

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Ketamin hatása az agykérgi aktivitásra
ultra–rövid fény–sötét körülmények
között tartott patkányokban**

OTDK dolgozat

Biológus mesterszak

Idegtudomány és Humánbiológia szakirány

készítette:

Sviatkó Katalin

témavezető:

Dr. Hajnik Tünde, adjunktus
Élettani és Neurobiológiai tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2014.

1 TARTALOMJEGYZÉK

1	TARTALOMJEGYZÉK	2
2	RÖVITÉDÉSJEGYZÉK	3
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1	BEVEZETÉS	4
3.2	AZ AGYKÉREG ELEKTROMOS TEVÉKENYSÉGE.....	4
3.2.1	EEG KAPCSOLATA AZ ÉBERSÉGI SZINTEKKEL	4
3.2.2	EEG HÁTTÉRÉBEN ÁLLÓ SEJTKAPCSOLATOK	6
4	ALVÁS SZABÁLYOZÁSA.....	7
4.1	HOMEOSZTATIKUS SZABÁLYOZÁS	7
4.2	CIRKADIÁN SZABÁLYOZÁS	8
4.3	ALVÁS-ÉBRENLÉT IDEGRENDSZERI SZABÁLYOZÓ TERÜLETEI	9
4.3.1	FELSZÁLLÓ RETICULARIS AKTIVÁLÓ RENDSZER	9
4.3.2	VENTROLATERALIS PREOPTICUS AREA	10
5	KETAMIN	11
6	CÉLKITŰZÉS.....	13
7	ANYAG ÉS MÓDSZERTAN	14
7.1	ÁLLATOK	14
7.2	ELEKTÓDOK	14
7.3	MŰTÉT	14
7.4	KÍSÉRLET	15
7.5	ADATOK KIÉRTÉKELÉSE	15
7.6	SZÖVETTANI VIZSGÁLATOK	17
8	EREDMÉNYEK	18
8.1	KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS AZ ALVÁSDEPRIVÁCIÓ HATÁSA AZ ALVÁS-ÉBRENLÉTI SZAKASZOK HOSSZÁRA.....	18
8.2	KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS AZ ALVÁSDEPRIVÁCIÓ HATÁSA A DELTA TELJESÍTMÉNYRE	20
8.3	KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS AZ ALVÁSDEPRIVÁCIÓ HATÁSA A KÉRGİ LASSÚ HULLÁMOK PARAMÉTEREIRE.....	22
8.4	KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS AZ ALVÁSDEPRIVÁCIÓ HATÁSA A SOKSEJT-AKTIVÍTÁSRA	23
8.5	KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS A DEPRIVÁCIÓ HATÁSA A CSD-RE.....	24
9	DISZKUSSZIÓ	26
10	ÖSSZEFOGLALÁS	30
11	SUMMARY	31
12	SZERZŐI NYILATKOZAT	Error! Bookmark not defined.
13	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	Error! Bookmark not defined.
14	IRODALOMJEGYZÉK.....	Error! Bookmark not defined.

2 RÖVITÉDÉSJEYZÉK

ARAS – Ascending Reticular Activating System

AW – Active Wakefulness, aktív ébrenlét

DP – delta teljesítmény

DR - dorsalis, medialis raphe

DS – Deep Sleep, mélyalvás

GABA – γ -amino-vajsav

LC – locus coeruleus

LD 1:1 – 1:1 óra fény–sötét körülmények

LDT - nucleus laterodorsalis tegmentalis

LFP – Local Field Potentials

LS – Light Sleep, felületes alvás

LTP – Long-Term Potentiation

MUA – Multi-Unit Activity

NMDAR – N-metil-D-aszpartát receptor

NREM – non-REM

PPN – nucleus pedunculo pontinus tegmentalis

PS – paradox alvás

QW – Quiet Wakefulness, nyugodt ébrenlét

REM – Rapid Eye Movement, paradox alvás

RHT – retino-hypothalamicus tractus

SCN – nucleus suprachiasmaticus

SCR – Slow Cortical Rhythm, lassú kérgi ritmus

SWS – Slow Wave Sleep, lassú hullámú alvás

TMN – nucleus tuberomammillaris

VLPO – ventrolateralis preopticus area

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 BEVEZETÉS

Az alvás létszükséglet. Majd minden állati szervezet közös jellemzője. Az alvásigény egy igen erős biológiai hajtóerő, melynek ideig-óraig (maximum 3 nap) ellen tudunk állni, majd menthetetlenül elalszunk. Életünk majdnem egyharmadát alvással töltjük, ennek ellenére mai napig nem tudjuk az alvás valódi okát és háttérmechanizmusa sem teljesen tisztázott. A kutatók mai álláspontja, hogy az alvás elsősorban az agy szükséglete. Ennek alapján az alvásigény annak a szükséglete, hogy a nap folyamán az idegrendszert ért hatásokat az agy rendezni tudja. Az alvás alatt jellemzően szinkronizált ritmusos agyi aktivitás a jellemző. Ennek kialakításában mind a corticalis mind a thalamo-corticalis szabályozás részt vesz. Tehát összefoglalóan elmondható, hogy az alvás egy nagyon bonyolult mintázat, melynek csak töredékeit ismerjük. A szabályozásában homeosztatikus, cirkadián és idegrendszeri elemek is részt vesznek. Az állatkísérleti alváskutatásban különböző drogok felhasználásával próbálnak a mintázat részleteire magyarázatot találni.

A ketamint 1962-ben szintetizálta először egy amerikai tudós, Calvin Stevens. A szabadalmat, mint állatgyógyászati anesztetikum a következő évben meg is kapta. 1965-re a humán orvostudomány is elfogadta az alkalmazását. Manapság gyermekgyógyászati érzéstelenítőként, major depresszió gyors antidepresszánsaként használják, azonban a fő felhasználási területe az állatgyógyászat maradt. A laboratóriumi műtétekhez is széles körben elterjedt a használata.

A TDK munkámban vizsgáltam a ketamin hatását a homeosztatikus alvási szabályozásra, valamint a fény közvetlen szabályozására az alvás-ébrenléti ciklusban.

3.2 AZ AGYKÉREG ELEKTROMOS TEVÉKENYSÉGE

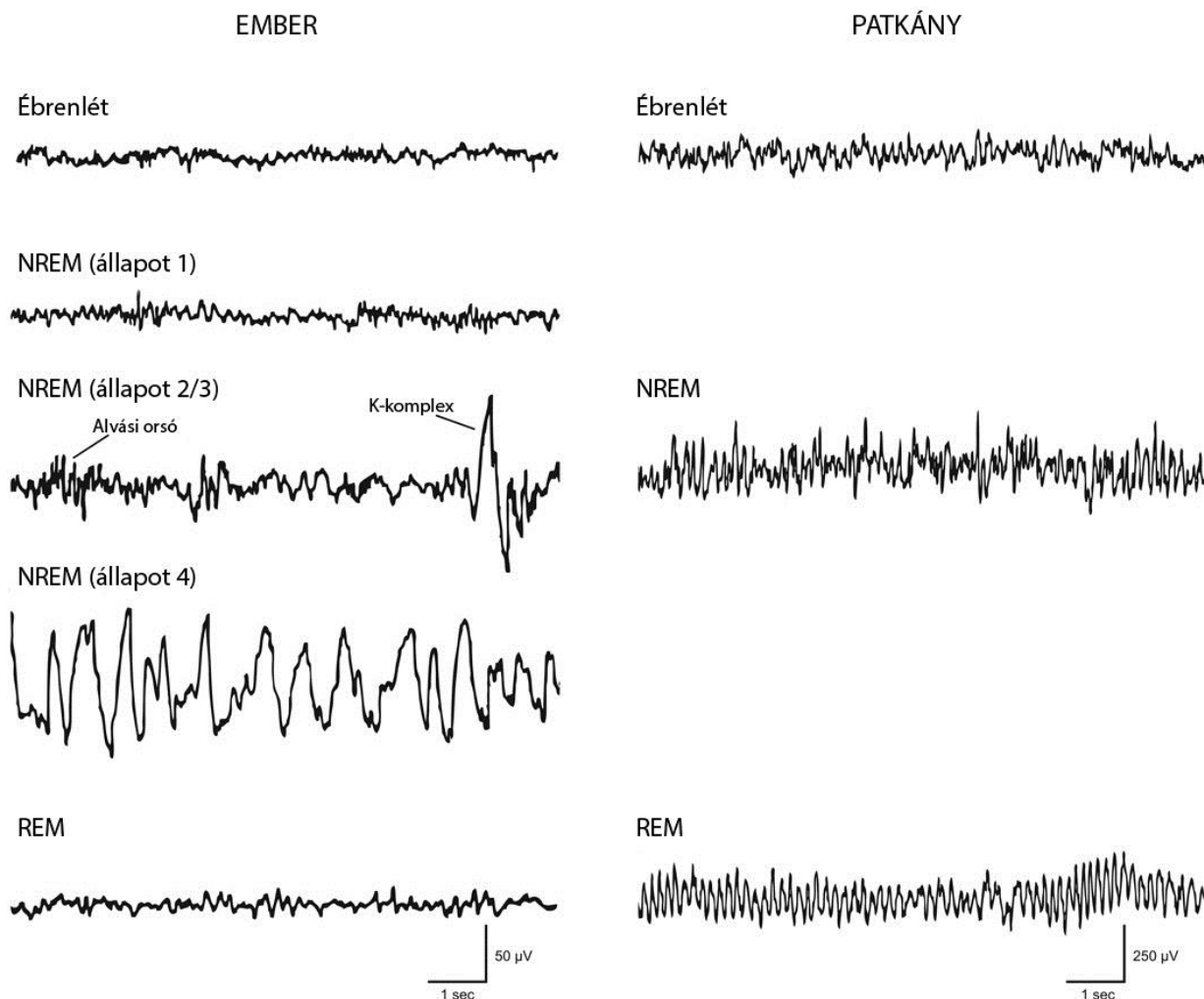
3.2.1 EEG KAPCSOLATA AZ ÉBERSÉGI SZINTEKKEL

Az EEG és a kéregből közvetlenül regisztrálható lokális mezőpotenciálok (local field potential – LFP) a corticalis és subcorticalis neuronok szinaptikus interakciója révén létrejövő membránpotenciál változások térbeni és időbeni szummációjából jönnek létre. A réteges szerkezetű kéregben a III., V. és a VI. rétegben találhatóak meg a piramissejtek sejttestjei. A hozzájuk tartozó dendritok az I. és a II. rétegig húzódnak. A szinaptikus aktivitás során a sejttest és a dendrit között alakul ki a néhány μV -os feszültségű dipólus. Az EEG jel

detektálásához körülbelül 10000 sejt együttes aktivitása szükséges, így elegendően nagy jel vezethető el az extracelluláris térből. A bioelektromos jelsorozat tulajdonságai – amplitúdó, frekvencia – az egyes kérgi területek működésének szinkronizáltságától függenek, ezért kapcsolatban állnak az éberségi szintekkel (Destexhe et al., 1999).

Emberben aktív ébrenlét alatt alacsony amplitúdójú, magas frekvenciájú gamma ($> 35\text{Hz}$) és béta ($13 - 35\text{Hz}$) hullámok dominálnak az EEG-ben, míg nyugodt ébrenlétben, csukott szem mellett alfa ($8 - 13\text{Hz}$) hullámok jelennek meg, főként az occipitalis kéreg fölött. Az alvás 2 fázisra bontható: REM alvás (Rapid Eye Movement, paradox alvás) és NREM alvás (non-REM). A NREM fázis további 4 stádiumra osztható. Az elsőre alacsony amplitúdójú háttér-aktivitás mellett az alfa hullámok csökkenése, a másodikra az alvási orsók ($12 - 14\text{Hz}$ szigma orsók) és K-komplexek megjelenése jellemző. A harmadik és negyedik stádium az úgynevezett lassú hullámú alvás (Slow Wave Sleep, SWS), melyben a magas amplitúdójú, alacsony frekvenciájú delta hullámok ($< 4\text{Hz}$) dominálnak. A REM fázisban az EEG-ben az ébrenléthez hasonlóan béta hullámok jelennek meg, gyors szemmozgások és az izomtónus drasztikus csökkenése mellett (atónia, kivétel külső szemizmok, légző izmok) (1. ábra) (Brown et al., 2012).

