

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Petrović

SPAVANJE I  
ELEKTROENCEFALOGRAFSKI RITMOVI  
KAO INDIKATORI POREMEĆAJA  
FUNKCIONALNO RAZLIČITIH  
HOLINERGIČKIH INERVACIJA VELIKOG  
MOZGA PACOVA

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena M. Petrović

SLEEP AND  
ELECTROENCEPHALOGRAPHIC  
RHYTHMS AS AN INDICATORS OF THE  
FUNCTIONALLY DISTINCT  
CHOLINERGIC INNERVATION  
DISORDERS IN RAT BRAIN

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

**Mentori:**

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

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

**Članovi komisije:**

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

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

Dr Aleksandar Kalauzi, naučni savetnik  
Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Dr Tihomir Ilić, redovni profesor  
Medicinski fakultet, VMA, Univerzitet Odbrane u Beogradu

Dr Lidija Radenović, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja” (projekat OI 173022), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom dr Jasne Šaponjić, naučnog savetnika.

## *Zahvalnica*

Iskrenu i duboku zahvalnost dugujem svom mentoru, **dr Jasni Šaponjić**, koja me je uvela u svet neuronauke i pokazala kako se treba baviti naukom. Neizmerno sam zahvalna na svestranoj podršci i poverenju koje mi je pružala od samog početka, na svim trenucima koje je provela sa mnom nesebično deleći svoje znanje, iskustvo i dragoceno vreme i na velikoj posvećenosti i neprocenjivoj pomoći u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Aleksandru Kalauziju** koji je vodio kompjutersku obradu signala i napisao programe koji su korišćeni u analizi spavanja i EEG signala. Zahvaljujem se na stručnoj pomoći i dragocenim savetima pruženim tokom izrade ove doktorske disertacije.

**Profesorima dr Pavlu Anđusu, dr Tihomiru Iliću i dr Lidiji Radenović** se zahvaljujem na vremenu koje su posvetili pregledu i oceni ove doktorske disertacije, kao i na stručnim savetima i sugestijama.

Koleginicama **Katarini Lazić i Jeleni Ćirić** sam neizmerno zahvalna na pomoći koju su mi nesebično pružale u eksperimentalnom radu i tokom izrade teze, kao i na podršci, razumevanju, strpljenju i prijateljstvu.

Veliku zahvalnost dugujem **Veri Tucović**, bez čije posvećenosti uzgajanju životinja ne bi bilo dobrih eksperimenata, a ni dobrih rezultata.

Hvala **mojoj porodici i svim mojim dragim prijateljima** na bezuslovnoj podršci i ljubavi. Hvala što ste bili tu za mene uvek kada je bilo potrebno.

Najveću zahvalnost dugujem svom suprugu **Anđeljku**, čija ljubav i podrška svemu daju smisao. Hvala što veruješ u mene i što razumeš...

## **Spavanje i elektroencefalografski ritmovi kao indikatori poremećaja funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova**

### **REZIME**

Alchajmerova bolest (AB) i Parkinsonova bolest (PB) su najčešće neurodegenerativne bolesti starenja. Neuropatologija AB i PB podrazumeva selektivan gubitak specifičnih populacija neurona, uključujući i holinergičke neurone bazalnog prednjeg mozga i moždanog stabla, kao i ushodni obrazac progresije neurodegeneracije od struktura u moždanom stablu uključenih u regulaciju REM („rapid eye movement”) spavanja ka prednjemoždanim regionima. Poremećaji ponašanja u toku REM spavanja („REM sleep behavior disorders” – RBD) veoma često ostaju neprimećeni kod AB i PB pacijenata i mogu se javiti godinama pa čak i decenijama pre motornih i kognitivnih poremećaja. Ovo ukazuje na značaj istraživanja poremećaja ponašanja u toku REM spavanja kao mogućeg ranog znaka pojave najčešćih neurodegenerativnih bolesti starenja.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio je da u eksperimentalnim modelima AB i PB holinergičke neuropatologije po prvi put ispita uticaj unilateralnih i bilateralnih lezija glavnog izvora kortikalne holinergičke inervacije (*nucleus basalis*, NB jedro) i glavnog izvora talamo-kortikalne holinergičke inervacije (*nucleus pedunculopontinus tegmentalis*, PPT jedro) velikog mozga pacova na spavanje i elektroencefalografske (EEG) ritmove. U ovim eksperimentalnim modelima holinergičke neuropatologije humanih bolesti (NB i PPT lezije) unilateralne lezije su predstavljale lakše oblike ili početne stadijume neurodegeneracija, dok su bilateralne lezije predstavljale teže oblike ili kasnije stadijume neurodegeneracija, a sama progresija bolesti je praćena ukupno 5 nedelja zavisno od eksperimentalne grupe.

U skladu sa osnovnom hipotezom ove doktorske disertacije, da funkcionalno različiti centralni holinergički sistemi imaju različite regulatorne funkcije u toku spavanja, koje se mogu definisati na osnovu EEG aktivnosti, postavljen je i osnovni cilj istraživanja: da se kroz analizu arhitekture spavanja, strukture prelaznih stanja i EEG

mikrostrukture osnovnih faza u toku spavanja (budnost, NREM – „non rapid eye movement”, REM) u eksperimentalnim modelima funkcionalno različite holinergičke neuropatologije pronađu potencijalni EEG markeri početka, težine i progresije neurodegeneracije, sa mogućnošću dalje primene ovako senzitivnih metoda (definisanih EEG markera) u eventualnoj prevenciji i promeni terapijskog pristupa u pacijenata sa rizikom razvoja AB i PB.

Mušjaci pacova Wistar soja su hronično implantirani za registrovanje spavanja. U toku operativne procedure za implantaciju elektroda za elektroencefalografiju (EEG) i elektromiografiju (EMG), korišćenjem tehnike stereotaksički navođene mikroinfuzije ibotenične kiseline (ekscitotoksina koji je generalni glutamatergički agonista), izvršene su selektivne unilateralne ili bilateralne NB ili PPT lezije.

Eksperimentalni protokol registrovanja spavanja je počinjao dve nedelje nakon oporavka od operativne procedure implantacije hroničnih elektroda, sa ili bez unilateralnih ili bilateralnih NB ili PPT lezija. Registrovano je 6 sati spavanja, jednom nedeljno tokom četiri nedelje u eksperimentima NB lezija, odnosno jednom nedeljno tokom pet nedelja u eksperimentima PPT lezija, korišćenjem programa DataWave SciWorks Experimenter 8.0 (Datawave Technologies, Longmont, SAD).

Nakon završetka eksperimentalnog protokola registrovanja spavanja, NB i PPT lezije su identifikovane NADPH – diaforaza histohemijskim bojenjem, a zatim i kvantifikovane u celokupnoj antero-posteriornoj dimenziji strukture korišćenjem ImageJ 1.46 programa (NIH, SAD).

Analiza spavanja i EEG signala urađena je, kako u kontrolnih pacova tako i u pacova sa identifikovanim NB ili PPT lezijama, u MATLAB 6.5 programu, korišćenjem originalno razvijenog programskog paketa. Na usnimljene šestočasovne signale je najpre primenjena Furijeova transformacija, a zatim je svaka od 2160 Furijeovih epoha dužine 10 s diferencirana kao budnost, NREM ili REM faza spavanja. Pored toga, za potrebe detaljnije analize poremećaja REM faze spavanja izazvanih bilateralnom PPT lezijom, grupisanje REM epoha je na osnovu snage EMG-a dodatno razdvojeno na dva podgrupisanja REM1 (REM epohe sa većom snagom EMG-a, patološki REM) i REM2 (REM epohe sa manjom snagom EMG-a, fiziološki REM). Potom je korišćenjem EEG

signala senzomotorne i motorne kore urađena topografska analiza arhitekture spavanja, strukture prelaznih stanja u toku spavanja, EEG mikrostrukture svih osnovnih faza u toku spavanja, kao i analiza kortiko-muskularnih koherencija između EEG-a senzomotorne ili motorne kore velikog mozga i EMG-a mišića dorzalne vratne muskulature. Za izračunavanje grupne raspodele gustine verovatnoće relativnih amplituda svih budnost/NREM/REM/REM1/REM2 konvencionalnih EEG frekventnih opsega u toku 6 h spavanja korišćena je PDE („Probability Density Estimate”) funkcija u MATLAB 6.5 programu. U daljoj funkcionalnoj analizi poremećaja REM faze spavanja, za svaki od konvencionalnih EEG frekventnih opsega su korišćenjem „cohere” funkcije u MATLAB 6.5 izračunate REM/REM1/REM2 kortiko-muskularne koherencije između EEG-a senzomotorne ili motorne kore i EMG-a mišića dorzalne vratne muskulature. Za statističku obradu svih podataka korišćena je neparametarska jednofaktorska Kruskal-Wallis ANOVA sa *post-hoc* Mann-Whitney U kontrastnim testom.

Bilateralna NB lezija je privremeno promenila arhitekturu spavanja 14 dana nakon lezije. Iako u slučaju fiziološke kontrole nije bilo razlika u trajanju budnosti, NREM i REM faze spavanja između senzomotorne i motorne kore, bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori smanjila trajanje budnosti i povećala trajanje NREM faze spavanja, dok je u motornoj kori smanjila trajanje budnosti i povećala trajanje REM faze spavanja. Istovremeno, u svim eksperimentalnim grupama, kako u fiziološkoj kontroli, tako i u unilateralnoj i bilateralnoj NB leziji, je EEG teta amplituda budnosti, NREM i REM faze spavanja bila niža u motornoj u odnosu na senzomotornu koru. Pored toga, bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori izazvala povećanje REM teta amplitude u trajanju od tri nedelje, dok su u motornoj kori i unilateralna i bilateralna NB lezija izazvale povećanje teta amplitude i u budnosti i u REM fazi spavanja.

PPT lezija nije promenila arhitekturu spavanja, ali je značajno izmenila strukturu prelaznih stanja, kao i EEG mikrostrukturu svih osnovnih faza spavanja. Obe lezije, i unilateralna i bilateralna PPT lezija, su dugotrajno povećale broj budnost/REM i REM/budnost prelaza tokom celokunog perioda od 5 nedelja. Ova promena u strukturi prelaznih stanja je od 28. dana bila praćena smanjenjem broja NREM/REM i REM/NREM prelaza, ali samo nakon bilateralne PPT lezije, kao težeg oblika



holinergičke neurodegeneracije. Unilateralna PPT lezija je izazvala povećanje EEG teta amplitude budnosti i EEG beta amplitude REM faze spavanja, a od treće nedelje nakon lezije i pad EEG delta amplitude budnosti. Bilateralna PPT lezija je izazvala povećanje EEG beta amplitude tokom svih faza spavanja, kao i povećanje EEG gama amplitude REM faze spavanja i smanjenje EEG delta amplitude budnosti i NREM faze spavanja.

Poređenje efekata bilateralne NB i bilateralne PPT lezije (modeli težih, odnosno progresivnijih oblika holinergičke neurodegeneracije) na arhitekturu spavanja, strukturu prelaznih stanja i EEG mikrostrukturu svih osnovnih faza spavanja je pokazalo postojanje topografski specifičnih razlika u poremećajima nastalim kao posledica degeneracije funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova. Za razliku od bilateralne NB lezije koja je privremeno izmenila trajanje budnosti i NREM faze spavanja u senzomotornoj kori, odnosno trajanje budnosti i REM faze spavanja u motornoj kori, bilateralna PPT lezija nije izmenila arhitekturu spavanja. Bilateralna PPT lezija je u obe kore dugotrajno (tokom 4 nedelje) povećala broj budnost/REM i REM/budnost prelaza i ovaj porast je bio praćen nekonzistentnim promenama u broju NREM/REM i REM/NREM prelaza u senzomotornoj kori, a u motornoj kori povećanjem broja ovih prelaza. Bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori smanjila broj NREM/REM i REM/NREM prelaza, dok je u motornoj kori povećala broj ovih prelaza tokom četiri nedelje. Promene u EEG mikrostrukturi nakon bilateralne PPT lezije bile su i u senzomotornoj i u motornoj kori izražene kao dugotrajno (tokom 4 nedelje) povećanje beta i gama amplitude budnosti, NREM i REM faze spavanja, odnosno kao smanjenje delta amplitude budnosti, ali samo u senzomotornoj kori. Nasuprot tome, bilateralna NB lezija je izazvala samo povećanje REM teta amplitude u senzomotornoj kori koje je trajalo tri nedelje.

Pored promena u strukturi prelaznih stanja u toku spavanja i EEG mikrostrukturi svih osnovnih faza spavanja, bilateralna PPT lezija je dodatno usloвила izdvajanje dva funkcionalno različita REM stanja u okviru REM faze spavanja, REM1 (PPT lezijom prouzrokovan patološki REM, REM bez atonije, REM sigma koherencije) i REM2 (fiziološki REM, REM sa atonijom, REM teta koherencije), naročito u motornoj kori. Iako nije promenila arhitekturu spavanja senzomotorne kore, bilateralna PPT lezija je u motornoj kori produžila trajanje patološkog REM1 stanja, a povećala broj

budnost/REM1/budnost i NREM/REM2/NREM prelaza u obe kore. U osnovi izmenjene REM EEG mikrostrukture su bile povećana beta amplituda senzomotorne kore za vreme celokupnog REM stanja i povećana teta amplituda motorne kore samo za vreme REM1 stanja. Bilateralna PPT lezija je izazvala generalizovan pad REM/REM1/REM2 beta kortiko-muskularne koherencije i dovela do izmene kontrole mišića dorzalne vratne muskulature dominantno iz senzomotorne kore.

Ova doktorska disertacija je, koristeći po prvi put nov eksperimentalni model holinergičke PB neuropatologije (PPT lezija), stereotaksički navođenu mikroinfuziju kao nov metodološki pristup za selektivne lezije moždanih jedara, nov histohemijski metod identifikacije deficita holinergičkih neurona, nov pristup u kvantifikaciji neuronskog deficita, kao i nov način analize EEG signala za vreme različitih faza spavanja, po prvi put dokazala topografski specifične razlike u arhitekturi spavanja, strukturi prelaznih stanja i EEG mikrostrukture osnovnih faza spavanja (budnost, NREM, REM), koje su nastale usled poremećaja funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova (NB lezija u odnosu na PPT leziju). U ovom novom eksperimentalnom modelu holinergičke PB neuropatologije po prvi put su dokazani dugotrajni i veoma ozbiljni poremećaji u spavanju izraženi kao: povećanje broja budnost/REM i REM/budnost prelaza, povećana kortikalna aktivacija tokom svih osnovnih faza spavanja, izdvajanje dva različita REM stanja (pojava patološkog REM stanja pored fiziološkog REM stanja), kao i dominantna izmena kontrole mišića dorzalne vratne muskulature iz senzomotorne kore, iskazana kao pad REM/REM1/REM2 beta koherencije.

**KLJUČNE REČI:** spavanje, elektroencefalografija (EEG), elektromiografija (EMG), holinergički neuroni, *nucleus basalis* (NB), *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT), lezija iboteničnom kiselinom (IBO), neurodegeneracija, pacov, kortiko-muskularna koherencija (CMC)

**NAUČNA OBLAST:** Neuronauke

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Neurofiziologija sa biofizikom

**UDK BROJ:**[[616.892.3+616.858]:636.028]:616.8-009.836 (043.3)

## **Sleep and electroencephalographic rhythms as an indicators of the functionally distinct cholinergic innervation disorders in rat brain**

### **ABSTRACT**

Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) are the most common neurodegenerative diseases of elderly. AD and PD neuropathology involves selective loss of specific neuronal population within the brain, including the basal forebrain and brainstem cholinergic neurons, with the ascending pattern of neurodegeneration progression from rapid eye movement (REM) sleep-related brainstem regulatory structures to the brain basal areas. REM sleep behavior disorders (RBD) very frequently go unnoticed in the AD and PD patients, and as a symptom, could precede the onset of motor and cognitive disturbances by years or even decades. This indicates the importance of RBD as a potential early marker of the neurodegenerative diseases of elderly.

Using the experimental models of AD and PD cholinergic neuropathology, this PhD thesis aimed to investigate for the first time the impact of unilateral and bilateral *nucleus basalis* (NB – the main source of cortical cholinergic innervation) and *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT – the main source of thalamo-cortical cholinergic innervation) lesions on sleep and electroencephalographic (EEG) rhythms during sleep in rat. In these experimental models of cholinergic neuropathology (NB and PPT lesions) the unilateral lesions were used as the models of mild or early stage neurodegenerations, whereas the bilateral lesions were used as the models of severe or progressed neurodegenerations, and the follow up period was up to 5 weeks depending on the experimental group.

Based on the hypothesis that functionally distinct cholinergic systems have different regulatory functions during sleep, that could be defined by EEG activity, this study aimed to investigate the sleep/wake architecture, sleep/wake state-related transitions structure and EEG microstructure of three main brain states (Wake, NREM – non rapid eye movement, REM) in order to find the possible EEG markers for the onset, severity, and progression of the functionally distinct cholinergic innervations disorders.

These EEG markers could be used as a sensitive and reliable methodology of early detection in the patients who are at risk to develop AD or PD, and for a potential prevention and modification of the therapeutic approach.

Male Wistar rats were chronically implanted for sleep recording. During operative procedure for the electroencephalographic (EEG) and electromyographic (EMG) electrodes implantation, the selective unilateral or bilateral NB or PPT lesions were performed by stereotaxically guided microinfusion of ibotenic acid (the general glutamate agonist).

Sleep recording sessions started after two weeks of recovery period. Sleep was recorded for 6 h, weekly, during 4 weeks in NB lesioned rats, and during 5 weeks in PPT lesioned rats, using DataWave SciWorks Experimenter 8.0 software (Datawave Technologies, Longmont, SAD).

At the end of recording sessions the NB and PPT lesions were identified by NADPH – diaphorase histochemistry, and quantified throughout the overall NB or PPT antero-posterior dimensions, using ImageJ 1.46 software (NIH, SAD).

Analysis of the signals recorded from the control rats and all rats with positively identified NB or PPT lesion was done in MATLAB 6.5 using originally developed software. Fourier analysis was applied on 6 h recordings, and each 10 s epoch was differentiated as Wake, NREM or REM state. Additionally, for detailed analysis of two distinct REM clusters, that emerged following bilateral PPT lesion, each REM epoch was further differentiated, based on the EMG power, as either REM without atonia (REM1, pathological REM), and REM with atonia (REM2, physiological REM). Further analysis included the topography of sleep/wake states architecture, sleep/wake state-related transitions structure, and EEG microstructure, as well as all REM related cortico-muscular coherences. To calculate the group probability density distribution of all conventional EEG frequency bands relative amplitudes/6 h for the Wake/NREM/REM/REM1/REM2 of each experimental group we used the Probability Density Estimate (PDE) routine within MATLAB 6.5. For the functional REM cluster differentiation the REM/REM1/REM2 cortico-muscular coherences (CMCs) were calculated separately, for each conventional EEG frequency band and each experimental

group, between the EEG of sensorimotor or motor cortex and the EMG of the dorsal nuchal muscles using the MATLAB 6.5 cohere routine. All statistical analyses were done using Kruskal-Wallis ANOVA with post-hoc Mann-Whitney U two-tailed tests.

Bilateral NB lesion transiently altered sleep/wake states topography 14 days following lesion. While the control rats exhibited equivalent durations of Wake, NREM and REM, as determined by sensorimotor versus motor cortex EEG, the bilateral NB lesion decreased Wake duration in both cortices, with NREM duration increased within the sensorimotor cortex, and REM duration increased within the motor cortex. At the same time, Wake, NREM and REM theta relative amplitude was lower in motor versus sensorimotor cortex in all experimental groups. In sensorimotor cortex the bilateral NB lesion increased only REM theta amplitude for three weeks, whereas in motor cortex both Wake and REM theta amplitude were transiently increased 14 days following both the unilateral and bilateral NB lesion.

PPT lesion did not change the sleep/wake architecture but did change the sleep/wake state-related transitions structure and the Wake/NREM/REM EEG microstructures. Both the unilateral and bilateral PPT lesions sustainably increased Wake/REM and REM/Wake transitions during 5 weeks, followed by the decreased NREM/REM and REM/NREM transitions from 28 days only in the case of the bilateral PPT lesion, as a more severe cholinergic neurodegeneration. The unilateral PPT lesion augmented Wake theta and REM beta amplitude, and with a delay of one week it attenuated Wake delta amplitude. The bilateral PPT lesion augmented beta amplitude during all sleep states, and REM gamma amplitude, but simultaneously attenuated Wake and NREM delta amplitude.

Comparison of the bilateral NB versus bilateral PPT lesion (the models of severe or progressed cholinergic neurodegenerations) effects on the sleep/wake states architecture, sleep/wake state-related transitions structure and EEG microstructures indicated the topographically specific differentiation of functionally distinct cholinergic innervation disorders. Whereas the bilateral NB lesion transiently altered Wake/NREM duration within the sensorimotor cortex, and Wake/REM duration within the motor cortex, the bilateral PPT lesion did not change the sleep/wake states distributions. Bilateral PPT lesion sustainably (during 4 weeks) increased the Wake/REM and

REM/Wake transitions within the both sensorimotor and motor cortex, followed by inconsistent dysregulation of the NREM/REM and REM/NREM transitions within the sensorimotor cortex, but oppositely by their increment within the motor cortex. Bilateral NB lesion sustainably (during 4 weeks) decreased the NREM/REM and REM/NREM transitions within the sensorimotor cortex, but oppositely increased them within the motor cortex. Sleep/wake state-related EEG microstructure following the bilateral PPT lesion was expressed as the sustained (during 4 weeks) Wake/NREM/REM beta and gamma amplitude augmentations within the both sensorimotor and motor cortex, and Wake delta amplitude attenuation, but only within the sensorimotor cortex. In contrast, the bilateral NB lesion augmented only REM theta amplitude within the sensorimotor cortex during three weeks.

Alongside the sleep/wake state-related transitions structure and Wake/NREM/REM EEG microstructure alteration, the bilateral PPT lesion in rats additionally potentiated the emergence of two distinct REM sleep states, REM1 (pathological REM, REM without atonia, sigma coherent REM) and REM2 (physiological REM, REM with atonia, theta coherent REM), specifically expressed within the motor cortex. Bilateral PPT lesion did not change the sleep/wake states architecture within the sensorimotor cortex, but pathologically increased the duration of REM1 within the motor cortex, alongside the increased Wake/REM1/Wake and NREM/REM2/NREM transitions within the both cortices. In addition, the augmented total REM beta amplitude within the sensorimotor cortex and REM1 theta amplitude within the motor cortex was the underlying EEG microstructure pathology. Finally, the bilateral PPT lesion dominantly induced sensorimotor cortex-dorsal nuchal muscle drive alteration, expressed throughout the REM/REM1/REM2 beta CMC decrease.

Introducing the novel experimental model of PD cholinergic neuropathology (PPT lesion), the stereotaxically guided microinfusion as a novel approach for the selective lesion of the brain nuclei, the novel histochemical method for the cholinergic neuronal loss identification, and the novel methodological approach for neuronal loss quantification, as well as the novel sleep-state related EEG signal analysis methodology, this PhD thesis evidenced for the first time the topographically different expression of the sleep/wake architecture, sleep/wake state-related transitions structure and

Wake/NREM/REM EEG microstructure, induced by the functionally distinct cholinergic innervation disorders in rat (NB versus PPT lesion). This study demonstrated for the first time the PPT lesion (novel experimental model of PD cholinergic neuropathology) induced sustained and more severe sleep disturbances expressed as: the Wake/REM and REM/Wake transitions increase, augmented cortical activation across all sleep/wake states, potentiation of two distinct REM clusters, and dominant sensorimotor cortex-dorsal nuchal muscle drive alteration throughout the REM/REM1/REM2 beta CMC decrease.

**KEY WORDS:** sleep, electroencephalography (EEG), electromyography (EMG), cholinergic neurons, *nucleus basalis* (NB), *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT), ibotenic acid (IBO) lesion, neurodegeneration, rat, cortico-muscular coherence (CMC)

**RESEARCH AREA:** Neuroscience

**RESEARCH FIELD:** Neurophysiology and Biophysics

**UDC NUMBER:** [[616.892.3+616.858]:636.028]:616.8-009.836 (043.3)

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Spavanje kao ponašanje .....	2
1.1.1. Elektroencefalografija i njen značaj u istraživanju spavanja .....	3
1.1.2. Fiziološke karakteristike budnosti, NREM i REM spavanja .....	6
1.1.3. Osnovni nivoi regulacija spavanja .....	8
1.1.4. Neurohemijska osnova regulacije budnosti .....	9
1.1.5. Neurohemijska osnova prelaska budnosti u spavanje.....	13
1.1.6. Neurohemijska osnova regulacije NREM spavanja.....	14
1.1.7. Neurohemijska osnova regulacije REM spavanja .....	15
1.1.8. Funkcija spavanja.....	19
1.2. Holinergički sistem mozga sisara .....	20
1.2.1. <i>Nucleus basalis</i> (NB) kao glavni kortikalni izvor holinergičke inervacije velikog mozga .....	21
1.2.2. <i>Nucleus pedunculopontinus tegmentalis</i> (PPT) kao glavni talamo-kortikalni izvor holinergičke inervacije velikog mozga .....	22
1.3. Neurodegeneracija i holinergički sistem u neurodegeneraciji.....	25
1.3.1. Alchajmerova bolest (AB) .....	26
1.3.2. Parkinsonova bolest (PB).....	27
1.4. Poremećaji ponašanja u toku REM faze spavanja u neurodegeneraciji .....	29
1.5. Eksperimentalni modeli AB i PB neuropatologije .....	31
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	33
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	36
3.1. Eksperimentalne životinje .....	37
3.2. Eksperimentalne grupe .....	37



3.3.	Operativna procedura.....	40
3.4.	Procedura registrovanja spavanja .....	45
3.5.	Histohemijska identifikacija i kvantifikacija NB i PPT lezija.....	47
3.6.	Analiza spavanja i EEG signala.....	49
3.7.	Statistička analiza podataka .....	53
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>54</b>
4.1.	Poremećaji spavanja u holinergičkoj denervaciji kore velikog mozga pacova ekscitotoksičnom lezijom glavnog izvora kortikalne holinergičke inervacije – lezija jedra <i>nucleus basalis</i> (NB).....	55
4.1.1.	Histohemijska identifikacija i kvantifikacija NB lezije .....	55
4.1.2.	Arhitektura spavanja .....	59
4.1.3.	EEG mikrostruktura spavanja .....	64
4.2.	Poremećaji spavanja u holinergičkoj denervaciji kore velikog mozga pacova ekscitotoksičnom lezijom glavnog izvora talamo-kortikalne inervacije – lezija jedra <i>nucleus pedunculopontinus tegmentalis</i> (PPT).....	70
4.2.1.	Histohemijska identifikacija i kvantifikacija PPT lezije.....	70
4.2.2.	Arhitektura spavanja i struktura prelaznih stanja.....	74
4.2.3.	EEG mikrostruktura spavanja .....	79
4.3.	Topografske razlike poremećaja spavanja u degeneracijama funkcionalno različitih holinergičkih inervacija kore velikog mozga pacova.....	83
4.3.1.	Topografske razlike arhitekture spavanja i strukture prelaznih stanja.....	83
4.3.2.	EEG mikrostruktura spavanja .....	88
4.4.	Poremećaji REM faze spavanja u talamo-kortikalnoj denervaciji velikog mozga pacova (PPT lezija) .....	93
4.4.1.	Topografske razlike trajanja i strukture prelaznih stanja REM faze spavanja nakon bilateralne PPT lezije .....	94
4.4.2.	Topografske razlike REM EEG mikrostrukture nakon bilateralne PPT lezije.....	100
4.4.3.	Topografske razlike lokomotorne kontrole za vreme različitih REM faza spavanja nakon bilateralne PPT lezije .....	103

<b>5. DISKUSIJA</b> .....	106
5.1. Poremećaji spavanja u holinergičkoj denervaciji kore velikog mozga pacova ekscitotoksičnom lezijom glavnog izvora kortikalne holinergičke inervacije – lezija jedra <i>nucleus basalis</i> (NB) .....	107
5.2. Poremećaji spavanja u holinergičkoj denervaciji kore velikog mozga pacova ekscitotoksičnom lezijom glavnog izvora talamo-kortikalne inervacije – lezije jedra <i>nucleus pedunculopontinus tegmentalis</i> (PPT) .....	111
5.3. Topografske razlike poremećaja spavanja u degeneracijama funkcionalno različitih holinergičkih inervacija kore velikog mozga pacova .....	116
5.4. Poremećaji REM faze spavanja u talamo-kortikalnoj denervaciji velikog mozga pacova (PPT lezija) .....	122
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	125
<b>7. LITERATURA</b> .....	129

## **1. UVOD**

---

Spavanje kao kompleksno ponašanje je već više od pola veka predmet intenzivnih istraživanja, a još uvek nisu potpuno poznati regulatorni mehanizmi ovog ponašanja, kako u fiziološkim uslovima, tako i u različitim patološkim uslovima u kojima se javljaju poremećaji spavanja. Kao i drugi kompleksni fenomeni, spavanje zahteva multidisciplinarni eksperimentalni pristup u istraživanju, kao i adekvatne eksperimentalne modele humanih bolesti „*in vivo*”, odnosno adekvatne eksperimentalne modele neuropatologije tih bolesti. Dosadašnje elektrofiziološke, farmakološke, anatomske i imunohistohemijske studije su u značajnoj meri doprinele razjašnjavanju regulatornih funkcija kao i ulazno-izlazne povezanosti moždanih struktura uključenih u regulaciju spavanja (Šaponjić, 2009). Poseban značaj u istraživanjima spavanja ima tehnika selektivnih lezija moždanih jedara pacova koja omogućava ispitivanje mehanizama regulacije fiziološkog i poremećenog spavanja (Šaponjić, 2009, 2011), kao ponašanja od značaja za ranu dijagnozu patologije spavanja u neurodegenerativnim bolestima čoveka (Boeve i sar., 2007; Šaponjić, 2011). Sa druge strane, eksperimentalni modeli lezija specifičnih transmitterskih sistema mozga u životinja su takođe neophodni u ispitivanju neurohemijskih mehanizama regulacije moždane aktivnosti u fiziološkim i patološkim stanjima, kao što je moždana povreda ili neurodegenerativni proces (Šaponjić, 2011).

## **1.1. Spavanje kao ponašanje**

Spavanje je kompleksno, globalno stanje u ponašanju svih sisara, koje je homeostatski regulisano (Pace-Schott i Hobson, 2002; Datta i MacLean, 2007). Generalno, spavanje bi se moglo definisati kao reverzibilno stanje imobilnosti i veoma redukovanog odgovora na senzorne stimuluse (Siegel, 2008). Međutim, spavanje nije univerzalno ponašanje sa istom vitalnom funkcijom kod svih vrsta. Ne samo da se prisustvo, kvalitet, intenzitet i funkcija spavanja razlikuju među vrstama, već se i u okviru jedne vrste menjaju tokom života (Siegel, 2008). Kod sisara su identifikovana i na osnovu ponašanja i fizioloških karakteristika definisana dva osnovna stanja (faze) spavanja: NREM („non-rapid eye movement”, sporotalasno) spavanje i REM („rapid eye movement”) spavanje, označeno još i kao paradoksalno spavanje (Pace-Schott i Hobson, 2002).

Spavanje nije pojedinačno, homogeno stanje, već mešavina više stanja, sa veoma složenom regulacijom, koja uključuje aktivnost i interakciju različitih populacija neurona i neurotransmiterskih sistema, na različitim nivoima centralnog nervnog sistema (Pace-Schott i Hobson, 2002). Mehanizmi regulacije spavanja su u osnovi uslovljeni cirkadijalnim ritmom budnost/spavanje i cikličnim smenjivanjem NREM i REM faze spavanja i manifestuju se na svim nivoima biološke organizacije – od gena i unutarćelijskih mehanizama, do mreža neuronskih populacija u okviru centralnog nervnog sistema (Hobson i Pace-Schott, 2002; Pace-Schott i Hobson, 2002). Kompleksnost spavanja kao ponašanja ogleda se u činjenici da danas ne postoji nijedna definicija koja je uspela da objedini sve aspekte spavanja kao ponašanja (Šaponjić, 2009).

### **1.1.1. Elektroencefalografija i njen značaj u istraživanju spavanja**

Savremena era u istraživanju spavanja započinje otkrićem elektroencefalografije (EEG), metode koja beleži spontanu globalnu električnu aktivnost mozga. Standardni EEG podrazumeva registrovanje moždane aktivnosti sa površine glave, ali elektrode za registrovanje moždane aktivnosti mogu biti postavljene i na samu površinu mozga, što se označava kao elektrokortikografija (ECoG), ili unutar dubokih moždanih struktura.

Osnovu električne aktivnosti mozga dominantno čine potencijali sinaptičkog porekla, kao i potencijali nesinaptičkog porekla. Budući da EEG zahteva odgovarajuće trajanje električne aktivnosti, ekscitatorni postsinaptički potencijali (EPSP) i inhibitorni postsinaptički potencijali (IPSP), kao potencijali polja trajanja oko 200 ms, omogućavaju idealne uslove za vremensku sumaciju električne aktivnosti. EEG signal zapravo predstavlja električnu aktivnost nastalu sumacijom EPSP i IPSP pojedinačnih neurona kore velikog mozga. Iako ima malu prostornu rezoluciju, prednost EEG-a kao klasične metode u odnosu na savremene dijagnostičke metode oslikavanja mozga, je i dalje veća vremenska rezolucija. Pored toga što odražava spontanu aktivnost neurona kore, EEG zavisi i od delovanja ushodnih projekcija poreklom iz subkortikalnih struktura, pre svega talamusa i retikularne formacije moždanog stabla (Dringenberg i Olmstead, 2003). EEG zapis pokazuje kontinuiranu ritmičku aktivnost mozga u obliku oscilacija amplitude 20-300  $\mu$ V i frekvencije 0-100 Hz. Ova ritmična aktivnost je iregularna i može se opisati kroz definisane standardne frekventne opsege, čija je pojava

i zastupljenost karakteristična za pojedina fiziološka i patološka stanja. U EEG signalu čoveka definisani su sledeći frekventni opsezi (**Slika 1.1.**, Pace-Schott i sar., 2008):

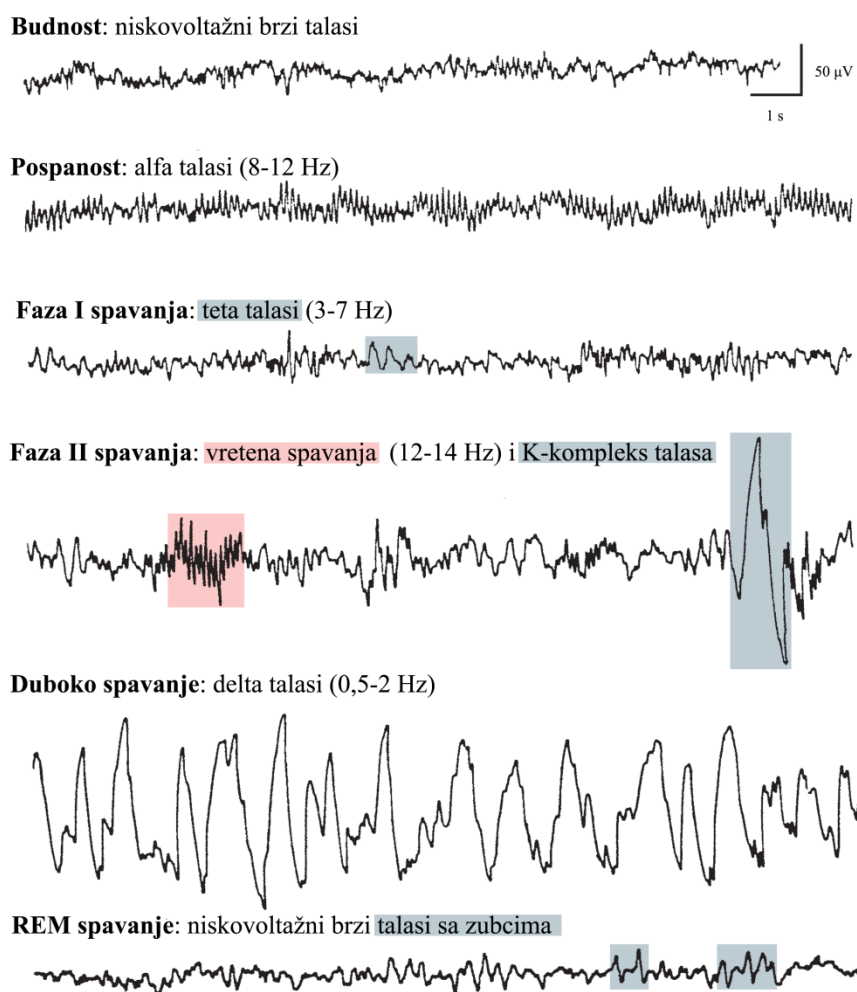
**delta** (0 – 4 Hz) – prisutan kod odraslih u toku sporotalasnog spavanja, kao i kod novorođene i male dece, kod kojih tokom procesa sazrevanja progresivno iščezava. U budnom stanju predstavlja znak patologije;

**teta** (4 – 8 Hz) – javljaju se pri pospanosti kod dece, a kod odraslih u stanju emotivnog stresa; predstavlja obeležje REM faze spavanja; poseban značaj u ljudi ima u patološkim stanjima koja se odnose na „usporenje” alfa aktivnosti, kao u slučaju redukcije cerebralnog protoka ili metaboličkih encefalopatija (Amzica i da Silva, 2011);

**alfa** (8 – 15 Hz) – karakteristiše normalni EEG odrasle osobe u budnom, relaksiranom stanju sa zatvorenim očima, u odsustvu naprezanja i mentalne aktivnosti (Bergerov talas);

**beta** (15 – 30 Hz) – povezan sa motornim ponašanjem, a javlja se i pri mentalnim naporima, u stanju napetosti ili uzbuđenja i predstavlja obeležje REM faze spavanja;

**gama** (> 30 Hz) – obrada i integracija različitih senzornih informacija, kognitivne ili motorne funkcije (Pace-Schott i sar., 2008).



**Slika 1.1. Tipični talasni oblici u EEG zapisu čoveka.** EEG zapis električne aktivnosti mozga čoveka u toku različitih stanja.

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

Iako su ispitivanja električne aktivnosti mozga počela još u XIX veku, početak istorije savremene elektroencefalografije vezan je za nemačkog neuropsihijatra Hansa Bergera, koji je 1924. godine prvi zabeležio električnu aktivnost mozga čoveka u budnom stanju. Berger je takođe prvi opisao i dva EEG ritma: alfa ritam, poznat još i kao Bergerov talas, koji se javlja kod osobe u budnom, relaksiranom stanju, sa zatvorenim očima i beta ritam, koji se javlja kada osoba otvori oči. Zahvaljujući Bergeru i njegovoj metodi registrovanja električne aktivnosti mozga sa površine glave, definisan je EEG zapis budnosti, spavanja i spavanja sa snovima (Loomis i sar., 1935, 1937, 1938), zatim EEG zapis pobuđenosti (Bremer, 1936; Moruzzi i Magoun, 1949;

Hess i sar., 1953; Hess, 1954), a takođe su definisana i četiri različita stanja u toku NREM spavanja (stadijumi 1–4), pri čemu su stadijumi 3 i 4 označeni kao sporotalasno spavanje (Dement i Kleitman, 1957). Prvi elektroencefalografski zapisi na mačkama nagovestili su postojanje dva različita EEG obrasca u toku spavanja (Klaue, 1937). Kasnija istraživanja su na osnovu EEG zapisa u mačaka definisala dve faze spavanja kao spavanje i „aktivno spavanje”, čime je zapravo po prvi put definisano REM spavanje u životinja (Dement, 1958). Upravo su ova istraživanja na eksperimentalnim modelima u životinja doprinela uspostavljanju veze između istovremenog postojanja mišićne atonije, brzih pokreta očnih jabučica („rapid eye movements” – REMs), visokovoltažnih šiljastih talasa u pontinskom EEG zapisu (ponto-genikulo-okcipitalni (PGO) talasi u čoveka, odnosno P talasi u pacova) i brze niskovoltažne aktivnosti u kori velikog mozga, a sve zajedno definisanih kao „paradoksalno spavanje” ili REM fenomen (Jouvet i sar., 1959a, 1959b).

Elektroencefalografija kao veoma jednostavna i neinvazivna metoda i danas ima široku primenu, ne samo u naučnim i kliničkim istraživanjima, već i u kliničkoj praksi i mada pomalo zapostavljena, još uvek predstavlja veoma bogat izvor informacija vezanih za funkcionalno, fiziološko i patološko stanje mozga.

### **1.1.2. Fiziološke karakteristike budnosti, NREM i REM spavanja**

Korišćenjem polisomnografije, koja podrazumeva elektroencefalografiju (EEG), elektrookulografiju (EOG) i elektromiografiju (EMG), moguće je okarakterisati kako budnost, tako i sva stanja u toku spavanja i to, ne samo ljudi, već i eksperimentalnih životinja poput mačaka, pacova i miševa.

**Budnost** se karakteriše visokofrekventnom niskovoltažnom EEG aktivnošću mozga („aktivirani EEG”), prisustvom mišićnog tonusa u EMG-u, voljnim pokretima, živim, eksterno generisanim senzacijama i percepcijom, a kod čoveka i logičkim i progresivnim mišljenjem.

