt.



18. ábra

Különböző fény-sötét körülmények között tartott állatok motoros aktivitása
 [Usui és mtsai. nyomán (Usui et al., 2003), módosítva]
 (A piros felkiáltójel jelzi, hogy a saját kísérleteink mikor kezdődtek; L.P. : fényimpulzus)

[3.] Az egységnyi mélyalvási időre eső delta teljesítmény a mély alvás alatt az agykéregből regisztrálható delta hullámok gyakoriságától és nagyságától függ. A rövid fényperiódus alkalmazásával kimutatható, hogy a fény közvetlenül befolyásolja a delta hullámok megjelenését. A világos emeli a mélyalvás alatti delta-teljesítményt, még olyankor is, ha a mélyalvásban töltött idő csökken. A fény alvásra gyakorolt hatásának ezt, az SCN-től független útját a retina melanopszin tartalmú ganglionsejtjeitől eredő, de az SCN-t kikerülő pályák jelentik. Ezek közül valószínűleg a ventrolaterális preoptikus areában (VLPO) található alvás-aktív neuronokon végződők a legjelentősebbek (Tsai et al., 2009). Természetesen a csapok-pálcikák által közvetített fénybemenet is hatással van az alvás-ébrenléti ciklus változásaira, ám ez az útvonal nem közvetlenül szabályoz. (Altimus et al., 2008)

[4.] Bár a napi ritmus nem szűnt meg, azaz az éberségi szinteket jellemző paraméterek (pl. DS hossz, DP stb.) ingadozása megőrizte 24 órás periódusidejét, az ingadozás jellege azonban megváltozott. Egyrészt csökkent az amplitúdó, másrészt a szélsőértékek közötti átmenetek időben elnyúltak. Ez egyrészt a homeosztatisz hajtóerő gyengülésének tudható be: az egy órányi sötétben töltött ébrenlétek nem növelték jelentősen az alvási „vágyat”, a hosszabb ébrenlétekkel tarkított fényperiódusokat pedig nem követi fokozott ébrenlét. További magyarázat, hogy a fény közvetlen hatással van az alvásra: a fény megjelenése (fényimpulzus), alvást vált ki, a fény leoltása pedig ébrenlétet (Borbély et al., 1975, Tsai et al., 2009). Ez a LD12:12 körülmények között csak egy-egy alkalommal fordul elő, ilyenkor éles növekedés, ill. csökkenés látható a DS hosszában. LD1:1 körülmények között viszont többször fordul elő az aktív és nyugalmi periódusban is, ez a hirtelen váltásokat „elkeni”.

[5.] A paradox alvásra a rövid fényperiódus szignifikáns hatással volt. Összhangban az irodalmi adatokkal (Alfoldi et al., 1991), az állatok többet aludtak a sötét, mint a világos órákban. Természetes körülmények között is jellemzően a fényszakasz végén (rest2) töltenek több időt paradox alvással az állatok. Alvásdepriváció után is először a mélyalvás pótlódik és csak ezt követően nő a paradox alvás mennyisége. A paradox alvás mindig adott mennyiségű mélyalvás után következik be, ez lehet az egyik oka, miért tolódnak a paradox alvászakaszok rendszeresen át a sötét órákba. Van azonban egy másik lehetséges magyarázat is. A fény lekapcsolása a szakirodalom szerint paradox alvást indukál (Lisk and Sawyer, 1966). Ez minden egyes

sötétszakaszban megnöveli kissé a PS mennyiségét, ami a teljes napra összegezve szignifikáns növekedést okoz. Esetünkben inkább az első magyarázat tűnik valószínűbbnek, hiszen 12 fény-sötét váltásból csak kétszer tapasztaltuk, hogy a fény lekapcsolását paradox alvás követte volna. Egy újabb kísérlet szerint a sötét paradox alvást indukáló hatása attól függ, hogy az állat, mely alvási szakaszában van (Tsai, 2005). Amennyiben a sötét impulzust NREM fázis követi, akkor Tsai és mtsai. szerint, megfigyelhetjük a paradox alvás specifikus növekedését.