A patkányban az emberhez hasonlóan a NREM fázisban a delta hullámok a jellemzőek, ellenben az éber és REM fázisban béta és a hippocampalis téta hullámok a dominánsak. Fontos megemlíteni az emberrel ellentétben a rágcsálók policiklikusak, ami azt jelenti, hogy egy nap többször 10-15 perces szakaszokban alszanak. Éjjeli állatok, azaz az aktív periódusok többsége a sötét órákra tehető (Phillips et al., 2010). NREM alvásukat hagyományosan felületes– (Light Sleep, LS) és mélyalvásra (Deep Sleep, DS), az éber állapotot pedig nyugodt– (Quiet Wakefulness, QW) és aktív ébrenlétre (Active Wakefulness, AW) osztják fel (1. ábra) (Barsh, 2009).



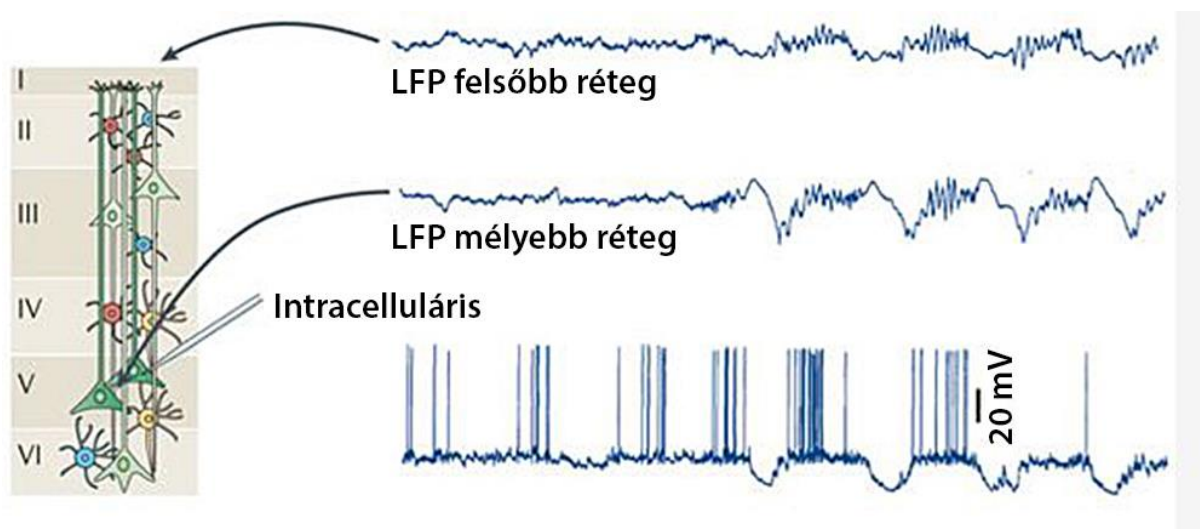
1. ábra

EEG és az éberségi szintek kapcsolata emberben és patkányban
(Brown et al., 2012)

3.2.2 EEG HÁTTÉRÉBEN ÁLLÓ SEJTKAPCSOLATOK

A kérgi szinkronizáció és deszinkronizáció háttérében cortico-corticalis, cortico–thalamicus és thalamo–corticalis mechanizmusok állnak. Ébrenlét és REM fázis alatt a felszálló aktiváló szinaptikus bemenetek depolarizálják a thalamus reticularis neuronjait. Ennek következtében tónusos tüzelés (egyedi kisülés) figyelhető meg a thalamicus relésejtekben és a kérgi piramissejtekben. Ekkor az EEG-n alacsony amplitúdójú, magas frekvenciájú hullámok regisztrálhatóak. NREM alvás alatt az aktiváló bemenet hiányában mindkét sejtípus hiperpolarizálódik és burst-ös tüzelés (nagyfrekvenciás ritmikus kisülés) alakul ki a thalamocorticalis neuronokban. A gyors kisülés-sorozatokat hosszú utóhiperpolarizáció követi. Ebben az állapotban a hálózat sejtjei szinkron módon működnek, az EEG-n nagy amplitúdójú, kis frekvenciájú hullámok láthatóak (Brown et al., 2012).

A mélyalvás alatti EEG jelek generálásában fontos szerepe van a lassú kérgi ritmusnak (Slow Cortical Rhythm, SCR) is, ami mögött a kérgi piramidális neuronok aktív (depolarizált, „up-state”) és inaktív (hiperpolarizált, „down-state”) állapotának lassú (0.1 – 1Hz), cortico–corticalis kapcsolatokon keresztül szinkronizált váltakozása áll. A „down-state”-ek alatt lassú, mélyben pozitív lokális mezőpotenciálok regisztrálhatóak (2. ábra) (Destexhe et al., 1999, Halasz et al., 2014).



2. ábra

Azonos időben készített LFP regisztrátum a motoros cortex felső és alsó rétegéből (Buzsaki et al., 2012)

4 ALVÁS SZABÁLYOZÁSA

Az alvás szabályozásában fontos szerepet töltenek be mind a homeosztatis, mind a cirkadián tényezők, valamint az idegrendszer szabályozásában résztvevő agyterületek.

4.1 HOMEOSZTATIKUS SZABÁLYOZÁS

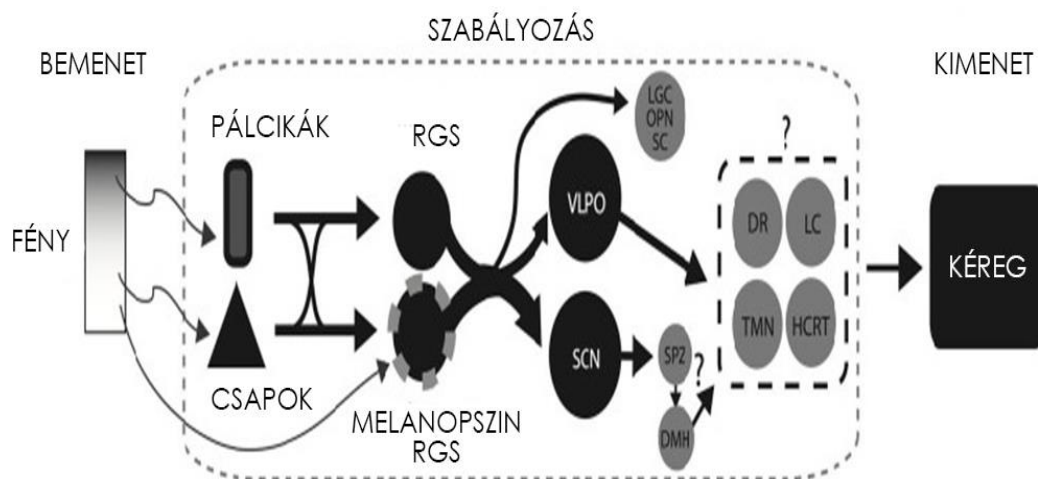
A homeosztatis szabályozásra utal, hogy a lassú hullámú alvás hosszát és intenzitását (ez utóbbit a delta frekvenciatartomány teljesítményével szokás jellemezni) befolyásolja az előtte lévő ébrenlét időtartama. 1983-ban Rechtschaffen és munkatársai patkányokon kimutatták, hogy az alvás megvonása hosszútávon (2-3 hét) halálhoz vezet. Az alváshiány következtében megnőtt az állatok táplálékigénye, de emellett a testsúlyuk folyamatosan csökkent. Ennek oka, hogy az állandó testhőmérsékletű állatok nagy energia befektetés révén tartják fent a hőháztartásukat, tehát a hőveszteség magas metabolikus rátához vezet. Így több táplálék bevitelére lett volna szüksége az állatoknak. Tehát az alvás alatt végbemenő

folyamatok befolyással bírnak a homeosztatikus tényezőkre, így létfontosságúnak tekinthetők (Rechtschaffen et al., 1983).

Rövid időtartamú (6 óra) alvásmegvonást mélyebb pótló (recovery) alvás követi. Mivel a kérgi delta hullámok nagyrészt a lassú kérgi ritmus miatt alakulnak ki, a delta teljesítmény szorosan összefügg a kérgi lassú LFP hullámok paramétereivel. Minél nagyobb a homeosztatikus nyomás, annál gyakoribb lesz a hiperpolarizált („down-state”) periódus. Összefoglalóan elmondható, hogy a homeosztatikus szabályozás alatt megnő a delta teljesítmény és a „down-state”-ek száma (Tononi, 2009, Hajnik et al., 2013, Halasz et al., 2014).

4.2 CIRKADIÁN SZABÁLYOZÁS

Az alvás-ébrenléti ciklus más viselkedési mechanizmusokhoz hasonlóan cirkadián szabályozás alatt áll. Az emlősökben a fő szabályozó óra (mesteróra), a hypothalamusban található nucleus suprachiasmaticus (SCN). Fő szinkronizáló jele („Zeitgeber-e”) a fény. A fényinformáció a retino-hypothalamicus pályán (RHT) keresztül szállítódik a suprachiasmaticus magba. Az SCN koordinálja és a fény-sötét váltakozáshoz igazítja a szervek és szövetek sejtjeinek molekuláris mechanizmusokon keresztül kialakított napi ritmusait. Ez teszi lehetővé a viselkedés számos vonatkozásában – pl. az alvás-ébrenlét szintjén – megfigyelhető napi ritmust (Houben et al., 2014, Muindi et al., 2014). A retina melanopszin tartalmú ganglionsejtjei közvetlenül is vetülnek az alvás-ébrenlét szabályozásában szereplő agyi területekre, így a fény közvetlenül is befolyásolhatja az egyes alvás-ébrenléti állapotokat (Tsai et al., 2009). Kiemelendő terület a ventrolateralis-preopticus area (VLPO), ahol c-FOS fehérje – neuronális aktivitás markere - expressziós vizsgálatot végeztek és növekedés mutatható ki a fény hatására. Feltételezhető, hogy a fény ingerére a VLPO GABAerg sejtjeinek az aktiválódása az alvási állapot féle tolja el a ciklust (3. ábra) (Muindi et al., 2014).



3. ábra

Retino-Hypothalamicus pályák (RHT)

SCN: nucleus suprachiasmaticus; VLPO: ventrolateralis preopticus area; RGS: retina ganglion sejtek (Muindi et al., 2014)

4.3 ALVÁS-ÉBRENLÉT IDEGRENDSZERI SZABÁLYOZÓ TERÜLETEI

Az ébrenlétet több agyi terület – cortex, basalis előagy, thalamus, hypothalamus, agytörzsi aktiváló rendszerek – összehangolt működése hozza létre. A jelátvitelben szerepet játszó neurotranszmitterek és neuromodulátorok közé tartozik a glutamát mellett a noradrenalin, a szerotonin, az acetilkolin, a hisztamin, a dopamin és az orexin/hypocretin. Az alvási állapot előmozdításában elsősorban a ventrolaterális preoptikus area (VLPO) GABAerg–galaninerger neuronjai vesznek részt (Miller and O'Callaghan, 2006).