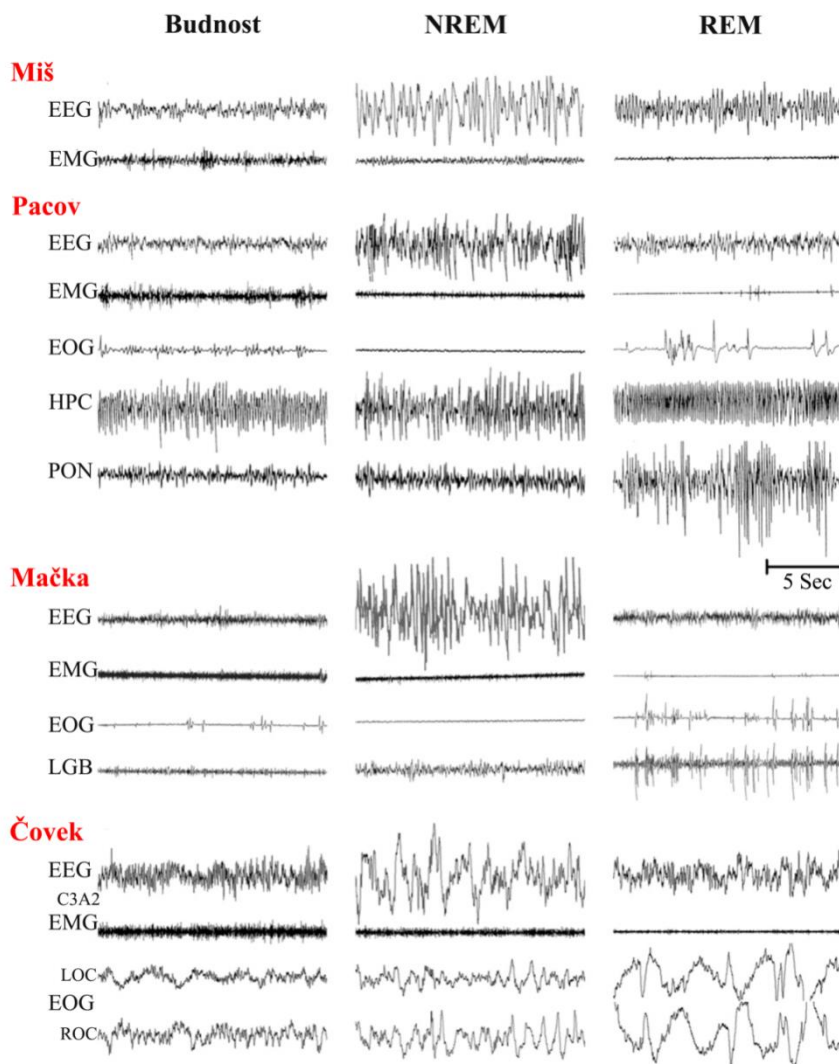
**NREM faza spavanja** ljudi je podeljena na četiri stadijuma, koji se međusobno razlikuju po dubini spavanja. Najdublji stadijumi NREM spavanja (stadijumi 3 i 4), označeni još i kao sporotalasno spavanje, se odlikuju prisustvom niskofrekventnog, visokovoltažnog delta ritma (1 – 4 Hz) u EEG zapisu. S druge strane, u EEG zapisu



početnih stadijuma NREM spavanja, označenih kao laki NREM, javljaju se karakteristična „vretena spavanja” (sigma ritam; 12 – 15 Hz) i K – kompleks talasa (spore oscilacije 0 – 1 Hz). Za razliku od ljudi, u životinja poput miševa, pacova i mačaka, NREM spavanje je podeljeno na dva stadijuma, označena kao sporotalasno spavanje I i II (Datta i MacLean, 2007). Za sporotalasno spavanje I karakteristično je prisustvo vretena spavanja u kortikalnom EEG signalu i ovo stanje je analogno NREM stadijumima 1 i 2 kod čoveka. Sporotalasno spavanje II, označeno još i kao delta spavanje, odlikuje se prisustvom niskofrekventnih oscilacija (0,1 – 4 Hz) u EEG zapisu i po karakteristikama odgovara NREM stadijumima 3 i 4 čoveka (Datta i MacLean, 2007). U toku NREM faze spavanja senzacije i percepcije su smanjene ili potpuno odsutne, a pokreti su epizodični i nevoljni.

**REM faza spavanja**, poznata još i kao paradoksalno spavanje ili REM fenomen, se pre svega odlikuje niskovoltaznim i visokofrekventnim oscilacijama (izrazito aktiviranim EEG-om) kore velikog mozga, slično kao u budnom stanju. Istovremeno, u hipokampalnom EEG zapisu prisutan je teta ritam (4 – 8 Hz); EOG zapis pokazuje visoku pojedinačnu ili grupnu aktivnost usled brzih pokreta očnih jabučica, sa istovremenim karakterističnim EEG zapisom označenim kao PGO talasi (ili samo P talasi u pacova); EMG beleži odsustvo tonusa antigravitacione muskulature, ali i faze kontrakcije mišića lica i distalnih mišića ekstremiteta, a kardiovaskularne i respiratorne funkcije postaju iregularne. U toku REM faze spavanja senzacije i percepcije su žive ali interno generisane, mišljenje je nelogično i bizarno, pokreti su komandovani ali inhibitorni i javljaju se snovi (Datta i MacLean, 2007). REM spavanje koje se javlja u životinja analogno je REM spavanju ljudi (Vertes, 1984; Boeve i sar., 2007; McCarley, 2007).

Najveći deo onoga što se danas zna o spavanju zasnovano je na istraživanjima na životinjama (White, 2006), a najčešće korišćeni eksperimentalni modeli uključuju miševe, pacove i mačke. Spavanje kao ponašanje je prisutno u svih sisara i mada postoje specifične razlike, opšta organizacija spavanja kao ponašanja, kao i fiziološke karakteristike osnovnih faza budnosti i spavanja pokazuju veliku sličnost među različitim vrstama (**Slika 1.2.**)



**Slika 1.2. Tipičan poligrafski zapis budnosti i spavanja različitih vrsta.** Poligrafski zapis budnosti, NREM i REM spavanja odraslog miša, pacova, mačke i čoveka. Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevier; Datta i MacLean, 2007; ©2007.

### 1.1.3. Osnovni nivoi regulacija spavanja

Regulacija budnosti i spavanja je izuzetno složena i odvija se na više nivoa. Jedna od osnovnih karakteristika spavanja sisara jeste cirkadijalna ritmičnost ovog ponašanja. Centar kontrole cirkadijalnih ritmova je suprahijazmatsko jedro *nucleus suprachiasmaticus* (SCN) koji se nalazi u hipotalamusu (Hobson i Pace-Schott, 2002). Međutim, regulacija budnosti i spavanja ne podrazumeva prosto praćenje ritma generisanog od strane SCN jedra. Naprotiv, informacije iz ovog jedra se najpre integrišu sa homeostatskim informacijama iz prednjeg hipotalamusa. Potom, ova dva sistema

zajedno interreaguju sa sistemom za pobuđivanje, koga čine jedra zadnjeg hipotalamusa, bazalnog prednjeg mozga i moždanog stabla, u cilju kontrole započinjanja spavanja. U toku spavanja dolazi do cikličnog smenjivanja NREM i REM faze spavanja. Dužina i broj NREM/REM ciklusa se razlikuje među vrstama. Kod čoveka se prva pojava REM spavanja javlja nakon što se prethodno uspostavi sporotalasno NREM spavanje (stadijumi 3 i 4), što je obično oko 70 minuta od početka spavanja i traje jako kratko. Nakon toga se ciklično (4 – 6 NREM/REM ciklusa u toku noći), na svakih 90 minuta, javljaju epizode REM spavanja i njihova dužina trajanja se postepeno povećava (do oko 30 minuta). Sa druge strane, NREM/REM ciklusi životinja su mnogo kraći, a u pacova traju svega oko 12 minuta (McCarley, 2007). Centri kontrole smenjivanja NREM/REM spavanja nalaze se u ponsu (Pace-Schott i Hobson, 2002).

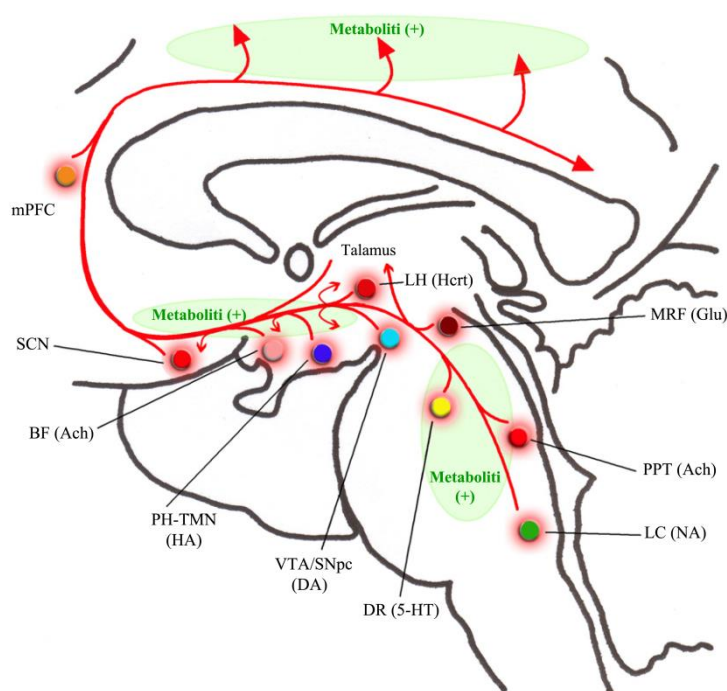
Iako se decenijama pretpostavljalo da je spavanje pasivan proces i da je moždana aktivnost u toku spavanja veoma redukovana, otkriće REM spavanja kao i procesa cikličnog smenjivanja NREM i REM faze spavanja (Aserinsky i Kleitman, 1953) je pokazalo da je mozak veoma aktivan u toku spavanja. Čak i tokom NREM faze spavanja, kada u EEG-u dominiraju vretena spavanja i visokovoltazni spori talasi, mozak zadržava nivo aktivnosti od oko 80 % u odnosu na budno stanje (Steriade i sar., 1999; Hobson, 2005). Dakle, spavanje je aktivno regulisani proces, a ne pasivan rezultat odsustva budnosti (Hobson, 2005). Mada je započinjanje NREM spavanja pasivan metabolički proces, održavanje NREM spavanja je takođe aktivan proces. Sa druge strane, započinjanje i održavanje REM spavanja je aktivan proces u kome učestvuju specifične populacije neurona kaudalnog srednjeg mozga i ponsa (Datta i MacLean, 2007).

#### **1.1.4. Neurohemijska osnova regulacije budnosti**

Stanje budnosti predstavlja kompleksno, koordinisano ispoljavanje različitih oblika ponašanja, pri čemu se ta ponašanja neprestano menjaju u skladu sa promenama u spoljašnjoj sredini i unutrašnjosti organizma. Neuronske populacije koje kontrolišu nastanak budnosti se nalaze u moždanom stablu, srednjem mozgu, hipotalamusu i bazalnom prednjem mozgu. Aktivacija neurona ovih moždanih struktura se direktnim i/ili indirektnim ushodnim putevima preko talamo-kortikalnog, hipotalamo-kortikalnog

i/ili bazalo-kortikalnog sistema prenosi na koru velikog mozga izazivajući njenu aktivaciju, kao i globalnu aktivaciju čitavog mozga u cilju započinjanja i održavanja budnosti (Datta i MacLean, 2007). Na **Slici 1.3.** dat je šematski prikaz moždanih struktura, njihovih neuroanatomskih veza i neurotransmitera uključenih u regulaciju budnosti.

Pontinski centri regulacije budnosti su **noradrenergički *locus coeruleus* (LC) neuroni, serotonergički *nucleus raphe dorsalis* (DR) neuroni, holinergički *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT) i *nucleus tegmentum laterodorsalis* (LDT) neuroni.** Aktivnost noradrenergičkih LC i serotonergičkih DR neurona je povezana sa kortikalnom aktivacijom i pobuđivanjem. Naime, ovi neuroni su maksimalno aktivni za vreme budnosti, smanjuju svoju aktivnost od budnosti ka NREM spavanju sve do REM spavanja, kada nastupa tzv. „monoaminska tišina” (Hobson i sar., 1975; Datta, 1997). Kako su PPT i LDT holinergički neuroni recipročno i inhibitorno povezani sa monoaminergičkim LC i DR pontinskim neuronima (Rye, 1997), obrazac aktivnosti holinergičkih neurona ponsa je suprotan obrascu aktivnosti monoaminergičkih neurona. Naime, pontinski holinergički neuroni su najaktivniji tokom REM faze spavanja, a svoju aktivnost smanjuju ka budnom stanju (Hobson i sar., 1975; Lu i sar., 2006). PPT holinergički neuroni se direktno projektuju u mnoge subkortikalne moždane strukture (talampus, hipotalampus, bazalni prednji mozak, suprahijazmatsko jedro, amigdaloidno jedro) i preko njih aktiviraju koru velikog mozga.



**Slika 1.3. Neurohemijska osnova regulacije budnosti.** Šematski prikaz moždanih struktura, neurotransmitera i neuroanatomskih veza odgovornih za regulaciju budnosti. mPFC – medijalna prefrontalna kora velikog mozga; SCN – *nucleus suprachiasmaticus*; BF – bazalni prednji mozak; PH – posteriorni hipotalamus; TMN – *nucleus tuberomamillaris*; VTA – *area tegmentalis ventralis*; SNpc – *nucleus substantiae nigrae pars compacta*; DR – *nucleus raphe dorsalis*; LC – *locus coeruleus*; PPT – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; MRF – *formatio reticularis mesencephali*; LH – lateralni hipotalamus; Ach – acetilholin; HA – histamin; DA – dopamin; 5-HT – serotonin; NA – noradrenalin; Glu – glutamat; Hcrt – hipokretin. Preuzeto i modificirano uz dozvolu izdavača Elsevier; Datta i MacLean, 2007; ©2007.

U regulaciji budnosti učestvuju i **neuroni retikularne formacije srednjeg mozga, *formatio reticularis mesencephali* (MRF)**. Ovi, najverovatnije glutamatergički neuroni, pokazuju visok stepen aktivnosti u toku budnosti i preko svojih ushodnih projekcija ka talamusu, hipotalamusu i bazalnom prednjem mozgu značajno doprinse aktivaciji kore velikog mozga (Datta i MacLean, 2007).

**Dopaminergički neuroni *nucleus substantiae nigrae* (SN) i ventralnog tegmentalnog regiona (VTA)** obimno inervišu frontalnu koru, striatum i limbičke regione, ali za razliku od ostalih struktura uključenih u regulaciju budnosti, njihov obrazac aktivnosti se ne menja sa promenama stanja u ciklusu budnost/spavanje. Ipak,

pored tonične aktivnosti ovih neurona, neke studije su opisale povećanje koncentracije dopamina za vreme budnosti, naročito u striatumu i prefrontalnoj kori (Feenstra i sar., 2000; Datta i MacLean, 2007).

Pored neurotransmitera neuronskih populacija moždanog stabla, u kontroli budnosti učestvuju i histaminergički neuroni posteriornog hipotalamusa, hipokretinski (oreksinski) neuroni lateralnog hipotalamusa i holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga (Datta i MacLean, 2007).

**Tuberomamilarno jedro, *nucleus tuberomamillaris* (TMN)**, glavni izvor histaminergičkih neurona posteriornog hipotalamusa, učestvuje u aktivaciji kore velikog mozga i kontroli budnosti putem eferentnih projekcija ka talamo-kortikalnom i bazalo-kortikalnom sistemu. Naime, ovi neuroni difuzno inervišu koru velikog mozga, kao i strukture moždanog stabla i bazalnog prednjeg mozga koje su uključene u regulaciju budnosti. Histaminergički TMN neuroni su primarno aktivni u toku budnosti i neposredno pre buđenja (Steininger i sar., 1999; Takahashi i sar., 2006), kada je i vanćelijska koncentracija histamina povišena (Mochizuki i sar., 1992). Takođe, ekscitacija histaminergičkih TMN neurona povećava aktivaciju kore velikog mozga i budnost (Monti i sar., 1986), dok inhibicija ovih neurona smanjuje budnost na račun povećanja sporotalasnog spavanja (Sakai i sar., 1990).

**Oreksin/hipokretin neuroni lateralnog hipotalamusa (LH)** se difuzno projektuju ka gotovo svim delovima centralnog nervnog sistema, a posebno ka jedrima moždanog stabla (PPT/LDT, LC, DR, SN, VTA), posteriornog hipotalamusa (TMN) i bazalnog prednjeg mozga, uključenim u regulaciju aktivacije kore velikog mozga i budnosti (Nambu i sar., 1999). Oreksin/hipokretin neuroni su najaktivniji za vreme budnosti, naročito u toku motorne aktivnosti i tada kroz ekscitaciju moždanih struktura odgovornih za regulaciju budnosti, podstiču održavanje ovog stanja. Miševi sa deficitom u hipokretinskom sistemu izazvanim genetskom modifikacijom ispoljavaju fenotip sličan narkolepsiji ljudi (Chemelli i sar., 1999; Hara i sar., 2001).

**Holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga (BF)** su uključeni u regulaciju mnogih oblika ponašanja vezanih za budnost, kao što su pažnja, obrada senzornih informacija i učenje (Sarter i Bruno, 2000). Ovi neuroni, koji zapravo predstavljaju

glavni izvor holinergičke inervacije kore velikog mozga, imaju posebnu ulogu u regulaciji aktivacije kore, jer sa jedne strane primaju ulaze iz struktura moždanog stabla i hipotalamusa koje regulišu stanje budnosti, a sa druge strane se široko projektuju na koru velikog mozga. Pored toga, holinergički BF neuroni imaju važnu ulogu u hipokampalnoj i talamičkoj EEG aktivaciji (Detari, 2000). Brojni eksperimentalni podaci pokazuju povećanu aktivnost holinergičkih BF neurona (Detari i Vanderwolf, 1987; Alam i sar., 1999), kao i povećanu koncentraciju acetilholina u kori velikog mozga i hipokampusu (Day i sar., 1991; Vazques i Baghdoyan, 2001) za vreme budnosti u odnosu na sporotalasno spavanje.

Mada su dosadašnja istraživanja funkcije **suprahijazmatskog jedra (SCN)** kontradiktorna, kada je u pitanju njegova uloga u regulaciji budnosti (Tobler i sar., 1983; Deboer i sar., 2003; Mistlberger, 2005), novija genetička istraživanja podržavaju hipotezu da je SCN centar kontrole ne samo cirkadijanih ritmova, već i budnosti (Laposky i sar., 2005).

#### **1.1.5. Neurohemijska osnova prelaska budnosti u spavanje**

Prelazak iz budnosti u spavanje je pasivan proces, uslovljen homeostatskom regulacijom koncentracije endogenih metabolita koji se akumuliraju u organizmu za vreme budnosti. Adenozin, gama-aminobuterna kiselina (GABA), glicin, prostaglandin D2 i citokini (interleukin 1 beta – IL-1 $\beta$  i faktor nekroze tumora alfa – TNF $\alpha$ ) samo su neki od krajnjih produkata metabolizma koji se akumuliraju u mozgu za vreme budnosti. Koncentracija ovih metabolita zavisi od intenziteta i trajanja budnosti i onda kada ona dostigne kritični nivo, dolazi do smanjenja aktivnosti neuronskih sistema budnosti i prelaska iz budnosti u spavanje (Datta i MacLean, 2007).

Od oko stotina metabolita koji se akumuliraju u mozgu za vreme budnosti, adenozin ima poseban značaj (Radulovački, 2005). Pokazano je da vanćelijska koncentracija adenozina raste sa porastom neuronske i metaboličke aktivnosti za vreme budnosti, a opada za vreme spavanja (Porkka-Heiskanen i sar., 2000; Datta i MacLean, 2007). U uslovima produžene budnosti (odloženo započinjanje spavanja) značajan nivo adenozina se akumulira u regionu bazalnog prednjeg mozga i kore velikog mozga (Porkka-Heiskanen i sar., 2000). Takođe, intracerebralno ubrizgavanje ili sistemska

administracija adenoza produžava period spavanja i povećava sporotalasnu aktivnost mozga pacova (Radulovacki, 1985; Ticho i Radulovacki, 1991). Noviji elektrofiziološki rezultati na isečku hipotalamusnog tkiva dokazali su da adozin inhibira identifikovane hipokretinske neurone lateralnog hipotalamusa miševa (Liu i Gao, 2007).

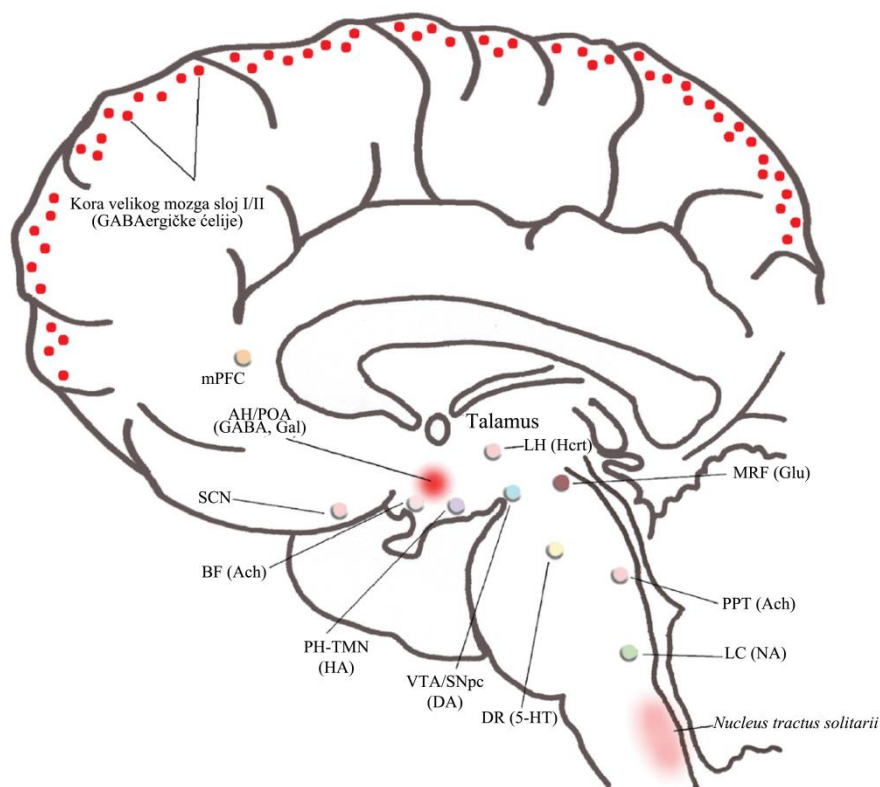
#### **1.1.6. Neurohemijska osnova regulacije NREM spavanja**

NREM spavanje započinje aktivacijom GABAergičkih neurona ventrolateralnog preoptičkog jedra hipotalamusa (VLPO) (Lu i sar., 2006). Ovo jedro, koje pored GABAergičkih sadrži i galaninske neurone, inerviše moždane strukture uključene u regulaciju budnosti (TMN, LH, LC, DR, PPT/LDT). Povećana aktivnost GABAergičkih VLPO neurona dovodi do inhibicije neurona budnosti, kao i talamičkih relejnih neurona, čime se značajno redukuje prenos senzornih signala kroz talamus i uspostavlja sporotalasno spavanje (NREM stadijumi 3 i 4).

Istraživanja pokazuju da pored GABAergičkih VLPO neurona potencijalnu ulogu u regulaciji NREM spavanja može imati i oslobađajući faktor hormona rasta (GHRF). Sinteza GHRF hormona je maksimalna za vreme sporotalasnog spavanja kada aktivirajući GABAergičke VLPO neurone pojačava dubinu i trajanje NREM spavanja (Obal i Krueger, 2004; Datta i MacLean, 2007).

Na **Slici 1.4.** dat je šematski prikaz moždanih struktura i neurotransmitera, uključenih u regulaciju NREM spavanja.



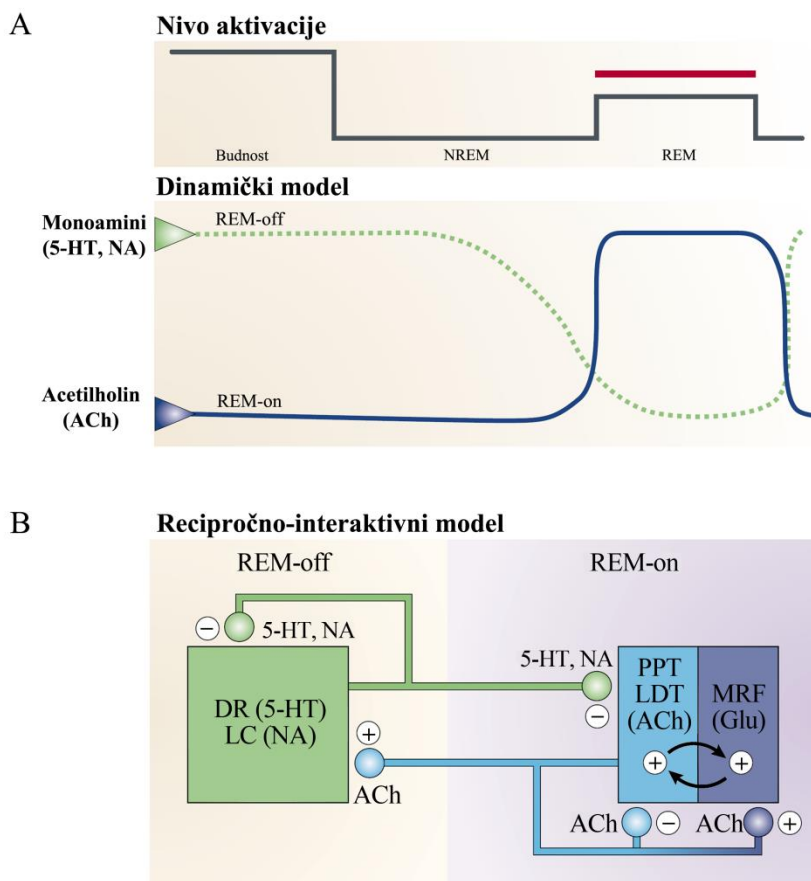


**Slika 1.4. Neurohemijska osnova regulacije NREM spavanja.** Šematski prikaz moždanih struktura i neurotransmitera odgovornih za regulaciju NREM spavanja. mPFC – medijalna prefrontalna kora velikog mozga; AH – anteriorni hipotalamus; POA – preoptički region; SCN – *nucleus suprachiasmaticus*; BF – bazalni prednji mozak; PH – posteriorni hipotalamus; TMN – *nucleus tuberomamillaris*; VTA – *area tegmentalis ventralis*; SNpc – *nucleus substantiae nigrae pars compacta*; DR – *nucleus raphe dorsalis*; LC – *locus coeruleus*; PPT – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; MRF – *formatio reticularis mesencephali*; LH – lateralni hipotalamus; Ach – acetilholin; HA – histamin; DA – dopamin; 5-HT – serotonin; NA – noradrenalin; Glu – glutamat; Hcrt – hipokretin; GABA – gama-aminobuterna kiselina; Gal – galanin. Preuzeto i modificovano uz dozvolu izdavača Elsevier; Datta i MacLean, 2007; ©2007.

### 1.1.7. Neurohemijska osnova regulacije REM spavanja

U toku spavanja, NREM i REM faza se ciklično smenjuju. Regulacija cikličnog pojavljivanja REM spavanja, kao i nastajanja pojedinačnih REM fenomena je izuzetno složena i podrazumeva aktivnost različitih neuronskih populacija moždanog stabla (Pace-Schott i Hobson, 2002).

Stari **recipročno interaktivni model** regulacije REM spavanja (**Slika 1.5.**) isticao je značaj recipročnih veza i inhibitornih interakcija holinergičkih (PPT i LDT) i monoaminergičkih (LC i DR) neurona.



**Slika 1.5. Recipročno-interaktivni model regulacije REM spavanja.** (A) Nivo aktivacije koji pokazuje smenu NREM i REM faze spavanja i dinamički model aktivnosti neurona „REM – uključivača” (REM – on) i „REM – isključivača” (REM – off) u pontinskim jedrima. (B) Recipročno-interaktivni model regulacije REM spavanja (prema: Hobson i sar., 1975). DR – *nucleus raphe dorsalis*; LC – *locus coeruleus*; PPT – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LDT – *nucleus tegmentum laterodorsalis*; MRF – *formatio reticularis mesencephali*; Ach – acetilholin; 5-HT – serotonin; NA – noradrenalin; Glu – glutamat.

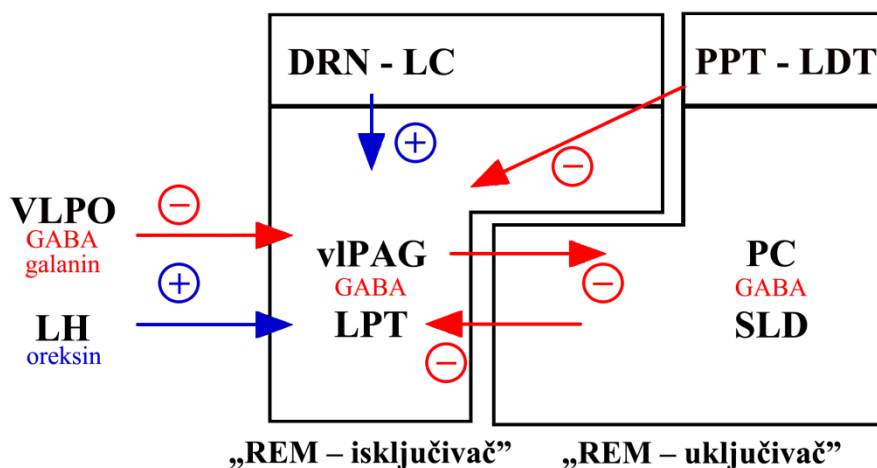
Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Mcmillan Publishers Ltd; Nature; Pace-Schott i Hobson, 2002; ©2002.

Prema ovom modelu, holinergički PPT i LDT neuroni su definisani kao „REM – uključivači” („REM – on” neuroni) koji mogu biti inhibirani ili dezinhbirani od strane

monoaminergičkih LC i DR neurona, koji su definisani kao „REM – isključivači” („REM – of” neuroni) (McCarley i Hobson, 1975). Osnovu modela činili su rezultati anatomskih i elektrofizioloških studija. Anatomske studije su potvrdile postojanje recipročne veze holinergičkih (PPT i LDT) i monoaminergičkih (LC, DR) neurona (Losier i Semba 1993; Rye, 1997), dok su elektrofiziološke studije pokazale recipročnu prirodu aktivnosti ovih neurona (Hobson i sar., 1975; McGinty i Harper, 1976; Lydic, 1987). Naime, za vreme budnosti, aminergički sistem moždanog stabla je aktivan i inhibira neurone pontinskog holinergičkog sistema. Tokom NREM spavanja aminergička inhibicija se smanjuje, dok holinergička ekscitacija raste. Za vreme REM spavanja aminergička inhibicija je potpuno ukinuta, a holinergički PPT/LDT neuroni su maksimalno aktivni.

Aktuelni model regulacije nastajanja i ciklične pojave REM spavanja (**Slika 1.6.**) nazvan je „**flip-flop**” model, po analogiji sa prekidačem strujnog kola (Lu i sar., 2006). Naime, selektivne lezije holinergičkih i monoaminergičkih pontinskih jedara, koja su prema starom recipročno-interaktivnom modelu regulacije REM spavanja bila definisana kao „REM – uključivači”, odnosno „REM – isključivači” su imale veoma malo efekta na REM spavanje (Lu i sar., 2006). Ovo je sugerisalo da neke druge neuronske mreže regulišu ulazak i izlazak iz REM spavanja. Da bi se identifikovala neuronska mreža uključena u regulaciju REM spavanja, najpre je obeleženo mesto konvergencije dva nishodna puta, koja polaze iz hipotalamusa, a važna su u regulaciji budnosti i spavanja: (1) projekcije oreksin/hipokretin LH neurona koje su ekscitatorne i neaktivne za vreme REM spavanja (Mileykovskiy i sar., 2005) i (2) projekcije GABA/galanin VLPO neurona koji su inhibitorni i aktivni za vreme REM spavanja (Lu i sar., 2002). Pretpostavljeno je (Lu i sar., 2006) da oreksin/hipokretin LH neuroni ekscitiraju, a GABA/galanin VLPO neuroni inhibiraju „REM – isključivač” region. Nishodne projekcije ovih neurona konvergiraju u regionu mezopontinskog tegmentuma, tačnije u **ventrolateralnom delu periakveduktalne sive mase (vIPAG)** i **laterodorzalnom pontinskom tegmentumu (LPT)** i ove neuronske populacije su definisane kao „**REM – isključivač**” region. Selektivne lezije ovog regiona su izazvale dvostruko povećanje broja i trajanja REM faze spavanja, čime je određena uloga ovih struktura u regulaciji REM spavanja (Lu i sar., 2006). Kada su za vreme ovog izazvanog povećanja REM spavanja anterogradno obeležene projekcije „REM – isključivač”

regiona (vIPAG i LPT) uz istovremeno detektovanje povećane ekspresije c-Fos proteina (visok nivo neuronske aktivnosti), identifikovane su intenzivne projekcije (veze) i definisan „REM – uključivač” region koji čine *nucleus sublaterodorsalis* (SLD) i *precoeruleus region* (PC). Imunohistohemijski je pokazano da su i „REM – uključivač” i „REM – isključivač” GABAergičke neuronske populacije.



**Slika 1.6. „Flip-flop” model regulacije REM spavanja.** Šematski prikaz regulacije REM spavanja prema „flip-flop” modelu sa međusobno inhibitornim „REM – uključivač” i „REM – isključivač” regionima. VLPO – ventrolateralni preoptički region; LH – lateralni hipotalamus; vIPAG – ventrolateralna periakveduktalna siva masa; LPT – laterodorzalni pontinski tegmentum; PC – *precoeruleus region*; SLD – *nucleus sublaterodorsalis*; DR – *nucleus raphe dorsalis*; LC – *locus coeruleus*; PPT – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LDT – *nucleus tegmentum laterodorsalis*. Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Mcmillan Publishers Ltd; Nature; Lu i sar., 2006; ©2006.

Na osnovu ovih elektrofizioloških i imunohistohemijskih eksperimenata (Lu i sar., 2006) je u celini definisan REM „prekidački sistem” i postavljena „flip-flop” teorija regulacije nastajanja REM spavanja. Po ovoj teoriji REM „prekidački sistem” je sastavljen od dve grupe GABAergičkih neurona koji međusobno interreaguju i jedan drugog inhibiraju. Oreksin/hipokretin LH neuroni ekscitiraju, dok GABA/galanin VLPO neuroni inhibiraju „REM isključivač” region. Takođe, po „flip-flop” teoriji i monoaminergički i holinergički neuroni moždanog stabla su uključeni u regulaciju REM spavanja, ali kao ekscitatorni (LC, DR neuroni) i inhibitorni (PPT, LDT neuroni) modulatori „REM isključivač” regiona (Lu i sar., 2006).

### 1.1.8. Funkcija spavanja

I pored obimnih istraživanja nauka još uvek nema odgovor na pitanje šta je zapravo funkcija spavanja. Činjenica je da spavanje nije univerzalno ponašanje sa istom vitalnom funkcijom kod svih vrsta. Kvalitet, intenzitet i funkcija spavanja se pre svega razlikuju između vrsta, a i u okviru jedne vrste se menjaju tokom razvoja i starenja (Siegel, 2008).

Klasične studije deprivacije spavanja u pacova ukazuju da se možda radi o obliku konstitutivnog ponašanja neophodnog za preživljavanje, obzirom da trajne fiziološke promene i promene u ponašanju, nastale usled dugotrajne (2-3 nedelje) deprivacije spavanja (70-90 % redukovano spavanje), na kraju dovode do smrti životinja (Rechtschaffen i Bergmann, 2002). Međutim, kod nekih drugih vrsta, poput miševa ili golubova, deprivacija spavanja izaziva tipične fiziološke promene (povećana telesna temperatura, povećan unos hrane praćen progresivnim gubitkom težine), ali nema letalan efekat (Newman i sar., 2009). Nedostatak spavanja kod ljudi izaziva pospanost, a homeostatski mehanizmi detektuju povećanu potrebu za spavanjem koja se nadoknađuje povećanjem sporotalasnog spavanja (Siegel, 2008). Za razliku od ljudi, pacov nedostatak spavanja nadoknađuje povećanjem REM spavanja (Rechtschaffen i Bergmann, 2002; Siegel, 2008). Deprivacija spavanja je uvek praćena produženim spavanjem, kao nadoknadom produžene budnosti, koje je proporcionalno trajanju deprivacije (Saper i sar., 2005).

Eksperimentalni dokazi govore o tome da spavanje, a naročito REM spavanje, može imati ulogu u razvoju i sazrevanju mozga (Garcia-Rill i sar., 2008). U odnosu na odraslog čoveka, novorođenče ne samo da spava duže, već i veći deo njegovog spavanja čini REM spavanje (oko 50 % u odnosu na 25 % kod odraslog čoveka). Podaci o EEG aktivnosti preveremeno rođenih beba, kao i „*in utero*” moždanoj aktivnosti, pokazuju da REM spavanje dominira u 26. nedelji gestacije, nakon čega se sve do kraja života povećava trajanje budnosti i to u najvećoj meri na račun smanjenja vremena provedenog u REM spavanju (Garcia-Rill i sar., 2008). U pacova, uspostavljanje odnosa između budnosti, NREM i REM spavanja se dešava u periodu od 10-30 dana starosti, kada se udeo REM spavanja smanjuje sa 75 % koliko je bio na rođenju, na oko 15 % (Jouvet-Mounier i sar., 1970). Smatra se da REM spavanje ima ulogu da usmeri proces

sazrevanja mozga tako što obezbeđuje endogenu aktivaciju neurona u vreme kada nema egzogene aktivacije ili je ona slaba (Garcia-Rill i sar., 2008). Na taj način intrauterino REM spavanje doprinosi uspostavljanju sinaptičkih veza, a visokofrekventna aktivacija u vidu PGO talasa iz moždanog stabla, koji se javljaju za vreme REM spavanja, doprinosi razvoju talamo-kortikalnih puteva (Garcia-Rill i sar., 2008).

Neki autori sugerišu da bi REM spavanje moglo imati ulogu u memoriji, smatrajući da snovi brišu nepotrebnu memoriju tako što inhibiraju senzorne informacije i vrše supresiju pokreta (Crick i Mitchison, 1983). Drugi autori smatraju da REM spavanje ima ulogu u konsolidaciji memorije i da interakcije između neokorteksa i hipokampusa za vreme spavanja doprinose memorisanju informacija dobijenih u toku dana (Buzsaki, 1996; Skaggs i McNaughton, 1996).

Takođe, brojni eksperimentalni dokazi govore o vezi između spavanja i gojaznosti (Vgontzas i sar., 1998; Resta i sar., 2003; Bixler i sar., 2005). Istraživanja na miševima pokazuju da je dužina spavanja povezana sa težinom i da raste sa porastom, a opada sa gubitkom težine miševa (Guan i sar., 2008). Smanjeni nivo oreksina, važnog medijatora budnosti, povezan je sa gojaznošću, prekomernim dnevnim spavanjem i narkolepsijom (Kok i sar., 2003; Sakurai, 2005).

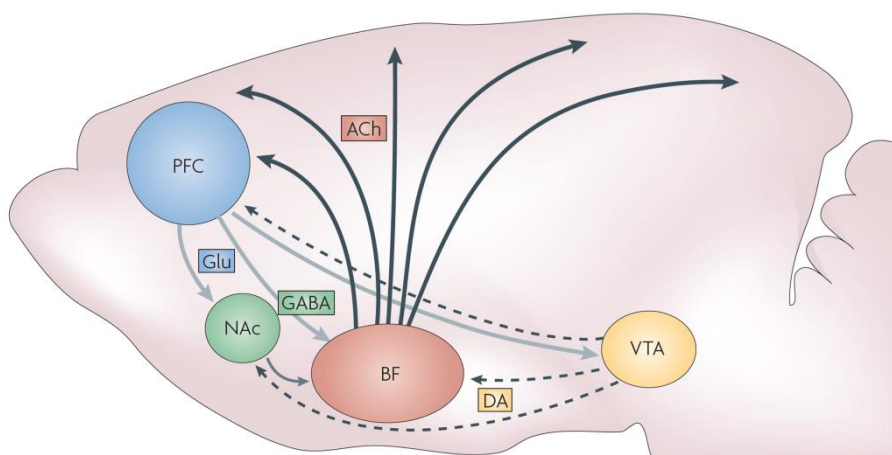
## **1.2. Holinergički sistem mozga sisara**

Acetilholin je široko rasprostranjen u nervnom sistemu i ima brojne funkcije. Naime, holinergički sistem mozga ima ulogu u razvoju kore velikog mozga (Sarter i Bruno, 2004), njenoj aktivnosti (Dringenberg, 2000), kontroli cerebralnog krvotoka (Schliebs i Arendt, 2006), homeostazi budnosti i spavanja (Kaur i sar., 2008), motornoj kontroli (Nishino i sar., 1995), kao i kognitivnim procesima, učenju i memoriji (Szymusiak, 1995).

U mozgu sisara postoje dva osnovna izvora holinergičke inervacije, sastavljena od dve funkcionalno različite grupe neurona: holinergički sistem neurona bazalnog prednjeg mozga i holinergički sistem neurona moždanog stabla (Semba, 1993; Semba and Fibiger, 1989; Rye, 1997).