Az LD1:1 között tartott állatoknál az egy napra vonatkoztatott paradox alvási szakasz hossza abszolút értékben is nőtt, az LD12:12 körülmények között tartott állatokéhoz képest. Ennek számos oka lehet. Lehetséges, hogy a rövid fény-sötét periódus következtében a lassú hullámú alvás iránti igény (ami a Borbély féle modellben az S-nek felel meg) sosem éri el a normál fény-sötét körülmények között kialakuló magasabb értéket, ezért a mélyalvási szakaszokat rövidebb időn belül követheti a paradox alvás fázisa. Ez különösen a sötét órákban hathat kedvezően a paradox alvás mennyiségére. Elképzelhető az is, hogy a megváltozott fény-sötét körülmények közvetlenül befolyásolják a paradox alvás megjelenését szabályozó agyi területeket (noradrenerg locus coeruleus, raphe dorsalis stb.).

[6.] A mélyalvás alatti delta-teljesítménysűrűség (DP/DS) az alvásmélység illetve az alvás iránti igény fokmérője (Borbely and Achermann, 1999). Mint korábban láthattuk [3.], a fény közvetlenül emeli a mélyalvás alatti delta-teljesítményt. A megvilágítás mértéke azonban nemcsak az alacsonyabb frekvenciájú jelekre van közvetlen hatással, hanem a magasabb frekvenciatartományokat is befolyásolja. A hatás ebben az esetben ellentétes, a fény gátló hatással van az EEG spektrum minden 6 Hz-nél nagyobb frekvenciájú összetevőjére (Alfoldi et al., 1991). Kísérletünkben különösen a béta tartományon belül csökkentek az értékek a világos órákban, a megelőző sötét órákhoz képest (11. ábra). A teljesítményértékek abszolút ingadozása is a béta hullámok esetében a legnagyobb mértékű.

A megvilágítás mértéke az emberek esetében is befolyásolja az alvás és az ébrenlét mennyiségét. Mivel az emberek alapvetően nappali élőlények, az ő esetükben a fény az ébrenlétre van serkentő és az alvásra gátló hatással (Lockley et al., 2006). Lockley és mtsai. különböző, rövid-hullámhosszú, látható fény hatását vizsgálták embereken, az éjjeli órákban. Azt figyelték meg, hogy 460-nm hullámhosszúságú, monokróm fénnel megvilágítva a vizsgált alanyt, az alany kevésbé volt álmos, emellett csökkent delta-, theta-, és növekedett alfa-, béta-teljesítményt

regisztráltak. Mélyalvás során a lámpa felkapcsolása növelte az alacsony és csökkentette a magas frekvenciák teljesítményét (16. ábra). Az akut hatás főleg a középső tartományban (8-28 Hz) jelentős: A fény megjelenése drasztikus teljesítménycsökkenést okoz az első 15 percben, majd a hatás enyhül a további világos időszakban. Az alacsony frekvenciák esetében a teljesítmény a fény felkapcsolásakor azonnal jelentkezik, de a teljes órában magas marad. A nagyon magas frekvenciák esetében szintén tartós a teljesítménycsökkentő hatás.

[7.] A megvilágítás megváltozására adott válasz sok esetben adaptációs jelenségeket is tartalmaz. Ez azt jelenti, hogy a megvilágítás okozta hatások legerősebben a fényviszonyok megváltozását követő rövid időszakban figyelhetők meg, majd a fényviszonyok tartós állandó értéke mellett a kiváltott hatás mértéke csökken. A jelenséget akkor lehet igazán megfigyelni, ha a spektrális összetevők változásait részletesebb időbeli bontásban vizsgáljuk. (16-19. ábra). A fény fel- illetve leoltásának akut hatása az éberségi szint függvényében eltérően befolyásolta a különböző frekvenciatartományokat.