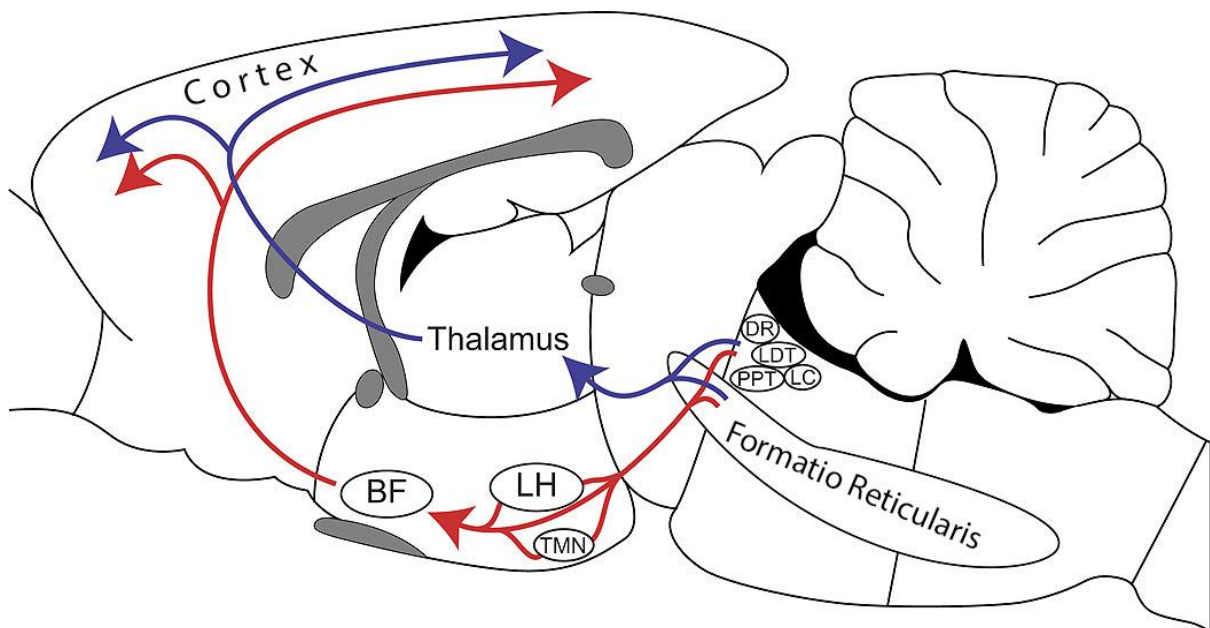
4.3.1 FELSZÁLLÓ RETICULARIS AKTIVÁLÓ RENDSZER

Az ébrenlétet biztosító pályarendszert felszálló retikuláris aktiváló rendszernek (Ascending Reticular Activating System, ARAS) nevezték el. Immunhisztokémiai, c-FOS módszer segítségével kimutatható összefüggés a különböző területek neuronális aktivitása és az alvás-ébrenléti állapotok között. Két főútvonal különböztethető meg (Brown et al., 2012).

Dorsalis útvonal magába foglalja a középagy, híd, nyúltvelői formatio reticularis glutamáterg területeit, valamint a kolinerg híd és a középagy találkozásánál található két sejtcsoportot - nucleus laterodorsalis tegmentalis (LDT) illetve nucleus pedunculo pontinus tegmentalis (PPN) (Brown et al., 2012).

Ventralis útvonal a mediális középgyi köteg, mely tartalmazza az agytörzsi glutamáterg, noradrenerg (locus coeruleus, LC), szerotoninerg (dorsalis, medialis raphe, DR) és dopaminerg (periaqueductalis szürkeállomány) neuronok projekcióit. Szinapszist alakítanak ki a glutamáterg, hisztaminerg, orexinerg postero/lateralis hypothalamussal és konvergálnak a kolinerg, GABAerg, glutamáterg neuronokkal a basalis előagyban (BF) (Brown et al., 2012).

Mindkét terület ingerülete a thalamus vagy basalis előagy közvetítésével az agykéregbe fut (4. ábra).



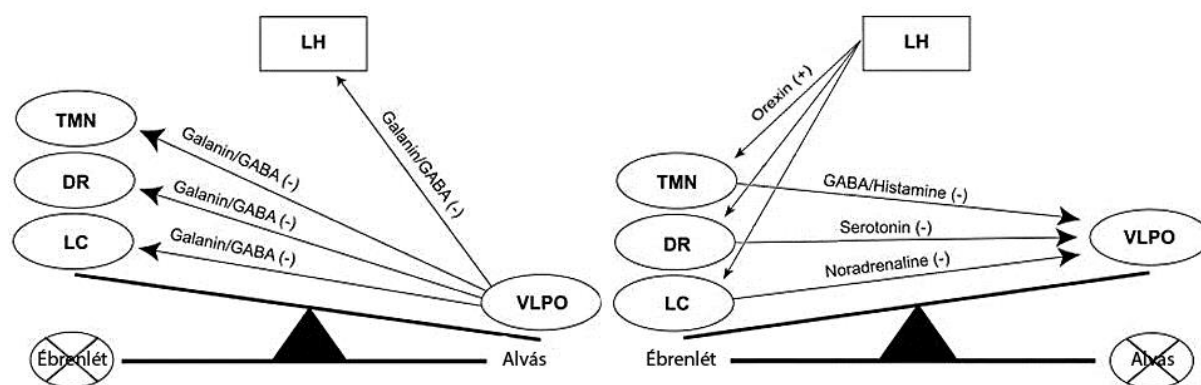
4. ábra

Dorsalis és ventralis felszálló aktiváló rendszer
Kék: dorsalis út; Piros: ventralis út
(Brown et al., 2012)

4.3.2 VENTROLATERALIS PREEPTICUS AREA

A ventrolaterális preoptikus terület (VLPO) neuronok egy csoportja a hypothalamusban. A VLPO GABAerg és galaninerg neuronjai alvás alatt duplájára növelik aktivitásukat. Ezen sejtek a felszálló aktiváló rendszerek minden magjához (locus coeruleus, raphe, PPT/LDT, nucleus tuberomammillaris (TMN), bazális előagy) küldenek rostokat (Brown et al., 2012).

Neuronjai reciprok („flip-flop”) gátló kapcsolatban állnak az ébrenlétet kiváltó noradrenerg, szerotoninerg és kolinerg rendszerekkel (5. ábra) (Brown et al., 2012).



5. ábra

Flip-flop modell az alvás–ébrenlét között
(Brown et al., 2012)

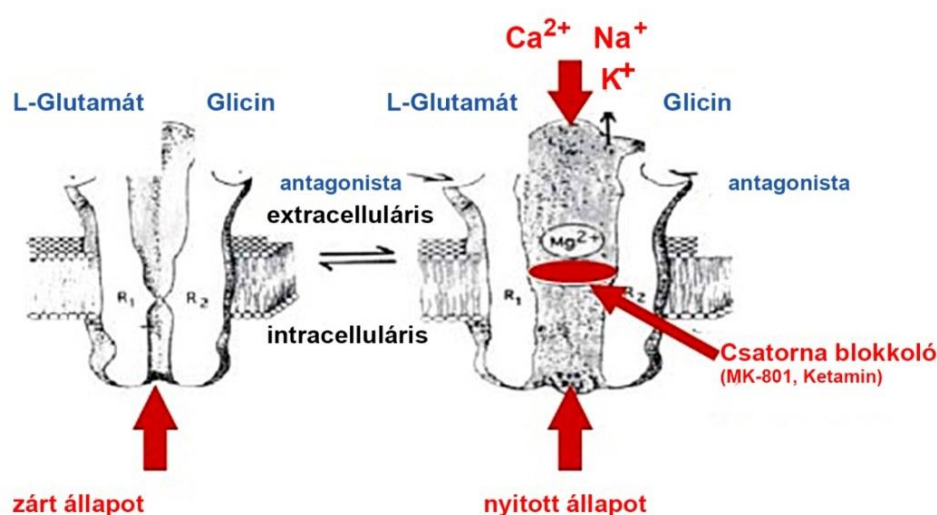
5 KETAMIN

A ketamin az állatkísérletekben gyakran alkalmazott anesztetikum. A drogok között egyedülálló módon mutat egyszerre hipnotikus, analgetikus és amnéziát okozó dóziszfüggő hatást. A ketamin disszociatív anesztetikum, hiszen egyszerre fájdalomcsillapító, megváltoztatja az éberségi szintet, percepciót, de nem okoz szedációt (Lu et al., 2008, Sinner and Graf, 2008). Funkcionálisan és elektrofiziológiailag is disszociáció figyelhető meg a thalamo–corticalis és a limbikus rendszerek között. A szenzoros bemenet még eléri a fogadó kérgi területeket, de az asszociáció már nem következik be. A humán kutatásokban testen kívüli élményként számoltak be a hatásáról (Green et al., 2011, Mion and Villevieille, 2013).

Az állatkísérletben altatáshoz xylazinnal kombináltan használják, ami szedatív, analgetikus, de nem anesztetikus ágens. A patkány–kísérletekben használt anaesztetikus dózis (80 mg/testsúly–kg) alkalmazását követően egy rövid ideig tartó, nagy delta hullámokkal jellemezhető hipnotikus állapot következik be, amit egy hosszabb, magas agykérgi aktivitással járó disszociatív fázis követ. A droghatás elmúltával az alvásdeprivációt követő pótláshoz hasonló folyamat figyelhető meg (Lu et al., 2008).

A ketamin nem kompetitív módon antagonizálja az N–metil–D–aszpartát receptort (NMDAR), így részlegesen blokkolja a glutamáterg neurotranszmissziót (Chauvette et al., 2011). A csatorna belsejében lévő Mg^{2+} kötőhelyhez kapcsolódik allosztérikus módon, így gátolja a nyitott csatornát (6. ábra) (Sinner and Graf, 2008). Az aktív enantimomer alakja az S(+)-ketamin, amely négyszer erősebben kötődik a receptorhoz, mint az R(-) izomer. Hatása összetett, hiszen több más receptorral is interakcióba lép, mint opioid, monoaminerg és kolinerg receptorok (Mion and Villevieille, 2013).

A glutaminsav a központi idegrendszer legáltalánosabb serkentő transzmittere, többek között a piramissejtek is glutamáterg transzmissziót folytatnak. A glutaminsavnak számos receptora van, ionotrópok és metabotrópok egyaránt. Az NMDA receptor az ionotróp típusba tartozik, különlegessége hogy Na^+ és K^+ ionok mellett a Ca^{++} ionokra is átjárható (Sinner and Graf, 2008). Fontos szerepet tulajdonítanak neki a tanulási mechanizmusokban (LTP: long-term potentiation) (Luscher and Malenka, 2012), de feladata ennél sokrétűbb, nyilvánvalóan részt vesz a kérgi szinkronizációs folyamatokban is. Például a ketamin anaesztetikus dózisa hatására kialakuló hipnotikus állapotra az up- és downstate-ek folyamatos váltakozása jellemző, ami sok kutatót a lassú hullámú alvás alatt megfigyelhető mintázatra emlékeztet, bár a természetes alvás esetében sokkal gyakoribbak és hosszabbak az aktív szakaszok és köztes állapotok is előfordulnak (Chauvette, 2011). Emellett a hiperglutamáterg állapot szerepet játszik a depresszió kialakításában is. Közelmúltban a tanulmányok egyértelműen igazolták, hogy a ketamin az NMDAR alulműködtetésével gyors antidepresszáns hatást okoz. Rövidtávon megoldást jelenthet a depresszió kezelésére (Mion and Villevieille, 2013).



6. ábra
N-metil-D-aszpartát receptor
(Sinner and Graf, 2008)

6 CÉLKITÚZÉS

A ketamin gyakran alkalmazott állatkísérleti anesztetikum. Szedatív hatása nincs (xylazinnal kombinálva használják), sőt szubanesztetikus dózis alkalmazása során a hipnotikus állapot sem következik be – vagy csak nagyon rövid ideig tart – hanem egy hosszú, magas agykérgi aktivitással járó állapot jelentkezik. A droghatás elmúltával az alvásdeprivációt követő pótláshoz hasonló folyamat figyelhető meg, mely a természetes alvásnak feleltethető meg jelen esetben (Lu et al., 2008). Tehát az imént említett hipotézis alapján, a ketamin, úgy vált ki ébrenléthez hasonló állapotot, hogy befolyásolja a homeosztatisztikus alvási szabályozást.