### 1.2.1. *Nucleus basalis* (NB) kao glavni kortikalni izvor holinergičke inervacije velikog mozga

**Holinergički sistem bazalnog prednjeg mozga (Slika 1.7.),** koji čine *nucleus basalis* (NB), *substantia innominata* i *stria diagonalis*, predstavlja glavni izvor holinergičke inervacije kore velikog mozga (Schliebs i Arendt, 2006). Ovaj holinergički sistem, sa NB jedrom, kao dominantnim izvorom holinergičke inervacije kore velikog mozga, ima važnu ulogu u aktivaciji kore velikog mozga i homeostazi spavanja (Dringenberg i Olmstead, 2003). Naime, holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga predstavljaju rostralnu komponentu uzlaznog aktivirajućeg sistema (Sarter i sar., 2009) i imaju ulogu u generisanju visokofrekventnih EEG ritmova i aktivaciji kore velikog mozga, kako za vreme budnosti, tako i za vreme REM faze spavanja (Dringenberg i Olmstead, 2003). Elektrofiziološke studije su pokazale da obrazac aktivnosti neurona bazalnog prednjeg mozga odgovara EEG promenama: stimulacija ovih neurona dovodi do EEG aktivacije, dok njihova inhibicija dovodi do EEG deaktivacije (Cape i Jones, 2000). Takođe, koncentracija acetilholina u kori velikog mozga je povećana za vreme budnosti, a naročito za vreme REM spavanja (Vazquez i Baghdoyan, 2001; Jones, 2003).



**Slika 1.7. Holinergički sistem neurona bazalnog prednjeg mozga.** Aferentno-eferentne veze holinergičkog sistema bazalnog prednjeg mozga i velikog mozga. BF – bazalni prednji mozak; PFC – prefrontalni region kore velikog mozga; NAc – *nucleus accumbens*; VTA – *area tegmentalis ventralis*; ACh – acetilholin; DA – dopamin; Glu – glutamat; GABA – gama-aminobuterna kiselina.

Preuzeto uz dozvolu izdavača Mcmillan Publishers Ltd; Nature; Sarter i sar., 2009; ©2009).

Projekcije NB neurona ka kori velikog mozga nisu difuzne, već pokazuju visoku specifičnost (Fournier i sar., 2004), kako prema modalitetu (ulazna specifičnost, aktivacija od strane specifičnih aferentnih veza), tako i prema regionu (izlazna specifičnost, projekcija ka određenom regionu mozga). Mada projekcije holinergičkih NB neurona prožimaju sve slojeve kore velikog mozga, pojedinačni NB neuroni inervišu relativno male delove kore velikog mozga, ne veće od 1-2 mm u prečniku. Na ovaj način, različite populacije NB neurona imaju mogućnost modulacije različitih regiona kore velikog mozga (Schliebs i Arendt, 2006).

Pokazano je da holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga podležu degenerativnim promenama tokom starenja. Degenerativne promene poput atrofije ćelija, smanjene aktivnosti acetilholin-transferaze i umerenog deficita holinergičkih neurona, uočene u ljudi i životinja (Schliebs i Arendt, 2006), uzrok su holinergičke hipofunkcije koja je povezana sa progresivnim kognitivnim poremećajima u starenju (Schliebs i Arendt, 2006, 2011). Na osnovu ove povezanosti, postavljena je „holinergička hipoteza” o poremećajima pamćenja u starosti i Alchajmerovoj bolesti (AB). Pored AB, degeneracija holinergičkih neurona bazalnog prednjeg mozga se javlja i kod drugih neurodegenerativnih bolesti sa demencijom kao jednim od simptoma, poput Parkinsonove bolesti (PB) i demencije sa Luvijevim telašcima (Schliebs i Arendt, 2006).

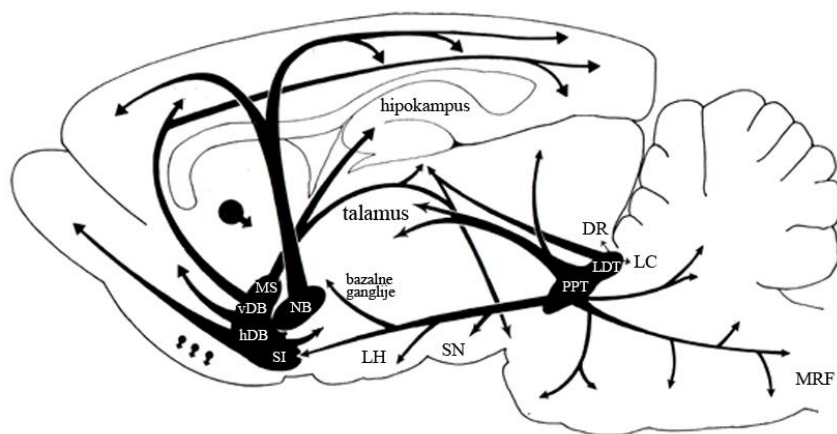
### **1.2.2. *Nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT) kao glavni talamo-kortikalni izvor holinergičke inervacije velikog mozga**

**Holinergički sistem neurona moždanog stabla (Slika 1.8.) čini *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT), koji zajedno sa *nucleus tegmentum laterodorsalis* (LDT), inerviše talamus, a indirektno preko talamusa i koru velikog mozga, čineći na taj način glavni talamo-kortikalni izvor holinergičke inervacije velikog mozga.**

PPT je heterogena struktura, sastavljena od holinergičkih i neholinergičkih (glutamatergičkih i GABAergičkih) neurona organizovanih u dva dela: dorzolateralni, kaudalni deo jedra sa gusto grupisanim neuronima – PPT *pars compacta* (dominantno holinergički neuroni) i rostro-medijalni deo u kome su neuroni više difuzno raspoređeni – PPT *pars dissipata* (dominantno glutamatergički neuroni). Naime holinergički



neuroni čine oko 50 % ukupnog broja PPT neurona, a oko 40 % svih PPT neurona se nalazi u okviru *pars compacta* dela PPT jedra, pri čemu 90 % ovih neurona čine holinergički neuroni. Sa druge strane, u PPT *pars dissipata* delu, holinergički neuroni čine 25-50 % populacije neurona ovog dela jedra (Rye, 1997; Jenkinson i sar., 2009; Alam i sar., 2011).



**Slika 1.8. Holinergički sistem neurona moždanog stabla.** Eferentne projekcije holinergičkih neurona moždanog stabla. PPT – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LDT – *nucleus tegmentum laterodorsalis*; DR – *nucleus raphe dorsalis*; LC – *locus coeruleus*; SN – *nucleus substantiae nigrae*; MRF – *formatio reticularis mesencephali*; LH – lateralni hipotalamus; NB – *nucleus basalis*; SI – *substantia innominata*; MS – *medial septum*; hDB/vDB – *stria diagonalis*.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevier; Woolf, 1991; ©1991.

PPT ima važnu ulogu u regulaciji REM faze spavanja (McCarley i Hobson, 1975; Lu i sar., 2006), pobuđivanju (Bringmann, 1995; Datta i Siwek, 1997; Rye, 1997; Datta i MacLean, 2007), kontroli disanja (Lydic i Baghdoyan, 1993; Šaponjić i sar., 2003, 2005a, 2005b, 2006), motornoj kontroli (Takakusaki i sar., 2004). PPT predstavlja glavnu strukturu odgovornu za kontrolu celokupnog REM fenomena, uključujući i motornu kontrolu tokom REM faze spavanja i svaka pojedinačna komponenta REM fenomena, nastala kao rezultat aktivnosti različitih neuronskih populacija i subpopulacija moždanog stabla, može biti izazvana i modulirana aktivacijom PPT jedra (Garcia-Rill, 1991; Rye, 1997; Datta i MacLean, 2007). Anatomske studije potvrđuju centralnu ulogu PPT jedra u kontroli REM fenomena: svaka individualna neuronska

populacija moždanog stabla odgovorna za generisanje nekog od REM fenomena (aktivacija kore velikog mozga, teta ritam, mišićna atonija, disregulacija disanja i/ili srčanog ritma) prima aferentna vlakna iz PPT jedra (Semba, 1993; Rye, 1997).

Aksoni individualnih holinergičkih PPT neurona su izuzetno razgranati i inervišu različite regione mozga. Ushodne projekcije ovih neurona idu dominantno ka talamusu, gde divergiraju u dve grane. Dorzalna grana eferentnog puta iz moždanog stabla inerviše talamus, a ventralna grana nastavlja pored hipotalamusa ka bazalnom prednjem mozgu (Losier i Semba, 1993; Steriade, 2000). Anatomske i elektrofiziološke studije pokazuju da je uticaj bazalnog prednjeg mozga i talamusa na kortikalnu aktivaciju pod snažnom modulatornom kontrolom eferentnih vlakana srednjeg mozga i moždanog stabla (Losier i Semba, 1993; Steriade, 2000). Projektujući se i ka bazalnom prednjem mozgu i ka talamusu, PPT ostvaruje ulogu glavnog kontrolnog relejnog jedra, odgovornog za integraciju funkcija oba holinergička sistema (kortikalnog, ekstratalamičkog BF sistema i talamo-kortikalnog PPT sistema) i njihovog uticaja na aktivaciju kore velikog mozga (Sarter i Bruno, 2000; Dringenberg i Olmstead, 2003). Sa druge strane, nishodne projekcije holinergičkih PPT neurona inervišu pontinsku retikularnu formaciju i nastavljaju ka dorzolateralnom tegmentumu gde divergiraju i difuzno inervišu medularnu retikularnu formaciju i učestvuju u regulaciji mišićnog tonusa (Rye, 1997).

Bazalne ganglije su takođe povezane sa REM regulatornim strukturama u regionu mezopontinskog tegmentuma gde se preklapaju sa neuronskim mrežama zaduženim za regulaciju hoda (Rye, 1997). Naime, PPT ostvaruje recipročne veze sa izlaznim jedrima bazalnih ganglija (*globus pallidus internus* – GPi i *nucleus substantiae nigrae pars reticulata* – SNpr) i ova recipročna veza je od izuzetne važnosti za fiziološku funkciju i bazalnih ganglija i PPT jedra. Pored uloge u kontroli posturalnog tonusa (Takakusaki i sar., 2004), PPT ima ulogu u regulaciji aktivnosti bazalnih ganglija i istovremeno predstavlja relejno jedro, kroz koje bazalne ganglije ostvaruju vezu sa kičmenom moždinom (Mena-Segovia i sar., 2004). Upravo zbog ove strukturne i funkcionalne međuzavisnosti, poremećaji funkcije bazalnih ganglija utiču na PPT i obrnuto, što se manifestuje motornim poremećajima, kao u slučaju PB neuropatologije.

Holinergički PPT neuroni mogu biti ozbiljno ugroženi u PB neuropatologiji. Degeneracija PPT holinergičkog sistema, kao i smanjena aktivnost acetilholin esteraze (AchE) na nivou talamusa, povezana je sa neurodegenerativnim bolestima iz grupe sinukleinopatija i promenama u toku REM faze spavanja (Boeve i sar., 2007).

### **1.3. Neurodegeneracija i holinergički sistem u neurodegeneraciji**

Progresivna disfunkcija i odumiranje nervnih ćelija predstavljaju najčešće karakteristike neurodegenerativnih bolesti koje se javljaju u humanoj populaciji. Klinička slika ovih bolesti je specifična i zavisi od regiona mozga zahvaćenog neurodegenerativnim promenama. Iako se klinički simptomi javljaju kao posledica selektivnog gubitka specifičnih populacija neurona, smatra se da patologija počinje konformacionim promenama specifičnih proteina, zbog čega oni gube svoju fiziološku funkciju i postaju toksični (Spillantini i Geodert, 2013). Solubilne forme proteina usled patoloških promena postaju nesolubilne i sklone agregaciji. Akumulacija patoloških formi proteina se najpre javlja samo u određenim regionima mozga, u ćelijama koje su posebno podložne tome (lokalna disfunkcija), a kasnije se širi i na druge moždane strukture.

Većina neurodegenerativnih bolesti se karakteriše unutarćeljskim i/ili vanćeljskim inkluzijama specifičnih proteina, zbog čega se ove bolesti označavaju još i kao proteinopatije (Bayer, 2013). Na osnovu patologije proteina moguće je razlikovati dve grupe neurodegenerativnih bolesti:

- **tautopatije** – karakteriše ih prisustvo agregacija hiperfosforilisanog tau proteina; ovde spadaju Alchajemerova bolest (AB), frontotemporalna demencija, kortikobazalni sindrom, progresivna supranuklearna paraliza;
- **sinukleinopatije** – karakteriše ih prisustvo agregacija proteina  $\alpha$ -sinukleina, ovde spadaju Parkinsonova bolest (PB), demencija sa Luvijevim telašcima (DLB), multipla sistemska atrofija (MSA).

Alchajemerova bolest (AB) i Parkinsonova bolest (PB) su najčešće neurodegenerativne bolesti starenja. Njihova prevalenca iznosi 0,5-1 % i uvećava se nakon 69. godine starosti na 1-3 % u slučaju PB, odnosno i do 50 % u slučaju AB (Nussbaum i Ellis, 2003). AB i PB podrazumevaju selektivan gubitak specifičnih

populacija neurona, uključujući i holinergičke neurone. Progresivan gubitak memorije u slučaju AB je povezan sa holinergičkom hipofunkcijom i degeneracijom holinergičkih neurona bazalnog prednjeg mozga (Schliebs i Arendt, 2011). Sa druge strane, iako osnovu PB patologije čini deficit dopaminergičkog sistema i holinergički sistem moždanog stabla može biti ugrožen ovom patologijom (Kotagal i sar., 2012a, 2012b).

Intenzivna, kako bazična, tako i klinička istraživanja u ovoj oblasti imaju za cilj razjašnjavanje etiologije i bolje razumevanje mehanizama neurodegenerativnih bolesti. Međutim, i pored svih akumuliranih znanja, neurodegenerativne bolesti i dalje ostaju neizlečive, a jedina mogućnost koju pruža savremena medicina je privremeno ublažavanja simptoma i to sa ograničenim uspehom.

### **1.3.1. Alchajmerova bolest (AB)**

Alchajmerova bolest (AB) je progresivna, neurodegenerativna bolest, koja predstavlja najčešći uzrok demencije u starosti i okarakterisana je kao „poremećaj holinergičke inervacije kore velikog mozga”. Pokazano je da holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga, pre svega holinergički NB neuroni, podležu degenerativnim promenama tokom starenja, a rezultujuća holinergička hipofunkcija povezana je sa progresivnim kognitivnim deficitom (Schliebs i Arendt, 2011). Korelacija holinergičkog deficita i rezultata kognitivnih testova pokazuje da kognitivni poremećaji postaju uočljivi tek nakon deficita holinergičkih neurona od 30 % (Schliebs i Arendt, 2006). Savremene pozitron emisiono tomografske (PET) studije ljudi potvrđuju deficit holinergičke inervacije kore velikog mozga, ali ne i talamusa, detektujući smanjenu aktivnost AchE kod AB pacijenata (Herholz i sar., 2007; Kotagal i sar., 2012b) i povezuju ga sa progresivnim kognitivnim deficitom (Bohnen i sar., 2005). Dakle, AB nije posledica generalizovanog holinergičkog deficita, već selektivne holinergičke denervacije kore velikog mozga (Bohnen i Albin, 2011).

Osnovne histopatološke karakteristike AB su vanćelijske inkluzije amiloid- $\beta$  proteina u vidu plakova i unutarćelijske inkluzije, nastale agregacijom hiperfosforilisanog tau-proteina, u vidu neurofibrilarnih čvorića (Giannakopoulos i sar., 2009).

Holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga takođe podležu patologiji tau-proteina i pretpostavlja se da bi to mogao biti uzrok poremećaja funkcije holinergičkog sistema (Schliebs i Arendt, 2006). Deficit kortikalnih holinergičkih neurona je zabeležen u kasnijim fazama AB, dok se u pacijenata sa blagim kognitivnim poremećajem ili pacijenata koji se nalaze u ranoj fazi bolesti ne detektuje gubitak holinergičkih BF neurona već gubitak funkcije ovih neurona (Schliebs i Arendt, 2011). Smatra se da bi patološke promene, poput smanjenja ekspresije pojedinih gena, narušenih ćelijskih signalnih puteva i citoskeletnog transporta, nastale usled patologije tau-proteina, pre svega mogle biti uzrok disfunkcije i atrofije, a vremenom i neurodegeneracije holinergičkih neurona (Schliebs i Arendt, 2006).

Poremećaj kortikalne holinergičke inervacije u ranim fazama AB može se donekle farmakološki nadomestiti upotrebom AchE inhibitora ili agonista muskarinskih acetilholinskih receptora, a u izvesnoj meri i usporiti progresija holinergičkog deficita (Martinez i sar., 2009).

### **1.3.2. Parkinsonova bolest (PB)**

Iako tradicionalno viđena kao motorni poremećaj izazvan degeneracijom dopaminergičkog sistema *nucleus substantiae nigrae* (SN), Parkinsonova bolest (PB) se danas opisuje kao multisistemska neurodegenerativna bolest (Boeve 2013; Raggi i sar., 2013), koja pored dopaminergičkog podrazumeva i patologiju drugih neurotransmiterskih sistema, poput holinergičkog (*nucleus basalis* – NB, *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* – PPT; *nucleus tegmentum laterodorsalis* – LDT), serotonergičkog (*nucleus raphe dorsalis* – DR) i noradrenergičkog (*locus coeruleus* – LC). Klinička manifestacija bolesti podrazumeva motorne poremećaje poput rigidnosti, tremora, bradikinezije i posturalne nestabilnosti koji su posledica deficita dopamina izazvanog degeneracijom neurona *nucleus substantiae nigrae*. Međutim, pored motornih, bolest karakterišu i brojni ne-motorni, kognitivni poremećaji (poremećaji pažnje i koncentracije, poremećaji u učenju i memoriji, demencija), autonomni poremećaji (ortostatička hipotenzija, konstipacija, urinarna inkontinencija, redukovana olfaktorna funkcija), psihološki i poremećaji u ponašanju (depresija, anksioznost, apatija, vizuelne halucinacije), kao i poremećaji u ciklusima budnost-spavanje (poremećaji ponašanja u toku REM faze spavanja, hipersomnija, insomnija) (Boeve,

2013). Ovi ne-motorni simptomi nastaju kao posledica deficita acetilholina, serotonina i noradrenalina izazvanih degeneracijom odgovarajućih moždanih struktura (strukture bazalnog prednjeg mozga, pontinska holinergička jedra PPT i LDT, *locus coeruleus*, *nucleus raphe dorsalis*, limbički sistem, neokorteks) (Boeve, 2013).

Za razliku od tipičnih motornih simptoma parkinsonizma (klinička manifestacija bolesti), koji se javljaju u kasnoj fazi neurodegeneracije dopaminergičkog sistema (deficit dopaminergičkih neurona od 80 %), subklinički simptomi, a naročito poremećaj ponašanja u toku REM spavanja, se često javljaju znatno ranije i mogu prethoditi motornim poremećajima nekoliko godina ili decenija (Boeve i sar., 2007; Withwell i sar., 2007; Simic i sar., 2009).

Histopatološki, PB se karakteriše abnormalnom akumulacijom proteina  $\alpha$ -sinukleina u vidu inkluzija označenih kao Luvijeva telašaca i Luvijevi neuriti, što ovu bolest svrstava u posebnu grupu neurodegenerativnih bolesti („Lewy body disease” – LBD), odnosno sinukleinopatija. Pojava inkluzija, kao i njihova progresija ima određenu topografsku i vremensku pravilnost prema Braak hipotezi (Braak i sar. 2003). Naime, Braak i sar. (2003) su definisali sistem na osnovu koga je moguće pratiti progresiju neuropatoloških promena i kliničke manifestacije PB, upravo na osnovu te topografske i vremenske sekvence pojave i progresije patologije proteina  $\alpha$ -sinukleina. Prema Braak-ovom sistemu, PB neuropatologija počinje u olfaktornim strukturama i produženoj moždini (faza 1), odakle se ascedentno širi ka strukturama moždanog stabla (faze 2-3), da bi u kasnijim fazama (faze 4-6) zahvatila i bazalne ganglije, strukture limbičkog sistema kao i neokorteks.

Humane PET studije ukazuju na jasnu povezanost kortikalne i subkortikalne (talamo-kortikalne) holinergičke denervacije sa kognitivnim i motornim deficitom kod pacijenata sa PB (Kotagal i sar., 2012b). Takođe, degeneracija holinergičkih PPT neurona je povezana sa poremećajima ponašanja u toku REM spavanja (Kotagal i sar., 2012a), kao i sa poremećajima u hodu i ravnoteži, uključujući i česte padove kod PB pacijenata (Bohnen i sar., 2009; Bohnen i Albin, 2011).

#### **1.4. Poremećaji ponašanja u toku REM faze spavanja u neurodegeneraciji**

Poremećaji ponašanja u toku REM faze spavanja („REM sleep behaviour disorder” - RBD) predstavljaju jedinstven oblik poremećaja spavanja koji se karakteriše gubitkom mišićne atonije i izraženom, kompleksnom motornom aktivnošću u vidu nevoljnih, najčešće odbrambenih ili agresivnih pokreta, koji su često povezani sa neprijatnim snovima i reflektuju njihov sadržaj (Schenck i Mahowald., 2002; Iranzo i sar., 2006; Postuma i sar., 2012). Klinička dijagnoza RBD-a se zasniva na polisomnografskom nalazu koji beleži gubitak atonije skeletne muskulature, kao i izražene, kako fazne, tako i tonične kontrakcije mišića, uz potvrdu (istorija bolesti ili video snimak u toku polisomnografije) o postojanju abnormalne motorne aktivnosti u toku REM faze spavanja (The International Classification of Sleep Disorders, 2005).

RBD zapravo predstavlja kompleksan poremećaj koji se može manifestovati u različitim uslovima. RBD može biti idiopatski, kada predstavlja primarno oboljenje i simptomatski, kada se javlja kao posledica neke druge, već prisutne patologije. Iako može biti izazvan farmakološki (Postuma i sar., 2012), RBD se najčešće javlja kao posledica strukturnih lezija u regionu srednjeg mozga i moždanog stabla (Boeve i sar., 2007; Sapin i sar., 2009; Luppi i sar., 2011). RBD može biti povezan sa tumorima ili moždanim udarom u regionu pontomedularnog žleba (Boeve i sar., 2007), narkolepsijom, limbičkim encefalitisom, farmakološkim sredstvima (alkohol, triciklični ili serotonergički antidepresivi, beta blokatori), kao i sa čitavim nizom neurodegenerativnih bolesti poput progresivne supranuklearne paralize, kortikobazalnog sindroma, frontotemporalne demencije i Hantingtonove bolesti (Postuma i sar., 2012). Međutim, u većini slučajeva RBD se javlja kao posledica neke od neurodegenerativnih bolesti tipa sinukleinopatija poput PB, DLB ili MSA (Boeve, 2013) i tom prilikom se RBD simptomi mogu javiti i 5-40 godina pre same kliničke manifestacije kognitivnih i motornih poremećaja (Boeve i sar., 2007; Withwell i sar., 2007; Simic i sar., 2009). Istraživanja pokazuju da čak 80 % pacijenata sa poremećajem ponašanja u toku REM faze spavanja vremenom razvije neku od neurodegenerativnih bolesti iz grupe sinukleinopatija (Boeve, 2013; Iranzo i sar., 2013).

Smatra se da je RBD patofiziologija posledica neurodegenerativnih procesa koji zahvataju strukture moždanog stabla uključene u regulaciju REM faze spavanja (Schenck i Mahowald., 2002; Boeve i sar., 2007). Naime, prema Braak-ovoj hipotezi (Braak i sar., 2003) neuropatologija sinukleinopatija započinje neurodegenerativnim procesima koji se najpre dešavaju u produženoj moždini i strukturama moždanog stabla, uključujući i REM regulatorne strukture, da bi se sa progresijom bolesti ushodno širili ka strukturama srednjeg i bazalnog prednjeg mozga. Na osnovu kliničke studije Mejo klinike za period 1990-2006. godine RBD je definisan kao mogući rani klinički znak neurodegenerativnih bolesti kao sto su sinukleinopatije (Boeve i sar., 2007; Raggi i sar., 2013).

Još uvek nisu u potpunosti poznati patofiziološki RBD mehanizmi, kao ni neuronske mreže uključene u regulaciju mišićne atonije za vreme REM spavanja. Dosadašnja istraživanja na pacovima i mačkama ukazuju na značaj pontinskih struktura u RBD patogenezi, navodeći SLD jedro kao strukturu koja ima centralnu ulogu u regulaciji REM mišićne atonije (Morison, 1998; Lu i sar., 2006). Naime, za vreme REM spavanja glutamatergički neuroni SLD jedra koji se projektuju ka produženoj moždini i kičmenoj moždini, direktno ili indirektno (preko MRF) inhibiraju motoneurone, što rezultira mišićnom atonijom. Disregulacija endogenih inhibitornih procesa usled lezije SLD jedra dovodi do izražene fazne motorne aktivnosti za vreme REM spavanja (Chen i sar., 2013).

Kada je u pitanju RBD ljudi, pretpostavlja se da bi pored gubitka mišićne atonije i pojačana fazna lokomotorna aktivnost mogla biti uzrok RBD patologije. (Boeve i sar., 2007). Lezije, degenerativni procesi ili farmakološke manipulacije SLD ili MRF regiona mogu biti sasvim dovoljne da izazovu gubitak atonije u toku REM faze spavanja, ali ne i pojavu kompleksnog motornog ponašanja (Lu i sar., 2006). Sa druge strane, procesi koji utiču na lokomotorni generator u smislu njegove pojačane aktivacije mogu dovesti do prevage nad toničnom inhibicijom spinalnih neurona od strane SLD ili MRF, što potencijalno može usloviti pojavu kompleksnog motornog ponašanja u toku REM faze spavanja (Boeve i sar., 2007; Iranzo i sar., 2013; Peever i sar., 2014).

Iako RBD patofiziologija nije do kraja razjašnjenja, sama činjenica da se RBD može javiti i nekoliko desetina godina pre kliničke manifestacije motornih i kognitivnih



simptoma ukazuje na značaj RBD-a kao ranog markera neurodegenerativnih bolesti tipa sinukleinopatija i istovremeno pruža jedinstvenu mogućnost za istraživanja patogeneze i progresije ovih neurodegenerativnih bolesti, kao i mogućnost za razvoj novih pravaca u prevenciji i terapiji sinukleinopatija (Boeve i sar., 2007).

## **1.5. Eksperimentalni modeli AB i PB neuropatologije**

Upotreba eksperimentalnih modela je od velike važnosti u biomedicinskim istraživanjima, a posebno u istraživanjima patologije različitih humanih bolesti i poremećaja. Ovakvi modeli pre svega omogućavaju istraživanja koja nisu moguća na ljudima, doprinose razjašnjavanju i boljem razumevanju patofizioloških mehanizama bolesti i pružaju mogućnost za razvoj efikasnijih tretmana i bolju prevenciju.

Komplementarnost eksperimentalnih modela sa humanim bolestima je od posebne važnosti. Naime, kvalitet eksperimentalnog modela zavisi od toga u kojoj meri etiologija, simptomi i patofiziološki mehanizmi, kao i odgovor na terapiju u životinja, odgovaraju humanim bolestima, ali i od sličnosti fiziologije i morfologije izabrane vrste sa humanom fiziologijom i morfologijom, što je posebno važno za interpretaciju i ekstrapolaciju dobijenih rezultata.

Međutim, većina „*in vivo*” ili „*in vitro*” eksperimentalnih modela u najboljem slučaju zadovoljava samo deo ovih uslova. I pored svih napora da se pronađu idealni model organizmi i dalje ostaje pitanje do koje mere je moguće kompleksne humane bolesti predstaviti eksperimentalnim modelom.

Kada su u pitanju AB i PB, kao najčešće neurodegenerativne bolesti starenja, eksperimentalni modeli se najčešće zasnivaju na dva osnovna metodološka pristupa: (1) sistemska ili lokalna primena neurotoksina koji izazivaju neurodegeneraciju specifičnih populacija neurona i (2) upotreba genetski modifikovanih životinja (transgene životinje). Oba pristupa imaju svoje specifične karakteristike, prednosti i ograničenja, a krajnji izbor eksperimentalnog modela zavisi od ciljeva istraživanja.

Modeli neurotoksičnih lezija predstavljaju klasične i najstarije eksperimentalne modele AB i PB neuropatologije. Upotreba različitih toksina rezultira različitim stepenom degeneracije specifičnih populacija neurona, kao i ekspresijom motornih i

kognitivnih poremećaja, ali ne izaziva patološke izmene specifičnih proteina (amiloid- $\beta$  i  $\alpha$ -sinuklein) koji karakterišu AB i PB patologiju. Sa druge strane, transgeni modeli, nastali eksperimentalnim manipulacijama gena uključenih u patologiju naslednih oblika ovih neurodegenerativnih bolesti, veoma dobro oslikavaju osnovne molekularne mehanizme patologije proteina, ali ne uspevaju da postignu deficit specifičnih populacija neurona kao što su holinergički i dopaminergički sistem (Blandini i Armentero, 2012; Braidy i sar., 2012; LaFerla i Green, 2012). Osim toga, najveći broj obolelih spontano razvije AB ili PB (sporadični slučajevi), dok su nasledne forme AB i PB izuzetno retke (manje od 1 % u slučaju AB, odnosno 10-15 % u slučaju PB (Blandini i Armentero, 2012; LaFerla i Green, 2012).

U cilju istraživanja uloge holinergičke hipofunkcije u AB patogenezi, ustanovljeni su eksperimentalni „*in vivo*” modeli kod kojih se holinergička hipofunkcija zasniva na leziji holinergičkih neurona bazalnog prednjeg mozga. Model lezije NB jedra pacova, predstavlja najčešće korišćeni eksperimentalni model holinergičke neuropatologije AB, koji se zasniva na sistemskoj ili lokalnoj primeni različitih selektivnih (192 IgG-saporin) ili neselektivnih toksina (ibotenična, kinurenska i kvinolinska kiselina) (Gower, 1986; Arendash i sar., 1987; Toledano i Alvarez, 2004, 2011; Šaponjić i sar., 2013). Međutim, ispitivanje holinergičke hipofunkcije u PB neuropatologiji je ograničeno nedostatkom adekvatnog eksperimentalnog modela PPT holinergičke neurodegeneracije. Eksperimentalni modeli koji su do sada korišćeni za istraživanje patogeneze i patofiziologije PB su se zasnivali na sistemskoj ili lokalnoj administraciji selektivnih neurotoksina koji oštećuju dopaminergičke neurone SN, kao što su MPTP, 6-OHDA, LPS, inhibitori proteozoma, rotenon (Bezard i Przedborski, 2011; Blandini i Armentero, 2012; Duty i Jenner, 2011), a deficit holinergičkih PPT neurona, odnosno holinergička hipofunkcija je eventualno praćena samo kao posledica prethodno izazvanog dopaminergičkog deficita (Pienaar i van de Berg, 2013; Piennar i sar., 2014).

U ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put korišćen eksperimentalni model holinergičke PD neuropatologije odnosno lezija holinergičkih neurona PPT jedra kao višeg nervnog centra integrativne holinergičke kontrole aktivnosti velikog mozga i veoma važne strukture u regulaciji spavanja.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

---

Alchajmerova bolest (AB) i Parkinsonova bolest (PB) predstavljaju najčešće neurodegenerativne bolesti starenja. Etiopatologija AB i PB podrazumeva selektivan gubitak specifičnih populacija neurona, uključujući i holinergičke neurone bazalnog prednjeg mozga i moždanog stabla, kao i ushodni obrazac progresije neurodegeneracije od REM regulatornih struktura u moždanom stablu ka prednjemoždanim regionima. Poremećaji ponašanja u toku REM spavanja u ovih bolesti se mogu javiti godinama i decenijama pre kliničke dijagnoze bolesti što ukazuje na značaj istraživanja poremećaja ponašanja u toku REM spavanja kao mogućeg ranog markera neurodegeneracije.

Ova doktorska disertacija imala je kao predmet istraživanja da u modelima AB i PB holinergičke neuropatologije pacova, po prvi put ispita uticaj unilateralnih i bilateralnih lezija glavnog izvora kortikalne holinergičke inervacije (NB jedro) i glavnog izvora talamo-kortikalne holinergičke inervacije (PPT jedro) pacova na spavanje. U ovim eksperimentalnim modelima holinergičke neuropatologije humanih bolesti unilateralne lezije su predstavljale lakši oblik ili početni stadijum neurodegeneracije, dok su bilateralne lezije predstavljale teži oblik ili kasniji stadijum neurodegeneracije, a progresija bolesti je praćena ukupno 5 nedelja.

Osnovna hipoteza ove doktorske disertacije je bila da funkcionalno različiti centralni holinergički sistemi imaju različite regulatorne funkcije u toku spavanja koje se mogu definisati na osnovu elektroencefalografске aktivnosti.

U skladu sa osnovnom hipotezom postavljen je osnovni cilj da se kroz analizu arhitekture spavanja, strukture prelaznih stanja i EEG mikrostrukture svih faza u toku spavanja u eksperimentalnim modelima neuropatologije humanih neurodegenerativnih bolesti pronađu potencijalni markeri početka, težine i progresije neurodegeneracije funkcionalno različitih holinergičkih sistema inervacije velikog mozga pacova, sa mogućnošću dalje primene ovako senzitivnih metoda u eventualnoj prevenciji i promeni terapijskog pristupa u pacijenata sa rizikom razvoja AB i PB.

U skladu sa postavljenom osnovnom hipotezom i osnovnim ciljem definisani su sledeći zadaci:

- **ispitivanje efekata unilateralnih i bilateralnih NB lezija** na arhitekturu spavanja i EEG mikrostrukturu budnosti, NREM i REM faze spavanja u cilju definisanja EEG markera početka i progresije poremećaja izazvanih degeneracijom glavnog kortikalnog izvora holinergičke inervacije velikog mozga pacova;
- **ispitivanje efekata unilateralnih i bilateralnih PPT lezija** na arhitekturu spavanja, strukturu prelaznih stanja i EEG mikrostrukturu budnosti, NREM i REM faze spavanja u cilju definisanja EEG markera početka i progresije poremećaja izazvanih degeneracijom glavnog talamo-kortikalnog izvora holinergičke inervacije velikog mozga pacova;
- **ispitivanje razlike efekata bilateralne NB i bilateralne PPT lezije**, kao težih oblika holinergičke degeneracije ili kasnijih stadijuma holinergičke neurodegeneracije na arhitekturu spavanja, strukturu prelaznih stanja i EEG mikrostrukturu budnosti, NREM i REM faze spavanja.
- **ispitivanje funkcionalne razlike REM faze spavanja**, kao posebne patologije bilateralne PPT lezije, analizom EEG mikrostrukture i kortikospinalne kontrole vratnih mišića za vreme REM faze spavanja.

### **3. MATERIJAL I METODE**

---

### 3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni odrasli mužjaci pacova Wistar soja, starosti 2-2,5 meseca i prosečne težine 250-290 g, odgajani u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu. Životinje su uzgajene i čuvane u standardnim uslovima (konstantna temperatura: 25 °C; svetlosni režim 12 h svetlo/12 h mrak) sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Tokom eksperimenata, životinje su bile smeštene u plastičnim kavezima sa prostirkom od sterilisane strugotine (2-3 životinje po kavezu), da bi nakon operativne procedure bile smeštene pojedinačno u zasebne kaveze.

Upotreba životinja i eksperimentalni protokol za izradu ove doktorske disertacije odobreni su od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu (rešenje broj 2-21/2010) i u skladu su sa Evropskom direktivom o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe (Direktiva 86/609/EEC).

### 3.2. Eksperimentalne grupe

U mužjaka Wistar soja pacova implantirane su EEG i EMG elektrode za hronično registrovanje spavanja. U toku operativne procedure za implantaciju elektroda izvršene su u odgovarajućim ekperimentalnim grupama lažne unilateralne ili bilateralne lezije, odnosno unilateralne ili bilateralne lezije jedra *nucleus basalis* (NB) ili jedra *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT). Sve eksperimentalne životinje su bile podeljene u devet eksperimentalnih grupa (**Slika 3.1.**):

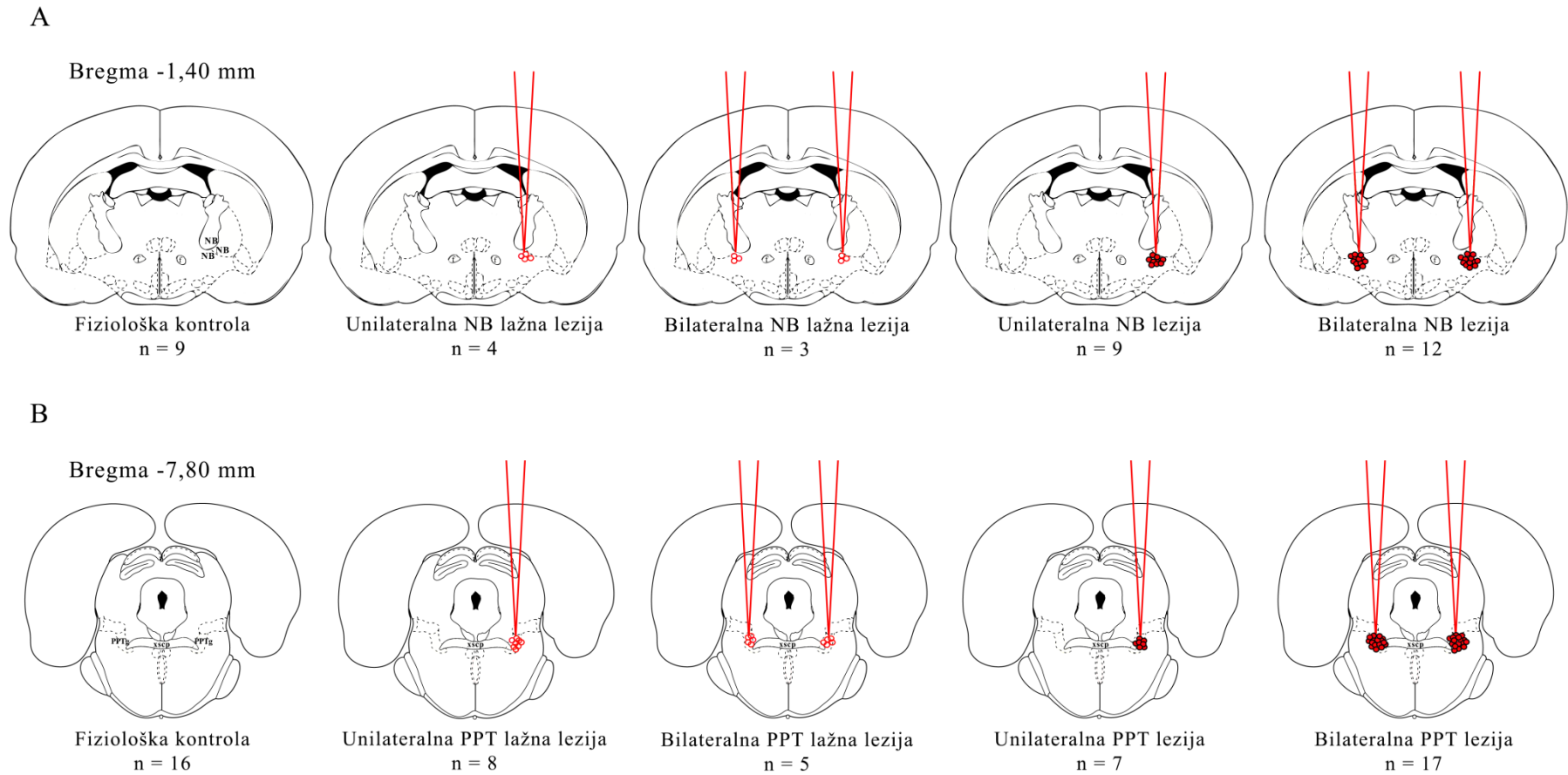
- **fiziološka kontrola** (n = 16)
- **unilateralna NB lažna lezija** (n = 4)  
(unilateralna mikroinfuzija kontrolnog rastvora u desni NB)
- **bilateralna NB lažna lezija** (n = 3)  
(bilateralna mikroinfuzija kontrolnog rastvora u NB)
- **unilateralna NB lezija** (n = 9)  
(unilateralna mikroinfuzija ekscitotoksičnog rastvora u desni NB)

- **bilateralna NB lezija** (n = 12)  
(bilateralna mikroinfuzija ekscitotoksičnog rastvora u NB)
- **unilateralna PPT lažna lezija** (n = 8)  
(unilateralna mikroinfuzija kontrolnog rastvora u desni PPT)
- **bilateralna PPT lažna lezija** (n = 5)  
(bilateralna mikroinfuzija kontrolnog rastvora u PPT)
- **unilateralna PPT lezija** (n = 7)  
(unilateralna mikroinfuzija ekscitotoksičnog rastvora u desni PPT)
- **bilateralna PPT lezija** (n = 17)  
(bilateralna mikroinfuzija ekscitotoksičnog rastvora u PPT).

Lezija jedra *nucleus basalis* (NB), glavnog izvora kortikalne holinergičke inervacije velikog mozga pacova, predstavlja najčešće korišćen eksperimentalni model holinergičke neuropatologije Alchajmerove bolesti (AB) (Gower, 1986; Arendash i sar., 1987; Toledano i Alvarez, 2004; Šaponjić i sar., 2013). Sa druge strane, lezija jedra *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT), jedinog izvora holinergičke talamo-kortikalne inervacije velikog mozga pacova, predstavlja u ovim istraživanjima po prvi put korišćen eksperimentalni model holinergičke neuropatologije jednog od mnogobrojnih oblika Parkinsonove bolesti (PB) (Petrović i sar., 2013a, 2013b, 2014).