Különösen erős adaptációs hatást figyelhetünk meg:

- a. a nagy frekvenciájú (28 Hz feletti, gyors gamma) komponensek sötét hatására bekövetkező teljesítménynövekedésében mély alvás alatt;
- b. a közepesen nagy (8-24 Hz, alfa, béta) frekvenciák fényfelkapcsolást követő teljesítménycsökkenésében, különösen felületes alvás és nyugodt ébrenlét esetében;
- c. ugyanezen frekvenciák (alfa, béta) sötét hatására bekövetkező teljesítménynövekedésében nyugodt ébrenlét alatt;
- d. végül paradox alvás alatt a theta és béta tartományok teljesítményében megfigyelhető növekedésben a fény felkapcsolását, ill. csökkenésében a fény lekapcsolását követően.

Az adaptáció hátterében a retinából érkező jelek gyengülése is állhat, hiszen érzékszerveink többségére jellemző az adaptáció. Az sem elképzelhetetlen azonban, hogy a jelenségnek központi idegrendszeri mechanizmusok állnak a hátterében.

Néhány esetben a fenti adaptációs jelenségnek épp az ellenkezőjét tapasztaltuk. Felületes alvás során az alfa és béta tartomány teljesítménye a sötét órák végén éri el a maximumát, ezért a fény felkapcsolása nincs akut hatással a teljesítményre (17. ábra). Hasonló jelenséget láthatunk a nagy frekvenciák esetében, nyugodt ébrenlét alatt (18. ábra). Ez lehet egy késleltetett hatás, de az is lehetséges, hogy az állat „anticipálja” a fény felkapcsolását, „számít” az esemény

bekövetkeztére. (Utóbbi esetben azt kellene feltételezni, hogy nyugodt ébrenlétben a fény serkentőleg hat a nagyfrekvenciákra, amit elég nehéz lenne megmagyarázni.)

Paradox alvás alatt a megvilágítás mértéke leghatározottabban a béta és théta sávokra volt hatással, ami nem véletlen, hiszen ez a két frekvenciatartomány jellemzi leginkább a paradox alvást. Bár a fény fel/lekapcsolásának akut hatása és az azt követő adaptáció egyértelműen jelen van, a sötét-fény illetve fény-sötét váltást megelőzően a gátló, ill. serkentő hatás a béta tartomány esetében újra erősebben érvényesül (19. ábra). A paradox alvás esetében sokan a théta teljesítményt tartják az intenzitás fokmérőjének (Borbely et al., 1984), hasonlóan ahhoz, ahogy a mélyalvás intenzitását a delta teljesítménnyel mérjük. Ennek fényében a théta tartomány teljesítményének növekedése a világos órákban kompenzációs mechanizmus is lehet, ami a paradox alvás hosszának csökkenését ellensúlyozza.

A közeljövőben tervezzük kísérleteink megismétlését és kibővítését: Hosszabb idejű adaptációs idő alkalmazásával – folyamatosan regisztrációval – rendszeresen ellenőrizzük a cirkadián ritmus meglétét vagy hiányát. Az alvásdeprivációt akkor végezzük el, ha a cirkadián ritmus bizonyítottan megszűnt, vagy ha ez esetleg – az irodalmi adatok (Usui et al., 2003) ellenére – több hét után sem következne be, akkor a nyugalmi időszak alatt.

További terveink között szerepel a delta hullámok hátterében álló lassú kérgi ritmus részletesebb elemzése, különösen az akut fényhatások vizsgálata a lassú hullámok jellemzőire, valamint kérgi piramissejtek aktivitásának vizsgálata a megvilágítás függvényében.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném megköszönni **Dr. Détári Lászlónak**, hogy lehetőséget biztosított/biztosít TDK munkám elkészítéséhez, valamint engedélyezte a tanszéki eszközök és laboratóriumok használatát.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Hajnik Tündének**, türelmét és rendkívüli segítőkészségét, melyet TDK munkám elkészítése közben tapasztalhattam. Külön megemlíteném kedves oktatói hozzáállását, melyben remélem a jövőben is részem lesz.

Szeretném továbbá megköszönni **Dr. Tóth Attilának** segítségét és jó tanácsait a TDK munka írásával kapcsolatban.