A droghatások vizsgálata során gyakori probléma, hogy az éberségi szintekre való hosszú távú hatásokat a cirkadián ritmus elfedheti. A rövid fény–sötét periódus hosszú távon a napi ritmus megszűnéséhez vezet (Usui et al., 2003), ezért az ilyen körülmények között tartott állatokban a különböző drogoknak az alvás–ébrenlét homeosztatisztikus szabályozására kifejtett hatása a cirkadián ritmustól függetlenül vizsgálható. Emellett megállapítható, hogy a vizsgált szerek befolyásolják-e, módosítják-e a fény közvetlen hatásait az egyes alvás–ébrenléti szakaszokra.

Kísérletem során, ultra-rövid mesterséges fény–sötét (LD 1:1) körülmények közé helyeztem a patkányokat, és 24 órás felvételek alapján, azt vizsgáltam, hogyan változtatja meg a ketamin hosszútávon az alvásmintázatot és ez milyen mértékben hasonlít a deprivációra, illetve a droghatás elmúltával jelentkező fokozott alvás mennyiben felel meg az alvásmegvonást követő pótlás (recovery) állapotához. A hasonlóságok és különbségek megállapításához a kérgi lassú hullámok jellemzőiben és a kérgi sejtek aktivitásában bekövetkező változásokat részletes analízisnek vetettem alá.

7 ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

7.1 ÁLLATOK

Kísérletemben 6 hím Wistar patkányt használtam, tömegük 340–585 gramm között változott. Az állatokat hangszigetelt szobában, 21°C-os hőmérsékleten, egyesével tartottam plexihengerben (magasság: 330mm, átmérő: 300mm). Megfelelő mennyiségű, minőségű táplálék és víz folyamatosan a rendelkezésükre állt. A vizsgálat megkezdése előtt három héttel a patkányok hozzá lettek szoktatva az 1–1 órás fény–sötét periódushoz. Az első világos szakasz 9:00–kor kezdődött, míg az első sötét szakasz 10:00–kor. Az állatok almozása mindig a fény szakaszban történt, ezáltal nem zavartam meg az LD 1:1 körülményeket. Méréseket azonban ezeken a napokon nem végeztem.

7.2 ELEKTRÓDOK

A vizsgálataimhoz 14-csatornás vertikális elektródegyüttest használtam, mellyel LFP-t (local field potencial) és soksejt-aktivitást (multi-unit activity, MUA) tudtam regisztrálni. Az elektródok 40µm vastag szigetelt platínium – irídium szálak, melyek egymástól 150µm távolságra helyezkednek el egy vertikális rozsdamentes acél csövön (Neuronelektrod Ltd, Budapest). Az EMG aktivitás monitorozásához a nyakszirtcsont melletti nyakizomba 2 darab izomelektrodot szúrtam. Ehhez rozsdamentes szigetelésű, 250µm átmérőjű (California Fine Wire, CA, USA) acélhuzalokat használtam.

7.3 MŰTÉT

Az altatáshoz ketamin – xylazin keveréket használtam. Az altatószer az állat tömegével arányosan 80 mg/testsúly–kg ketamint és 10 mg/testsúly–kg xylazint tartalmazott, melyet intraperitoneálisan adtam be. A patkány testhőmérsékletének fenntartása érdekében melegítőpadon végeztem az elektródok beültetését. A fej rögzítéséhez sztereotaxikus készüléket (David Kopf) alkalmaztam. A koponya megtisztítása után az elektródegyüttes helyét pozicionáltam: bregmától posterior +2.00mm, balra laterálisan +2.00mm (motoros kéreg). A behelyezés után a csonthoz fogászati cementtel rögzítettem. A műtét után 1 hét felépülési időt hagytam az állatoknak.

7.4 KÍSÉRLET

A műtét előtti hetekben az állatokat 1–1 órás fény–sötét szakaszt (light – dark conditions, 1–1 hour [LD (1:1)]) biztosító szobába helyeztem. Egy hetes felépülési és hozzászokási időt követően több alkalommal 24 órás kontrollfelvételeket készítettem. A felvételek mindig a világos szakaszban 9:00–kor kezdődtek.

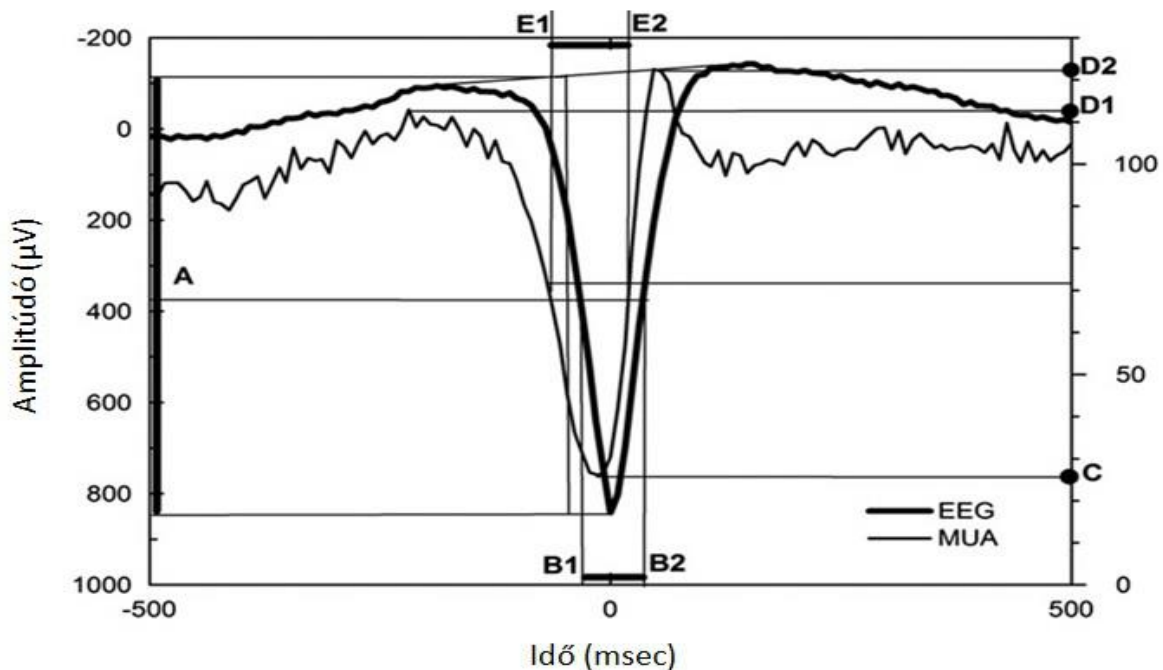
A ketaminos mérés 24 órás rögzítése 9:00–kor kezdődött, az anesztetikus dózishoz megfelelő mennyiségű ketamin beadását követően. A 6 órás depriváció szintén 9:00–kor kezdődött, melyet a „gentle handling” módszerével hajtottam végre: nem megszokott táplálék adása vagy számukra „érdekes játék” elhelyezése a plexihengerbe. Ezt követően a pótlási (recovery) fázist 18 órán keresztül regisztráltam. A jeleket házilag készített előerősítőn keresztül vezettem az erősítőbe (Elsoft BT.), majd 500–szoros erősítés és szűrés (0.3Hz – 10kHz) után A/D kártyával digitalizáltam és a számítógépen rögzítettem (NI6254M, 16bit ill. Labview; National Instruments, Austin TX, USA). A mintavételi frekvencia 8192Hz volt. A 2 hatványait a Fourier analízis pontosságának és sebességének a növelése végett alkalmaztam.

7.5 ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

Az alvás–ébrenléti ciklus meghatározásához készült fájlokat Dr. Détári László által készített szoftver segítségével elemeztem. Először Fast–Fourier analízist végeztem, mellyel 4 másodperces EEG szakaszok teljesítmény–spektrumát határoztam meg a delta, teta, alfa és a béta frekvenciasávokban. Ezek után a delta teljesítmény (DP), a teta/delta arány és az izomvariancia adatok alapján meghatároztam az alvás–ébrenléti fázisokat. Az elemzés első lépéseként a paradox alvási szakaszokat jelöltem be manuálisan, alacsony DP, magas teta/delta arány és alacsony izomaktivitás esetén. A többi fázist a szoftver automatikusan osztotta be a kontrollfelvételek alapján meghatározott 25, 50 és 75%–os DP–limitek alapján. Végeredményként kaptam egy hipnogrammot, melyben megkülönböztettem aktív ébrenlést (AW), nyugodt ébrenlést (QW), felületes alvást (LS), mélyalvást (DS) és paradox alvást (PS). A különböző fázisokban töltött időt és a különböző frekvenciasávok teljesítményértékeit 1–1 órás bontásban összegeztem és az adatsorokat Excel táblázatba helyeztem. A teljesítményértékeket – mivel ezek nagyban függenek az elektród pontos helyétől, ellenállásától stb. – átlagolás előtt állatonként normalizáltam.

A hiperpolarizált „down–state” állapotoknak megfelelő mélyben pozitív lassú LFP hullámokat egy másik, szintén Dr. Détári László által készített program segítségével

válogattam ki, azt az elvezetést használva, melyen a lassú hullámok a legnagyobb amplitúdóval jelentek meg. Meghatároztam az ébrenlét alatt regisztrálható maximális LFP amplitúdót. Ennek az értéknek a háromszorosát használtam küszöbnek, azaz csak azokat a hullámokat tekintettem „down state”-nek, amik túllépték ezt a limitet. A kiválogatott görbék maximuma körül 1000 ms hosszúságú szakaszokat óránként átlagoltam. Meghatároztam az egy óra alatt megjelenő „down-state”-ek számát, félszélességét és amplitúdóját. A görbe amplitúdójának a maximum és a két lokális minimum átlaga közti különbséget tekintettem (7. ábra).



7. ábra

Átlagolt lassú hullámok (vastaggal jelölt) és MUA (vékonyal jelölt) görbék jellemzése. A: down-state amplitúdója; B1 – B2: down-state időtartam; C: MUA minimum; D1, D2: MUA maximum; E1 – E2: MUA időtartam
(Hajnik et al., 2013)

A soksejt- (multi-unit) aktivitás elemzéséhez a nagyfrekvenciás felvételeket digitálisan megszűrtem (felüláteresztő szűrő 128Hz-nél), majd 1/128s hosszú intervallumokban meghatároztam a küszöböt (a háttéraktivitás szórásának négyszeresét) meghaladó pozitív csúcsok számát. A fenti módon kiválogatott lassú hullámok maximuma körül (1000 ms hosszan), óránkénti bontásban a soksejt-aktivitás adatait is átlagoltam így a lassú hullámok alatt a sejtaktivitásban bekövetkező változásokat – minimum, félszélesség – is vizsgálhattam (7. ábra).

A lassú kérgi hullámok alatt a lokális extracelluláris potenciálváltozások által indukált szinaptikus áramok pontos meghatározásához egy dimenziós áramforrás-sűrűség (current

source density (CSD)) analízist végeztem. A felvételek egy-egy reprezentatív 10 perces szakaszában – 1: ketamin anaesztézia; 2: ketamin okozta hiperaktív szakaszt követő alvás; ill. 3: deprivációt követő alvás – a vertikális elektródegyüttes mind a 14-csatornáján átlagoltam a lassú hullámok körüli 1 másodperces szakaszokat. Az ábrákat egy MATLAB script segítségével hoztam létre amely a következő formulát használja fel (Mitzdorf, 1985):

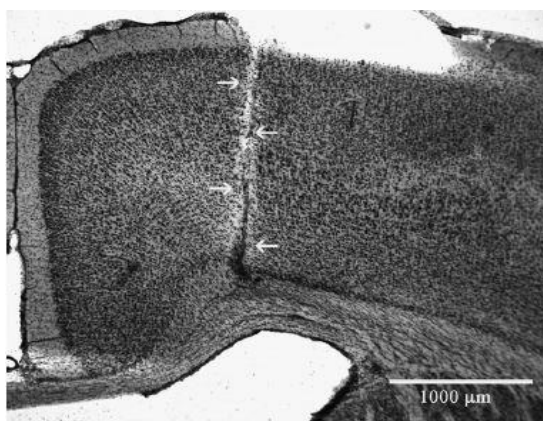
$$CSD(h,t) = \frac{\Phi(h-n\Delta h,t) - 2\Phi(h,t) + \Phi(h+n\Delta h,t)}{\Delta h^2},$$

(CSD(h,t): CSD t időben és h mélységben; $\Phi(h,t)$: átlagolt mezőpotenciál t időben és h mélységben; Δh : az elektródfelszínek közötti távolság (150 μ m)).