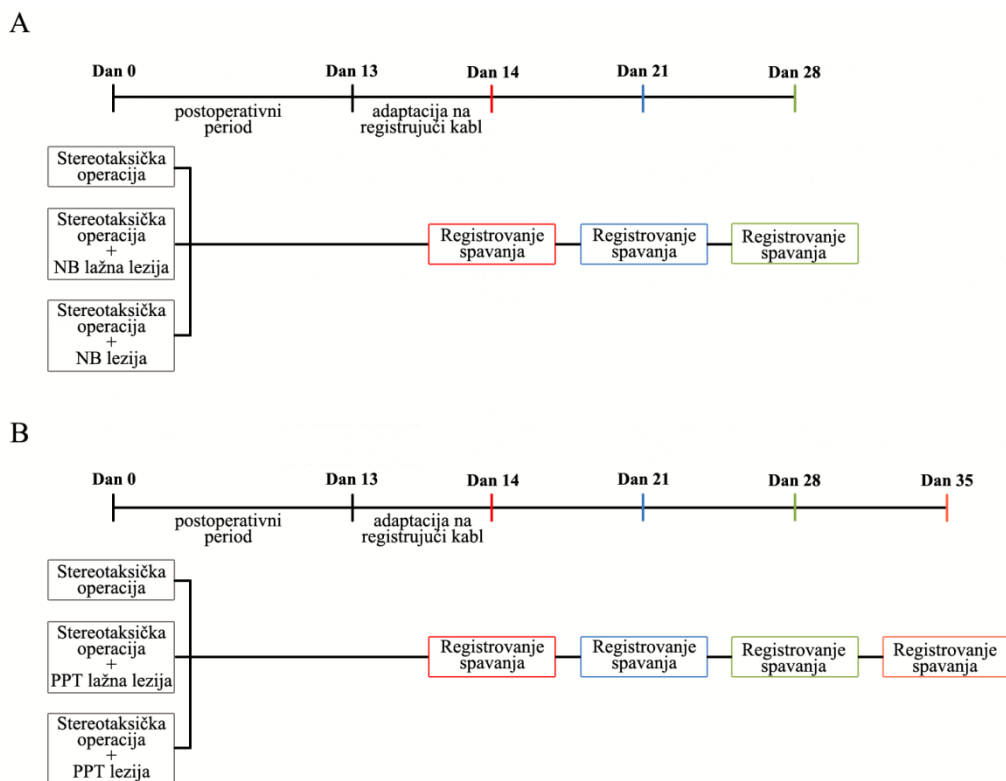
U ovim eksperimentalnim modelima holinergičke neuropatologije humanih bolesti (AB i PB), unilateralne lezije su korišćene kao model lakšeg oblika, odnosno početka holinergičke neurodegeneracije, a bilateralne lezije kao model težeg oblika, odnosno kasnijeg stadijuma holinergičke neurodegeneracije. Progresija holinergičke neurodegeneracije je praćena tokom 4 nedelje u slučaju NB lezije, odnosno tokom 5 nedelja u slučaju PPT lezije.





**Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimentalnih grupa.** (A) Šematski prikaz eksperimentalnih grupa i broja pacova (n) korišćenih u eksperimentima NB lezije; f – fornix; NB – nucleus basalis; (B) Šematski prikaz eksperimentalnih grupa i broja pacova (n) korišćenih u eksperimentima PPT lezije; xscp – decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum; PPTg – nucleus pedunculo pontinus tegmentalis. Prazni kružići – PBS mikroinfuzije (lažne lezije); crveni kružići – IBO mikroinfuzije (lezije).

Ekspertimentu su rađeni prema protokolima prikazanim na **Slici 3.2.**



**Slika 3.2.** Šematski prikaz eksperimentalnog protokola za registrowanje spavanja u modelima kortikalne (**A**) i talamo-kortikalne (**B**) holinerđiĉke denervacije.

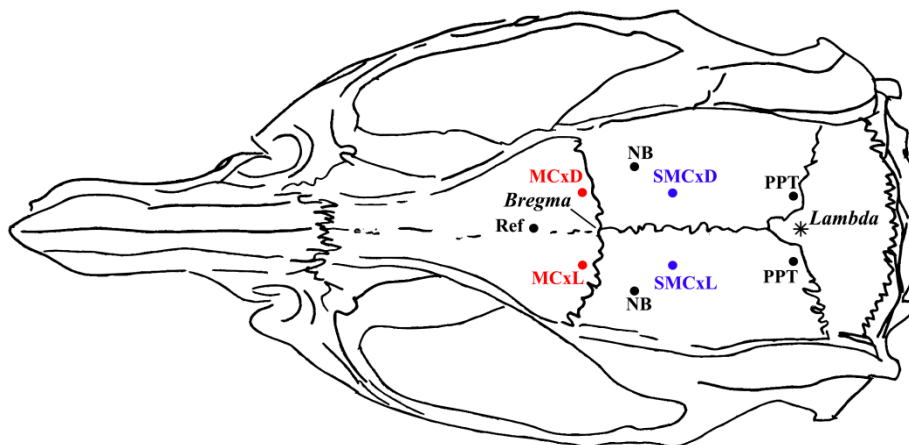
### 3.3. Operativna procedura

Sve ųivotinje su podvrgnute operativnoj proceduri implantacije EEG i EMG elektroda za hroniĉno registrowanje spavanja (Šaponjiĉ i sar., 2007). Pacovi su anestetizirani ketamin/diazepam anestezijom (50 mg/kg, *i.p.* Zoletil 50, Virbac, Francuska) i postavljeni u stereotaksiĉki ram. Krzno glave je obrijano i duų sagitalnog ųava lobanje je skalpelom naĉinjen rez. Kosti lobanje su potom oĉiųćene od miųiĉnog i podmiųiĉnog tkiva kako bi se omoguĉio pristup orijentacionim stereotaksiĉkim taĉkama na kostima lobanje (bregma i lambda). Nakon toga su stereotaksiĉki razmerena mesta za otvore na kostima lobanje za implantaciju EEG elektroda, kao i za finalni stereotaksiĉki pristup za postavljanje mikroinfuzione Hamilton igle u duboka moųdana jedra (NB ili PPT). Da bi se u odraslih pacova Wistar soja ispunio osnovni stereotaksiĉki uslov u razmeravanju koordinata za implantaciju elektroda ili za

mikroinfuzije, posebno za duboke moždane strukture, u odnosu na bregmu i lambdu, pacovi moraju biti težine do 290 g, a rastojanje između ovih orijentacionih stereotaksičkih tačaka na lobanji treba da bude 9 mm. Za registrovanje kortikalne aktivnosti motorne i senzomotorne kore implantirane su parne parijetalne EEG šraf elektrode od nerđajućeg čelika. Sve stereotaksičke koordinate, kako za položaj EEG elektroda, tako i za položaj mikroinfuzione igle, su određene prema stereotaksičkom atlasu za pacove (Paxinos i Watson, 2005) i to:

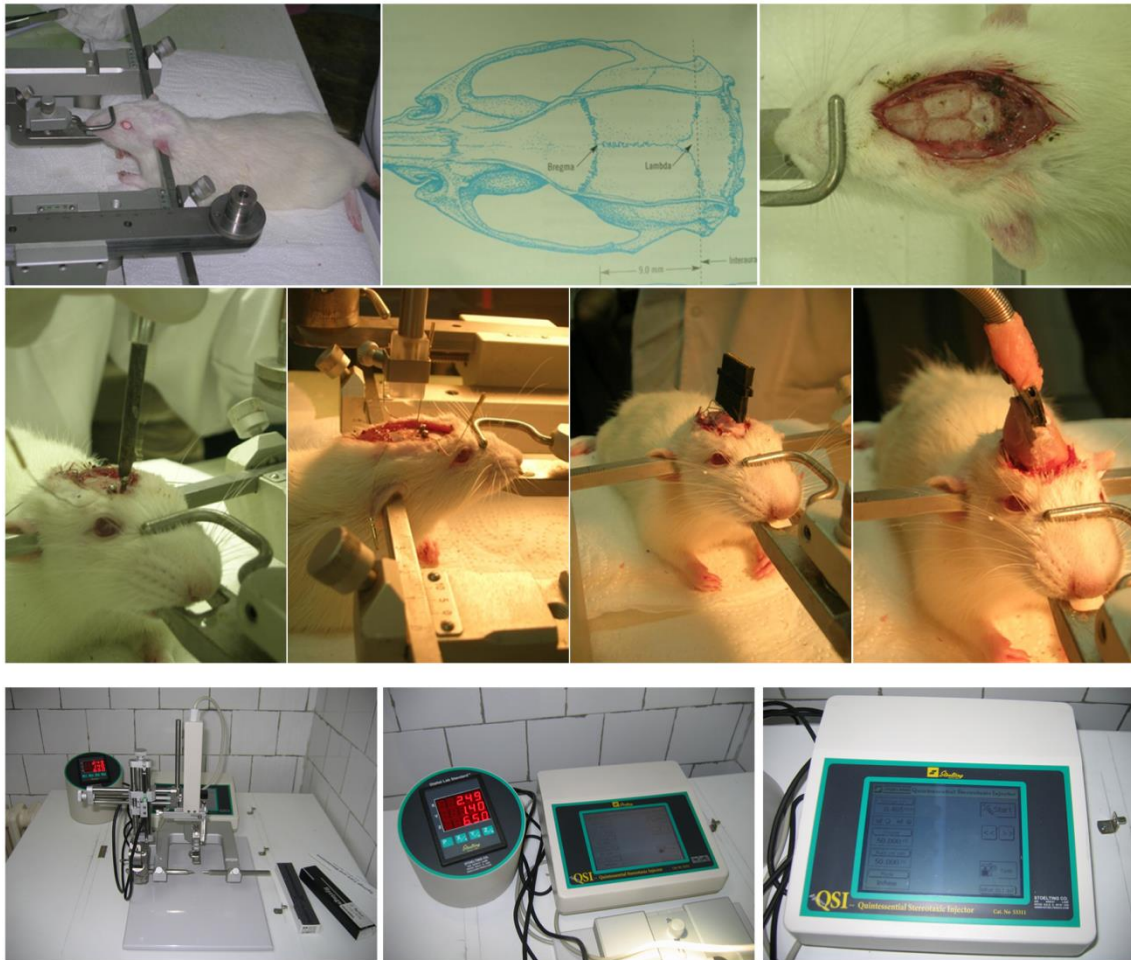
- **za motornu koru (MCx):** antero-posteriorno +1,00 mm od bregme; medio-lateralno 2,00 mm; dorzo-ventralno: 1,00 mm;
- **za senzomotornu koru (SMCx):** antero-posteriorno -3,00 mm od bregme; medio-lateralno 2,00 mm; dorzo-ventralno: 1,00 mm.

Na ovim koordinatama su bušilicom sa čeličnim svrdlom prečnika 1 mm izbušeni otvori na parijetalnim i frontalnim kostima lobanje, u koje su potom epiduralno postavljene EEG šraf elektrode. Za procenu mišićne aktivnosti, parne žičane EMG elektrode obložene teflonom su implantirane u dorzalnu vratnu muskulaturu. Referentna šraf elektroda je implantirana u nazalnu kost. Izvodi svih elektroda su skupljeni i uvučeni u plastični konektor, koji je potom pričvršćen za šraf elektrode i lobanju uz pomoć dentalnog cementa (Simgal, Galenika a.d. Srbija, Beograd). Sve korišćene stereotaksičke koordinate za otvore na kostima lobanje su prikazane na **Slici 3.3**.



**Slika 3.3.** Šematski prikaz koordinata otvora na kostima lobanje za implantaciju EEG elektroda za hronično registrovanje spavanja pacova i koordinata otvora za postavljanje mikroinfuzione igle za lezije dubokih jedara mozga (NB i PPT) u odnosu na stereotaksičke orijentacione tačke (bregma i lambda). SMCxL, SMCxD – senzomotorna kora levo, senzomotorna kora desno; MCxL, MCxD – motorna kora levo, motorna kora desno; Ref – referentna elektroda. (Preuzeto i modifikovano iz: Paxinos i Watson, 2005).

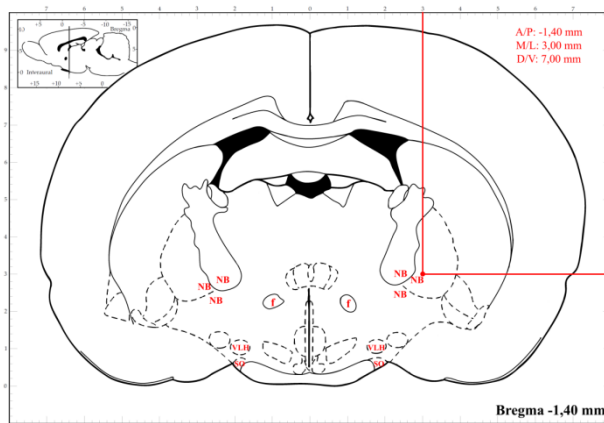
Tokom operativne procedure implantacije EEG i EMG elektroda, korišćenjem metode stereotaksički navođene mikroinfuzije (**Slika 3.4.**), urađene su i selektivne unilateralne (desne) i bilateralne NB i PPT lažne lezije (mikroinfuzije kontrolnog rastvora u NB ili PPT jedro), kao i unilateralne (desne) i bilateralne lezije (mikroinfuzije ekscitotoksina u NB ili PPT jedro). U slučaju mikroinfuzija lažnih lezija u NB ili PPT jedro je ubrizgavan 0,1 M rastvor Na-fosfatnog pufera (0,1 M PBS), dok je u slučaju lezija ubrizgavan rastvor 0,1 M ibotenične kiseline (IBO) u 0,1 M PBS-u (0,1M IBO/0,1M PBS; IBO Sigma Aldrich). Ibotenična kiselina je generalni agonista glutamatskih receptora koja izaziva ekscitotoksičan efekat (patološko povećanje vanćelijske koncentracije glutamata) delujući preko jonotropnih (NMDA) i metabotropnih glutamatskih receptora i posledično dovodi do odumiranja neurona (Inglis i Semba, 1997). Rastvori su ubrizgavani u volumenu od 100 nl, u jednom pulsu tokom 60 s. Za mikroinfuzije je korišćen digitalizovani standardni laboratorijski stereotaksički aparat sa injektorom (Stoelting Co, SAD) i Hamilton špric (1 µl, sa 26 ga iglom).



**Slika 3.4.** Prikaz operativne procedure za implantaciju EEG i EMG elektroda za hronično registrovanje spavanja i metode stereotaksički navođene mikroinfuzije.

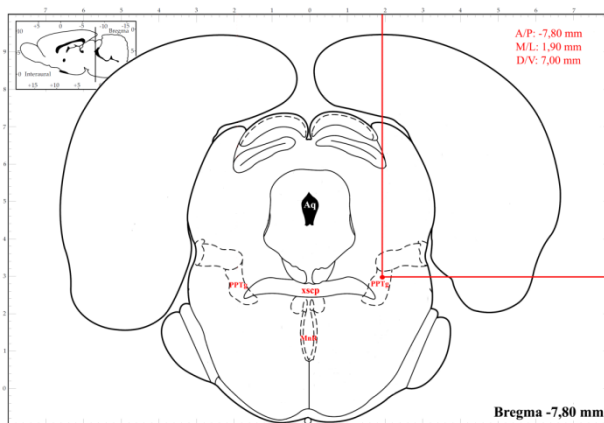
Položaj Hamilton šprica za PBS ili IBO mikroinfuzije u NB ili PPT jedro, je određen prema stereotaksičkom atlasu (Paxinos i Watson, 2005) i to:

- **za NB (Slika 3.5., antero-posteriorno: -1,40 mm od bregme; medio-lateralno: 3,00 mm; dorzo-ventralno: 7,00 mm od površine mozga)**
- **za PPT (Slika 3.6., antero-posteriorno: -7,80 mm od bregme; medio-lateralno: 1,90 mm; dorzo-ventralno: 7,00 mm od površine mozga).**



**Slika 3.5.** Šematski prikaz tipične stereotaksičke koordinate korišćene u eksperimentima za ekscitotoksičnu NB leziju. NB – *nucleus basalis*; f – *fornix*; VLH – *nucleus hypothalamicus ventrolateralis*; SO – *nucleus supraopticus*. Preuzeto i modifikovano iz Paxinos and Watson, 2005.

Koncentracija IBO kao i volumen mikroinfuzije su izabrani na osnovu prethodnih studija (Inglis i Semba, 1997; Bjelobaba i Šaponjić, 2013). Nakon mikroinfuzije rastvora (PBS ili IBO) i pre izvlačenja igle iz tkiva, Hamiltonov špric je ostavljen na mestu mikroinfuzije tokom 5 minuta kako bi se omogućila difuzija ubrizganog rastvora u okolno tkivo. U slučaju bilateralnih ekscitotoksičnih mikroinfuzija, nakon izvlačenja, igla je isprana fiziološkim rastvorom pre nego što je stereotaksički pozicionirana za sledeću kontralateralnu mikroinfuziju u NB ili PPT.



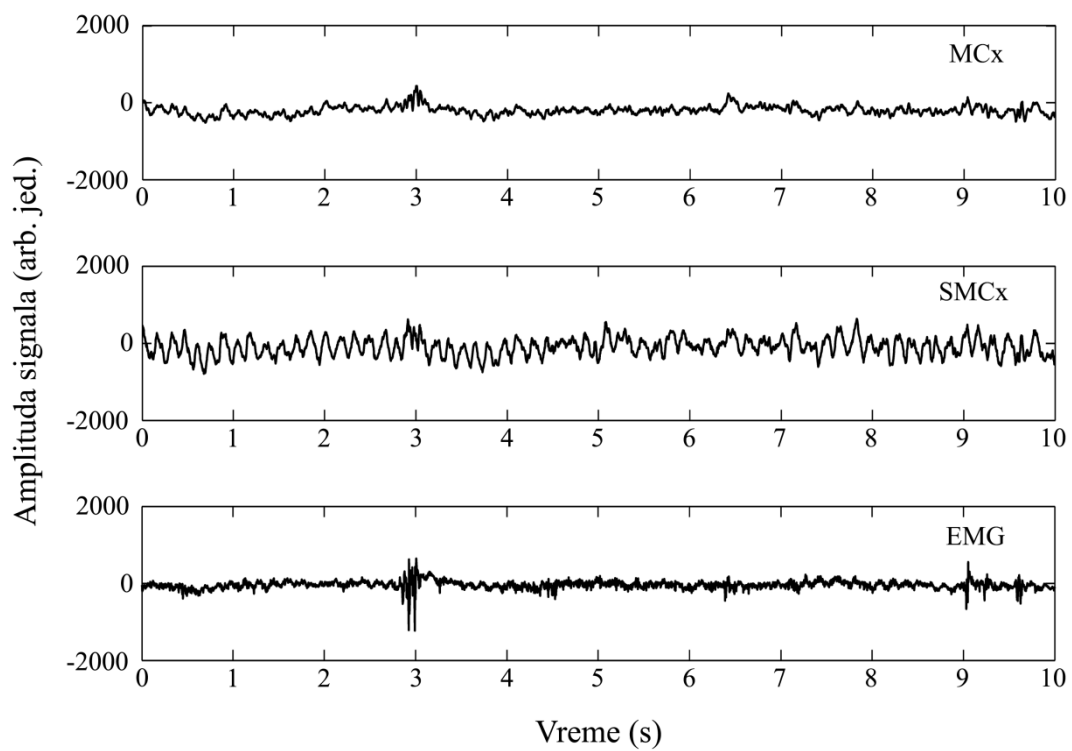
**Slika 3.6.** Šematski prikaz tipične stereotaksičke koordinate korišćene u eksperimentima za ekscitotoksičnu PPT leziju. PPTg – *nucleus pedunculo pontinus tegmentalis*; xscp – *decussation pedunculorum cerebellarium superiorum*; MnR – *nucleus raphe medianus*; Aq – *aqueductus cerebri - Sylvii*. Preuzeto i modifikovano iz Paxinos and Watson, 2005.

Tehnika stereotaksički navođene mikroinfuzije korišćenjem digitalizovanog stereotaksičkog aparata sa digitalizovanim injektorom omogućava preciznost u razmeravanju stereotaksičkih koordinata u sve tri ose (antero-posteriorno, medio-lateralno, dorzo-ventralno) sa rezolucijom od 10  $\mu\text{m}$ , kao i mikroinfuzije kontrolisanog volumena i trajanja. U našim ekperimentima, mikroinfuzije od 100 nl rastvora imaju procenjeni efektivni radijus od 300  $\mu\text{m}$  u tkivu „*in vivo*” (Šaponjić i sar., 2005a) čime je obezbeđena selektivnost u manipulaciji NB i PPT jedara.

Na kraju operativne procedure rane su ušivene hirurškim koncem (SMI AG, Belgija) i životinje su ostavljene da se oporave tokom dve nedelje. Prethodna istraživanja su pokazala da je period oporavaka od najmanje 10 dana neophodan za ponovno uspostavljanje fiziološke arhitekture spavanja nakon operativne procedure hronične implantacije elektroda za registrovanje spavanja (Šaponjić i sar., 2007).

### **3.4. Procedura registrovanja spavanja**

Prema eksperimentalnom protokolu, registrovanje spavanja je počinjalo nakon dvonedeljnog oporavka od operativne procedure. Pre početka registrovanja spavanja, životinje su tokom 24 h adaptirane na kavez (kavez od pleksiglasa, dimenzija 30 x 30 x 30 cm) i kabl za registrovanje. Jednom nedeljno, tokom 4 nedelje u slučaju NB lezije, odnosno tokom 5 nedelja u slučaju PPT lezije, registrovano je 6 sati spavanja u toku fiziološki neaktivne cirkadijalne faze pacova (od 9 do 15 h). EEG i EMG analogni signali su nakon adekvatnog pojačanja (pojačivač sa 16 kanala, model 3600, A-M System Inc. Carlborg, SAD) i filtriranja (pojasni filter 0,3-100 Hz) digitalizovani frekvencijom od 256 uzoraka u sekundi. Akvizicija i digitalizacija signala je vršena korišćenjem *DataWave SciWorks Experimenter 8.0* akvizicionog softvera (Datawave Technologies, Longmont, SAD), a digitalizovani signali su sačuvani za kasniju analizu. Primer analognih signala u toku registracije spavanja dat je na **Slici 3.7**.



**Slika 3.7. Primer 10 s analognih EEG i EMG signala.** Prikaz EEG signala motorne (MCx) i senzomotorne (SMCx) kore i EMG signala vratnih mišića u toku registrovanja spavanja u trajanju od 10 s.



### 3.5. Histochemijska identifikacija i kvantifikacija NB i PPT lezija

Nakon završetka eksperimentalnog protokola registrovanja spavanja NB i PPT lezije su identifikovane NADPH – diaforaza histochemijskim bojenjem (Vincent i sar., 1983; Dawson i sar., 1991; Hope i sar., 1991; Sabbatini i sar., 1999; Paxinos i sar., 2009), a zatim i kvantifikovane prebrojavanjem NADPH – diaforaza pozitivnih ćelija.

Životinje su anestezirane ketamin/diazepam anestezijom (50 mg/kg, *i.p.*, Zoletil 50, Virbac, Francuska), a mozgovi transkardijalno perfundovani najpre fiziološkim rastvorom (200 ml 0,9 % NaCl, brzina perfuzije 40 ml/min), zatim 4 % paraformaldehidom (200 ml 4 % rastvor paraformaldehida u 0,1 M PBS-u; prvih 100 ml brzinom perfuzije 40 ml/min, a zatim 30 ml/min) i na kraju 10 % saharozom (200 ml 10 % rastvor saharoze u 0,1 M PBS-u; brzina perfuzije 30 ml/min). Po završetku perfuzije, pacovi su žrtvovani dekapitacijom, a mozgovi izolovani, očišćeni od krvnih sudova i moždanih ovojnica i postfiksirani u 4 % paraformaldehidu na temperaturi od +4 °C preko noći. Tkivo je potom dehidratirano u 30 % saharozu (30 % rastvor saharoze u 0,1 M PBS-u) tokom nekoliko dana na temperaturi od +4 °C.

Nakon dehidratacije, korišćenjem kriotoma (Leica) mozgovi su isečeni na poprečne preseke debljine 40 µm, u četiri serije (A-D), tako da je sečenje urađeno kroz čitavu antero-posteriornu dimeziju odgovarajućeg jedra (NB ili PPT). Preseci su direktno sa kriotoma sakupljeni u rastvor antifrizu (40 % rastvor etilen-glikola u 0,1 M kalijum-acetatu koji sadrži 1 % polivinilpirolidon (PVP40, Sigma Aldrich, Nemačka)) i tako čuvani na temperaturi od -20 °C do daljeg korišćenja.

Identifikacija deficita holinergičkih neurona vršena je NADPH – diaforaza histochemijskim bojenjem na nefiksiranim, slobodno plutajućim presecima (Vincent i sar., 1983; Dawson i sar., 1991; Hope i sar., 1991; Sabbatini i sar., 1999; Paxinos i sar., 2009). Preseci su najpre isprani 3 puta po 10 minuta u 0,1 M PBS-u (pH = 7,4), a zatim inkubirani u rastvoru za bojenje na 37 °C tokom 60 minuta. Osnovu rastvora za bojenje činio je supstratni rastvor koji je sadržao nitro blu tetrazolium hlorid (NBT, Serva, Nemačka) i 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat (BCIP, Serva, Nemačka) u supstratnom puferu pH = 9,5 (0,1 M Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). U supstratni rastvor je

potom dodata  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-Na-4 so ( $\beta$ -NADPH, Serva, Nemačka) i dimetil sulfoksid (DMSO, Sigma Aldrich, Nemačka). Kako bi se smanjila nespecifična reakcija tkiva usled prisustva endogene alkalne fosfataze, u rastvor je dodat i specifičan inhibitor – levamizol (Sigma Aldrich, Nemačka) u finalnoj koncentraciji od 2 mM (Bjelobaba i Šaponjić, 2013). Nakon inkubacije, preseći su još jednom isprani 3 puta po 10 minuta u 0,1 M PBS-u, postavljeni na mikroskopske pločice i ostavljeni da se osuše preko noći na sobnoj temperaturi. Sledećeg dana pločice sa presecima su stavljene u ksilol i nakon 24 h na preseke je stavljen DPX medijum (Sigma Aldrich, Nemačka) i postavljeno pokrovno staklo. Preseci su analizirani i slikani na mikroskopu Axio Observer Microscope Z1 (ZEISS, Nemačka).

Kvantifikacija holinergičkog deficita izazvanog NB i PPT lezijama vršena je na prethodno izabranim i slikanim presecima, u ImageJ 1.46 programu (NIH, SAD) i to sa ciljem procene oštećenja izazvanog lezijama, a ne utvrđivanja apsolutnog broja holinergičkih neurona. Stoga je prebrojavanje NADPH – diaforaza – pozitivnih neurona za svaku eksperimentalnu grupu urađeno na tri preseka po životinji, izabranih tako da pripadaju prethodno definisanim stereotaksičkim opsezima (Paxinos i Watson, 2005). U tu svrhu, čitava antero-posteriorna dimenzija NB, odnosno PPT jedra je podeljena na tri stereotaksička opsega izražena u mm posteriorno od bregme. Stereotaksički opsezi za NB jedro su bili: 1,00 – 1,30; 1,40 – 1,60; 1,70 – 1,90, a za PPT jedro: 6,90 – 7,40; 7,50 – 8,00; 8,10 – 8,60. Na svakom od preseka, NADPH – diaforaza – pozitivni neuroni su prebrojani za svaku stranu mozga posebno, da bi zatim za svaku eksperimentalnu grupu i u okviru svakog stereotaksičkog opsega, bila određena srednja vrednost broja holinergičkih neurona po strani mozga, kako kontrolnih, tako i lediranih mozgova (Petrović i sar., 2013a, 2014; Šaponjić i sar., 2013) .

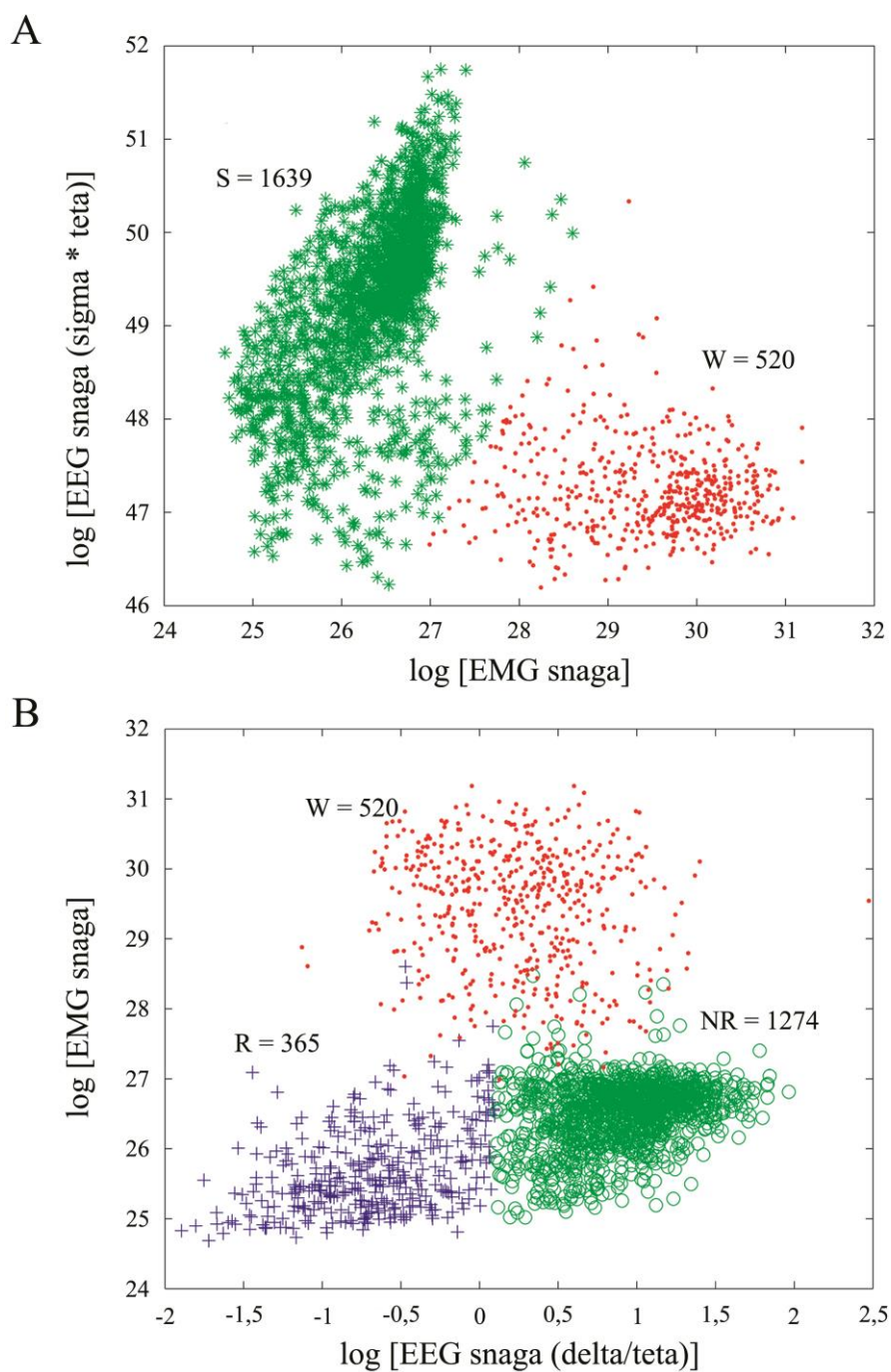
Kontrolne vrednosti apsolutnog broja holinergičkih neurona smatrane su kao 100 %, a holinergički deficit unilateralnih (desna, ledirana strana mozga) i bilateralnih (svaka strana mozga pojedinačno) lezija je izražen najpre kao procenat kontrolne vrednosti, a zatim kao razlika procenta NADPH – diaforaza – pozitivnih neurona lezije u odnosu na kontrolne vrednosti i to za svaki pojedinačni presek i svaki stereotaksički opseg u svakom lediranom mozgu. Na kraju je za svaku eksperimentalnu grupu

izračunata srednja vrednost razlike procenata kako bi se procenio stereotaksički opseg sa najvišim deficitom.

### 3.6. Analiza spavanja i EEG signala

Analiza spavanja i EEG signala urađena je u MATLAB 6.5 programu korišćenjem originalno razvijenog analiznog paketa (Petrović i sar., 2013a, 2013b, 2014; Šaponjić i sar., 2013). Analiza je obuhvatila sve snimljene signale fizioloških kontrola, lažnih NB i PPT lezija, kao i svih unilateralnih i bilateralnih NB i PPT lezija kod kojih je prethodno utvrđen holinergički deficit.

Na snimljene šestočasovne signale je najpre primenjena Furijeova transformacija (FFT). Nakon toga je svaka od 2160 Furijeovih epoha, dužine 10 s, na osnovu EEG i EMG karakteristika, bila diferencirana kao jedno od tri osnovna stanja: budnost, NREM ili REM faza spavanja. Na **Slici 3.8.** je prikazan tipičan primer grafika razdvajanja grupisanja epoha od 10 s budnosti, NREM i REM faza spavanja, koji je služio za razdvajanje svih osnovnih faza u toku 6 h spavanja. Diferenciranje faza spavanja je rađeno u dva koraka. Najpre su na osnovu proizvoda snaga sigma i teta frekventnog opsega na y-osi i ukupne snage EMG-a na x-osi (**Slika 3.8. A**) odvojene epohe koje pripadaju budnosti (visoka ukupna snaga EMG-a, niska vrednost proizvoda snaga sigma i teta frekventnog opsega) od epoha koje pripadaju spavanju (niska ukupna snaga EMG-a, visoka vrednost proizvoda snaga sigma i teta frekventnog opsega). U drugom koraku su epohe koje pripadaju spavanju dalje razdvojene na NREM i REM epohe (**Slika 3.8. B**) na osnovu količnika snaga delta i teta frekventnog opsega na x-osi i ukupne snage EMG-a na y-osi (niža ukupna snaga EMG-a i manji količnik snaga delta i teta frekventnog opsega – REM; viša ukupna snaga EMG-a i veći količnik snaga delta i teta frekventnog opsega – NREM). Epohe budnosti na finalnom grafiku razdvajanja grupisanja faza spavanja su prenešene iz prethodnog razdvajanja (**Slika 3.8. B**). Za samo razdvajanje grupisanja epoha faza spavanja je korišćen algoritam K-sredine za dva grupisanja, a u cilju boljeg razdvajanja vrednosti na x- i y-osi su logaritmovane.



**Slika 3.8. Primer grafika razdvajanja grupisanja faza budnosti i spavanja.** Razdvajanja grupisanja epoha od 10 s budnosti, NREM i REM faze spavanja tokom 6 h. (A) Razdvajanje epoha budnosti (W grupisanje, tačkice) i spavanja (S grupisanje, zvezdice); (B) razdvajanje NREM (NR grupisanje, kružići) i REM (R grupisanje, krstići) epoha. Svaki simbol predstavlja jednu epohu trajanja 10 s. Epohе budnosti na finalnom grafiku razdvajanja faza spavanja (B) su prenešene iz prethodnog razdvajanja budnosti i spavanja.

Za potrebe detaljnije analize poremećaja REM faze spavanja izazvanih bilateralnom PPT lezijom, grupisanje REM epoha je na osnovu snage EMG-a dodatno razdvojeno na dva podgrupisanja korišćenjem istog MATLAB 6.5 algoritma K-sredina za dva grupisanja. Na ovaj način su REM epohe dalje diferencirane kao REM bez atonije – REM1 (REM epohe sa većom snagom EMG-a) i REM sa atonijom – REM2 (REM epohe sa manjom snagom EMG-a).

Time je za svaku pojedinačnu životinju definisana arhitektura spavanja, odnosno dužina trajanja budnosti, NREM i REM, odnosno REM1 i REM2 faze spavanja, izražena kao ukupan broj epoha od 10 s svake faze spavanja u toku 6 h. Na kraju je za svaku eksperimentalnu grupu izračunata grupna srednja vrednost broja epoha na 6 h za svako stanje.

Analizom strukture prelaznih stanja definisan je broj svih tipova prelaza (budnost/NREM i NREM/budnost; budnost/REM i REM/budnost; NREM/REM i REM/NREM) u toku 6 h spavanja. Za potrebe ove analize, za svaku životinju i svaku eksperimentalnu grupu, diferenciranje budnosti, NREM i REM faze spavanja je urađeno na epohama dužine 5 s (Yan et al., 2011; Petrović i sar. 2013a, 2013b, 2014). Potom je 6 h spavanja, odnosno niz od 4230 Furijeovih epoha dužne 5 s definisanih kao jedno od tri osnovna stanja, preveden u jednodimenzionu matricu kodova 0-2 po sistemu: 0 – budnost, 1 – NREM, 2 – REM. Korišćenjem jednostavnog algoritma za prebrojavanje, za svakih sat vremena signala vršeno je prebrojavanje svih šest mogućih različitih parova kodova (0/1, 1/0, 0/2, 2/0, 1/2, 2/1), čime je zapravo određen broj svih tipova prelaza (0/1 – budnost/NREM, 1/0 – NREM/budnost itd.) po satu u toku 6 h spavanja (Petrović i sar., 2013a, 2013b, 2014).

U slučaju pacova kod kojih je REM faza spavanja dodatno diferencirana na REM1 i REM2 (Petrović i sar., 2014), broj svih tipova prelaza (budnost/NREM i NREM/budnost; budnost/REM i REM/budnost; budnost/REM1 i REM1/budnost; budnost/REM2 i REM2/budnost; NREM/REM i REM/NREM; NREM/REM1 i REM1/NREM; NREM/REM2 i REM2/NREM) je određen korišćenjem istog algoritma za prebrojavanje i jednodimenzione matrice sa dodatnim kodovima za ova dva stanja (3 – REM1 i 4 – REM2).

Na kraju je za svaku eksperimentalnu grupu struktura prelaznih stanja bila definisana kao grupna srednja vrednost broja prelaza po satu u toku 6 h spavanja (Petrović i sar., 2013a, 2013b, 2014).

Analiza EEG mikrostrukture, za svako od prethodno definisanih stanja (budnost, NREM, REM, REM1 i REM2 faza spavanja), je obuhvatila analizu promena amplituda svih konvencionalnih EEG frekventnih opsega ( $\delta = 0,3\text{--}4$  Hz;  $\theta = 4,1\text{--}8$  Hz;  $\sigma = 10,1\text{--}15$  Hz;  $\beta = 15,1\text{--}30$  Hz;  $\gamma = 30,1\text{--}50$  Hz). Kako bi se eliminisao uticaj individualnih variranja apsolutnih amplituda, za svaki od frekventnih opsega izračunate su relativne amplitude kao:

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

Potom je za svaku eksperimentalnu grupu i svaki frekventni opseg izračunata grupna gustina raspodele verovatnoće relativnih EEG amplituda budnosti, NREM, REM, REM1 i REM2 faze spavanja na 6 h korišćenjem PDE funkcije (eng. „Probability Density Estimation” – PDE) u MATLAB 6.5 programu. Zapravo, za potrebe PDE analize, za svaki frekventni opseg i svako stanje, relativne amplitude svih epoha od 10 s svih pacova koje pripadaju određenoj eksperimentalnoj grupi su objedinjene u jedinstveni ansambl za koji je potom izračunata grupna raspodela gustine verovatnoće.

Za statističku analizu grupne raspodele gustine verovatnoće relativnih amplituda svakog EEG frekventnog opsega na 6 h, izračunate su srednje vrednosti relativnih amplituda i to za budnost i NREM fazu spavanja na svakih 60 minuta, a za REM, REM1 i REM2 fazu spavanja na svakih 30 minuta (Petrović i sar., 2013a, 2013b, 2014; Šaponjić i sar., 2013).

Za potrebe dalje funkcionalne diferencijacije REM/REM1/REM2 grupisanih epoha od 10 s, izazvanih bilateralnom PPT lezijom, urađena je analiza kortiko-muskularnih koherencija (CMC) između EEG signala senzomotorne, odnosno motorne kore i EMG signala mišića dorzalne vratne muskulature. Vrednosti kortiko-muskularnih koherencija su dobijene korišćenjem „cohere” funkcije u MATLAB 6.5 programu (Jung i sar., 2012), koja zapravo predstavlja dopunu Pirsonovog koeficijenta korelacije u

frekventnom domenu i definiše se kao kros-spektralna gustina normalizovana auto-spektrum (Jung i sar., 2012). Drugim rečima, kortiko-muskularna koherencija računa koherenciju kvadriranog modula dva signala x (EEG) i y (EMG) kao:

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

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

Na ovaj način su za svakih 10 s šestočasovnih EEG i EMG signala izračunate CMC vrednosti za svaku pojedinačnu frekvenciju od 0,3-50 Hz, sa rezolucijom od 0,1 Hz, da bi zatim ove vrednosti bile usrednjene u okviru svakog konvencionalnog EEG frekventnog opsega i za svaku REM fazu (REM, REM1 i REM2) svake eksperimentalne grupe bile izračunate grupne srednje vrednosti koherencije na 30 minuta (Petrović i sar., 2014).