Szeretném megköszönni **Szüleimnek**, hogy minden lehetőséget megadtak, hogy egyetemre járhassek és nyugodt családi háttérrel biztosítottak dolgozatom elkészítéséhez, valamint **testvéremnek** és **barátaimnak** a sok biztatást, figyelmet, és külön megköszönném még **Tóth Zsófiának** a segítségét.

Köszönöm szépen!

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Alfoldi P, Franken P, Tobler I, Borbely AA (1991) Short light-dark cycles influence sleep stages and EEG power spectra in the rat. *Behavioural brain research* 43:125-131.
- Altimus CM, Guler AD, Villa KL, McNeill DS, Legates TA, Hattar S (2008) Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:19998-20003.
- Benington JH (2000) Sleep homeostasis and the function of sleep. *Sleep* 23:959-966.
- Borbely AA, Achermann P (1999) Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *Journal of biological rhythms* 14:557-568.
- Borbely AA, Huston JP, Waser PG (1975) Control of sleep states in the rat by short light-dark cycles. *Brain research* 95:89-101.
- Borbely AA, Tobler I, Hanagasioglu M (1984) Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behavioural brain research* 14:171-182.
- Card JP, Fitzpatrick-McElligott S, Gozes I, Baldino F, Jr. (1988) Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell and tissue research* 252:307-315.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G (2005) The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews* 9:11-24.
- Crick F, Mitchison G (1983) The function of dream sleep. *Nature* 304:111-114.
- Halász P (1982) Alvás és alvászavarok. *Medicina*.
- Jouvet M (1998) Paradoxical sleep as a programming system. *Journal of sleep research* 7 Suppl 1:1-5.
- Kavanau JL (1999) Adaptations and pathologies linked to dynamic stabilization of neural circuitry. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23:635-648.
- Lisk RD, Sawyer CH (1966) Induction of paradoxical sleep by lights-off stimulation. *Proc Soc Exp Biol Med* 123:664-667.
- Lockley SW, Evans EE, Scheer FA, Brainard GC, Czeisler CA, Aeschbach D (2006) Short-wavelength sensitivity for the direct effects of light on alertness, vigilance, and the waking electroencephalogram in humans. *Sleep* 29:161-168.

- Miller DB, O'Callaghan JP (2006) The pharmacology of wakefulness. *Metabolism: clinical and experimental* 55:S13-19.
- Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shigeyoshi Y (2003) An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:6141-6151.
- Nakao M, McGinty D, Szymusiak R, Yamamoto M (1995) A thermoregulatory model of sleep control. *The Japanese journal of physiology* 45:291-309.
- Nicolau MC, Akaarir M, Gamundi A, Gonzalez J, Rial RV (2000) Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep. *Progress in neurobiology* 62:379-406.
- Obal F, Jr., Krueger JM (2003) Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8:d520-550.
- Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298:2213-2216.
- Roffwarg HP, Muzio JN, Dement WC (1966) Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science* 152:604-619.
- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298:2211-2213.
- Siegel J (2004) Brain mechanisms that control sleep and waking. *Die Naturwissenschaften* 91:355-365.
- Spiegel K, Sheridan JF, Van Cauter E (2002) Effect of sleep deprivation on response to immunization. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 288:1471-1472.
- Tsai JW, Hannibal J, Hagiwara G, Colas D, Ruppert E, Ruby NF, Heller HC, Franken P, Bourgin P (2009) Melanopsin as a sleep modulator: circadian gating of the direct effects of light on sleep and altered sleep homeostasis in Opn4(-/-) mice. *PLoS biology* 7:e1000125.
- Tsai LL (2005) Sleep dependent effect of dark pulses on sleep in albino and pigmented rats. *The Chinese journal of physiology* 48:72-78.
- Underwood H, Groos G (1982) Vertebrate circadian rhythms: retinal and extraretinal photoreception. *Experientia* 38:1013-1021.
- Usui S, Okazaki T, Honda Y (2003) Interruption of the rat circadian clock by short light-dark cycles. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 284:R1255-1259.

- van Esseveldt KE, Lehman MN, Boer GJ (2000) The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain research Brain research reviews* 33:34-77.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682-685.