Végül az adatokon statisztikai elemzéseket (ANOVA split-splot, kétmintás t-próba) végeztem.

7.6 SZÖVETTANI VIZSGÁLATOK

A vertikális elektródegyüttes pontos helyének ellenőrzéséhez szövettani vizsgálatokat végeztem. Az elektród helyét egyenáramú lézióval megjelöltem. A kísérletek végeztével az állatokat mély uretán narkózisban paraformaldehiddel (PFA) perfundáltam. A fixált agyból 50 μ m-es szeleteket készítettem, és gallocianiddal megfestettem. A szúrt csatorna helyét fénymikroszkóp segítségével határoztam meg. Referenciaként a Paxinos és Watson-féle sztereotaxikus atlaszt használtam (8. ábra).



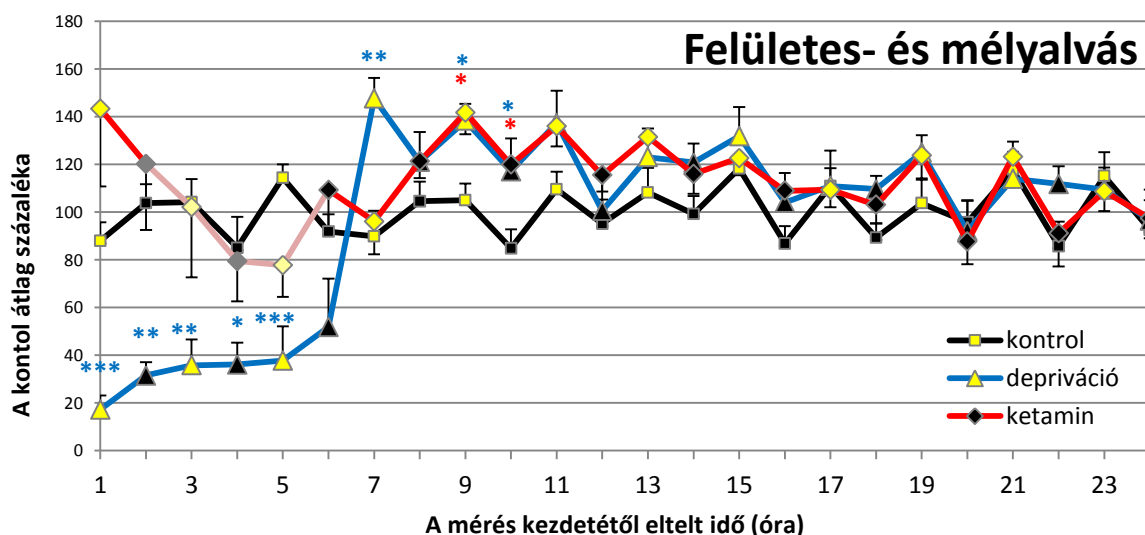
8. ábra

Saját készítésű metszet. A nyilak az elektródegyüttes helyét jelölik a motoros kéregben

8 EREDMÉNYEK

8.1 KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS AZ ALVÁSDEPRIVÁCIÓ HATÁSA AZ ALVÁS-ÉBRENLÉTI SZAKASZOK HOSSZÁRA

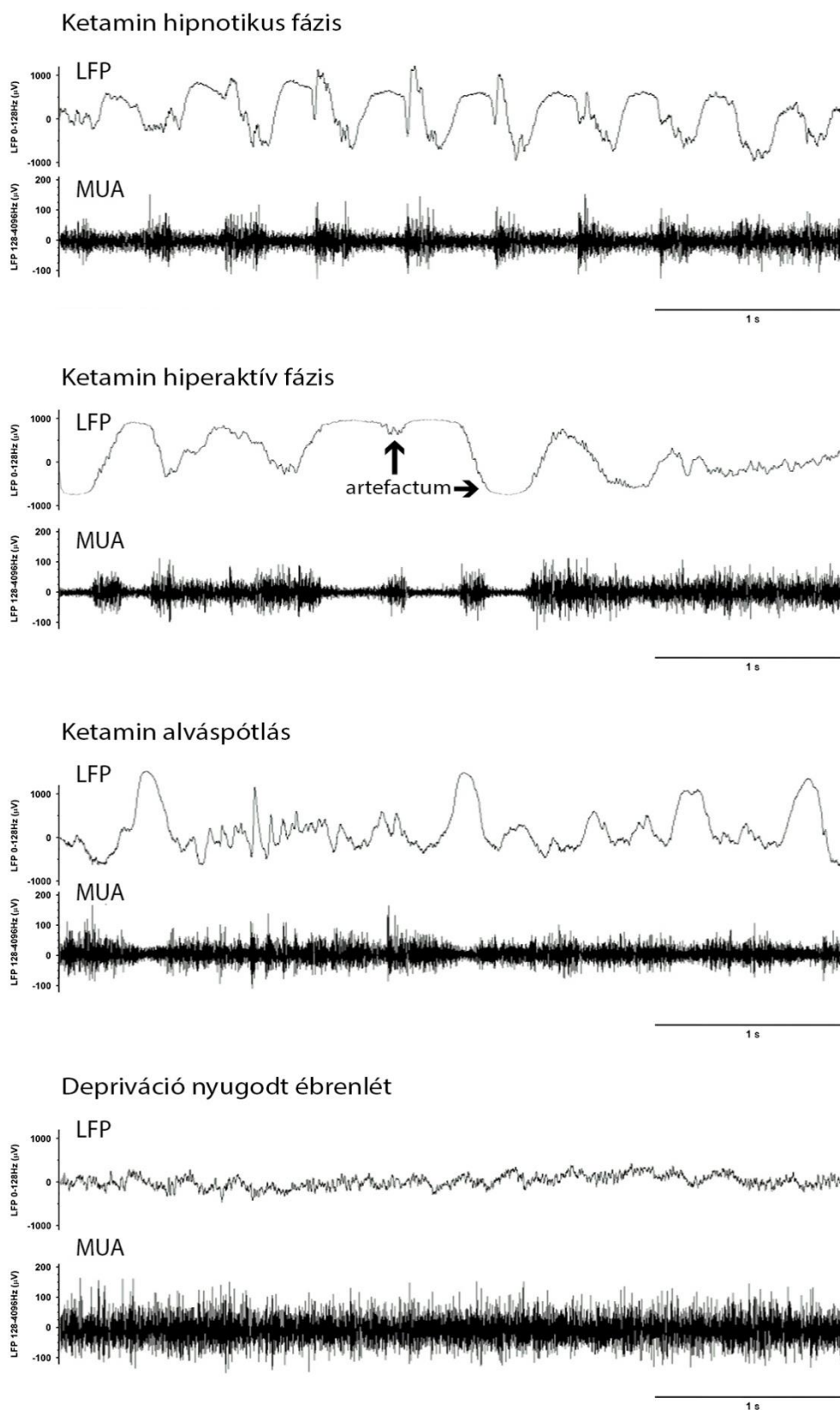
Több hetes ultra – rövid fény – sötét (LD 1:1) körülmény között tartott állatokban a napi ritmus gyakorlatilag megszűnt (9. ábra). Az óránkénti alvás mennyiség egyenletes oszlott el a nap folyamán, úgy, hogy a világos órákban szignifikánsan többet töltöttek NREM alvásban, sötétben pedig szignifikánsan többet REM alvásban. A depriváció alatt az állatok többnyire aktív vagy nyugodt ébrenléti állapotban voltak, bár az alvási nyomás növekedésével egyre nehezebb volt ébren tartani őket, a felületes alvás mennyisége fokozatosan nőtt. A megvonást követően szignifikánsan nőtt a mélyalvásban töltött idő.



9. ábra

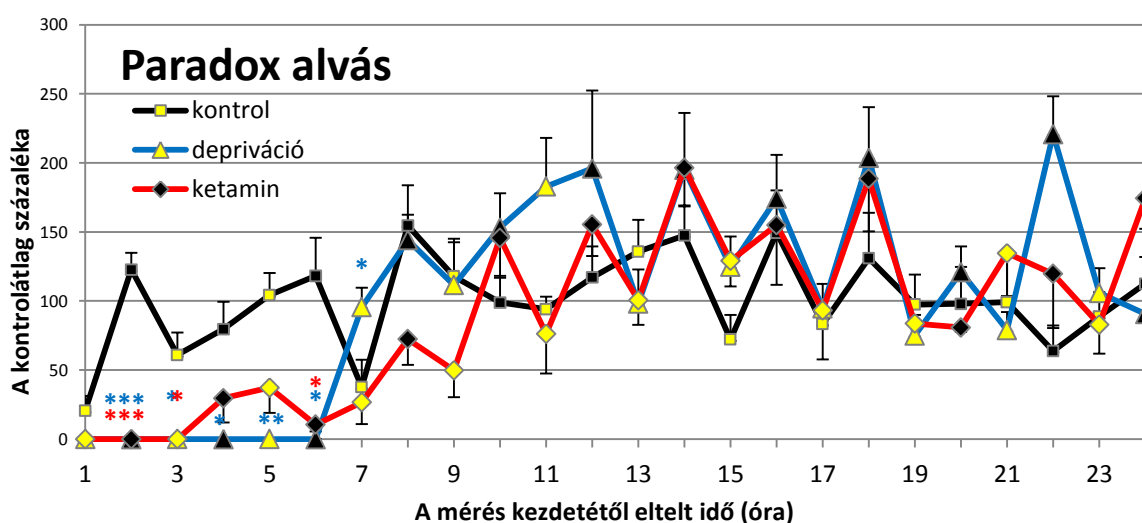
LD 1:1 –ben tartott állatok NREM alvásának (felületes és mélyalvás) napi eloszlása óránként, százalékos értékben kifejezve. Sárga adatpontok: világos órák; fekete adatpontok: sötét órák; fekete vonal: kontroll; piros vonal: ketamin; kék vonal: depriváció és recovery. ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$

A ketamin beadásának hatására egy rövid ideig tartó (10–40perc) hipnotikus állapot alakult ki, amit hosszabb ($5,2 \pm 2,0$ óra) aktív ébrenléthez hasonló állapot követett. Az állatok folyamatosan mozogtak, ami gyakori mozgási műtermékeket okozott az LFP elektródokon is (10. ábra). A műtermékek egy részének frekvenciája és amplitúdója a delta hullámokhoz hasonló, ezért automatikus kiválogatásuk nem lett tökéletes. Ezt a tényt a ketamin hatást ábrázoló görbéken halvány vonallal érzékeltettem. A ketamin hatását követően az irodalmi adatoknak megfelelően, megnövekedett a NREM alvásban töltött idő, ez azonban csak a 9–10. órában szignifikáns, amikor már minden állatban elmúlt a droghatás (9. ábra).