### 3.7. Statistička analiza podataka

Rezultati analize arhitekture spavanja su prikazani kao grupna srednja vrednost + standardna devijacija (SD), dok su rezultati analize strukture prelaznih stanja prikazani kao grupna srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SE). Za analizu statističke značajnosti korišćena je neparametarska jednofaktorska Kruskal-Wallis ANOVA sa *post-hoc* Mann-Whitney U testom. Za vrednosti  $p < 0,05$  razlike su smatrane statistički značajnim.

## **4. REZULTATI**

---



#### **4.1. Poremećaji spavanja u holinergičkoj denervaciji kore velikog mozga pacova ekscitotoksičnom lezijom glavnog izvora kortikalne holinergičke inervacije – lezija jedra *nucleus basalis* (NB)**

Efekat ekscitotoksične NB lezije na arhitekturu spavanja i EEG mikrostrukturu u toku spavanja je praćen tokom perioda od četiri nedelje (14, 21 i 28 dana nakon lezije), a za analizu su korišćeni EEG signali senzomotorne (SMCx) i motorne (MCx) kore velikog mozga pacova. Analiza je obuhvatila sledeće eksperimentalne grupe: fiziološka kontrola (n = 9), unilateralna NB lažna lezija (n = 4), bilateralna NB lažna lezija (n = 3), unilateralna NB lezija (n = 9), bilateralna NB lezija (n = 12).

##### **4.1.1. Histoheмиjska identifikacija i kvantifikacija NB lezije**

Za potrebe procene holinergičkog deficita izazvanog NB lezijom, najpre su određene kontrolne vrednosti broja NADPH – diaforaza – pozitivnih neurona. Obzirom da ni za jedan od tri stereotaksička opsega statistička analiza (neparameterska jednofaktorska Kruskal-Wallis ANOVA sa Mann-Whitney-U *post-hoc* testom) nije pokazala značajne razlike u broju holinergičkih neurona između jedne i druge strane mozga fizioloških kontrola i kontrolne strane unilateralnih NB lezija ( $\chi^2 \geq 0,12$ ;  $p \geq 0,54$ ), ove tri grupe su objedinjene i za svaki od stereotaksičkih opsega je izračunata srednja vrednost broja holinergičkih neurona. Kontrolne vrednosti apsolutnog broja holinergičkih neurona, smatrane kao 100 %, bile su:  $52,08 \pm 12,43$  (za stereotaksički opseg 1,00-1,30 mm),  $52,80 \pm 13,45$  (za stereotaksički opseg 1,40-1,60 mm) i  $56,27 \pm 14,76$  (za stereotaksički opseg 1,70-1,90 mm).

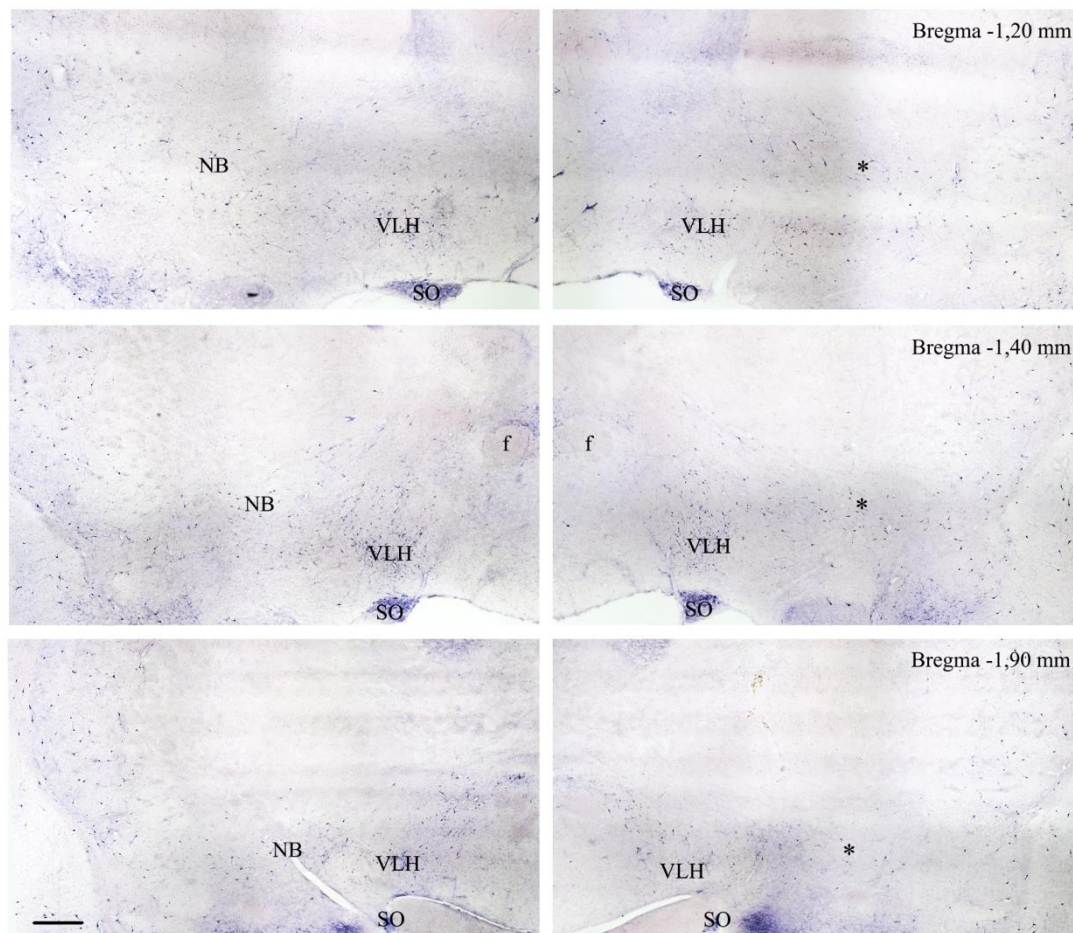
Kvantifikacija holinergičkog deficita nakon ekscitotoksične NB lezije, urađena na bazi broja NADPH – diaforaza pozitivnih neurona, je pokazala postojanje deficita holinergičkih neurona kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju NB jedra i kod unilateralnih i kod bilateralnih NB lezija.

Broj NADPH – diaforaza pozitivnih neurona unilateralnih NB lezija na svim stereotaksičkim koordinatama je bio statistički značajno manji u poređenju sa kontrolnim vrednostima ( $z \geq -2,88$ ;  $p \leq 0,04$ ), a maksimalni deficit holinergičkih

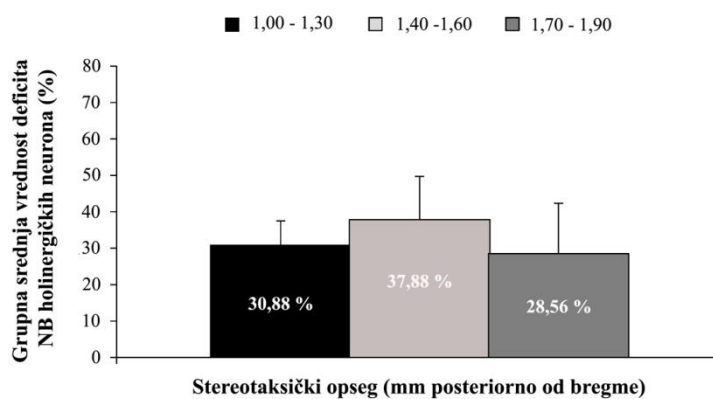
neurona od  $37,88 \pm 11,86$  % je bio u okviru stereotaksičkog opsega 1,40-1,60 mm posteriorno od bregme. Na **Slici 4.1.** prikazan je tipičan primer histološke identifikacije unilateralne NB lezije, kao i rezultati kvantifikacije deficita holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega.

Broj NADPH – diaforaza pozitivnih neurona svake strane mozga bilateralnih NB lezija na svim stereotaksičkim koordinatama je bio statistički značajno manji u poređenju sa kontrolnim vrednostima ( $z \geq -2,95$ ;  $p \leq 0,01$ ), a maksimalni deficit holinergičkih neurona od  $56,16 \pm 8,01$  % na jednoj, odnosno  $52,02 \pm 15,49$  % na drugoj strani mozga je bio u okviru stereotaksičkog opsega 1,70-1,90 mm posteriorno od bregme. Na **Slici 4.2.** prikazan je tipičan primer histološke identifikacije bilateralne NB lezije, kao i rezultati kvantifikacije deficita holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega.

A

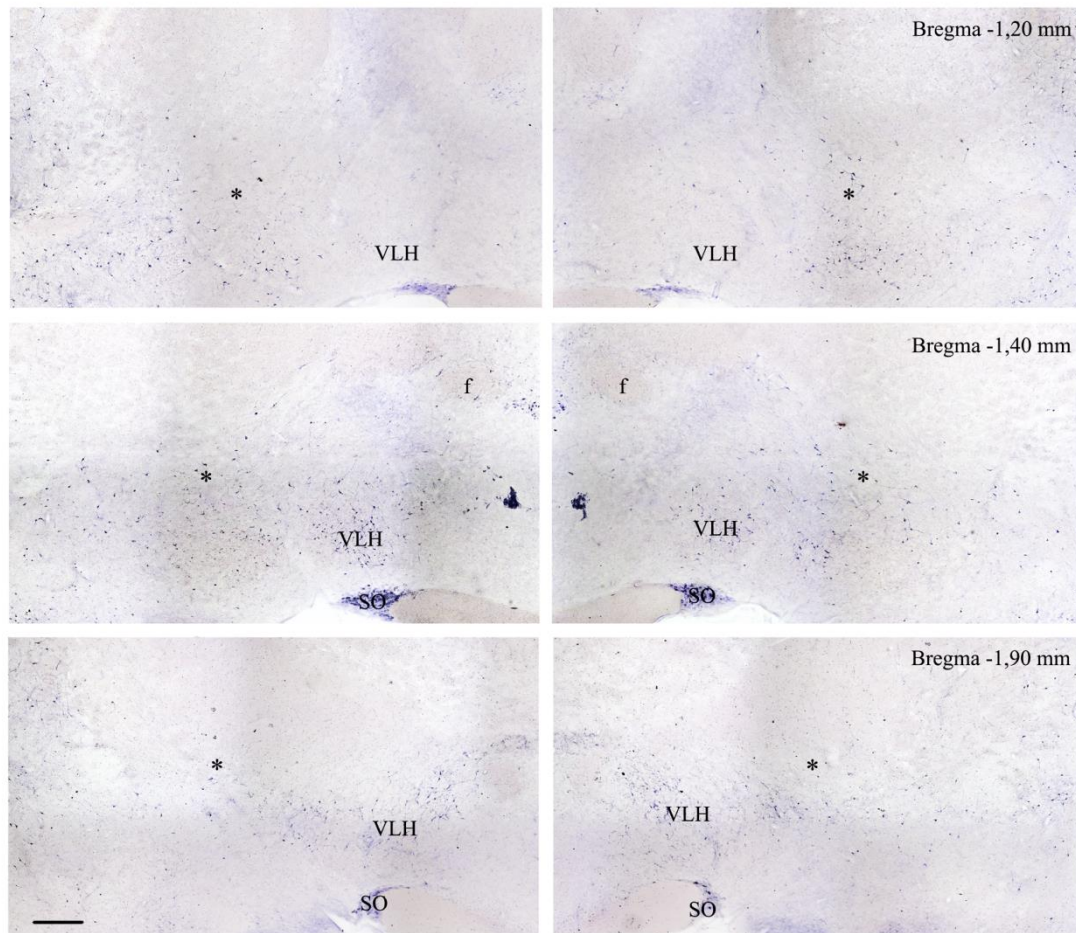


B

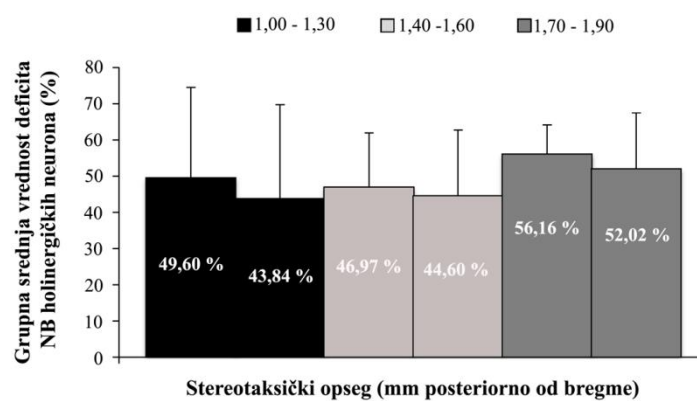


**Slika 4.1. Histološka identifikacija i kvantifikacija unilateralne NB lezije.** Tipičan primer identifikovane unilateralne NB lezije (A) i kvantifikacija deficita holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega u celokupnoj antero-posteriornoj dimenziji NB jedra, urađena na bazi broja NADPH – diaforaza pozitivno obojenih neurona (B). NB – *nucleus basalis*; crna zvezdica označava ledirani NB – *nucleus basalis*; VLH – *nucleus hypothalamicus ventrolateralis*; SO – *nucleus supraopticus*; f – fornix; Skala 200  $\mu$ m.

A



B



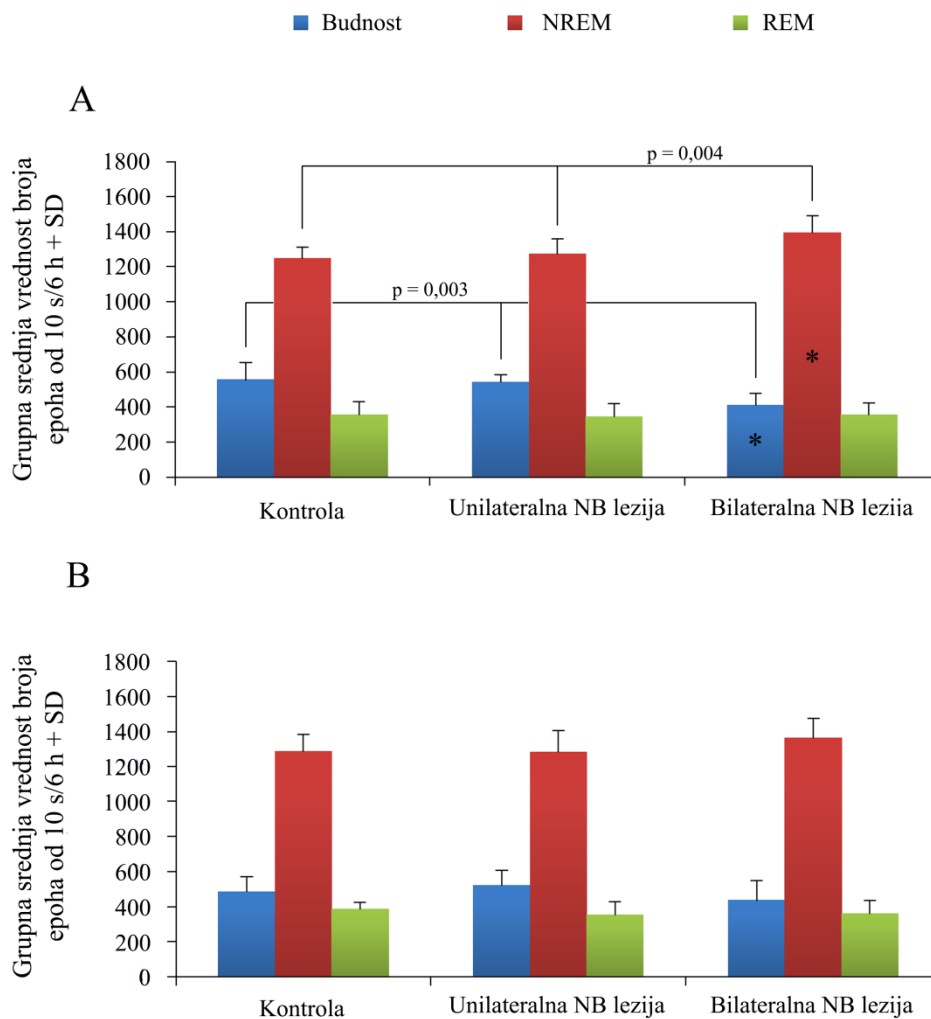
**Slika 4.2. Histološka identifikacija i kvantifikacija bilateralne NB lezije.** Tipičan primer identifikovane bilateralne NB lezije (A) i kvantifikacija deficita holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega u celokupnoj antero-posteriornoj dimenziji NB jedra, urađena na bazi broja NADPH – diaforaza pozitivno obojenih neurona (B). Crna zvezdica označava ledirani NB – *nucleus basalis*; VLH – *nucleus hypothalamicus ventrolateralis*; SO – *nucleus supraopticus*; f – *fornix*; Skala 200  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Arhitektura spavanja

Analiza arhitekture spavanja fiziološke kontrole, unilateralne i bilateralne NB lažne lezije, kao i unilateralne i bilateralne NB lezije, urađena na osnovu EEG signala senzomotorne kore, je pokazala da je samo bilateralna lezija izazvala promene u trajanju budnosti, NREM i REM faze spavanja (**Slika 4.3. A**). Dve nedelje nakon lezije, broj epoha budnosti u toku 6 h spavanja se smanjio ( $\chi^2 = 11,87$ ;  $p = 0,003$ ), a broj NREM epoha se povećao ( $\chi^2 = 11,06$ ;  $p = 0,004$ ) u poređenju sa fiziološkom kontrolom. Broj epoha REM faze spavanja nije bio promenjen ( $\chi^2 = 0,06$ ;  $p = 0,969$ ).

Statistička analiza nije pokazala značajne razlike u broju epoha budnosti, NREM i REM faze spavanja između: fiziološke kontrole i unilateralne lažne lezije ( $z \geq -1,70$ ;  $p \geq 0,089$ ); fiziološke kontrole i bilateralne lažne lezije ( $z \geq -1,23$ ;  $p \geq 0,221$ ); fiziološke kontrole i unilateralne lezije ( $z \geq -1,16$ ;  $p \geq 0,247$ ). Razlika u broju epoha budnosti, NREM i REM faze spavanja nije bilo ni između unilateralne lezije i unilateralne lažne lezije ( $z \geq -1,51$ ;  $p \geq 0,131$ ), kao ni između unilateralne lezije i bilateralne lažne lezije ( $z \geq -1,94$ ;  $p \geq 0,053$ ). Sa druge strane, bilateralna NB lezija je usloвила statistički značajno smanjenje broja epoha budnosti ( $z = -2,93$ ;  $p = 0,003$ ) i povećanje broja epoha NREM faze spavanja ( $z = -2,30$ ;  $p = 0,022$ ) u poređenju sa unilateralnom NB lezijom, kao i u poređenju sa fiziološkom kontrolom ( $z = -2,84$ ;  $p = 0,004$  za budnost;  $z = -3,02$ ;  $p = 0,003$  za NREM).

Kako analiza arhitekture spavanja nije pokazala razlike u dužini trajanja budnosti, NREM i REM faze spavanja između fiziološke kontrole i unilateralne ili bilateralne lažne lezije dve nedelje nakon lezije ( $z \geq -1,70$ ;  $p \geq 0,089$ ), rezultati efekta lezije u daljoj analizi su prikazani samo u odnosu na fiziološku kontrolu.

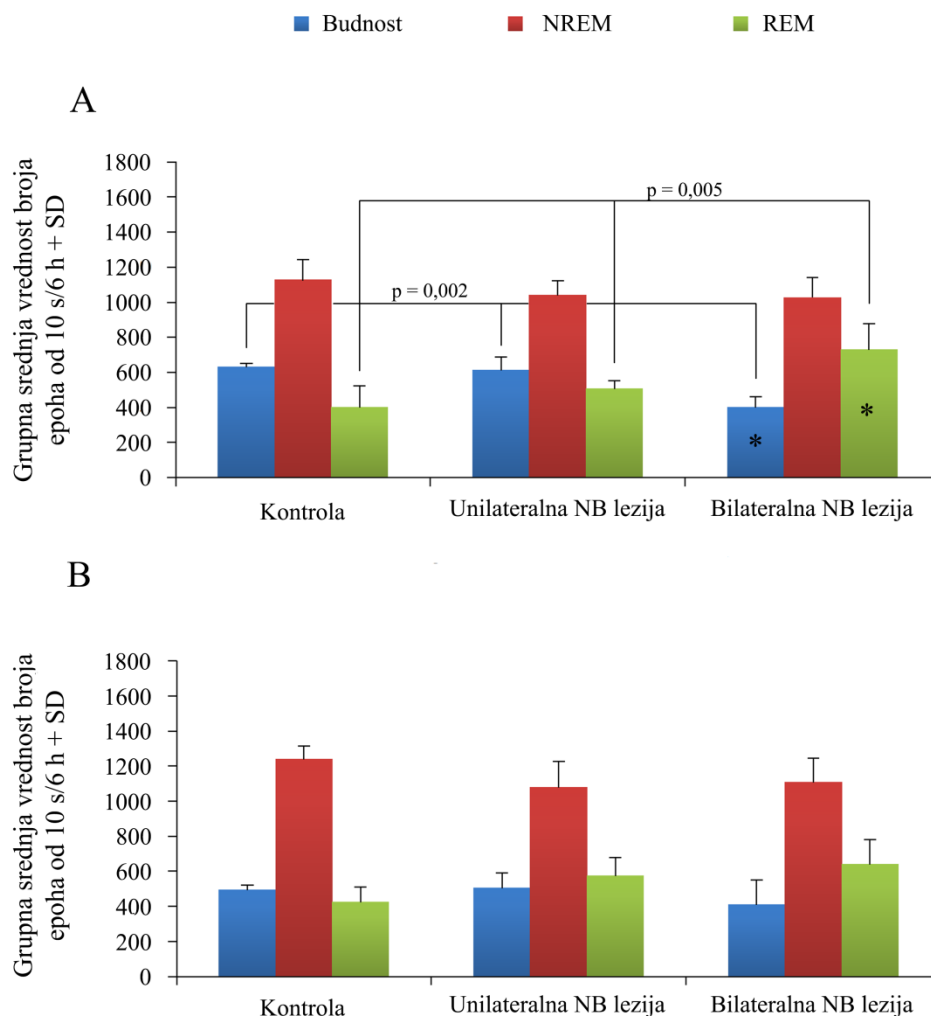


**Slika 4.3. Efekat NB lezije na arhitekturu spavanja u senzomotornoj kori.** Grupna srednja vrednost broja epoha od 10 s budnosti, NREM i REM faze spavanja u toku 6 h + standardna devijacija (SD) u senzomotornoj kori 14 dana (A) i 21 dan (B) nakon lezije.

Međutim, ova promena u arhitekturi spavanja dve nedelje nakon bilateralne lezije bila je prolaznog karaktera. Tri nedelje nakon bilateralne NB lezije trajanje budnosti, NREM i REM faze spavanja nije bilo različito u poređenju sa fiziološkom kontrolom (Slika 4.3. B,  $\chi^2 = 2,54$ ;  $p = 0,281$  za budnost;  $\chi^2 = 1,41$ ;  $p = 0,493$  za NREM;  $\chi^2 = 1,52$ ;  $p = 0,468$  za REM) i ovakva arhitektura spavanja se održala i četiri nedelje nakon lezije ( $\chi^2 = 1,23$ ;  $p = 0,542$  za budnost;  $\chi^2 = 0,51$ ;  $p = 0,774$  za NREM;  $\chi^2 = 4,87$ ;  $p = 0,088$  za REM; podaci nisu prikazani).

Analiza arhitekture spavanja na osnovu EEG signala motorne kore je takođe pokazala da je samo bilateralna lezija izazvala promene u trajanju budnosti, NREM i REM faze spavanja (**Slika 4.4. A**). Kao i u slučaju senzomotorne kore, dve nedelje nakon lezije broj epoha budnosti u toku 6 h spavanja se smanjio ( $\chi^2 = 12,07$ ;  $p = 0,002$ ). Međutim, za razliku od senzomotorne kore, gde je smanjenje broja epoha budnosti bilo praćeno povećanjem broja NREM epoha, u motornoj kori je dve nedelje nakon bilateralne lezije došlo do povećanja broja REM epoha ( $\chi^2 = 10,78$ ;  $p = 0,005$ ).

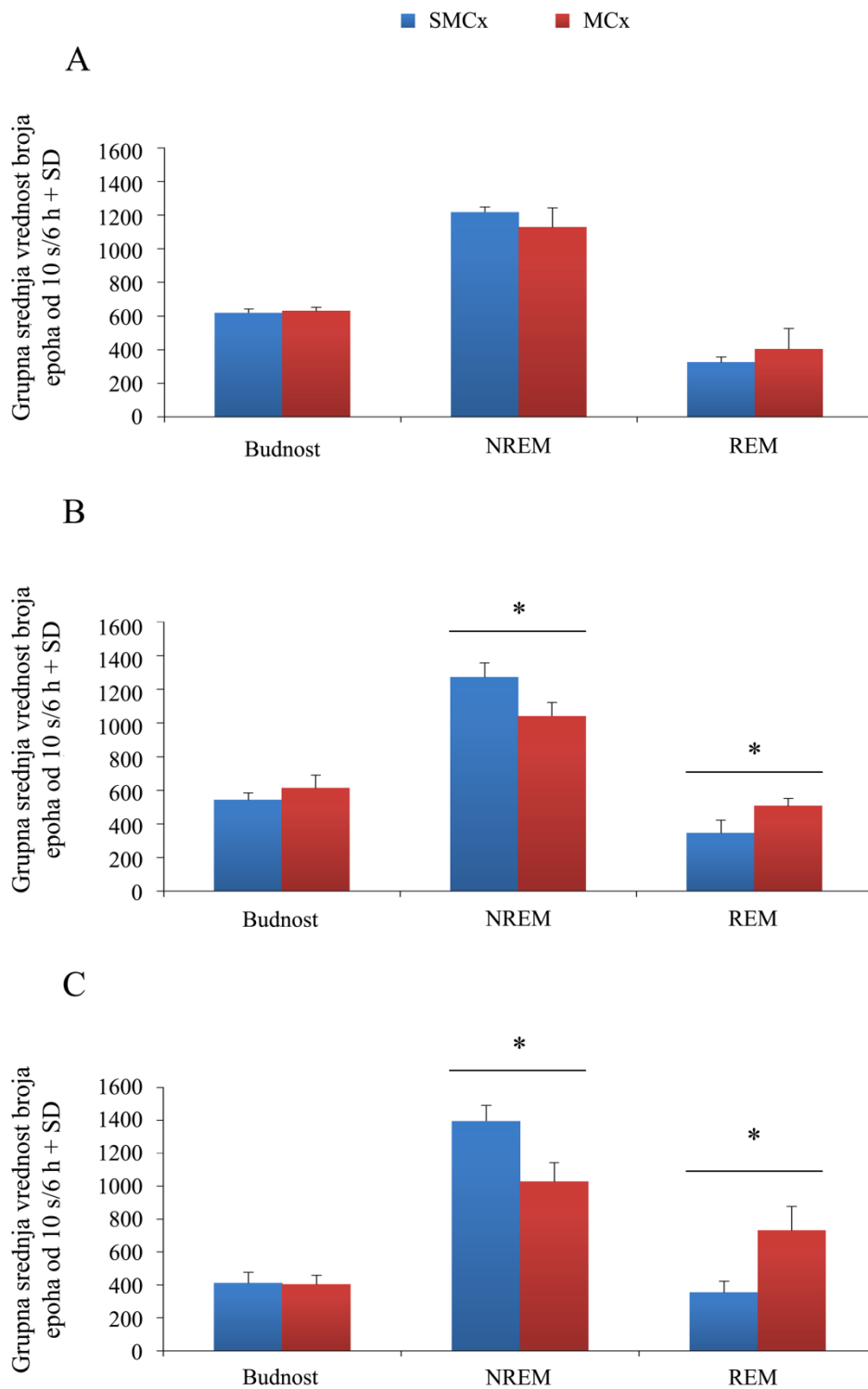
Tri nedelje nakon lezije, arhitektura spavanja bilateralno lediranih pacova se nije razlikovala od arhitekture spavanja fizioloških kontrola (**Slika 4.4. B**,  $\chi^2 = 1,31$ ;  $p = 0,518$  za budnost;  $\chi^2 = 3,93$ ;  $p = 0,140$  za NREM;  $\chi^2 = 5,87$ ;  $p = 0,053$  za REM) i ovakva arhitektura spavanja se održala i četiri nedelje nakon lezije ( $\chi^2 = 1,77$ ;  $p = 0,413$  za budnost;  $\chi^2 = 0,004$ ;  $p = 0,998$  za NREM;  $\chi^2 = 1,98$ ;  $p = 0,371$  za REM; podaci nisu prikazani).



**Slika 4.4. Efekat NB lezije na arhitekturu spavanja u motornoj kori.** Grupna srednja vrednost broja epoha od 10 s budnosti, NREM i REM faze spavanja u toku 6 h + standardna devijacija (SD) u motornoj kori 14 dana (A) i 21 dan (B) nakon lezije.

Topografska analiza arhitekture spavanja (poređenje dužine trajanja budnosti, NREM i REM faze spavanja, diferenciranih na osnovu EEG signala senzomotorne u odnosu na motornu koru) nije pokazala statistički značajne razlike između senzomotorne i motorne kore fizioloških kontrola ( $z \geq -0,44$ ;  $p \geq 0,114$ ). Međutim, za razliku od fizioloških kontrola, kod unilateralnih i kod bilateralnih NB lezija pokazano je postojanje topografski različite arhitekture spavanja dve nedelje nakon lezije (Slika 4.5): u senzomotornoj kori je detektovan statistički značajno veći broj NREM epoha ( $z = -2,68$ ;  $p = 0,007$  za unilateralnu NB leziju;  $z = -3,10$ ;  $p = 0,002$  za bilateralnu NB leziju) dok je u motonoj kori detektovan veći broj REM epoha ( $z = -2,52$ ;  $p = 0,012$  za unilateralnu NB leziju;  $z = -3,10$ ;  $p = 0,002$  za bilateralnu NB leziju).





**Slika 4.5. Topografija arhitekture spavanja 14 dana nakon NB lezije.** Grupna srednja vrednost broja epoha od 10 s budnosti, NREM i REM faze spavanja u toku 6 h + standardna devijacija (SD) u motornoj (MCx) i senzomotornoj kori (SMCx) u fiziološkoj kontroli (A) i 14 dana nakon unilateralne (B) i bilateralne NB lezije (C). \* statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,012$ .

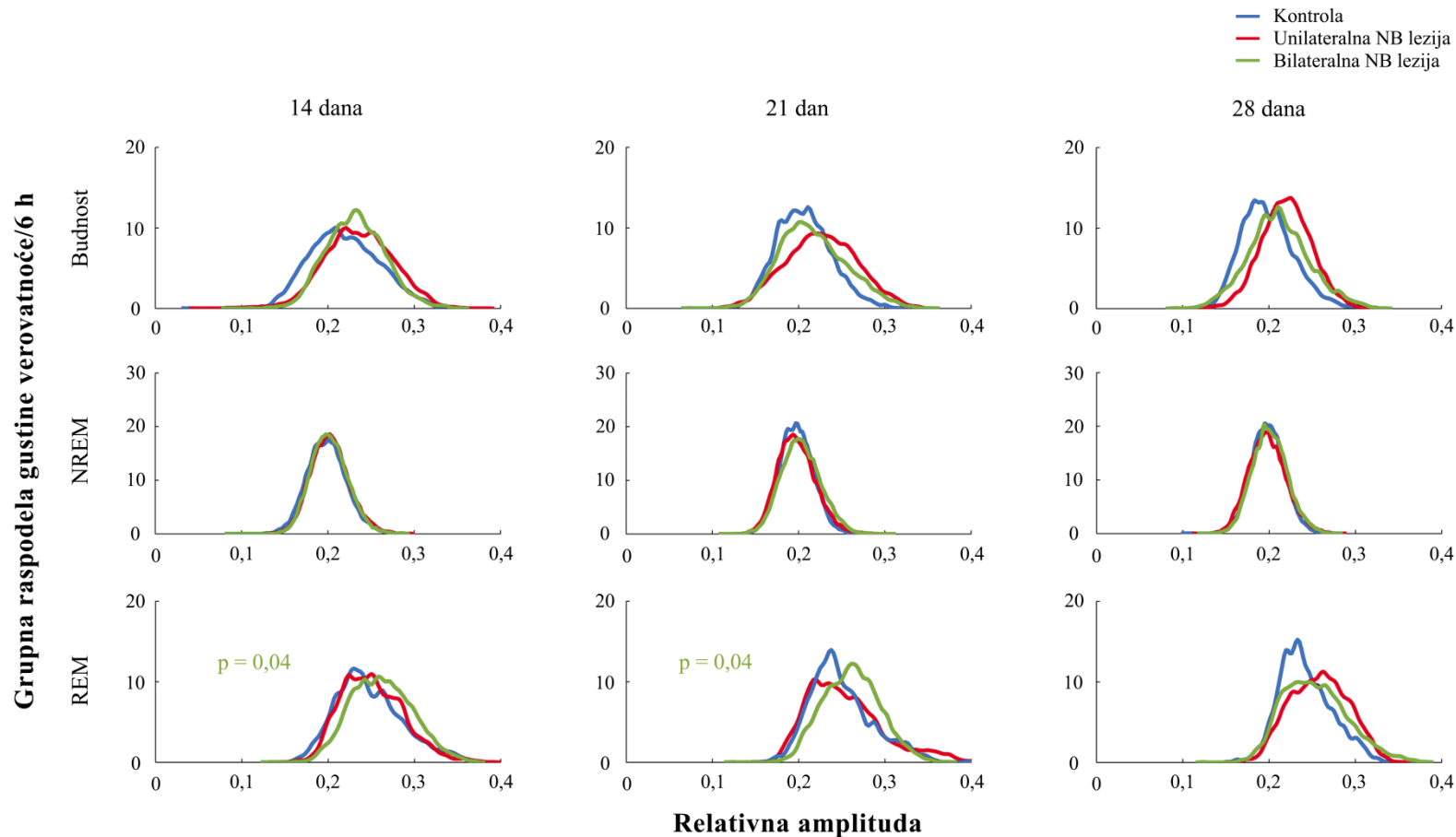
### 4.1.3. EEG mikrostruktura spavanja

Za potrebe dalje analize efekta NB lezije na EEG mikrostrukturu budnosti i spavanja, praćena je promena relativnih amplituda svih EEG frekventnih oblasti u toku budnosti, NREM i REM faze spavanja. Za svaku eksperimentalnu grupu (fiziološka kontrola, unilateralna NB lezija, bilateralna NB lezija) i za svako od prethodno definisanih stanja (budnost, NREM, REM), relativne EEG amplitude su prikazane kao grupne raspodele gustine verovatnoće odgovarajućih frekventnih opsega.

Poređenje relativnih amplituda svih frekventnih opsega budnosti i NREM faze spavanja, definisanih na osnovu EEG signala senzomotorne kore, nije pokazalo statistički značajne razlike između unilateralne i bilateralne lezije i fiziološke kontrole dve nedelje nakon lezije ( $\chi^2 \geq 3,27$ ;  $p \geq 0,09$  za budnost;  $\chi^2 \geq 0,66$ ;  $p \geq 0,06$  za NREM). Sa druge strane, u toku REM faze spavanja došlo je do porasta teta relativne amplitude (**Slika 4.6.**, leva kolona;  $\chi^2 = 6,67$ ;  $p = 0,04$ ), pri čemu je ova promena bila najveća i dostigla statističku značajnost samo u slučaju bilateralne lezije ( $z = -2,31$ ;  $p = 0,02$  u odnosu na fiziološku kontrolu;  $z = -2,01$ ;  $p = 0,03$  u odnosu na unilateralnu leziju).

Tri nedelje nakon bilateralne NB lezije, REM teta relativna amplituda je i dalje bila povećana (**Slika 4.6.**, srednja kolona;  $\chi^2 = 6,72$ ;  $p = 0,04$ ) i u odnosu na fiziološku kontrolu ( $z = -2,20$ ;  $p = 0,03$ ) i u odnosu na unilateralnu leziju ( $z = -2,02$ ;  $p = 0,04$ ). Ovo povećanje teta relativne amplitude u toku REM faze spavanja, bilo je praćeno smanjenjem delta relativne amplitude u toku budnosti ( $\chi^2 = 7,95$   $p = 0,02$ ; podaci nisu prikazani), podjednako posle unilateralne i posle bilateralne NB lezije ( $z = -1,67$ ;  $p = 0,10$ ). NREM EEG mikrostruktura nije bila promenjena ( $\chi^2 \geq 1,52$ ;  $p \geq 0,06$ ).

Četiri nedelje nakon bilateralne NB lezije REM teta relativna amplituda se vratila na kontrolnu vrednost (**Slika 4.6.**, desna kolona;  $\chi^2 = 4,95$ ;  $p = 0,08$ ), dok je delta relativna amplituda budnosti i dalje bila smanjenja ( $\chi^2 = 6,47$ ;  $p = 0,04$ ; podaci nisu prikazani).

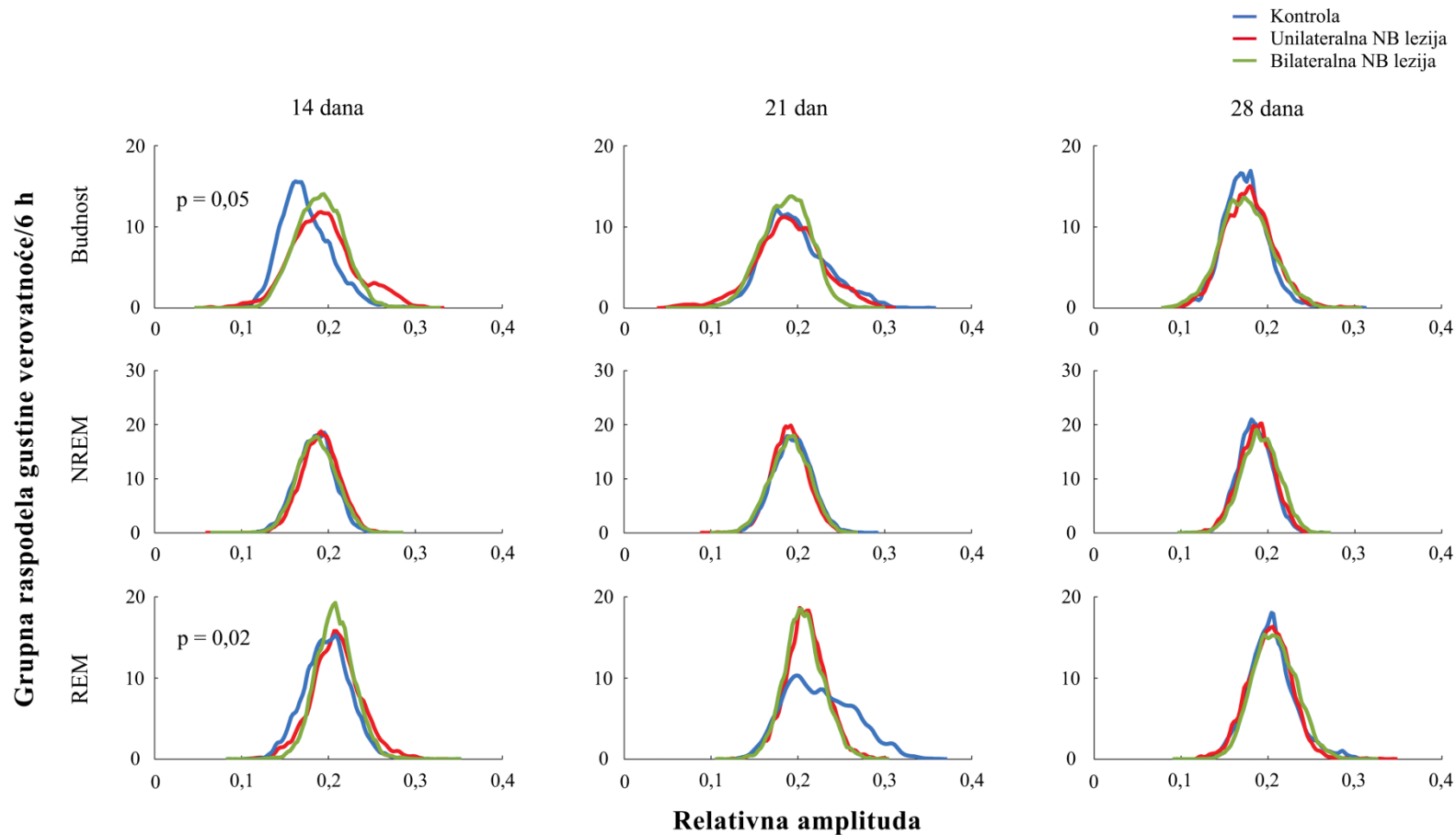


**Slika 4.6. Efekat NB lezije na EEG teta amplitudu u senzomotornoj kori od 14 do 28 dana nakon lezije.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG teta amplitude senzomotorne kore/6 h u toku budnosti (gornji red), NREM (srednji red) i REM faze spavanja (donji red) nakon unilateralne (crvena linija,  $n = 9$ ) i bilateralne NB lezije (zelena linija,  $n = 12$ ) u odnosu na fiziološku kontrolu (plava linija,  $n = 8$ ).  $p$  – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada je kontrastni Mann-Whitney U test odgovarajuće eksperimentalne grupe doprineo značajnosti.