10. ábra
4 másodperces eredeti LFP felvételek

A REM alvás – annak ellenére, hogy mind a ketamin, mind a depriváció hosszú időre megszüntette – csak a deprivációt követő első órában mutat szignifikáns növekedést. Ez valószínűleg az egyedi értékek nagy szórásának tudható be, hiszen az átlagok hosszú ideig szinte minden órában a kontrol fölött voltak (11. ábra). Megfigyelhető a REM alvás óránkénti mennyisége a sötét órákban magasabb. A sötét és világos órák közötti különbség a ketamin-hatást követő pótlás során kifejezetten nőtt: az értékek a világos órákban a kontrol közelében, a sötét órákban viszont fölötté vannak, bár az egyes értékek a nagy szórás miatt nem szignifikánsak. A REM alvás pótlása tehát elsősorban a sötét órákban zajlott.

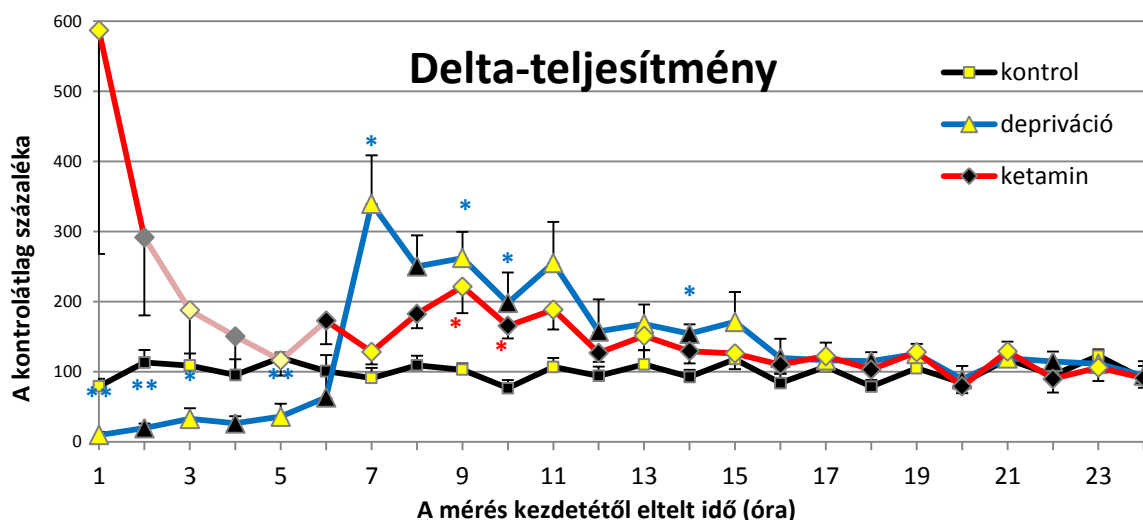


11. ábra

LD 1:1 –ben tartott állatok REM alvásának (felületes és mélyalvás) napi eloszlása óránként, százalékos értékekben kifejezve. Sárga adatpontok: világos órák; fekete adatpontok: sötét órák; fekete vonal: kontrol; piros vonal: ketamin; kék vonal: depriváció és recovery. ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$

8.2 KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS AZ ALVÁSDEPRIVÁCIÓ HATÁSA A DELTA TELJESÍTMÉNYRE

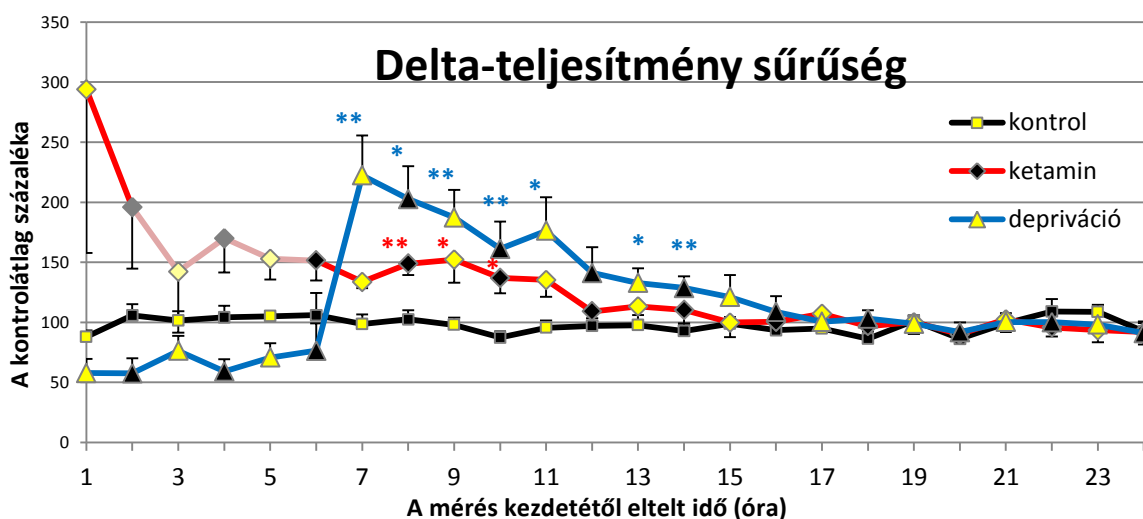
A NREM alvás intenzitását a delta tartomány teljesítménye tükrözi. A deprivációt követő pótlás során nagymértékű növekedés látható. A pótlás főként a világos órákban volt nagymértékű, a világos és sötét órák közti különbség megnövekedett. A ketamin először óriási deltateljesítmény növekedést okozott, majd a hiperaktivitást követő pótlási idő alatt újra szignifikánsan a kontrol fölött volt, bár a deprivációhoz képest a növekedés kisebb volt (12. ábra).



12. ábra

LD 1:1 –ben tartott állatok NREM alatti delta teljesítményének napi eloszlása óránként, százalékos értékben kifejezve. Sárga adatpontok: világos órák; fekete adatpontok: sötét órák; fekete vonal: kontroll; piros vonal: ketamin; kék vonal: depriváció és recovery. ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$

Elemeztem a delta sáv teljesítménysűrűségét, azaz az egységi NREM alvásra eső delta teljesítményt is (delta teljesítmény/alvási idő). Mind a ketamin, mind a depriváció hatására ez az érték is szignifikánsan megemelkedett. Tovább nőtt a különbség a depriváció és a ketaminhatás erőssége között: a depriváció több órán keresztül szignifikáns növekedést mutatott (13. ábra).

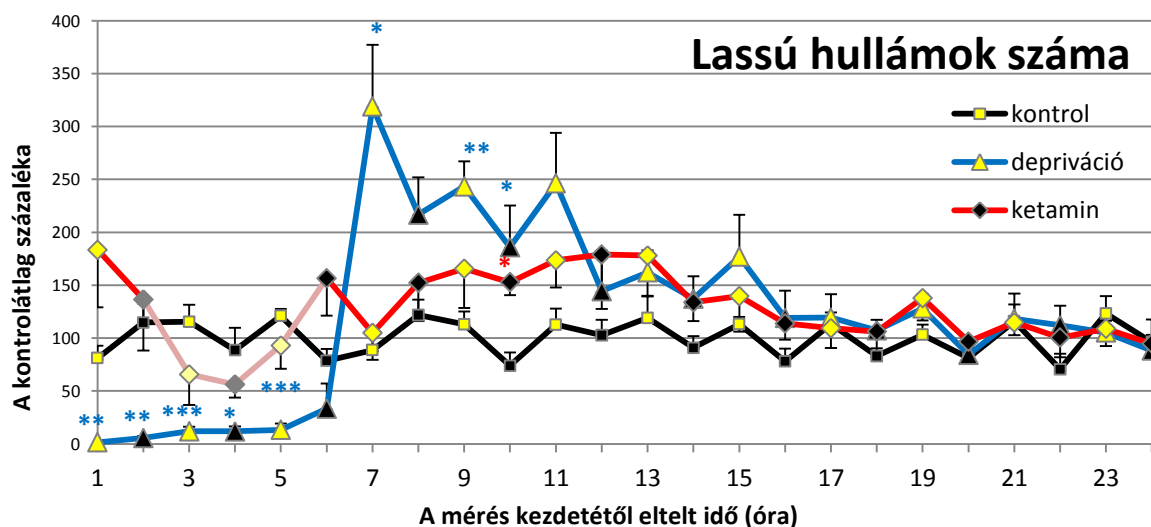


13. ábra

LD 1:1 –ben tartott állatok NREM alatti delta-teljesítmény sűrűségének napi eloszlása óránként, százalékos értékben kifejezve. Sárga adatpontok: világos órák; fekete adatpontok: sötét órák; fekete vonal: kontroll; piros vonal: ketamin; kék vonal: depriváció és recovery. ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$

8.3 KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS AZ ALVÁSDEPRIVÁCIÓ HATÁSA A KÉRGI LASSÚ HULLÁMOK PARAMÉTEREIRE

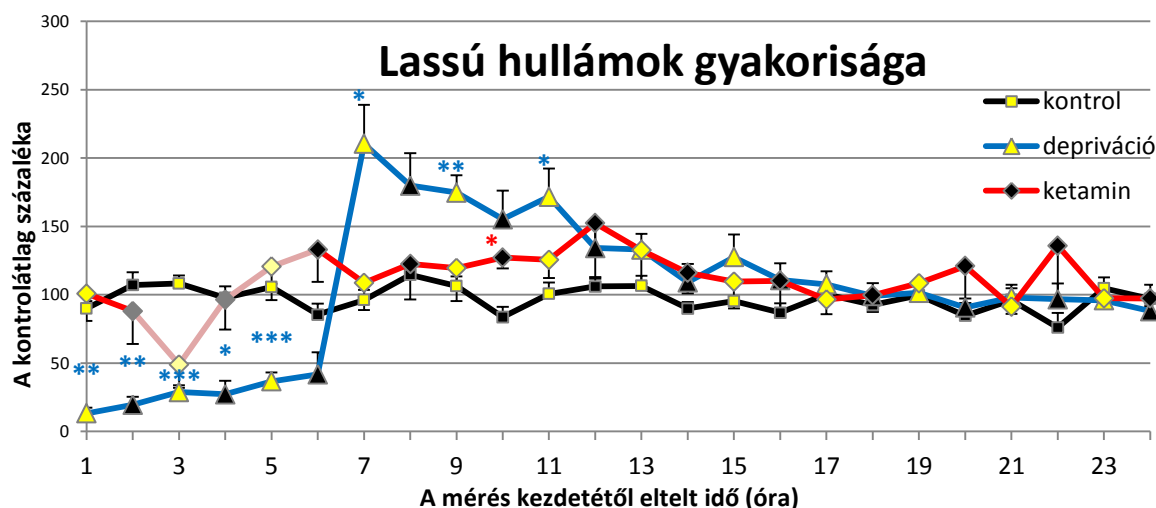
A EEG delta hullámai a „down-state”-ek alatt regisztrálható mélyben pozitív lassú mezőpotenciáloknak felelnek meg, a delta teljesítmény növekedésének hátterében ezen hullámok mennyiségének vagy alakjának változásai állnak (14. ábra). A ketamin kezdetben az „up-és „down-state” -ek folyamatos váltakozását okozta (10. ábra) – ez a lassú hullámok mennyiségének óriási növekedését eredményezte, de mivel a hatás csak rövid ideig tartott, az óránkénti átlagban ez csak kevéssé tükröződik. A hullámok alakja is megváltozott: szélességük megnőtt, amplitúdójuk pedig – bár nem minden állatban – csökkent. Az alvásdeprivációt követően az irodalmi adatoknak megfelelően elsősorban a lassú hullámok száma növekedett szignifikánsan (14. ábra). A ketamin okozta ébrenlét elmúltával csak kisebb mértékű mennyiségi növekedés látható. A hullámok amplitúdója a ketaminos mérésekben nem változott, a deprivációt követően is csak enyhén, és csak a pótlás első órájában. A hullámok félszélessége szignifikánsan és tartósan, de csak kis mértékben volt a kontrol érték fölött – mind a deprivációs, mind a ketaminos mérésekben. A lassú hullámok mennyisége a NREM alvási időhöz és a delta teljesítményhez hasonlóan a világos órákban volt nagyobb, ez a különbség deprivációt követően fokozódott, a ketamin okozta ébrenlétet követően viszont csökkent.