Analiza EEG mikrostrukture budnosti, NREM i REM faze spavanja na osnovu EEG signala motorne kore je pokazala topografski različit efekat NB lezije (**Slika 4.7.**). Za razliku od senzomotorne kore, gde je dve nedelje nakon NB lezije samo bilateralna lezija usloвила povećanje REM teta relativne amplitude (**Slika 4.6.**, leva kolona), u motornoj kori su obe lezije, unilateralna i bilateralna NB lezija, uslovile povećanje teta relativne amplitude, u toku budnosti (**Slika 4.7.**, leva kolona;  $\chi^2 = 6,18$ ;  $p = 0,05$ ;  $z \geq -2,31$ ;  $p \leq 0,04$ ) i u toku REM faze spavanja (**Slika 4.7.**, leva kolona;  $\chi^2 = 7,62$ ;  $p = 0,02$ ;  $z \geq -2,62$ ;  $p \leq 0,02$ ). NREM teta relativna amplituda nije bila promenjena (**Slika 4.7.**, leva kolona;  $\chi^2 = 1,77$ ;  $p = 0,41$ ).

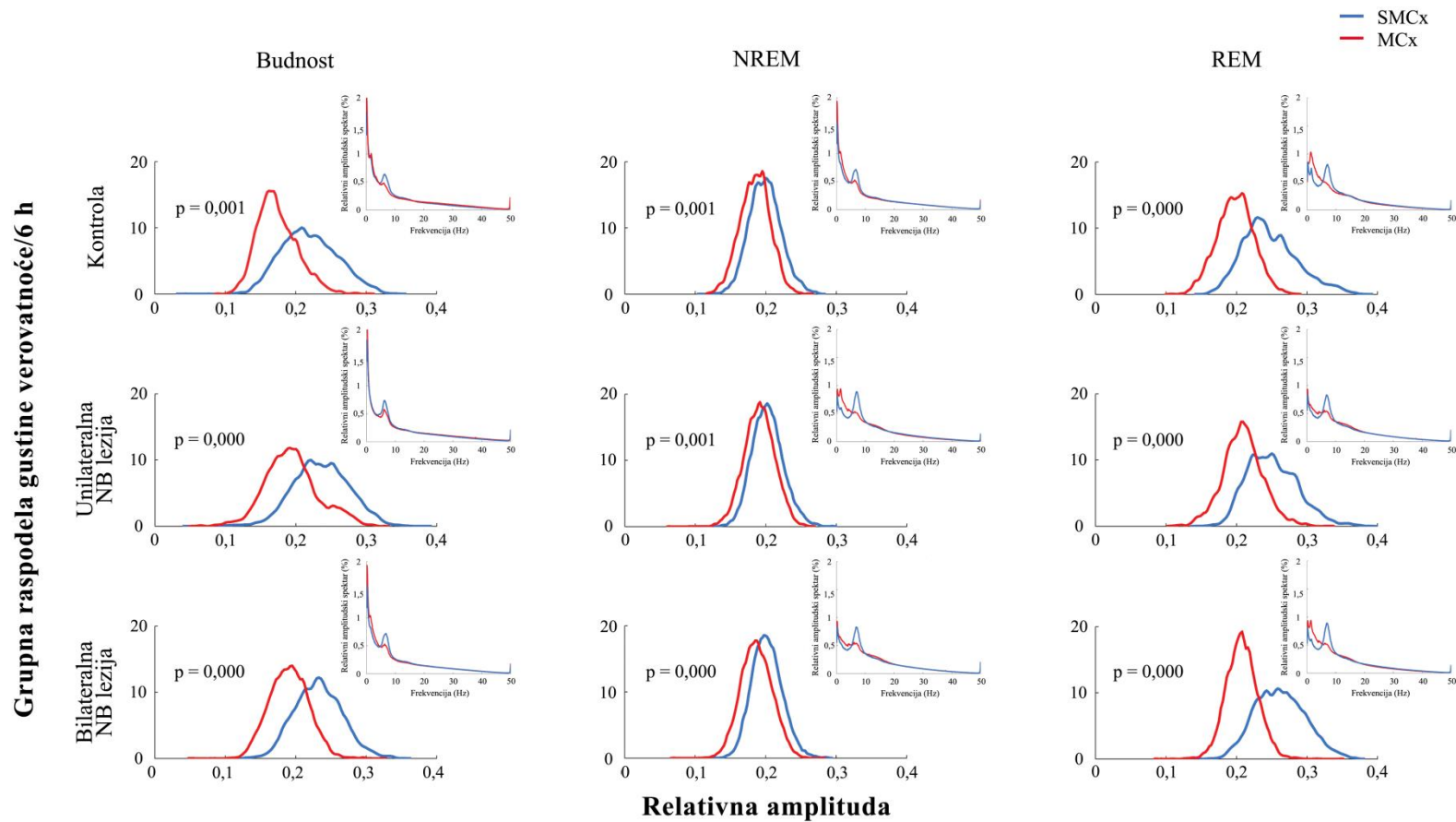
Tri nedelje nakon lezije (**Slika 4.7.**, srednja kolona), relativne teta amplitude budnosti i REM faze spavanja su se vratile na kontrolne vrednosti ( $\chi^2 = 1,34$ ;  $p = 0,51$  za relativnu teta amplitudu budnosti;  $\chi^2 = 4,64$ ;  $p = 0,10$  za REM relativnu teta amplitudu). Istovremeno, REM delta relativna amplituda se povećala i to samo nakon bilateralne NB lezije ( $\chi^2 = 18,09$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z = -3,16$ ;  $p = 0,002$  u odnosu na fiziološku kontrolu; podaci nisu prikazani).

Četiri nedelje nakon NB lezije sve razlike u EEG mikrostrukтури između lezija i fiziološke kontrole su se izgubile. REM delta relativna amplituda, kao i teta relativne amplitude budnosti i REM faze spavanja su bile na kontrolnim vrednostima (**Slika 4.7.**, desna kolona;  $\chi^2 = 0,61$ ;  $p = 0,74$  za teta amplitudu budnosti;  $\chi^2 = 0,66$ ;  $p = 0,72$  za REM delta amplitudu;  $\chi^2 = 1,83$ ;  $p = 0,40$  za REM teta amplitudu; podaci nisu prikazani).



**Slika 4.7. Efekat NB lezije na EEG teta amplitudu u motornoj kori od 14 do 28 dana nakon lezije.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG teta amplitude/6 h motorne kore u toku budnosti (gornji red), NREM (srednji red) i REM faze spavanja (donji red) nakon unilateralne (crvena linija,  $n = 7$ ) i bilateralne NB lezije (zeleno linija,  $n = 10$ ) u odnosu na fiziološku kontrolu (plava linija,  $n = 5$ ). **p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada su oba kontrastna Mann-Whitney U testa doprinela značajnosti.

Poređenje relativne EEG teta amplitude senzomotorne i motorne kore u toku budnosti, NREM i REM faze spavanja kod fizioloških kontrola, kao i kod unilateralnih i bilateralnih NB lezija, je pokazalo postojanje topografije relativne teta amplitude koja je nezavisna od stanja (**Slika 4.8.**). Naime, kod sve tri eksperimentalne grupe je relativna teta amplituda budnosti, NREM i REM faze spavanja bila veća u senzomotornoj nego u motornoj kori ( $z \geq -5,85$ ;  $p \leq 0,001$ ).



**Slika 4.8. Topografija EEG teta amplitude 14 dana nakon NB lezije.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG teta amplitude/6 h senzomotorne (SMCx) i motorne kore (MCx) u toku budnosti, NREM i REM faze spavanja u fiziološkoj kontroli (gornji red) i 14 dana nakon unilateralne (srednji red) i bilateralne NB lezije (donji red) sa odgovarajućim grupnim relativnim EEG amplitudskim spektrima; **p** – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.

## **4.2. Poremećaji spavanja u holinergičkoj denervaciji kore velikog mozga pacova ekscitotoksičnom lezijom glavnog izvora talamo-kortikalne inervacije – lezija jedra *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT)**

Efekat ekscitotoksične PPT lezije na arhitekturu spavanja, strukturu prelaznih stanja i EEG mikrostrukturu je praćen tokom perioda od pet nedelja (14, 21, 28 i 35 dana nakon lezije), a za analizu su korišćeni EEG signali senzomotorne kore velikog mozga pacova. Analiza je obuhvatila sledeće eksperimentalne grupe: fiziološka kontrola (n = 8), unilateralna PPT lažna lezija (n = 8), bilateralna PPT lažna lezija (n = 5), unilateralna PPT lezija (n = 7), bilateralna PPT lezija (n = 7).

### **4.2.1. Histoheмиjska identifikacija i kvantifikacija PPT lezije**

Za potrebe procene holinergičkog deficita izazvanog PPT lezijom, najpre su određene kontrolne vrednosti broja NADPH – diaforaza – pozitivnih neurona. Obzirom da ni za jedan od tri stereotaksička opsega statistička analiza (neparameterska jednofaktorska Kruskal-Wallis ANOVA sa Mann-Whitney-U *post-hoc* testom) nije pokazala značajne razlike u broju holinergičkih neurona između jedne i druge strane mozga fizioloških kontrola i kontrolne strane unilateralnih PPT lezija ( $\chi^2 \geq 1,16$ ;  $p \geq 0,25$ ), ove tri grupe su objedinjene i za svaki od stereotaksičkih opsega je izračunata srednja vrednost broja holinergičkih neurona. Kontrolne vrednosti apsolutnog broja holinergičkih neurona, smatrane kao 100 %, su bile:  $54,83 \pm 9,40$  (za stereotaksički opseg 6,90-7,40 mm),  $75,44 \pm 12,60$  (za stereotaksički opseg 7,50-8,00 mm) i  $89,29 \pm 15,32$  (za stereotaksički opseg 8,10-8,60 mm).

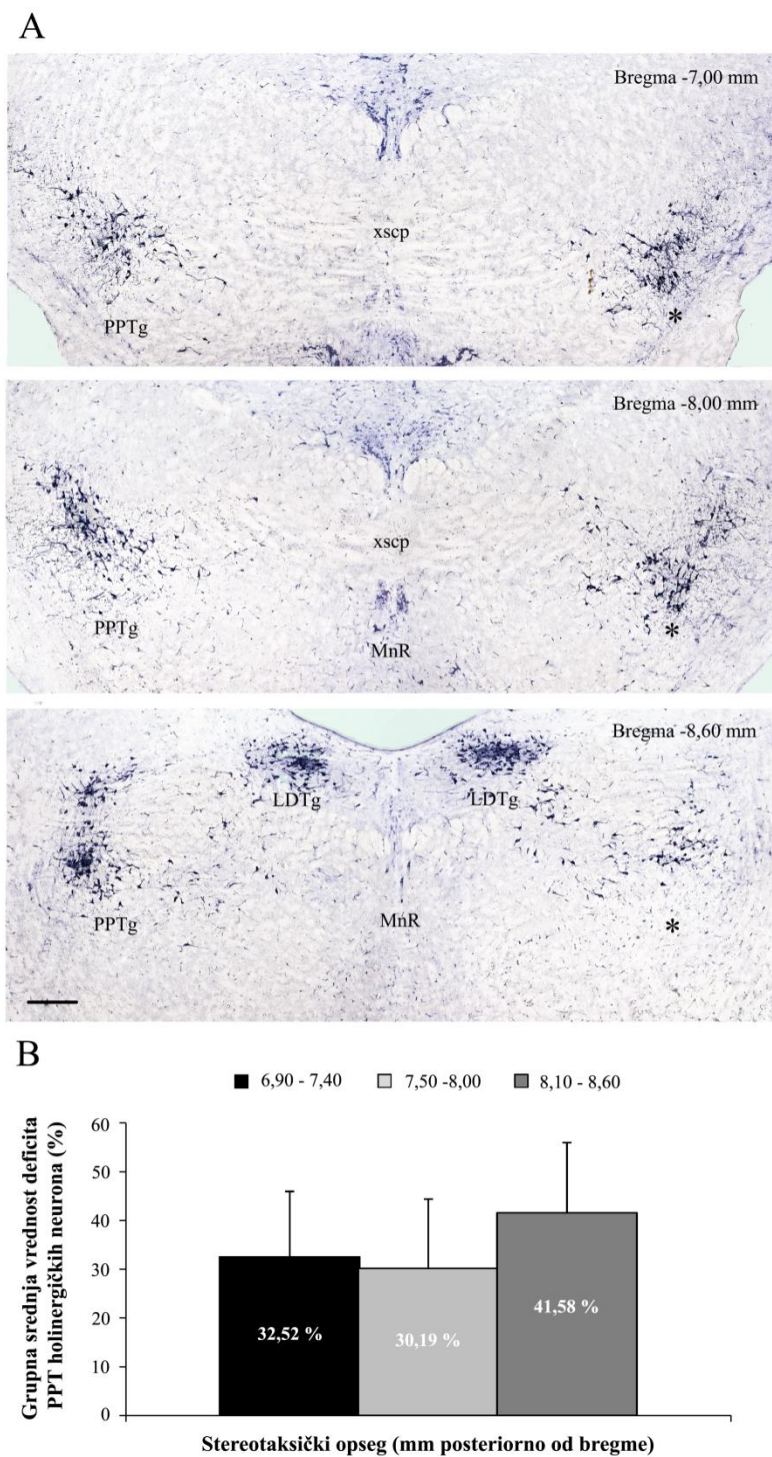
Kvantifikacija holinergičkog deficita nakon ekscitotoksične PPT lezije, urađena na bazi broja NADPH – diaforaza pozitivno obojenih neurona, je pokazala postojanje deficita kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra i kod unilateralnih i kod bilateralnih PPT lezija.

Broj NADPH – diaforaza pozitivnih neurona unilateralnih PPT lezija na svim stereotaksičkim koordinatama je bio statistički značajno manji u poređenju sa kontrolnim vrednostima ( $z \geq -3,43$ ;  $p \leq 0,002$ ), a maksimalni deficit holinergičkih neurona od  $41,58 \pm 14,42\%$  je bio u okviru stereotaksičkog opsega 8,10-8,60 mm

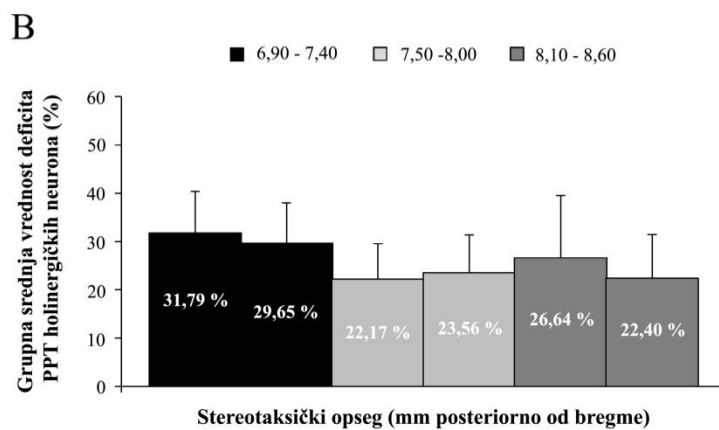
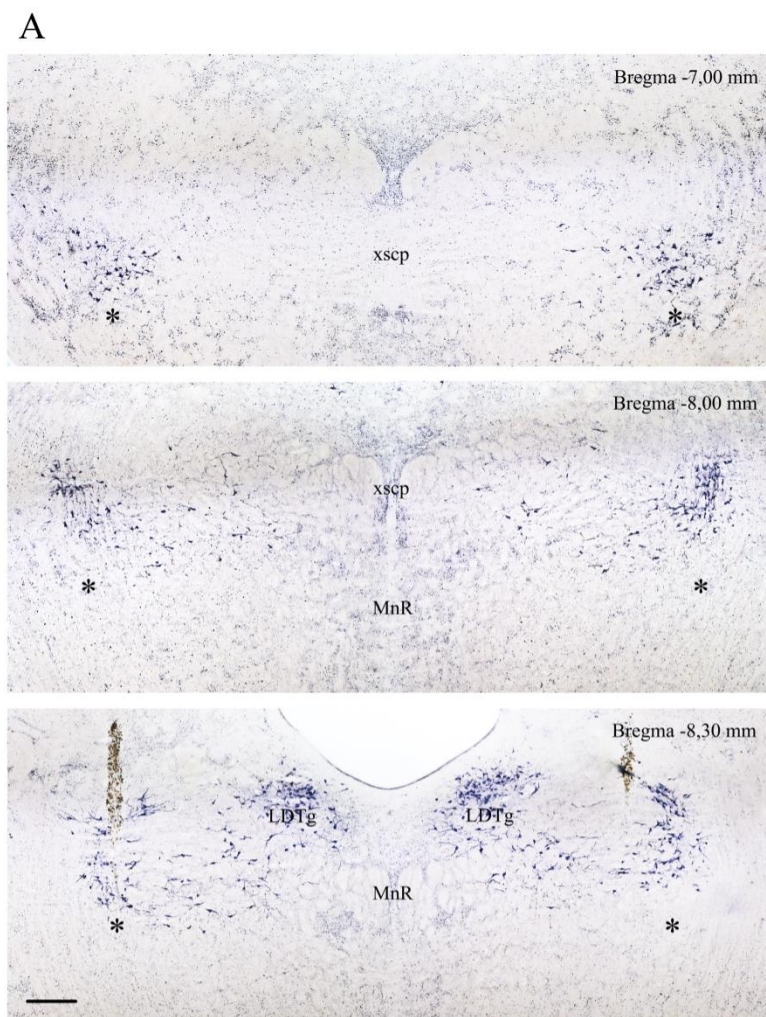


posteriorno od bregme. Na **Slici 4.9.** prikazan je tipičan primer histološke identifikacije unilateralne PPT lezije, kao i rezultati kvantifikacije deficita holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega.

Broj NADPH – diaforaza pozitivno obojenih neurona svake strane mozga bilateralnih PPT lezija na svim stereotaksičkim koordinatama je bio statistički značajno manji u poređenju sa kontrolnim vrednostima ( $z \geq -3,52$ ;  $p \leq 0,005$ ), a maksimalni deficit holinergičkih neurona od  $31,79 \pm 8,61$  % na jednoj, odnosno  $29,65 \pm 8,35$  % na drugoj strani mozga je bio u okviru stereotaksičkog opsega 6,90-7,40 mm posteriorno od bregme. Na **Slici 4.10.** prikazan je tipičan primer histološke identifikacije bilateralne PPT lezije, kao i rezultati kvantifikacije deficita holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega.



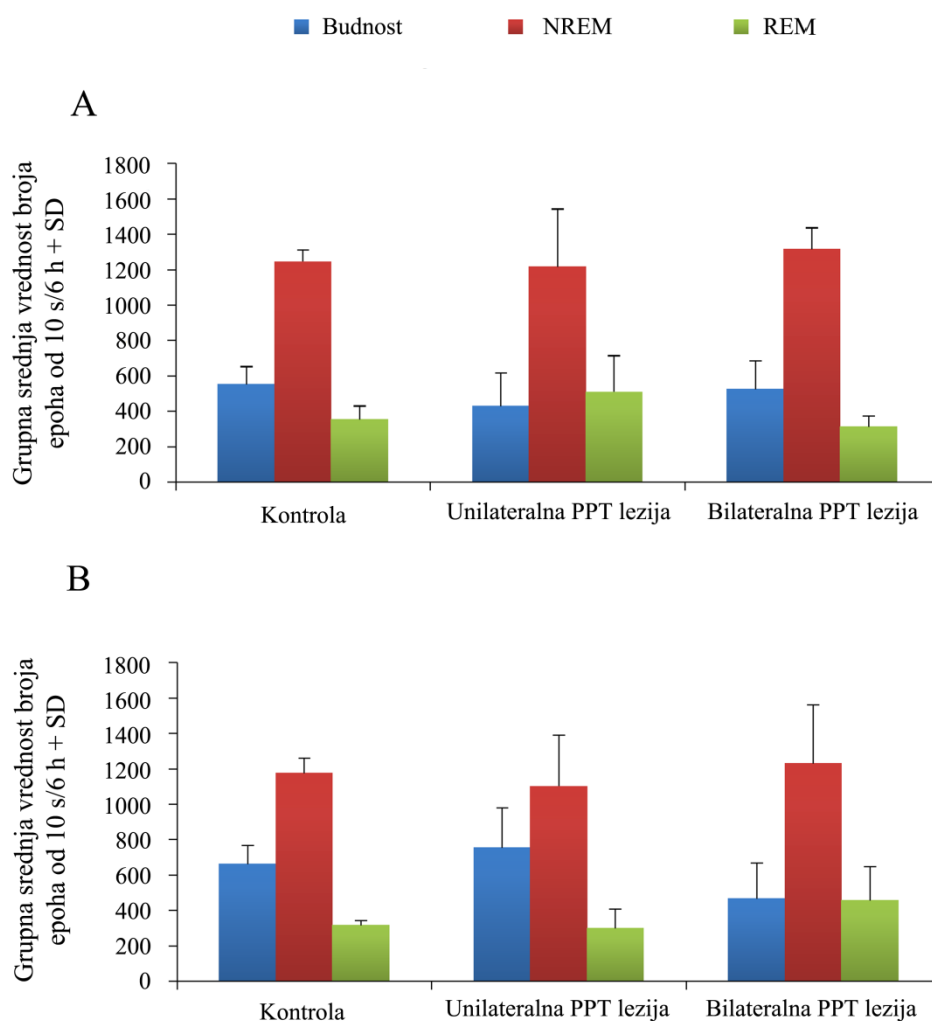
**Slika 4.9. Histološka identifikacija i kvantifikacija unilateralne PPT lezije.** Tipičan primer identifikovane unilateralne PPT lezije (A) i kvantifikacija deficita holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega u PPT jedru, urađena na bazi broja NADPH – diaforaza pozitivno obojenih neurona (B). PPTg – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; crna zvezdica označava ledirani PPTg; LDTg – *nucleus tegmentum laterodorsalis*; xscp – *decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum*; MnR – *nucleus raphe medianus*. Skala 200  $\mu$ m.



**Slika 4.10. Histološka identifikacija i kvantifikacija bilateralne PPT lezije.** Tipičan primer identifikovane bilateralne PPT lezije (**A**) i kvantifikacija deficita holinergičkih neurona u tri stereotaksička opsega u PPT jedru, urađena na bazi broja NADPH – diaforaza pozitivno obojenih neurona (**B**). Crna zvezdica označava ledirani PPTg – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LDTg – *nucleus tegmentum laterodorsalis*; xscp – *decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum*; MnR – *nucleus raphe medianus*. Skala 200  $\mu$ m.

#### 4.2.2. Arhitektura spavanja i struktura prelaznih stanja

Tokom perioda od 5 nedelja, koliko je praćen efekat unilateralne i bilateralne PPT lezije, nije bilo promena u arhitekturi spavanja (**Slika 4.11. A, B**;  $\chi^2 \geq 0,78$ ;  $p \geq 0,17$  za budnost;  $\chi^2 \geq 0,73$ ;  $p \geq 0,34$  za NREM fazu spavanja;  $\chi^2 \geq 0,72$ ;  $p \geq 0,08$  za REM fazu spavanja).

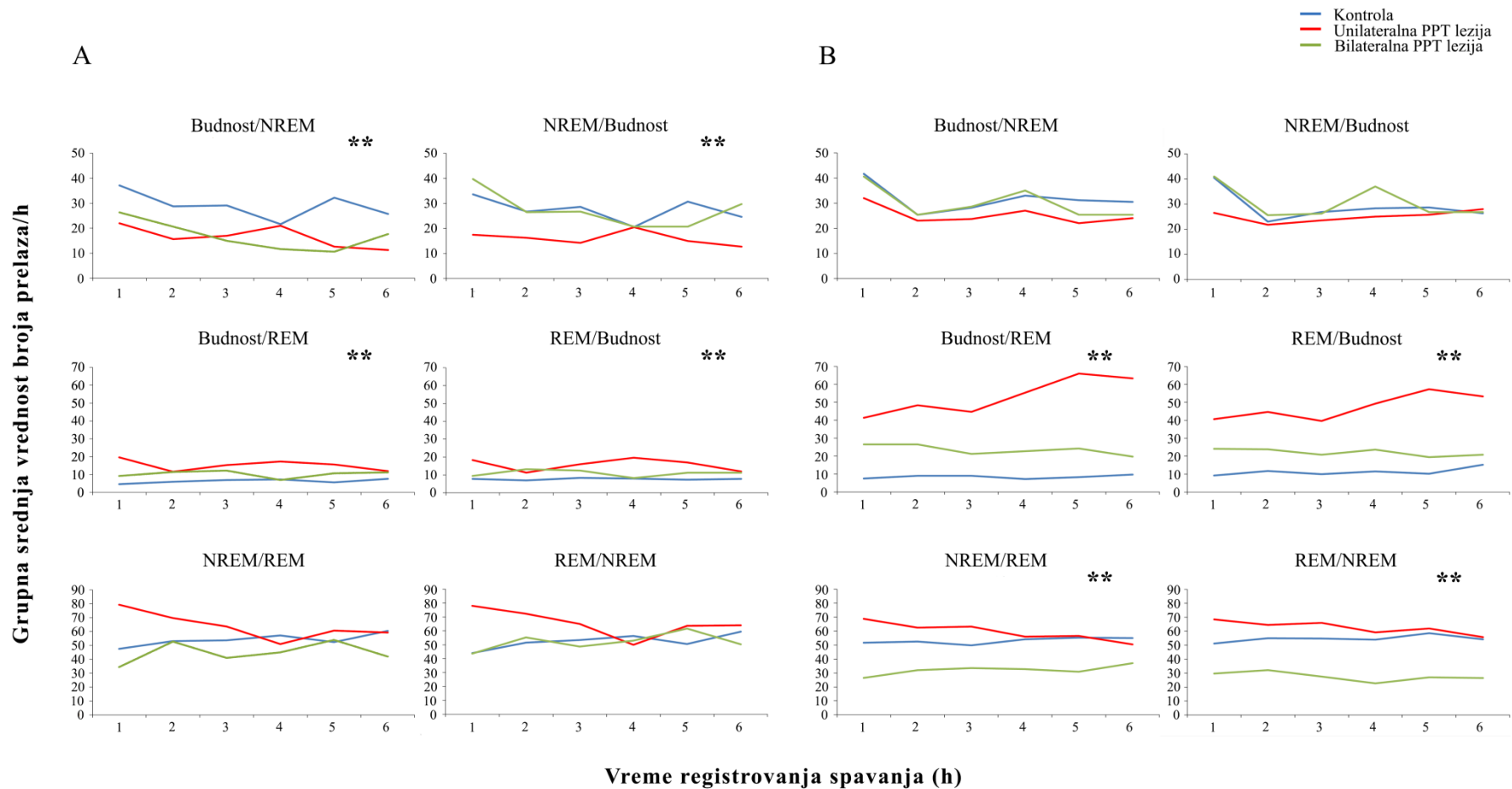


**Slika 4.11. Efekat PPT lezije na arhitekturu spavanja u senzomotornoj kori.** Grupna srednja vrednost broja epoha od 10 s budnosti, NREM i REM faze spavanja u toku 6 h + standardna devijacija (SD) u senzomotornoj kori 14 dana (**A**) i 35 dana (**B**) nakon lezije.

Kako analiza arhitekture spavanja nije pokazala razlike u dužini trajanja budnosti, NREM i REM faze spavanja između fiziološke kontrole i unilateralne ili bilateralne

lažne lezije ni u jednom vremenskom periodu (od 14 do 35 dana nakon operativne procedure) ( $\chi^2 \geq 2,36$ ;  $p \geq 0,19$  za budnost;  $\chi^2 \geq 1,26$ ;  $p \geq 0,22$  za NREM fazu spavanja;  $\chi^2 \geq 1,33$ ;  $p \geq 0,51$  za REM fazu spavanja), rezultati efekta PPT lezije u daljoj analizi su prikazani samo u odnosu na fiziološku kontrolu.

U toku perioda od 5 nedelja unilateralna i bilateralna PPT lezija su izazvale promene u strukturi prelaznih stanja (**Slika 4.12.**, **Tabela 4.1.**) iako nisu promenile arhitekturu spavanja. Najtipičnija i najdugotrajnija promena koja se održala tokom čitavog perioda od 5 nedelja, jeste povećanje broja budnost/REM i REM/budnost prelaza podjednako i nakon unilateralne i nakon bilateralne PPT lezije.



**Slika 4.12. Efekat PPT lezije na strukturu prelaznih stanja u toku spavanja u senzomotornoj kori.** Grupna srednja vrednost broja svih prelaza merenih na sat vremena u toku 6 h spavanja 14 dana (A) i 35 dana (B) nakon unilateralne (crvena linija) i bilateralne PPT lezije (zeleno linija) u odnosu na fiziološku kontrolu (plava linija). \*\*  $p \leq 10^{-4}$ .

Na samom početku, dve nedelje nakon PPT lezije (**Tabela 4.1.**, **Slika 4.12. A**), broj prelaza budnost/NREM se smanjio, jednako i posle unilateralne i posle bilateralne PPT lezije ( $\chi^2 = 20,47$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z \geq -3,64$ ;  $p = 10^{-4}$ ), dok se broj prelaza NREM/budnost smanjio samo nakon unilateralne PPT lezije ( $\chi^2 = 19,01$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z = -4,20$ ;  $p = 10^{-4}$ ). Istovremeno, broj prelaza budnost/REM i REM/budnost se povećao nakon obe lezije ( $\chi^2 \geq 18,05$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z \geq -4,03$ ;  $p \leq 0,01$ ).

Tri nedelje nakon PPT lezije (**Tabela 4.1.**) broj prelaza budnost/NREM i NREM/budnost se vratio na kontrolne vrednosti ( $\chi^2 \geq 0,45$ ;  $p \geq 0,69$ ). Istovremeno, porast broja prelaza budnost/REM i REM/budnost nakon obe lezije ( $\chi^2 \geq 30,69$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z \geq -5,48$ ;  $p \leq 0,004$ ) je dodatno bio praćen porastom broja prelaza NREM/REM i REM/NREM i u unilateralnoj i bilateralnoj leziji ( $\chi^2 \geq 7,53$ ;  $p \leq 0,02$ ;  $z \geq -2,89$ ;  $p \leq 0,03$ ).

Četiri nedelje nakon PPT lezije (**Tabela 4.1.**) broja prelaza budnost/REM i REM/budnost je i dalje bio povećan nakon obe lezije ( $\chi^2 \geq 45,56$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z \geq -5,13$ ;  $p = 10^{-4}$ ) i praćen smanjenjem broja prelaza NREM/REM i REM/NREM samo nakon bilateralne PPT lezije ( $\chi^2 \geq 24,53$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z \geq -6,03$ ;  $p = 10^{-4}$ ).

Pet nedelja nakon PPT lezije (**Tabela 4.1.**, **Slika 4.12. B**) povećanje broja prelaza budnost/REM i REM/budnost izazvano i unilateralnom i bilateralnom lezijom se i dalje održalo ( $\chi^2 \geq 39,62$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z \geq -5,50$ ;  $p \leq 0,001$ ), zajedno sa smanjenjem broja prelaza NREM/REM i REM/NREM samo nakon bilateralne lezije ( $\chi^2 \geq 27,07$ ;  $p = 10^{-4}$ ;  $z \geq -5,33$ ;  $p = 10^{-4}$ ).

**Tabela 4.1. Efekat PPT lezije na strukturu prelaznih stanja u toku spavanja u senzomotornoj kori.** Grupna srednja vrednost broja svih prelaza merenih na sat vremena u toku 6 h spavanja  $\pm$  standardna greška (SE) od 14 do 35 dana nakon lezije. \* statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,03$ .

	<b>Budnost/NREM</b>	<b>NREM/Budnost</b>	<b>Budnost/REM</b>	<b>REM/Budnost</b>	<b>NREM/REM</b>	<b>REM/NREM</b>
<b>14 dana</b>						
Kontrola	29,10 $\pm$ 1,82	27,50 $\pm$ 1,75	6,39 $\pm$ 0,72	7,73 $\pm$ 0,52	54,07 $\pm$ 3,41	52,55 $\pm$ 3,25
Unilateralna PPT lezija	<b>16,61 <math>\pm</math> 1,89 *</b>	<b>16,04 <math>\pm</math> 1,31 *</b>	<b>15,28 <math>\pm</math> 1,61 *</b>	<b>15,72 <math>\pm</math> 1,68 *</b>	63,94 $\pm$ 5,76	65,50 $\pm$ 6,41
Bilateralna PPT lezija	<b>17,00 <math>\pm</math> 2,00 *</b>	27,38 $\pm$ 2,77	<b>10,33 <math>\pm</math> 0,97 *</b>	<b>11,00 <math>\pm</math> 0,94 *</b>	44,88 $\pm$ 4,45	52,11 $\pm$ 5,99
<b>21 dan</b>						
Kontrola	31,53 $\pm$ 2,43	29,07 $\pm$ 2,49	6,04 $\pm$ 0,68	9,73 $\pm$ 0,71	45,73 $\pm$ 3,24	43,40 $\pm$ 3,31
Unilateralna PPT lezija	28,89 $\pm$ 3,10	29,17 $\pm$ 3,00	<b>32,33 <math>\pm</math> 3,30 *</b>	<b>29,96 <math>\pm</math> 2,78 *</b>	<b>58,83 <math>\pm</math> 4,65 *</b>	<b>60,87 <math>\pm</math> 4,71 *</b>
Bilateralna PPT lezija	29,11 $\pm$ 2,94	26,17 $\pm$ 2,27	<b>17,11 <math>\pm</math> 2,65 *</b>	<b>18,28 <math>\pm</math> 2,49 *</b>	<b>64,04 <math>\pm</math> 6,00 *</b>	<b>65,13 <math>\pm</math> 6,84 *</b>
<b>28 dana</b>						
Kontrola	25,08 $\pm$ 2,55	24,50 $\pm$ 2,40	5,83 $\pm$ 0,76	7,22 $\pm$ 0,84	56,57 $\pm$ 2,61	55,67 $\pm$ 2,82
Unilateralna PPT lezija	25,78 $\pm$ 3,15	25,54 $\pm$ 2,49	<b>54,50 <math>\pm</math> 3,88 *</b>	<b>48,67 <math>\pm</math> 3,38 *</b>	61,75 $\pm$ 6,04	65,96 $\pm$ 6,17
Bilateralna PPT lezija	23,03 $\pm$ 1,73	24,71 $\pm$ 2,19	<b>12,38 <math>\pm</math> 1,09 *</b>	<b>13,19 <math>\pm</math> 0,96 *</b>	<b>36,07 <math>\pm</math> 2,66 *</b>	<b>27,22 <math>\pm</math> 1,74 *</b>
<b>35 dana</b>						
Kontrola	31,64 $\pm$ 1,51	28,94 $\pm$ 1,53	8,46 $\pm$ 0,82	11,33 $\pm$ 0,85	53,08 $\pm$ 2,90	54,63 $\pm$ 3,38
Unilateralna PPT lezija	25,28 $\pm$ 2,11	25,08 $\pm$ 2,25	<b>53,17 <math>\pm</math> 3,47 *</b>	<b>47,50 <math>\pm</math> 3,20 *</b>	59,58 $\pm$ 6,08	62,67 $\pm$ 6,37
Bilateralna PPT lezija	30,07 $\pm$ 2,85	30,57 $\pm$ 2,76	<b>23,50 <math>\pm</math> 3,39 *</b>	<b>22,14 <math>\pm</math> 2,12 *</b>	<b>32,10 <math>\pm</math> 2,30 *</b>	<b>28,31 <math>\pm</math> 1,90 *</b>

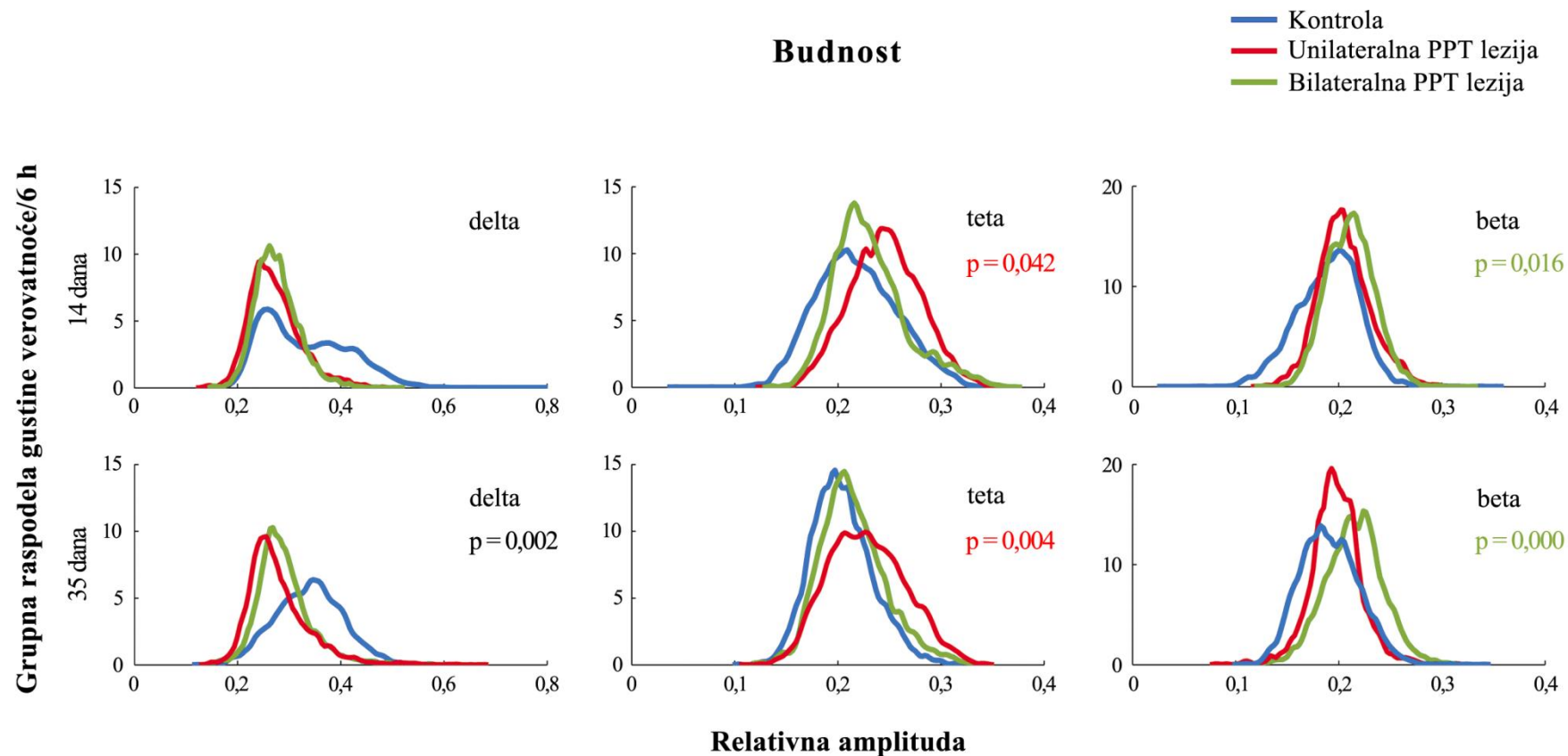


### 4.2.3. EEG mikrostruktura spavanja

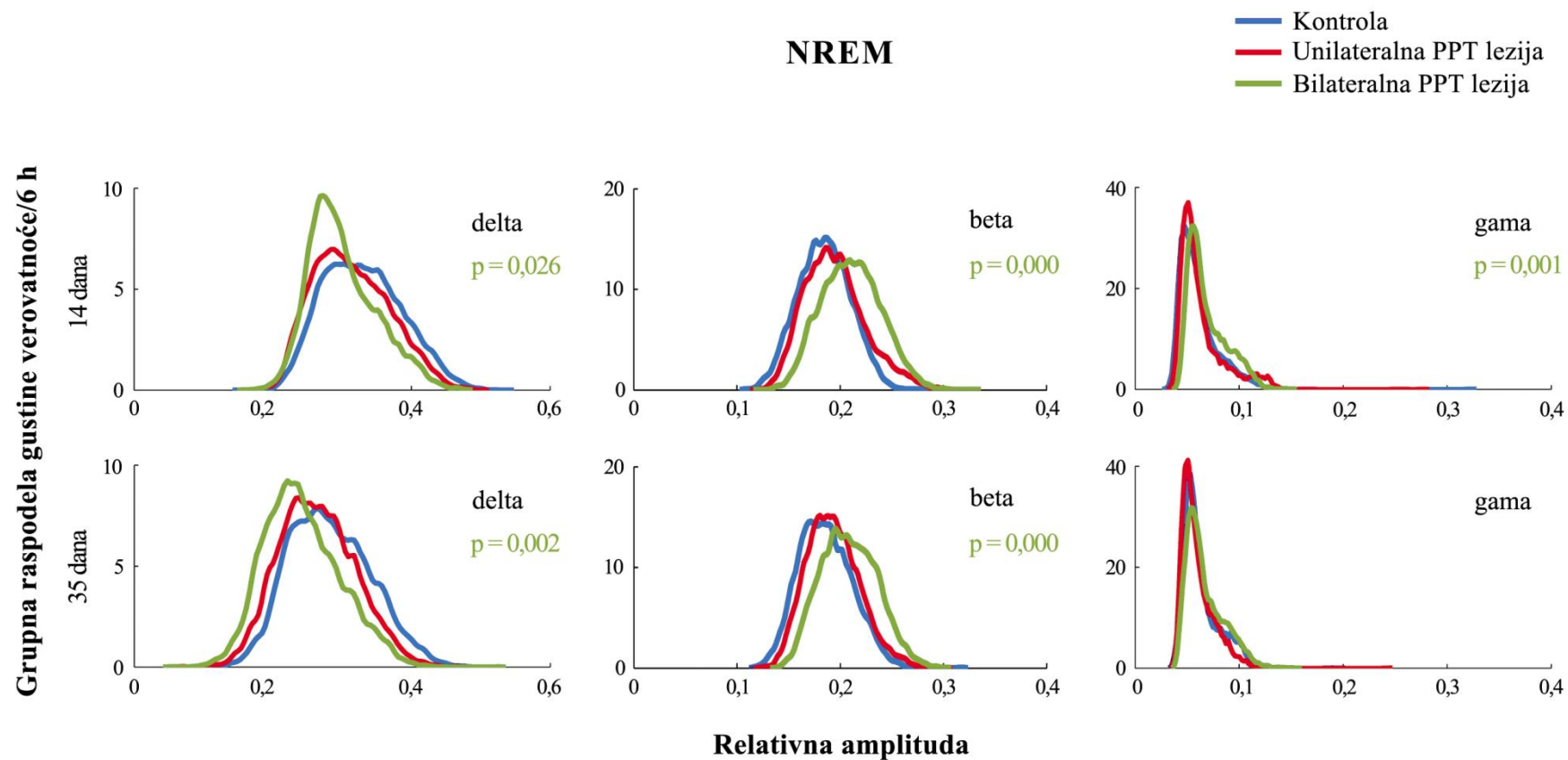
PPT lezija je izazvala značajne promene EEG mikrostrukture budnosti, NREM i REM faze spavanja. Ove promene, generalno izražene kao povećanje amplitude viših frekventnih opsega (beta i gama amplitude) i smanjenje amplitude nižih frekventnih opsega (delta amplituda), odnosno kao povećana aktivacija kore velikog mozga tokom svih faza budnosti i spavanja, su trajale pet nedelja.