14. ábra

A kéri lassú hullámok óránkénti mennyiségének napi eloszlása LD 1:1 -ben tartott állatokban. Sárga adatpontok: világos órák; fekete adatpontok: sötét órák; fekete vonal: kontroll; piros vonal: ketamin; kék vonal: depriváció és recovery. ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$

A lassú hullámok esetében is meghatároztam az egységi NREM alvásra eső darabszámot, azaz a hullámok gyakoriságát (15. ábra). A ketamin ebben a paraméterben még kisebb növekedést okozott a deprivációhoz képest. A fény közvetlen hatása is megváltozni látszik, depriváció után inkább a világos, ketamin után inkább a sötét órákban nagyobb (ezek a változások csak tendenciaszerűek, nem szignifikánsak).



15. ábra

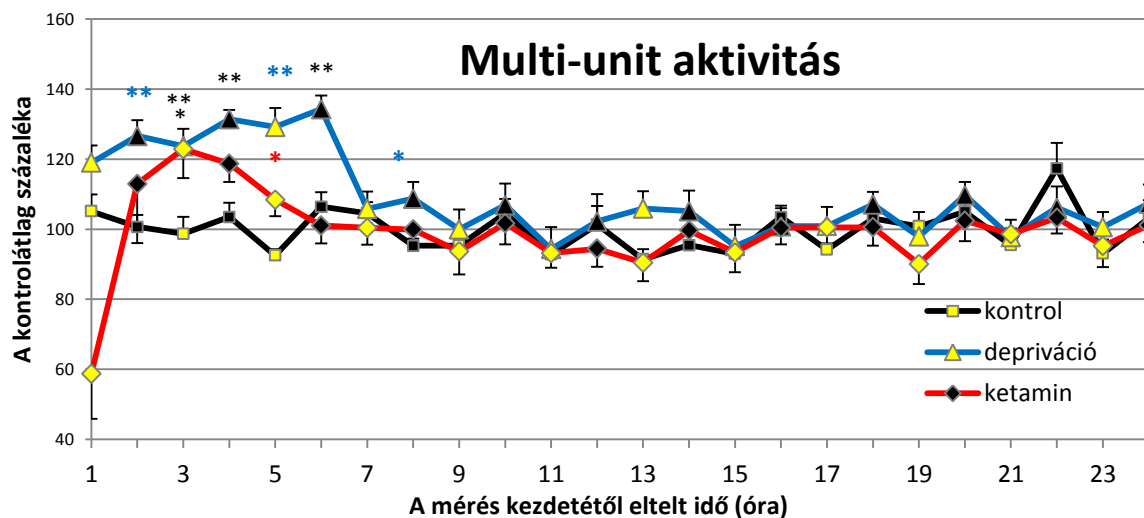
A kéri lassú hullámok óránkénti gyakorisága LD 1:1 –ben tartott állatokban. Sárga adatpontok: világos órák; fekete adatpontok: sötét órák; fekete vonal: kontrol; piros vonal: ketamin; kék vonal: depriváció és recovery. ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$

8.4 KETAMIN–INJEKCIÓ ÉS AZ ALVÁSDEPRIVÁCIÓ HATÁSA A SOKSEJT–AKTIVITÁSRA

A kéri lassú hullámok a lassú kéri ritmus hatására alakulnak ki, a mélyben pozitív hullám maximuma a sejtek elcsendesülését, a sejtmembrán hiperpolarizált állapotát tükrözi. A hullámok alakjában megfigyelhető változásokat követi a MUA változása is: a csökkenés mértéke (MUA–minimum) nem változik sem a deprivációt, sem a ketaminhatást követően, a csendes időszak hossza enyhe mértékben, de szignifikánsan nő mindkét esetben.

Megvizsgáltam az átlagos soksejt–aktivitást is, mind alvási fázisoktól függően, mind azoktól függetlenül. Az átlagos MUA sötétben szignifikánsan magasabb volt, mint világosban, részben a magasabb sejtaktivitással jellemezhető éber szakaszok nagyobb gyakorisága miatt. Szintén az aktív ébrenlét dominanciája miatt magas a MUA a depriváció és a ketamin okozta hiperaktív szakasz alatt. Különbség viszont, hogy míg a ketamin kiürülésével párhuzamosan a MUA is csökken, a depriváció alatt – az aktív ébrenlét

csökkenése és a rövid felületes alvásszakaszok növekedése ellenére – a MUA fokozatos növekedést mutat (16. ábra).

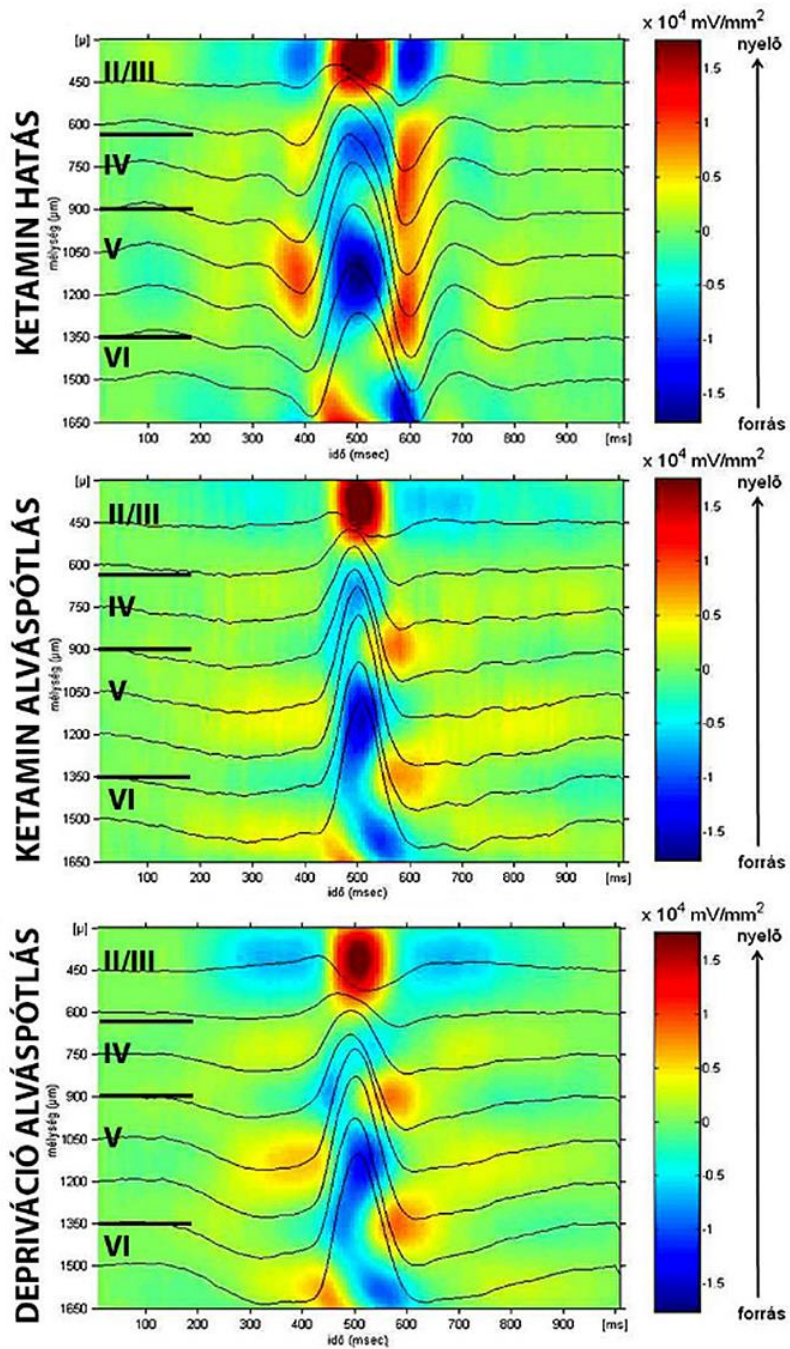


16. ábra

A kéri MUA aktivitás óránkénti átlagának napi eloszlása LD 1:1 –ben tartott állatokban. Sárga adatpontok: világos órák; fekete adatpontok: sötét órák; fekete vonal: kontroll; piros vonal: ketamin; kék vonal: depriváció és recovery. ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$

8.5 KETAMIN-INJEKCIÓ ÉS A DEPRIVÁCIÓ HATÁSA A CSD-RE

A sejtek hiperpolarizáltságának megfelelően a lassú hullámok maximuma alatt a mélyebb rétegekben egy erős forrás (source) jelent meg, a neki megfelelő nyelő (sink) a II-es rétegben alakult ki. A legerősebb jel abban a mélységben alakult ki, ahol a legnagyobb amplitúdójú LFP hullámokat regisztráltuk, ez a kéreg V. rétegének felel meg. A ketamin okozta hiperaktivitást követő alvás során jelentkező lassú hullámok alatt kialakuló áramok nem különböztek a deprivációt követő alvás alatt megjelenőktől. A ketamin–anesthézia során kialakuló szélesebb hullámok alatt is hasonlóak voltak ezek az áramok, de nagyobb intenzitásúak (17. ábra).



17. ábra

Az átlagolt kérgi lassú hullámok CSD profiljai. Az átlagolás egy–egy tíz perces reprezentatív felvételtől történt, egy általam kiválasztott állatból. Felső: A ketamin kezdeti hatása Középső: A ketamin okozta hiperaktivitást követő alvás Alsó: A deprivációt követő alváspótlás

9 DISZKUSSZIÓ

A droghatások háttérében álló élettani folyamatok könnyebben vizsgálhatóak, ha a droghatással interferáló egyéb hatásokat kiküszöböljük. Az alvási ciklust szabályozó neuroncsoportok aktivitása például cirkadián ritmust követ, ami a drogok alvásra gyakorolt hatásait módosíthatja – pl. nagyobbnak vagy kisebbnek tüntetve fel azt. Az ultra-rövid fényt (LD 1:1) periódus váltakozása hosszútávon a napi ritmus megszűnéséhez vezet (Usui et al., 2003). A kísérletemben 4–5 hetet töltöttek az állatok LD 1:1 körülmények között, mely elegendő volt a napi ritmus teljesen megszűnéséhez.

A ketamin normál anesztetikus dózisának (80 mg/testsúly–kg) hatására a patkányokban egy rövid ideig tartó (10–40 perces) hipnotikus állapot alakul ki, ezalatt a piramissejtek „Up” és „Down” állapotai szélsőségesen és hiperszinkronizáltan jelentkeznek, a kéregből egyenletesen nagy amplitúdójú lassú hullámok vezethetők el (10. ábra). A ketamin nem-kompetitív módon antagonizálja az NMDA-receptort, ezáltal akadályozza a glutamáterg serkentő transzmissziót. Több más receptor és ioncsatorna működését is befolyásolja, ezek közül még jelentős kortikális szinaptikus ritmicitást potenciózó szerepet játszhat a hiperpolarizáció-aktivált kationcsatornák (HCN1) gátlása. Így nem alakul ki depolarizáció, a sejtek hiperpolarizált állapotban maradnak, valamint megnő a szinaptikus hatékonyság (Chauvette et al., 2011, Zhou et al., 2013).

C-Fos vizsgálatok segítségével kimutatták, hogy nagy dózisban (150 mg/testsúly–kg) a ketamin gátolja mind az alvás, mint az ébrenlét serkentésében szereplő területeket, míg kisebb, szubanesztetikus dózisban (30–60 mg/testsúly–kg), illetve a drogkoncentráció csökkenésével az aktiváló rendszerek fokozott működését idézi elő az alvásközpont (ventrolateralis preopticus area, VLPO) teljes gátlása mellett. Ez eredményezi a jellegzetes hiperaktív állapotot (Lu et al., 2008, Chauvette et al., 2011). Elképzelhető, hogy az NMDA receptorok ketaminnal való gátlása a GABAerg (γ -amino-vajsav) sejteken erősebb (illetve kisebb dózisok esetén dominál), ezért gátlódnak a GABAerg VLPO sejtek, miközben az aktiváló rendszerek felszabadulnak a GABAerg gátlás alól.