Na samom početku, dve nedelje nakon PPT lezije, unilateralna lezija je izazvala povećanje relativne teta amplitude u budnosti (**Slika 4.13.**,  $\chi^2 = 6,33$ ;  $p = 0,04$ ) i relativne beta amplitude u toku REM faze spavanja (**Slika 4.15.**,  $\chi^2 = 20,08$ ;  $p = 10^{-4}$ ). Tri nedelje nakon unilateralne PPT lezije teta amplituda budnosti je i dalje bila povećana ( $\chi^2 = 13,55$ ;  $p = 0,001$ ) i njen porast je bio praćen smanjenjem delta amplitude budnosti ( $\chi^2 = 11,44$ ;  $p = 0,003$ ). Ovako izmenjenja EEG mikrostruktura budnosti (smanjena delta amplituda i povećana teta amplituda), izazvana unilateralnom lezijom, održala se do kraja perioda od pet nedelja (**Slika 4.13.**,  $\chi^2 \geq 10,23$ ;  $p \leq 0,006$  za delta amplitudu;  $\chi^2 \geq 6,33$ ;  $p \leq 0,04$  za teta amplitudu).

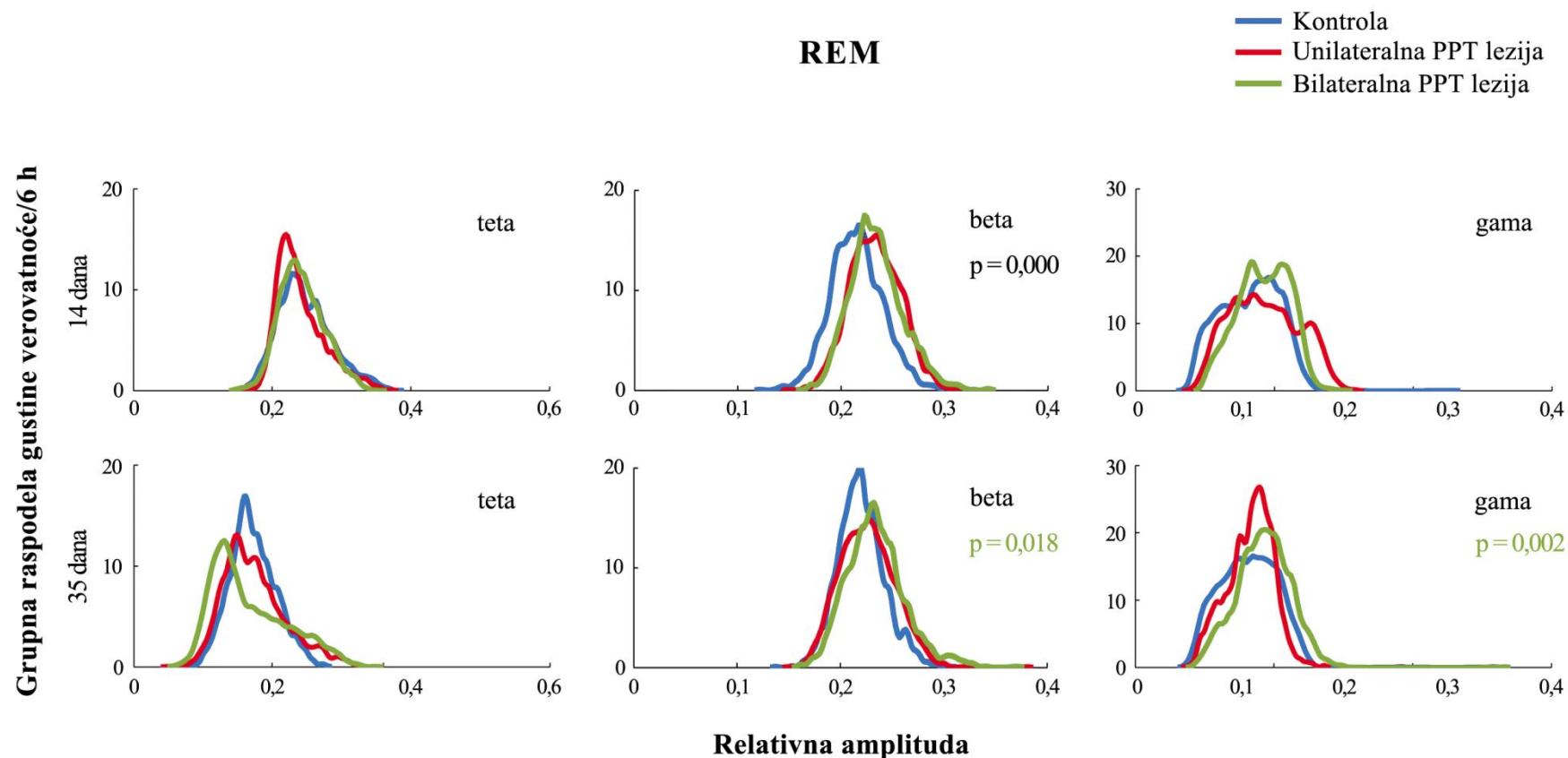
Bilateralna PPT lezija je izazvala povećanje beta amplitude budnosti (**Slika 4.13.**), NREM (**Slika 4.14.**) i REM (**Slika 4.15.**) faze spavanja, koje je trajalo od 14 do 35 dana nakon lezije ( $\chi^2 \geq 8,22$ ;  $p \leq 0,02$  za budnost;  $\chi^2 \geq 11,09$ ;  $p \leq 0,004$  za NREM;  $\chi^2 \geq 7,98$ ;  $p \leq 0,02$  za REM). Ovaj dugotrajni, generalizovani porast beta amplitude je dve nedelje nakon lezije bio praćen smanjenjem delta amplitude u toku NREM faze spavanja (**Slika 4.14.**,  $\chi^2 = 7,27$ ;  $p = 0,03$ ). Tri nedelje nakon bilateralne lezije, uz sve prethodne promene EEG mikrostrukture, dodatno se javlja i smanjenje delta amplitude budnosti ( $\chi^2 = 11,44$ ;  $p = 0,003$ ). Smanjenje delta amplitude budnosti i NREM faze spavanja, kao i povećanje gama amplitude u toku REM faze spavanja je trajalo do kraja perioda od pet nedelja (**Slika 4.13.**,  $\chi^2 \geq 12,94$ ;  $p \leq 0,006$  za delta amplitudu budnosti; **Slika 4.14.**,  $\chi^2 \geq 7,27$ ;  $p \leq 0,03$  za delta amplitudu NREM faze spavanja; **Slika 4.15.**,  $\chi^2 \geq 6,60$ ;  $p \leq 0,04$  za gama amplitudu REM faze spavanja).



**Slika 4.13. Efekat PPT lezije na EEG mikrostrukturu budnosti u senzomotornoj kori.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG delta, teta i beta amplitude senzomotorne kore/6 h u toku budnosti 14 dana (gornji red) i 35 dana (donji red) nakon unilateralne (crvena linija,  $n = 7$  za termin 14 dana;  $n = 6$  za termin 35 dana) i bilateralne PPT lezije (zelena linija,  $n = 7$  za termine 14 i 35 dana) u odnosu na fiziološku kontrolu (plava linija,  $n = 8$  za termin 14 dana;  $n = 5$  za termin 35 dana). **p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada su oba kontrastna Mann-Whitney U testa doprinela značajnosti; **p**, **p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada je kontrastni Mann-Whitney U test odgovarajuće eksperimentalne grupe doprineo značajnosti.



**Slika 4.14. Efekat PPT lezije na EEG mikrostrukturu NREM faze spavanja u senzomotornoj kori.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG delta, beta i gama amplitude senzomotorne kore/6 h u toku NREM faze spavanja 14 dana (gornji red) i 35 dana (donji red) nakon unilateralne (crvena linija, n = 7 za termin 14 dana; n = 6 za termin 35 dana) i bilateralne PPT lezije (zeleno linija, n = 7 za termine 14 i 35 dana) u odnosu na fiziološku kontrolu (plava linija, n = 8 za termin 14 dana; n = 5 za termin 35 dana). **p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada je kontrastni Mann-Whitney U test odgovarajuće eksperimentalne grupe doprineo značajnosti.



**Slika 4.15. Efekat PPT lezije na EEG mikrostrukturu REM faze spavanja u senzomotornoj kori.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG teta, beta i gama amplitude senzomotorne kore/6 h u toku REM faze spavanja 14 dana (gornji red) i 35 dana (donji red) nakon unilateralne (crvena linija,  $n = 7$  za termin 14 dana;  $n = 6$  za termin 35 dana) i bilateralne PPT lezije (zelena linija,  $n = 7$  za termine 14 i 35 dana) u odnosu na fiziološku kontrolu (plava linija,  $n = 8$  za termin 14 dana;  $n = 5$  za termin 35 dana). **p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada su oba kontrastna Mann-Whitney U testa doprinela značajnosti; **p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada je kontrastni Mann-Whitney U test odgovarajuće eksperimentalne grupe doprineo značajnosti.

### **4.3. Topografske razlike poremećaja spavanja u degeneracijama funkcionalno različitih holinergičkih inervacija kore velikog mozga pacova**

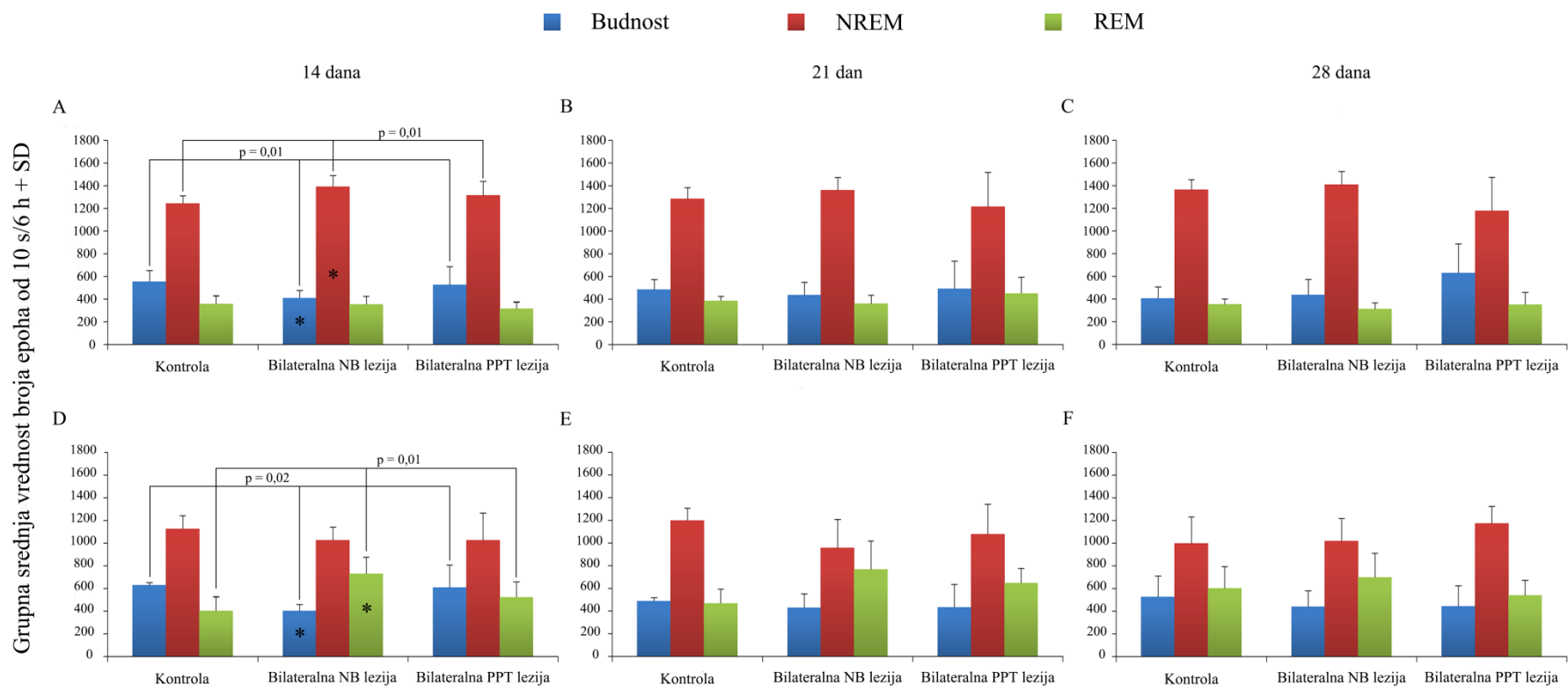
Rezultati prethodnih analiza poremećaja u toku spavanja, izazvanih ekscitotoksičnom lezijom dva funkcionalno različita izvora holinergičke inervacije kore velikog mozga pacova, su pokazali da su u oba modela holinergičke neuropatologije bilateralne lezije izazvale daleko veće i dugotrajnije poremećaje u poređenju sa unilateralnim lezijama. Stoga su za potrebe topografske analize razlika poremećaja u ovim modelima holinergičkih degeneracija poređeni efekti samo bilateralnih NB i PPT lezija. Korišćenjem EEG signala motorne i senzomotorne kore fiziološke kontrole (n = 8), bilateralne NB lezije (n = 12) i bilateralne PPT lezije (n = 7) analizirane su topografske razlike u arhitekturi spavanja, strukturi prelaznih stanja i EEG mikrostrukturi budnosti, NREM i REM faze spavanja u periodu od 14 do 28 dana nakon lezije.

#### **4.3.1. Topografske razlike arhitekture spavanja i strukture prelaznih stanja**

Analiza arhitekture spavanja je pokazala postojanje razlika u efektima bilateralne NB i bilateralne PPT lezije. Za razliku od bilateralne PPT lezije koja nije izmenila arhitekturu spavanja u periodu od 14 do 28 dana nakon lezije, bilaterlna NB lezija je izazvala poremene u dužini trajanja budnosti, NREM i REM faze spavanja, pri čemu su te promene bile topografski različito izražene.

Tokom perioda od četiri nedelje bilateralna NB lezija je samo privremeno promenila arhitekturu spavanja u senzomotornoj kori (**Slika 4.16. A-C**). Dve nedelje nakon bilateralne NB lezije (**Slika 4.16. A**) broj epoha budnosti se smanjio ( $\chi^2 = 8,51$ ;  $p = 0,01$ ), a broj epoha NREM faze spavanja se povećao ( $\chi^2 = 9,02$ ;  $p = 0,01$ ). U periodu od 21 do 28 dana nakon lezije (**Slike 4.16. B, C**) dužina trajanja budnosti, NREM i REM faze spavanja nakon bilateralne NB lezije se nije razlikovala u poređenju sa bilateralnom PPT lezijom i fiziološkom kontrolom ( $\chi^2 \geq 0,66$ ;  $p \geq 0,25$ ).

Nasuprot promeni dužine trajanja budnosti i NREM faze spavanja u senzomotornoj kori dve nedelje nakon bilateralne NB lezije (**Slika 4.16. A-C**), u motornoj kori je došlo do smanjenja broja epoha budnosti ( $\chi^2 = 8,28$ ;  $p = 0,02$ ) i povećanja broja epoha REM faze spavanja (**Slika 4.16. D**;  $\chi^2 = 9,35$ ;  $p = 0,01$ ). Ova promena je kao i u senzomotornoj kori bila privremena, tako da se arhitektura spavanja već od 21. dana nakon bilateralne NB lezije nije razlikovala u poređenju sa bilateralnom PPT lezijom i fiziološkom kontrolom (**Slika 4.16. E, F**;  $\chi^2 \geq 0,87$ ;  $p \geq 0,06$ ).



**Slika 4.16. Topografija arhitekture spavanja 14-28 dana nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije.** Grupna srednja vrednost broja epoha od 10 s budnosti, NREM i REM faze spavanja u toku 6 h + standardna devijacija (SD) u senzomotornoj (A-C) i motornoj kori (D-F) od 14 do 28 dana nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije u odnosu na fiziološku kontrolu.

Razlike u efektima bilateralne NB i bilateralne PPT lezije su se iskazale i kroz promene u strukturi prelaznih stanja. Bilateralna PPT lezija je izazvala dugotrajni porast broja prelaza budnost/REM i REM/budnost, podjednako izražen u obe kore, dok je bilateralna NB lezija dugotrajno promenila broj NREM/REM i REM/NREM prelaza, sa topografski različito izraženim smerom promene (pad u senzomotornoj kori, porast u motornoj kori). Topografija strukture prelaznih stanja od 14 do 28 dana nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije, u odnosu na fiziološku kontrolu, prikazana je u **Tabeli 4.2.**

Tokom perioda od 14 do 28 dana nakon lezije, bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori dugotrajno smanjila broj NREM/REM i REM/NREM prelaza (**Tabela 4.2.**,  $\chi^2 \geq 17,08$ ;  $p \leq 10^{-4}$ ), dok je bilateralna PPT lezija dugotrajno povećala broj budnost/REM i REM/budnost prelaza (**Tabela 4.2.**,  $\chi^2 \geq 13,68$ ;  $p \leq 0,001$ ). Pored povećanog broja budnost/REM i REM/budnost prelaza, koji se održao tokom četiri nedelje, bilateralna PPT lezija je najpre izazvala privremeno povećanje broja NREM/REM i REM/NREM prelaza 21 dan nakon lezije ( $z \geq -2,59$ ;  $p \leq 0,01$ ), a zatim se 28 dana nakon lezije njihov broj smanjio u odnosu na fiziološku kontrolu ( $z \geq -6,00$ ;  $p \leq 10^{-4}$ ) i time izjednačio sa brojem prelaza smanjenim nakon bilateralne NB lezije ( $z \geq -1,21$ ;  $p \geq 0,23$ ).

Za razliku od senzomotorne kore gde je bilateralna NB lezija izazvala dugotrajno smanjenje broja NREM/REM i REM/NREM prelaza, u motornoj kori je izazvala povećanje broja ovih prelaza tokom čitavog perioda od 14 do 28 dana nakon lezije (**Tabela 4.2.**,  $\chi^2 \geq 23,30$ ;  $p \leq 10^{-4}$ ). Efekat bilateralne PPT lezije u motornoj kori je, kao i u senzomotornoj kori, bio izražen kao dugotrajno povećanje broja budnost/REM i REM/budnost prelaza (**Tabela 4.2.**,  $\chi^2 \geq 9,89$ ;  $p \leq 0,01$ ). Ovo povećanje broja budnost/REM i REM/budnost prelaza bilo je praćeno povećanjem broja NREM/REM i REM/NREM prelaza od 14 do 21 dana nakon bilateralne PPT lezije (**Tabela 4.2.**,  $z \geq -5,47$ ;  $p \leq 0,02$ ).



**Tabela 4.2. Topografija strukture prelaznih stanja u toku spavanja nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije.** Grupna srednja vrednost broja svih prelaza merenih na sat vremena u toku 6 h spavanja  $\pm$  standardna greška (SE) od 14 do 28 dana nakon lezija u senzomotornoj (SMCx) i motornoj kori (MCx). \* statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,01$ .

	Budnost/NREM	NREM/Budnost	Budnost/REM	REM/Budnost	NREM/REM	REM/NREM
<b>SMCx</b>						
<b>14 dana</b>						
Kontrola	29,10 $\pm$ 1,82	27,50 $\pm$ 1,75	6,39 $\pm$ 0,72	7,73 $\pm$ 0,52	54,07 $\pm$ 3,41	52,55 $\pm$ 3,25
Bilateralna NB lezija	27,75 $\pm$ 1,33	26,40 $\pm$ 1,40	6,10 $\pm$ 0,75	<b>6,17 <math>\pm</math> 0,49 *</b>	<b>31,56 <math>\pm</math> 1,78 *</b>	<b>35,04 <math>\pm</math> 2,12 *</b>
Bilateralna PPT lezija	<b>17,00 <math>\pm</math> 2,00 *</b>	27,38 $\pm$ 2,77	<b>10,33 <math>\pm</math> 0,97 *</b>	<b>11,00 <math>\pm</math> 0,94 *</b>	44,88 $\pm$ 4,45	52,11 $\pm$ 5,99
<b>21 dan</b>						
Kontrola	31,53 $\pm$ 2,43	29,07 $\pm$ 2,49	6,04 $\pm$ 0,68	9,73 $\pm$ 0,71	45,73 $\pm$ 3,24	43,40 $\pm$ 3,31
Bilateralna NB lezija	24,27 $\pm$ 1,26	22,02 $\pm$ 1,26	6,21 $\pm$ 0,74	8,63 $\pm$ 0,80	<b>34,30 <math>\pm</math> 1,48 *</b>	<b>31,97 <math>\pm</math> 1,48 *</b>
Bilateralna PPT lezija	29,11 $\pm$ 2,94	26,17 $\pm$ 2,27	<b>17,11 <math>\pm</math> 2,65 *</b>	<b>18,28 <math>\pm</math> 2,49 *</b>	<b>64,04 <math>\pm</math> 6,00 *</b>	<b>65,13 <math>\pm</math> 6,84 *</b>
<b>28 dana</b>						
Kontrola	25,08 $\pm$ 2,55	24,50 $\pm$ 2,40	5,83 $\pm$ 0,76	7,22 $\pm$ 0,84	56,57 $\pm$ 2,61	55,67 $\pm$ 2,82
Bilateralna NB lezija	28,20 $\pm$ 2,73	24,33 $\pm$ 2,40	5,20 $\pm$ 0,75	6,89 $\pm$ 0,80	<b>30,93 <math>\pm</math> 2,75 *</b>	<b>31,92 <math>\pm</math> 3,02 *</b>
Bilateralna PPT lezija	23,03 $\pm$ 1,73	24,71 $\pm$ 2,19	<b>12,38 <math>\pm</math> 1,09 *</b>	<b>13,19 <math>\pm</math> 0,96 *</b>	<b>36,07 <math>\pm</math> 2,66 *</b>	<b>27,22 <math>\pm</math> 1,74 *</b>
<b>MCx</b>						
<b>14 dana</b>						
Kontrola	27,08 $\pm$ 2,46	25,92 $\pm$ 2,15	15,11 $\pm$ 1,23	13,21 $\pm$ 1,09	70,88 $\pm$ 6,15	69,75 $\pm$ 6,31
Bilateralna NB lezija	22,75 $\pm$ 1,41	<b>21,29 <math>\pm</math> 1,32 *</b>	<b>11,92 <math>\pm</math> 1,26 *</b>	13,53 $\pm$ 1,16	<b>105,79 <math>\pm</math> 2,73 *</b>	<b>104,29 <math>\pm</math> 2,61 *</b>
Bilateralna PPT lezija	30,81 $\pm$ 2,44	31,58 $\pm$ 2,21	<b>20,44 <math>\pm</math> 1,62 *</b>	<b>17,94 <math>\pm</math> 1,32 *</b>	<b>87,00 <math>\pm</math> 3,75 *</b>	<b>87,93 <math>\pm</math> 3,76 *</b>
<b>21 dan</b>						
Kontrola	27,54 $\pm$ 2,58	26,00 $\pm$ 2,45	7,44 $\pm$ 1,21	10,89 $\pm$ 1,17	40,33 $\pm$ 3,41	36,83 $\pm$ 3,40
Bilateralna NB lezija	23,00 $\pm$ 2,62	23,61 $\pm$ 2,70	<b>20,72 <math>\pm</math> 2,34 *</b>	13,89 $\pm$ 1,63	<b>86,79 <math>\pm</math> 5,66 *</b>	<b>87,38 <math>\pm</math> 5,56 *</b>
Bilateralna PPT lezija	29,22 $\pm$ 3,86	25,38 $\pm$ 3,02	<b>23,56 <math>\pm</math> 2,36 *</b>	<b>22,94 <math>\pm</math> 2,40 *</b>	<b>100,29 <math>\pm</math> 4,56 *</b>	<b>100,17 <math>\pm</math> 4,86 *</b>
<b>28 dana</b>						
Kontrola	34,00 $\pm$ 2,36	29,29 $\pm$ 2,34	10,83 $\pm$ 1,36	11,79 $\pm$ 1,14	79,27 $\pm$ 4,42	75,77 $\pm$ 4,67
Bilateralna NB lezija	<b>17,78 <math>\pm</math> 1,47 *</b>	<b>17,40 <math>\pm</math> 1,58 *</b>	<b>7,90 <math>\pm</math> 0,99 *</b>	9,50 $\pm$ 0,86	<b>111,06 <math>\pm</math> 4,35 *</b>	<b>109,33 <math>\pm</math> 4,51 *</b>
Bilateralna PPT lezija	<b>27,39 <math>\pm</math> 3,44 *</b>	25,22 $\pm$ 3,15	<b>14,77 <math>\pm</math> 0,99 *</b>	<b>16,27 <math>\pm</math> 1,21 *</b>	76,37 $\pm$ 4,89	74,90 $\pm$ 4,95

### 4.3.2. EEG mikrostruktura spavanja

Iako nije bilo dugotrajne promene u arhitekturi spavanja tokom perioda od četiri nedelje, EEG mikrostruktura budnosti, NREM i REM faze spavanja je bila dugotrajno izmenjena nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije (**Slike 4.17. - 4.19.**).

Dve nedelje nakon bilateralne PPT lezije u senzomotornoj kori je došlo do pada delta amplitude (**Slika 4.17. A**;  $\chi^2 = 6,70$ ;  $p = 0,04$ ) i porasta beta i gama amplitude u budnosti (**Slika 4.17. C, D**;  $\chi^2 = 14,84$ ;  $p = 10^{-4}$  za beta amplitudu;  $\chi^2 = 8,04$ ;  $p = 0,02$  za gama amplitudu). Ove promene delta i beta amplitude u budnosti, izazvane bilateralnom PPT lezijom, su se održale tokom čitavog perioda od četiri nedelje ( $\chi^2 \geq 6,40$ ;  $p \leq 0,04$ ), kada je i bilateralna NB lezija izazvala smanjenje delta amplitude i porast beta amplitude, jednako kao i PPT lezija (**Slika 4.17. A**;  $z = -1,25$ ;  $p = 0,21$  za delta amplitudu; **Slika 4.17. C**;  $z = -0,27$ ;  $p = 0,79$  za beta amplitudu).

Samo je bilateralna PPT lezija promenila EEG mikrostrukturu tokom NREM faze spavanja u senzomotornoj kori (**Slika 4.18.**). Dugotrajni porast beta amplitude tokom perioda od četiri nedelje (**Slika 4.18. C**;  $\chi^2 \geq 6,44$ ;  $p \leq 0,04$ ) bio je praćen prolaznim padom delta amplitude 14 dana nakon lezije (**Fig 4.18. A**;  $\chi^2 = 9,86$ ;  $p = 0,01$ ) i porastom gama amplitude u periodu od 14 do 21 dan nakon lezije (**Slika 4.18. D**;  $\chi^2 \geq 10,18$ ;  $p \leq 0,01$ ).

U toku REM faze spavanja (**Slika 4.19.**) bilateralna NB lezija je povećala relativnu teta amplitudu u senzomotornoj kori u periodu od tri nedelje (**Slika 4.19. B**;  $\chi^2 \geq 7,41$ ;  $p \leq 0,03$ ), koja se nakon toga vratila na kontrolnu vrednost ( $\chi^2 = 1,01$ ;  $p = 0,60$ ), dok je bilateralna PPT lezija izazvala dugotrajno povećanje beta i gama relativne amplitude u trajanju od četiri nedelje (**Slika 4.19. C, D**;  $\chi^2 \geq 6,59$ ;  $p \leq 0,04$ ).

Dve nedelje nakon lezije, u motornoj kori je došlo do porasta teta amplitude u budnosti (**Slika 4.17. B**;  $\chi^2 = 8,42$ ;  $p = 0,02$ ) i to podjednako nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije ( $z \geq -2,97$ ;  $p \leq 0,04$ ). Međutim, ovaj porast je bio privremen i tri nedelje nakon obe lezije teta amplituda se vratila na kontrolne vrednosti (**Slika 4.17. B**;  $\chi^2 = 1,65$ ;  $p = 0,44$ ). U isto vreme, bilateralna PPT lezija je izazvala povećanje beta amplitude (**Slika 4.17 C**;  $\chi^2 = 7,79$ ;  $p = 0,02$ ), koje je trajalo četiri nedelje ( $\chi^2 \geq 7,79$ ;  $p$

$\leq 0.02$ ). Ovo povećanje beta amplitude je četiri nedelje nakon lezije bilo praćeno smanjenjem delta amplitude (**Slika 4.17. A**;  $\chi^2 = 9,14$ ;  $p = 0,01$ ).

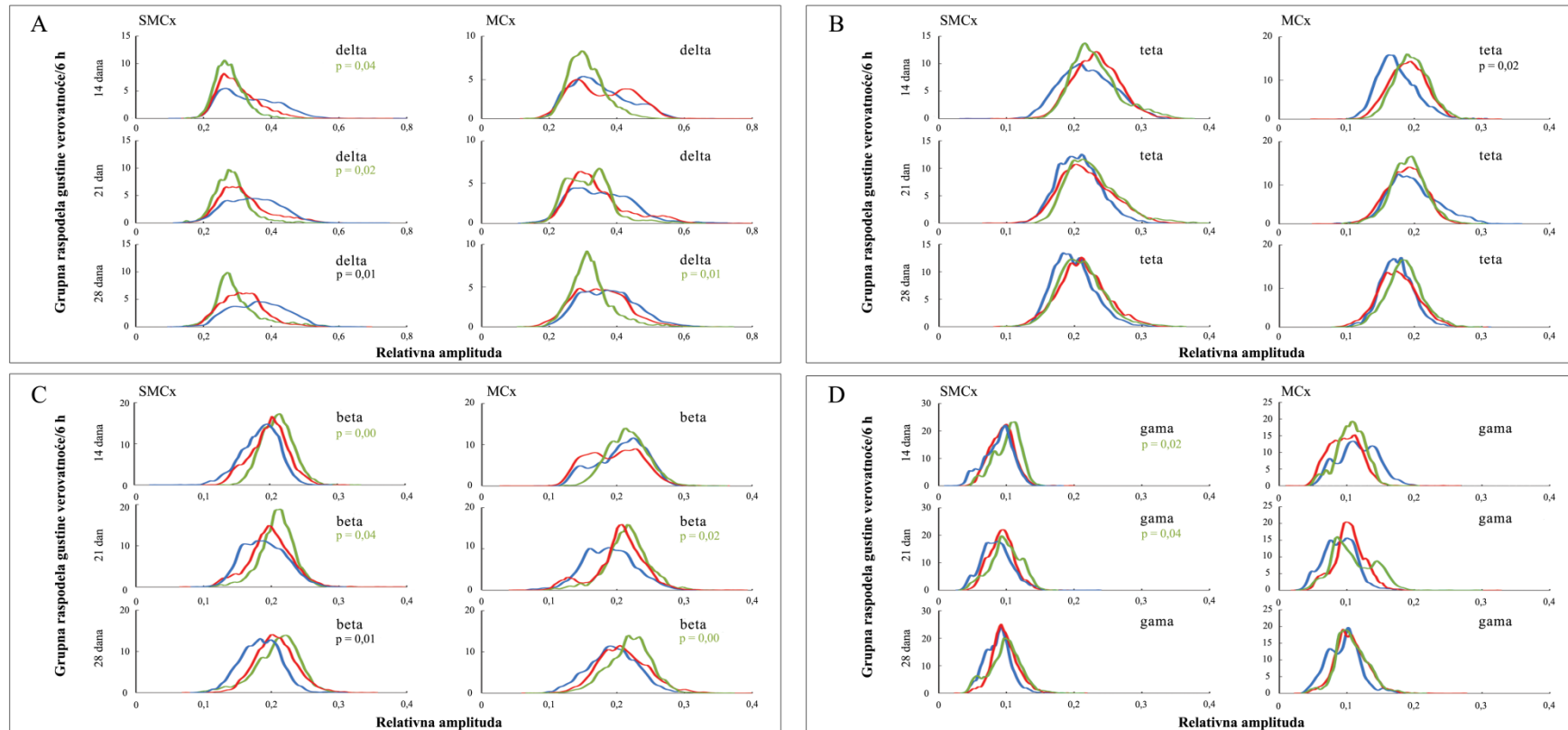
U toku NREM faze spavanja je dve nedelje nakon bilateralne NB lezije došlo do porasta delta amplitude (**Slika 4.18. A**;  $\chi^2 = 23,29$ ;  $p = 10^{-4}$ ) i pada beta i gama amplitude (**Slika 4.18. C, D**;  $\chi^2 = 28,29$ ;  $p = 10^{-4}$  za beta amplitudu;  $\chi^2 = 19,50$ ;  $p = 10^{-4}$  za gama amplitudu). Tri nedelje nakon bilateralne PPT lezije pad delta i teta amplitude (**Slika 4.18. A, B**;  $\chi^2 = 11,01$ ;  $p = 10^{-4}$  za delta amplitudu;  $\chi^2 = 12,48$ ;  $p = 10^{-4}$  za teta amplitudu) je bio praćen porastom beta i gama amplitude (**Slika 4.18. C, D**;  $\chi^2 = 19,52$ ;  $p = 10^{-4}$  za beta amplitudu;  $\chi^2 = 12,17$ ;  $p = 10^{-4}$  za gama amplitudu). Četiri nedelje nakon lezija jedina promena u EEG mikrostrukturi NREM faze spavanja bila je povećana teta amplituda izazvana bilateralnom NB lezijom (**Slika 4.18. B**;  $\chi^2 = 9,05$ ;  $p = 0,01$ ), dok se bilateralna PPT lezija nije razlikovala od fiziološke kontrole ( $z \geq -1,44$ ;  $p \geq 0,15$ ).

Bilateralna NB lezija je na samom početku, dve nedelje nakon lezije, privremeno izmenila EEG mikrostrukturu REM faze spavanja, tako što je povećala teta amplitudu u motornoj kori (**Slika 4.19. B**;  $\chi^2 = 7,74$ ;  $p = 0,02$ ). Tri nedelje nakon lezije porast delta amplitude (**Slika 4.19. A**;  $\chi^2 = 11,55$ ;  $p = 10^{-4}$ ) je bio praćen padom beta amplitude (**Slika 4.19. C**;  $\chi^2 = 9,22$ ;  $p = 0,01$ ). Četiri nedelje nakon bilateralne NB lezije, EEG mikrostruktura REM faze spavanja se nije razlikovala od fiziološke kontrole ( $z \geq -0,70$ ;  $p \geq 0,49$ ).

Dve nedelje nakon bilateralne PPT lezije, delta amplituda REM faze spavanja je bila smanjena (**Slika 4.19. A**;  $\chi^2 = 15,79$ ;  $p = 10^{-4}$ ), dok su sigma, beta i gama amplitude bile povećane (**Slika 4.19. C, D**;  $\chi^2 \geq 8,85$ ;  $p \leq 0,01$  za beta i gama amplitudu; podaci za sigma amplitudu nisu prikazani). Tri nedelje nakon bilateralne PPT lezije samo je teta amplituda bila smanjena (**Slika 4.19. B**;  $\chi^2 = 7,43$ ;  $p = 0,02$ ). Četiri nedelje nakon lezije beta i gama amplituda su i dalje bile povećane (**Slika 4.19. C, D**;  $\chi^2 \geq 8,34$ ;  $p \leq 0,02$ ).

## Budnost

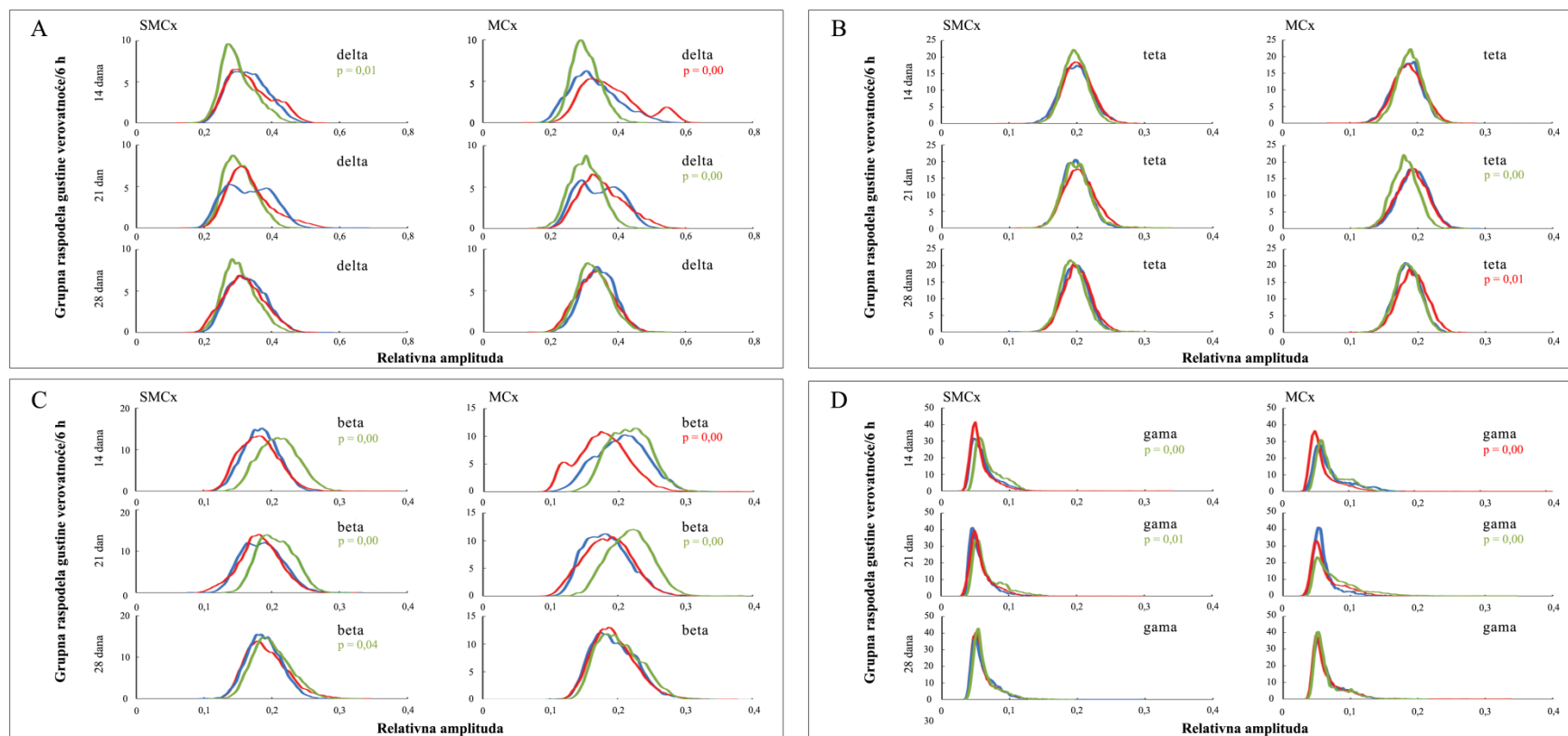
— Kontrola  
— Bilateralna NB lezija  
— Bilateralna PPT lezija



**Slika 4.17. Topografija EEG mikrostrukture budnosti od 14 do 28 dana nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije u odnosu na fiziološku kontrolu.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG delta (A), teta (B), beta (C) i gama (D) amplitude/6 h u toku budnosti u senzomotornoj (SMCx) i motornoj kori (MCx). **p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada su oba kontrastna Mann-Whitney U testa doprinela značajnosti; **p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada je kontrastni Mann-Whitney U test odgovarajuće eksperimentalne grupe doprineo značajnosti.