A ketamint a disszociatív anesztetikumok közé sorolják, mivel analgéziát (fájdalomcsillapítás) és amnéziát (emlékezetkiesés) okoz, de nem jár a tudat teljes elvesztésével. Tehát a szenzoros bemenet még eléri az agykérget, de az asszociációja már nem következik be (Mion and Villevieille, 2013). Mind a ketamin okozta hiperaktív, disszociatív állapotot, mind a hagyományos „gentle handling” módszerrel végzett alvásdeprivációt

hasonlónak tűnő alváspótlás követ (Campbell and Feinberg, 1996), jóllehet a két „ébrenlét” sok tekintetben eltér egymástól. A stresszt nem okozó depriváció tulajdonképpen a természetes ébrenlét meghosszabbítása, feltehetően ugyanazok a szabályozó agyterületek aktívak, illetve gátoltak, mint a természetes ébrenlét alatt, a rendszer működésében legfeljebb mennyiségi változások következnek be. A ketamin okozta hiperaktivitás ettől különbözik. A depriváció során a VLPO-t a „flip-flop” mechanizmus alapján az ébrenlét alatt a felszálló aktiváló területekről érkező projekciók tartják gátlás alatt. A ketamin az előbbiekkal ellentétben a VLPO GABAerg sejtjeire fejt ki közvetlen gátlást, az ARAS csak részben aktív a hiperaktív fázisban (Lu et al., 2008).

Mindezek ellenére eredményeink részben megerősítik a korábbi feltevéseket, miszerint a ketamin-hatást követő fokozott mennyiségű alvás a deprivációt követőhöz hasonlóan „pótlás”. Tehát a ketamin is hatással van a homeosztatikus alvási szabályozásra. Mindkét esetben nőtt a mélyalvásban töltött idő, illetve a delta teljesítmény növekedését a lassú hullámok gyakoriságának növekedése okozta. A mélyben pozitív lassú mezőpotenciálok háttérében álló csendes „down” állapotok hossza hasonlóképpen változott, valamint a hullámok félszélessége is mindkét esetben enyhén, de szignifikánsan nőtt a kontrolhoz képest. A depriváció okozta hatások azonban erősebbek voltak – ez részben annak tudható be, hogy a depriváció minden állat esetében ugyanakkor fejeződött be, míg a droghatás lecsengése az állatok között nagyobb szórást mutatott. Patkányban a ketamin felezési ideje átlagosan 2.5-3 óra (Veilleux-Lemieux et al., 2013). Emellett megállapítható, hogy a depriváció alatt teljesen éberek voltak az állatok, mivel intenzívebb alváspótlásra volt szükségük.

A „down-állapot” alatt a sejtek hiperpolarizált állapotban vannak, azaz negatívabb a membránpotenciáljuk. Tehát az extracelluláris térből pozitívabb membránpotenciál vezethető el. A lassú hullámok áramforrás-sűrűség profiljából megállapítható, hogy a lokális szinaptikus áramok tekintetében is csak mennyiségi változások történtek, a források és nyelők helyzete nem változott sem a deprivációt, sem a ketamin-hatást követő pótlás során. A ketamin-hatás hipnotikus fázisában intenzívebben követik egymást az down-állapotok és valamivel hosszabbak a természetes alvás alattiaknál, de a források és nyelők helyzetében nem látható változás: mindhárom esetben a kéreg V. rétegében - ahonnan a legnagyobb mélyben pozitív hullámokat regisztráltuk – egy erős forrás (source), a II. rétegben pedig egy neki megfelelő nyelő (sink) alakul ki.

A fény közvetlenül is képes befolyásolni a lassú hullámokat és az alvást, ennek háttérében a retina melanopszin tartalmú ganglionsejtjeiből eredő, közvetlenül az

alvásközpontba (VLPO) vetülő serkentő hatás áll (Muindi et al., 2014). Az állatok szignifikánsan több időt töltöttek NREM alvásban a világos, illetve REM alvásban a sötét órákban. Ennek egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a paradox alvás mindig egy adott mennyiségű mélyalvás után következhet csak be, ezért megjelenése eltolódik a sötét órákra. Egy másik magyarázat szerint a sötétnek direkt paradox alvást indukáló hatása van (Tsai, 2005), különösen akkor, ha fény az állatok mélyalvása során szűnik meg. Ez nagyon rövid időközönként váltakozó fény-sötét viszonyok között gyakori, ezért az indukáló hatás kifejezett.

Kísérletünk kimutatta a fény közvetlen szabályozó szerepét a deprivációt és a ketamin-hatást követő pótlás alatt egyaránt. A REM alvás hosszában megfigyelhető különbségek mindkét esetben nőttek. A fenti két gondolatmenetet követve vagy erősödött az a feltétel, hogy a REM csak adott mennyiségű mélyalvást követően léphet fel, vagy a mélyalvás pótlásának fokozott igénye a világos órákban tovább csökkentette a REM bekövetkezésének esélyét. A sötét direkt paradox alvást indukáló hatásának elméletét elfogadva pedig a deprivációt és a ketamin-hatást követő pótlás során vagy tovább erősödött a sötét REM indukáló hatása, vagy a villany leoltásának pillanataiban az állatok még gyakrabban voltak az indukáló hatást fokozó mélyalvás állapotában.

Érdekes módon a lassú hullámok megvilágítástól függő mennyiségére ellenkező hatást fejtett ki a depriváció és a ketamin: a deprivációt követő pótlás fokozta, a ketamin viszont csökkentette a kontrol mérésben kimutatható különbségeket. Sőt gyakoriságuk a sötét órákban tendenciaszerűen nőtt. Elképzelhető, hogy a ketamin ezt a hatását a retino-hypothalamicus pálya működésének befolyásolásával fejt ki.

Érdekes megfigyelés, hogy a ketaminnal kezelt állatok éberszerű viselkedése alapján – állandó mozgás, hiperaktivitás – azt vártuk volna, hogy a mozgatókéregbe helyezett elektródon ezekben a mérésekben magasabb soksejt-aktivitást fogunk regisztrálni, mint a depriváció alatt, mikor többnyire nyugodt ébrenléti állapotban lévő, jóval kevesebbet mozgó, sőt időnként figyelmünket kiejátszva szendergő állatokból származó mérésekben – ám ennek épp az ellenkezőjét tapasztaltuk. Lehetséges, hogy a ketaminos „ébrenlét” alatti alacsonyabb sejtaktivitás esetén kevesebb sejt kerül egyszerre aktivált állapotba vagy ugyanannyi sejt kisebb frekvenciával tüzel, mint a depriváció során. Feltételezhető, hogy ez a kisebb mértékű aktivitás hozzájárul ahhoz, hogy a „pótlás” mértéke – mélyalvásban töltött idő, deltateljesítmény - a ketamin-hatást követően kisebb mértékű volt.

Kísérleteinkben a ketamin anaesztetikus dózisát alkalmaztuk, ezért a természetes deprivációval összevethető hiperaktív fázist mindig megelőzte egy hipnotikus szakasz. Ráadásul ennek hossza az egyes állatok egyedi érzékenysége (illetve az i.p. beadott injekció pontos helyének) köszönhetően nagy szórást mutatott, ezért a hiperaktív fázisok is eltérő időszakokban (fényes vagy sötét órákban) kezdődtek, ami kedvezőtlenül befolyásolhatta az eredményeinket. Szubanaesztetikus dózis alkalmazásával a hipnotikus fázis nem következik be (Lu et al., 2008), és így a hiperaktív fázist követő pótlási időszak is szinkronizáltabban jelezhető. Ezért terveink között szerepel a ketamin dóziszfüggő hatásainak vizsgálata.

Nem vizsgáltuk részletesen – egyelőre – az LFP egyéb komponenseit, például a téta tartományt, ami a ketaminos hiperaktivitás alatt nagyon magas (Lu et al., 2008). Vizsgálata valószínűleg érdekes lehet, hiszen az NMDA receptorok fontos szerepet játszanak a téta hullámok fő generátorának tekintett hippocampusban, például az LTP genezisében.

Emellett jövőbeni terveink között szerepel, hogy a fény – ketamin hatásai közti interakciókat más kísérleti felállásokban – rövidebb illetve hosszabb fény–sötét váltakozás mellett - is teszteljük, hogy részletesebb képet kapjunk a ketamin okozta változásokról.

10 ÖSSZEFOGLALÁS

Az állatkísérletekben a ketamin egy gyakran alkalmazott anesztetikum. Anesztetikus dózis alkalmazása során először egy rövid ideig tartó, nagy delta hullámokkal jellemezhető hipnotikus állapot következik be, amit egy hosszabb, magas agykérgi aktivitással járó disszociatív fázis követ. A droghatás elmúltával az alvásdeprivációt követő pótláshoz hasonló folyamat figyelhető meg.

A droghatások vizsgálata során gyakori probléma, hogy az éberségi szintekre való hosszú távú hatásokat a cirkadián ritmus elfedheti. A rövid fény–sötét periódus hosszú távon a napi ritmus megszűnéséhez vezet.

Kísérleteinkben 1–1 órás fény–sötét periódushoz adaptálódott állatokba ültetett vertikális elektródegyüttes segítségével vizsgáltuk az éberségi szintek hosszában, a kérgi lassú hullámok paramétereiben és a kérgi soksejt–aktivitásban bekövetkező változásokat ketamin beadása után.

Az ultra-rövid fény–sötét periódus használatával bizonyítható, hogy a fény közvetlen hatással van a lassú hullámok megjelenésére – függetlenül a cirkadián ritmustól: megnövelte a lassú hullám gyakoriságot a mélyalvás alatt és csökkentette a REM időtartamát. A ketamin a szakirodalomban leírt módon hatott az éberségi szintekre, bár a REM pótlása a deprivációt követő pótláshoz képest kisebb mértékű volt. Az EEG delta tartományának megnövekedett teljesítménye elsősorban a lassú hullámok gyakoriságában bekövetkező változások következménye. A soksejt–aktivitás növekedése a „hiperaktív” EEG ellenére depriváció alatt mérhetőnél kisebb volt, negatív pótlás – kontroll alatti érték – egyik esetben sem volt megfigyelhető. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a fény megléte illetve hiánya módosíthatja a ketamin éberségi szintekre kifejtett hatásait.

11 SUMMARY

Ketamine is a frequently used anesthetic in animal experiments. At anesthetic doses a short lasting hypnotic state with large delta waves occurs followed by a longer dissociative phase with high cortical activity. After this hyperactive phase there is an increase of EEG delta activity, which is very similar to sleep recovery after sleep deprivation.

It is a common problem during the examination of drugs, that the long-term effects on the consciousness or direct effects on the EEG activity may be obscured by the circadian rhythm. Under short light-dark conditions the circadian rhythm become disarranged, which in long-term leads to the almost complete elimination of the daily rhythm.

In our experiments - by the use of vertical array electrodes implanted into animals adapted to 1-1 hour light-dark periods - we studied the changes in the length of sleep-wake states, the parameters of cortical slow waves and multi-unit activity caused by i.p. administration of ketamine.

Using the ultrashort photoperiod it can be proved, that the light directly affects the appearance of slow waves - irrespectively of the circadian rhythm: it increases the incidence of slow waves during deep sleep and decreases REM duration. Ketamine affected the wakefulness states in accordance with the relevant literature, although the increase of REM sleep duration after ketamine-induced hyperactivity was reduced compared to that after sleep deprivation. The increase of the EEG delta power is primarily the consequence of the higher incidence of slow waves. Despite of the high frequency EEG, the multiunit activity was lower during the hyperactive state caused by ketamine than during deprivation. We didn't experience negative rebound in either case. According to our results the existence or lack of light can modify the effect of ketamine on the wakefulness states.