## NREM

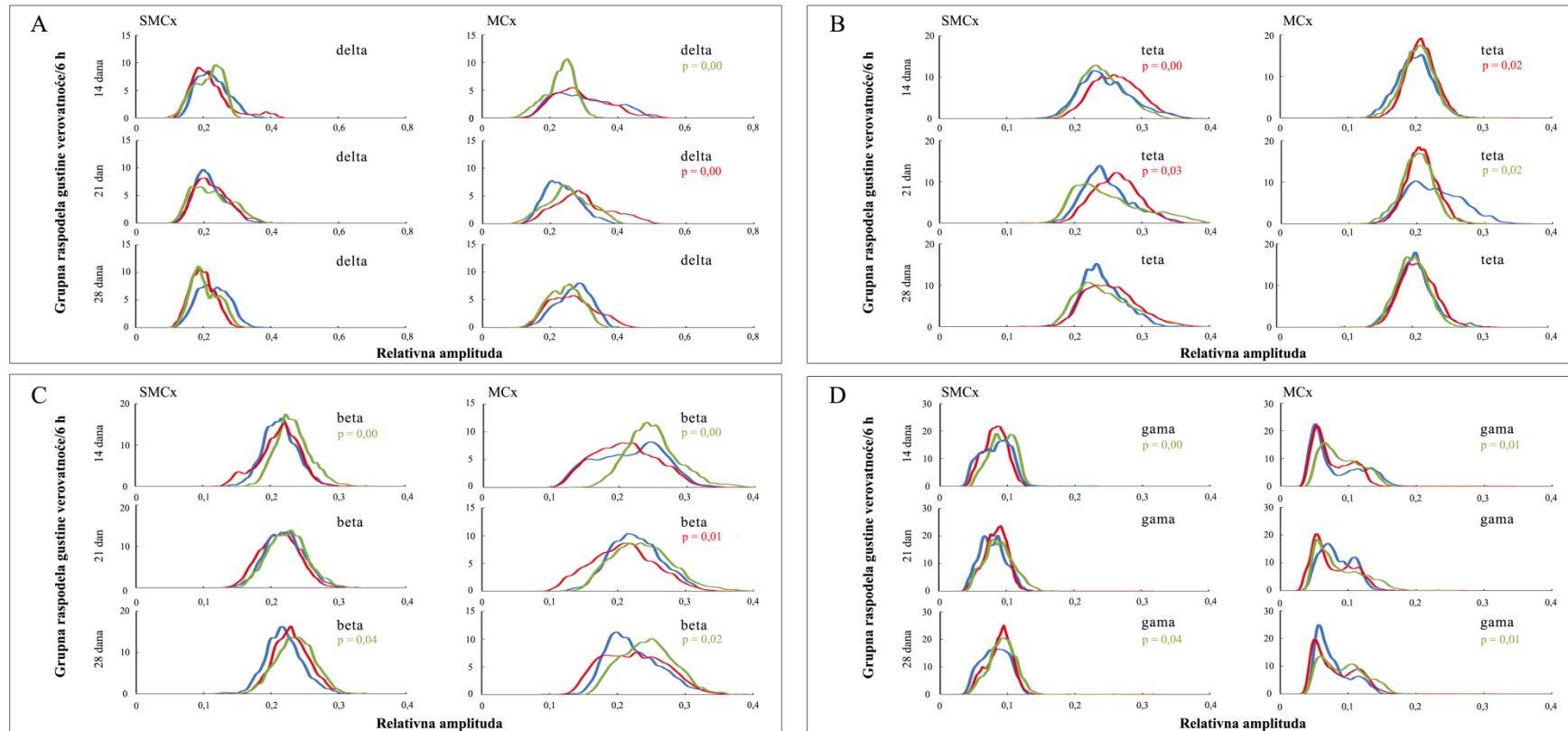
— Kontrola  
— Bilateralna NB lezija  
— Bilateralna PPT lezija



**Slika 4.18.** Topografija EEG mikrostrukture NREM faze spavanja od 14 do 28 dana nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije u odnosu na fiziološku kontrolu. Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG delta (A), teta (B), beta (C) i gama (D) amplitude/6 h u toku budnosti u senzomotornoj (SMCx) i motornoj kori (MCx). **p, p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada je kontrastni Mann-Whitney U test odgovarajuće eksperimentalne grupe doprineo značajnosti.

REM

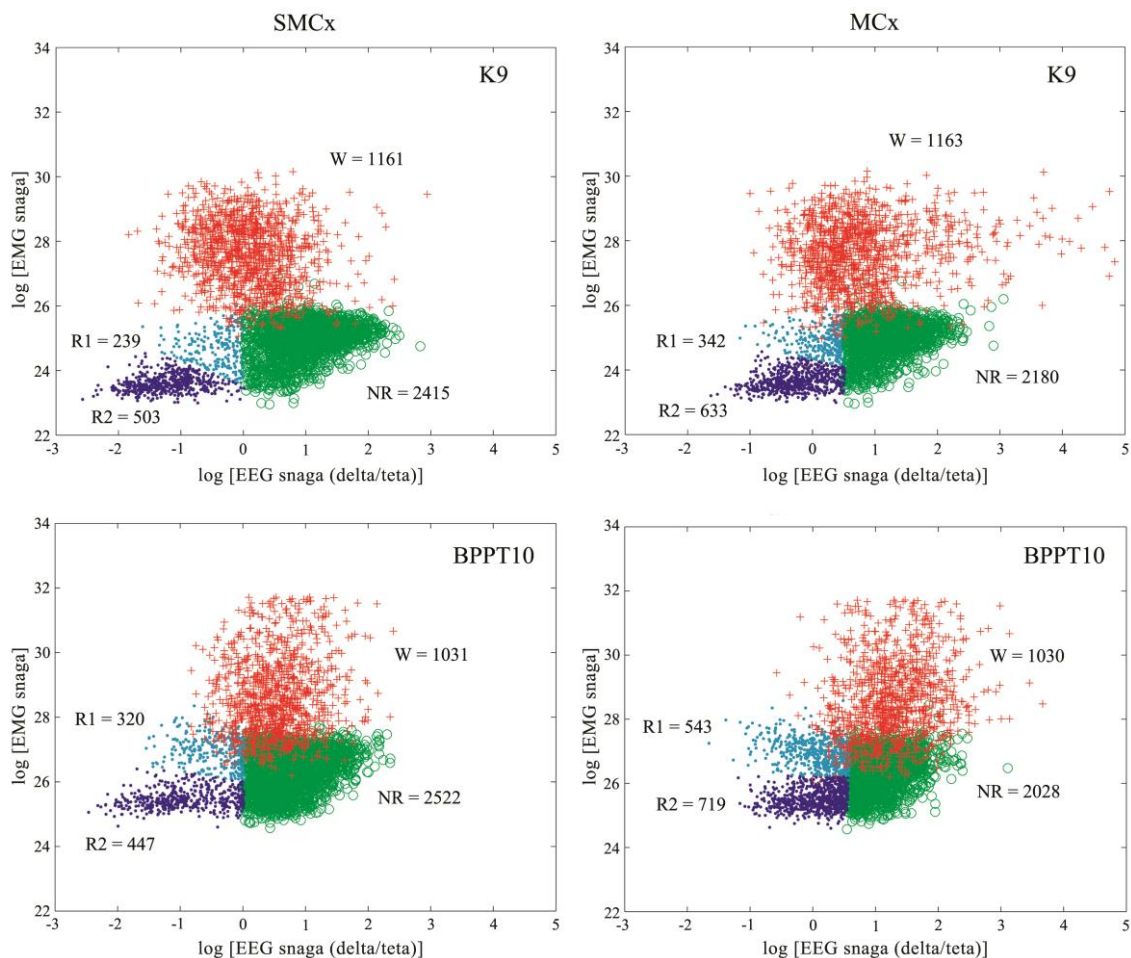
— Kontrola  
 — Bilateralna NB lezija  
 — Bilateralna PPT lezija



**Slika 4.19. Topografija EEG mikrostrukture REM faze spavanja od 14 do 28 dana nakon bilateralne NB i bilateralne PPT lezije u odnosu na fiziološku kontrolu.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne EEG delta (A), teta (B), beta (C) i gama (D) amplitude/6 h u toku budnosti u senzomotornoj (SMCx) i motornoj kori (MCx). **p, p** – statističke značajnosti Kruskal-Wallis testa kada je kontrastni Mann-Whitney U test odgovarajuće eksperimentalne grupe doprineo značajnosti.

#### **4.4. Poremećaji REM faze spavanja u talamo-kortikalnoj denervaciji velikog mozga pacova (PPT lezija)**

Prethodna analiza poremećaja u toku spavanja izazvanih ekscitotoksičnom lezijom talamo-kortikalnog izvora holinergičke inervacije kore velikog mozga pacova je ukazala da se u graficima razdvajanja grupisanja faza spavanja kod pacova sa bilateralnom PPT lezijom u okviru grupisanja REM epoha od 10 s javljaju dva podgrupisanja (REM1 i REM2), koja se razlikuju po EMG snazi (**Slika 4.20.**). Kako PPT ima funkciju u kontroli celokupnog REM fenomena, uključujući i motornu kontrolu, koja u slučaju REM faze spavanja podrazumeva pojavu atonije antigravitacione muskulature, oštećenje ovog jedra može imati za posledicu izdvajanje dva podgrupisanja REM epoha različite EMG snage (REM1 – REM bez atonije i REM2 – REM sa atonijom). Prisustvo REM1 epoha, odnosno REM epoha bez atonije, predstavlja poremećaj ponašanja u REM fazi spavanja, odnosno patološki REM i važan je znak početka neurodegenerativnih bolesti poput AB i PB. Stoga smo pokušali da korišćenjem EEG signala motorne i senzomotorne kore fiziološke kontrole (n = 16) i bilateralne PPT lezije (n = 17), kroz analizu arhitekture spavanja, strukture prelaznih stanja, EEG mikrostrukture i kotriko-muskularnih koherencija, pokažemo da su REM1 i REM2 podgrupisanja, koja se pojavljuju u graficima razdvajanja grupisanja faza spavanja kao posledica bilateralne PPT lezije, dva funkcionalno različita REM stanja.



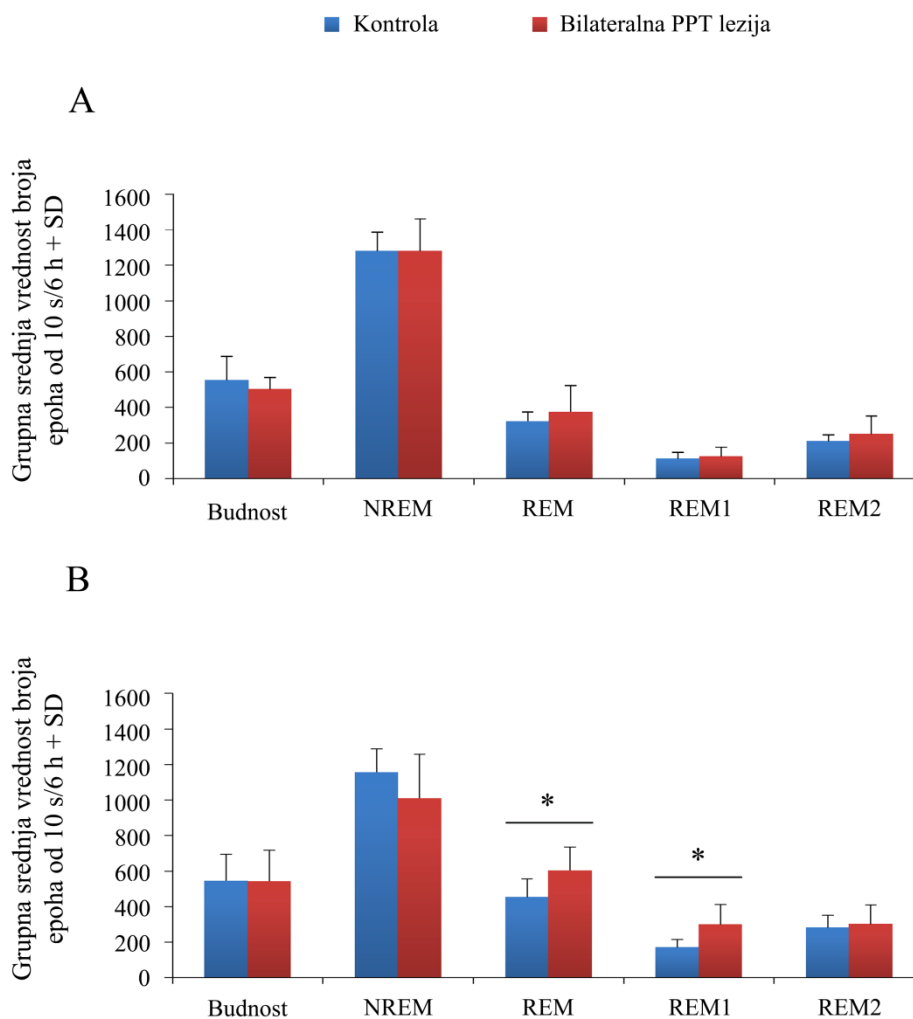
**Slika 4.20. Tipični primeri finalnih grafika razdvajanja grupisanja faza spavanja.** Finalni grafici razdvajanja grupisanja epoha od 5 s budnosti, NREM i REM faze spavanja u senzomotornoj (SMCx) i motornoj kori (MCx) tokom 6 h spavanja kod fiziološke kontrole (K9) i bilateralno lediranog pacova (BPPT10). Svaki simbol predstavlja jednu epohu trajanja 5 s. Epohe budnosti (W grupisanje, krstići) su prenešene iz prethodnog razdvajanja budnosti i spavanja; NR grupisanje (kružići) – epohe NREM faze spavanja; R1, R2 podgrupisanja (tačkice) - epohe REM1 i REM2 faze spavanja.

#### 4.4.1. Topografske razlike trajanja i strukture prelaznih stanja REM faze spavanja nakon bilateralne PPT lezije

Bilateralna PPT lezija nije izmenila arhitekturu spavanja u senzomotornoj kori dve nedelje nakon lezije (Slika 4.21. A). Dužina trajanja budnosti, NREM, REM, REM1 i REM2 faze spavanja se nisu razlikovale u poređenju sa fiziološkom kontrolom

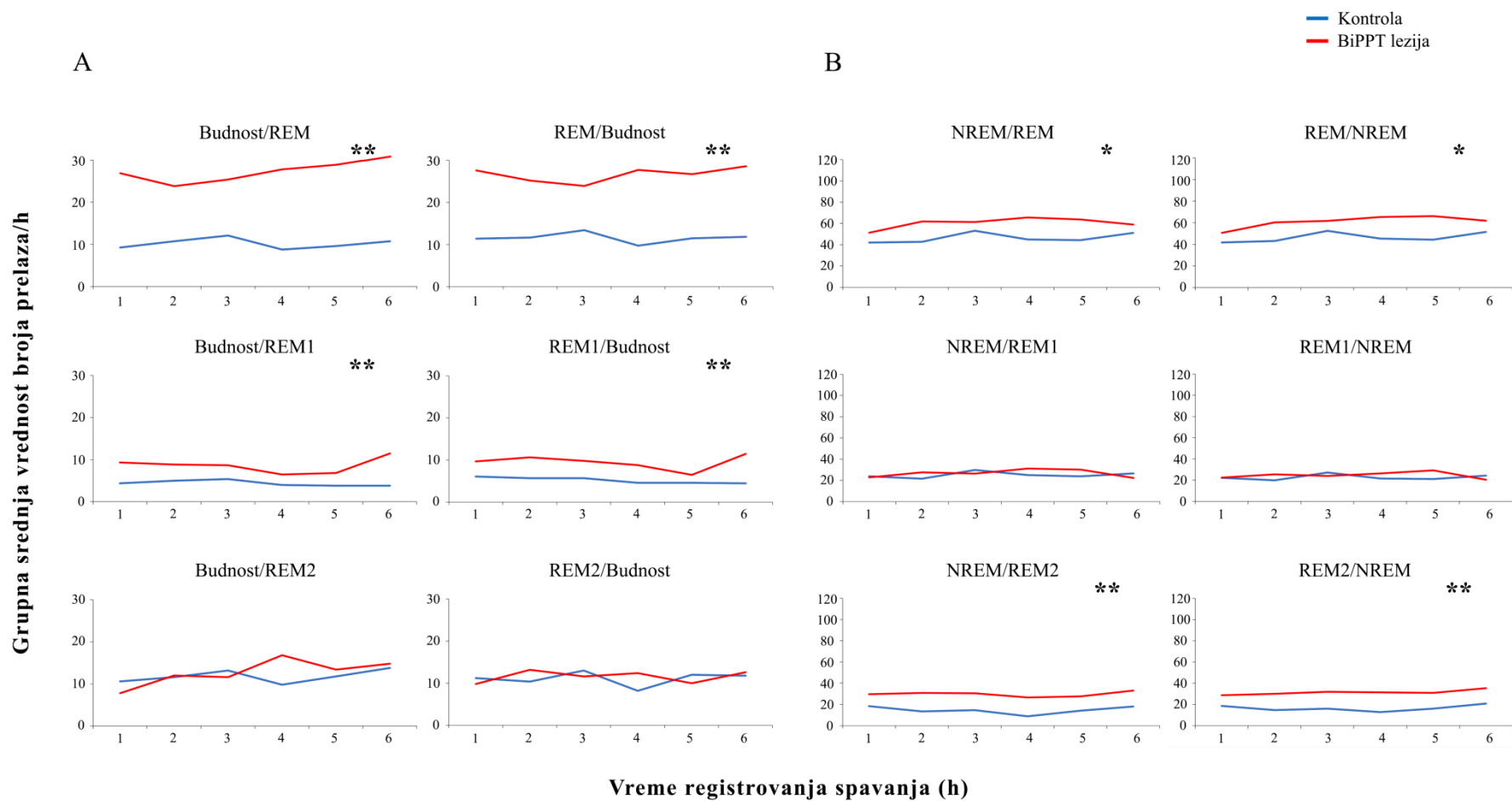


( $z \geq -0,69$ ;  $p \geq 0,52$ ). Sa druge strane, u motornoj kori se povećala dužina trajanja REM faze spavanja ( $z = -2,31$ ;  $p = 0,02$ ) na račun povećanja dužine trajanja REM1 faze ( $z = -2,62$ ;  $p = 0,006$ ), dok se trajanje budnosti i NREM spavanja nisu promenili (**Slika 4.21. B**;  $z \geq -1,24$ ;  $p \geq 0,24$ ).

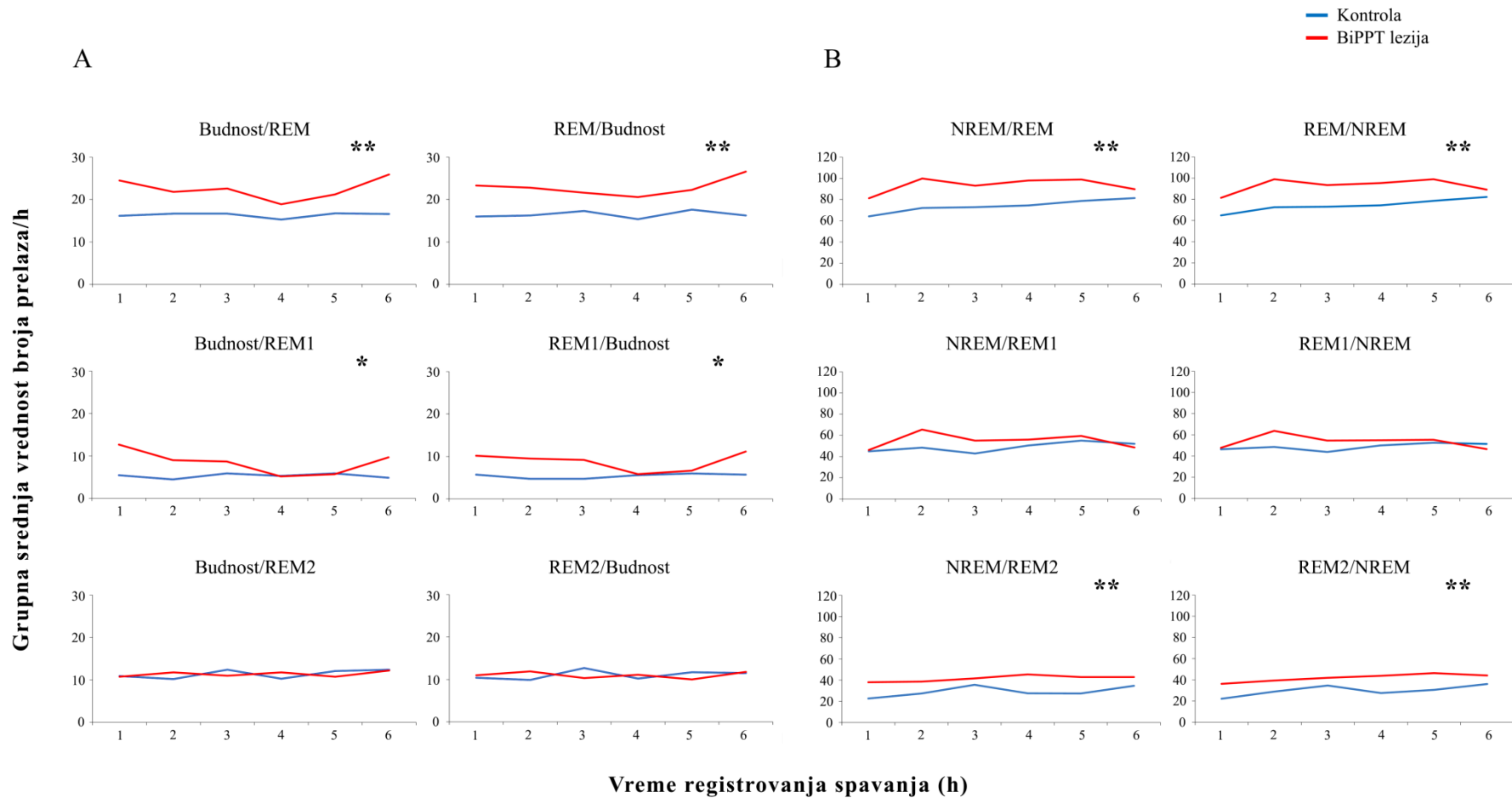


**Slika 4.21. Topografija arhitekture spavanja 14 dana nakon bilateralne PPT lezije.** Grupna srednja vrednost broja epoha od 10 s budnosti, NREM, REM, REM1 i REM2 faze spavanja u toku 6 h + standardna devijacija (SD) u senzomotornoj (**A**) i motornoj kori (**B**) 14 dana nakon bilateralne PPT lezije u odnosu na fiziološku kontrolu. \* statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,02$ .

Analiza strukture prelaznih stanja u toku spavanja je pokazala da je bilateralna PPT lezija u obe kore izazvala povećanje broja budnost/REM i REM/budnost prelaza ( $z \geq -6,43$ ;  $p \leq 0,001$ ), pri čemu je porast broja ovih prelaza nastao usled porasta broja budnost/REM1 i REM1/budnost prelaza ( $z \geq -4,25$ ;  $p \leq 0,02$ , **Slika 4.22. A i Slika 4.23. A, Tabela 4.3.**). Istovremeno, bilateralna PPT lezija je u obe kore izazvala i povećanje broja NREM/REM i REM/NREM prelaza ( $z \geq -4,24$ ;  $p \leq 0,005$ ), pri čemu je ova promena nastala usled povećanja broja NREM/REM2 i REM2/NREM prelaza ( $z \geq -4,90$ ;  $p \leq 10^{-4}$ , **Slika 4.22. B i Slika 4.23. B, Tabela 4.4.**).



**Slika 4.22. Struktura prelaznih stanja u toku spavanja u senzomotornoj kori 14 dana nakon bilateralne PPT lezije.** Grupna srednja vrednost broja budnost/REM/budnost (**A**) i NREM/REM/NREM (**B**) prelaza merenih na sat vremena tokom 6 h spavanja u senzomotornoj kori 14 dana nakon bilateralne PPT lezije (BiPPT lezija) u odnosu na fiziološku kontrolu (Kontrola). \*\*  $p \leq 10^{-4}$ ; \*  $p \leq 0,02$ .



**Slika 4.23. Struktura prelaznih stanja u toku spavanja u motornoj kori 14 dana nakon bilateralne PPT lezije.** Grupna srednja vrednost broja budnost/REM/budnost (**A**) i NREM/REM/NREM (**B**) prelaza merenih na sat vremena tokom 6 h spavanja u motornoj kori 14 dana nakon bilateralne PPT lezije (BiPPT lezija) u odnosu na fiziološku kontrolu (Kontrola). \*\*  $p \leq 10^{-4}$ ; \*  $p \leq 0,02$ .

**Tabella 4.3. Struktura budnost/REM/budnost prelaza u toku spavanja 14 dana nakon bilateralne PPT lezije (BiPPT lezija).** Grupna srednja vrednost broja budnost/REM/budnost prelaza merenih na sat vremena u toku 6 h spavanja  $\pm$  standardna greška (SE) 14 dana nakon lezije u senzomotornoj (SMCx) i motornoj kori (MCx). \* statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,02$ .

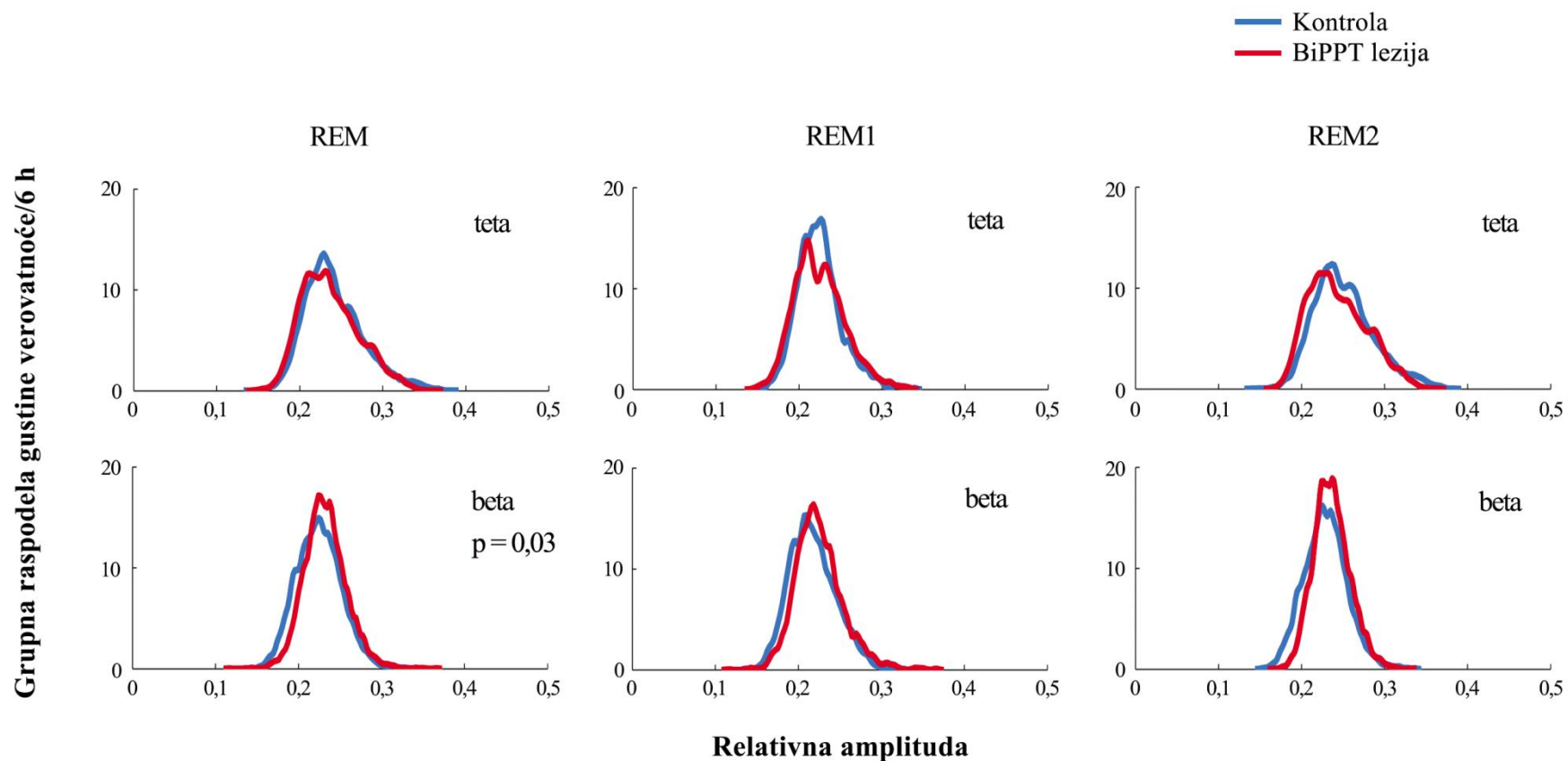
	Budnost/REM	REM/Budnost	Budnost/REM1	REM1/Budnost	Budnost/REM2	REM2/Budnost
<b>SMCx</b>						
Kontrola	10,19 $\pm$ 0,91	11,60 $\pm$ 0,78	4,40 $\pm$ 0,45	5,20 $\pm$ 0,44	11,80 $\pm$ 1,28	11,10 $\pm$ 1,17
BiPPT lezija	<b>27,28 <math>\pm</math> 2,16 *</b>	<b>26,62 <math>\pm</math> 2,06 *</b>	<b>8,61 <math>\pm</math> 0,91*</b>	<b>9,50 <math>\pm</math> 0,92 *</b>	12,73 $\pm$ 1,36	11,60 $\pm$ 1,00
<b>MCx</b>						
Kontrola	16,37 $\pm$ 0,80	16,46 $\pm$ 0,77	5,29 $\pm$ 0,54	5,40 $\pm$ 0,40	11,38 $\pm$ 0,71	11,07 $\pm$ 0,62
BiPPT lezija	<b>22,48 <math>\pm</math> 1,41 *</b>	<b>22,87 <math>\pm</math> 1,43 *</b>	<b>8,47 <math>\pm</math> 1,01 *</b>	<b>8,75 <math>\pm</math> 0,80 *</b>	13,39 $\pm$ 0,63	11,02 $\pm$ 0,59

**Tabella 4.4. Struktura NREM/REM/NREM prelaza u toku spavanja 14 dana nakon bilateralne PPT lezije (BiPPT lezija).** Grupna srednja vrednost broja NREM/REM/NREM prelaza merenih na sat vremena u toku 6 h spavanja  $\pm$  standardna greška (SE) 14 dana nakon lezije u senzomotornoj (SMCx) i motornoj kori (MCx). \* statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,005$ .

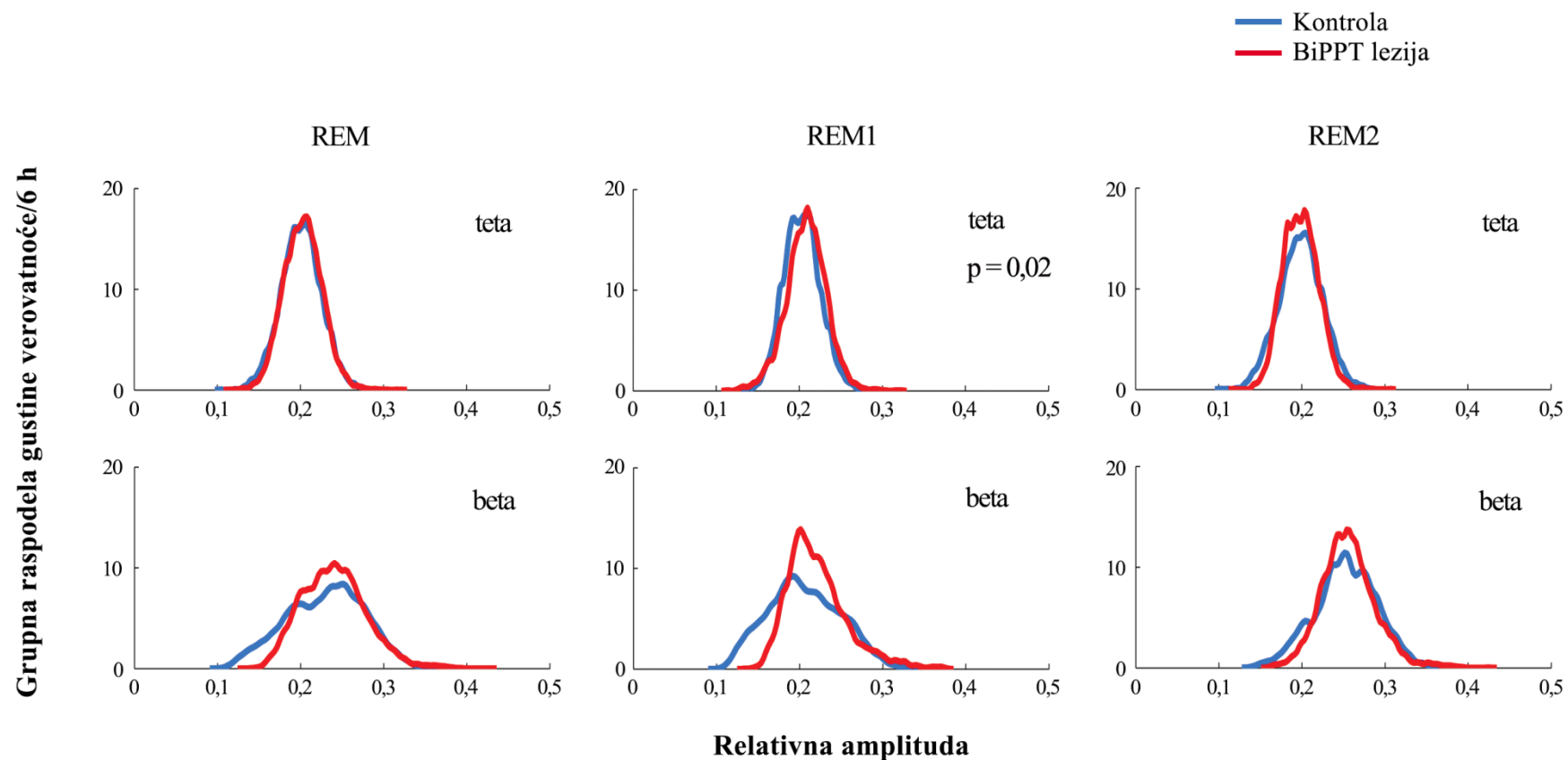
	NREM/REM	REM/NREM	NREM/REM1	REM1/NREM	NREM/REM2	REM2/NREM
<b>SMCx</b>						
Kontrola	46,46 $\pm$ 2,44	46,44 $\pm$ 2,51	25,15 $\pm$ 1,59	22,75 $\pm$ 1,65	14,58 $\pm$ 1,21	16,56 $\pm$ 1,32
BiPPT lezija	<b>60,58 <math>\pm</math> 3,68 *</b>	<b>61,10 <math>\pm</math> 3,77 *</b>	26,76 $\pm$ 1,48	24,63 $\pm$ 1,57	<b>29,69 <math>\pm</math> 2,25 *</b>	<b>31,44 <math>\pm</math> 2,45 *</b>
<b>MCx</b>						
Kontrola	73,96 $\pm$ 3,22	74,24 $\pm$ 3,19	48,97 $\pm$ 2,39	48,77 $\pm$ 2,50	29,26 $\pm$ 1,71	30,00 $\pm$ 1,62
BiPPT lezija	<b>93,46 <math>\pm</math> 2,58 *</b>	<b>92,81 <math>\pm</math> 2,54 *</b>	55,11 $\pm$ 2,72	53,81 $\pm$ 2,62	<b>41,58 <math>\pm</math> 2,06 *</b>	<b>41,99 <math>\pm</math> 1,89 *</b>

#### 4.4.2. Topografske razlike REM EEG mikrostrukture nakon bilateralne PPT lezije

Dve nedelje nakon bilateralne PPT lezije EEG mikrostruktura REM faze spavanja je bila promenjena, a promene su bile topografski različito izražene. U senzomotornoj kori bilateralna PPT lezija je izazvala povećanje beta amplitude ( $z = -2,12$ ;  $p = 0,03$ , **Slika 4.24.**) u toku REM faze spavanja (ukupan REM), dok je u motornoj kori izazvala povećanje teta amplitude ( $z = -2,31$ ;  $p = 0,02$ , **Slika 4.25.**) u toku REM1 faze spavanja (REM bez atonije).



**Slika 4.24. REM/REM1/REM2 EEG mikrostruktura senzomotorne kore.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne REM/REM1/REM2 EEG teta (gornji red) i beta amplitude (donji red)/6 h u senzomotornoj kori (SMCx), 14 dana nakon bilateralne PPT lezije (BiPPT lezija, crvena linija), u odnosu na fiziološku kontrolu (Kontrola, plava linija). **p** – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.



**Slika 4.25. REM/REM1/REM2 EEG mikrostruktura motorne kore.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativne REM/REM1/REM2 EEG teta (gornji red) i beta amplitude (donji red)/6 h u motornoj kori (MCx), 14 dana nakon bilateralne PPT lezije (BiPPT lezija, crvena linija), u odnosu na fiziološku kontrolu (Kontrola, plava linija). **p** – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.



#### 4.4.3. Topografske razlike lokomotorne kontrole za vreme različitih REM faza spavanja nakon bilateralne PPT lezije

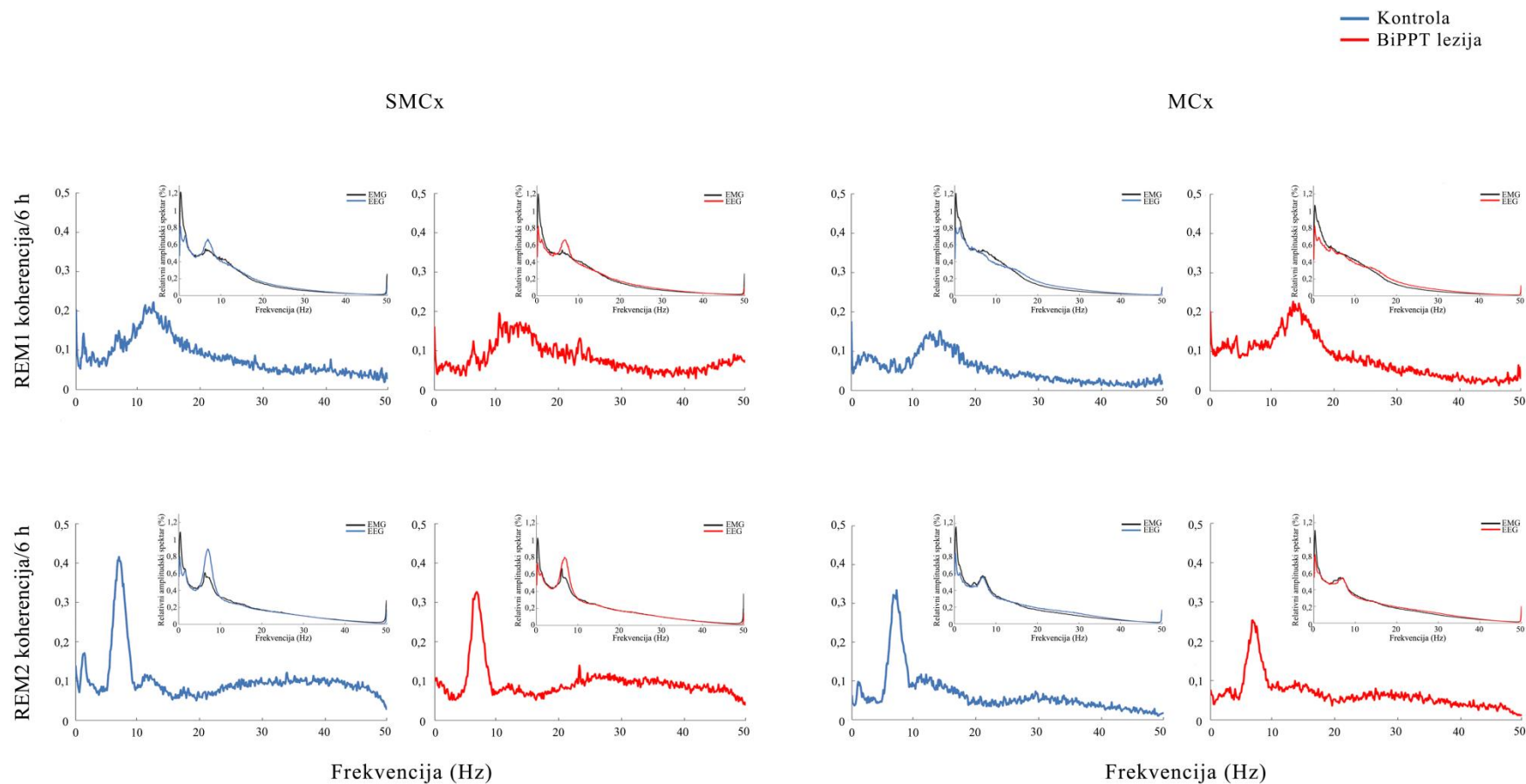
Analiza kortiko-muskularnih koherencija (CMC) u fiziološkoj kontroli je pokazala da se motorna i senzomotorna kontrola mišića vratne muskulature iz kore velikog mozga u toku REM faze spavanja prirodno odlikuje najvišim CMC vrednostima u teta i sigma frekventnom opsegu. Dalja CMC analiza razdvojenih REM faza je pokazala da REM1, definisan kao REM bez atonije (patološki REM), ima najvišu sigma CMC vrednost (**Slika 4.26., Tabela 4.5.**), dok REM2, definisan kao REM sa atonijom (fiziološki REM), ima najvišu teta CMC vrednost (**Slika 4.26., Tabela 4.5.**).

Sa druge strane, bilateralna PPT lezija je dominantno izmenila kontrolu mišića vratne muskulature iz senzomotorne kore, naročito u toku REM2 faze spavanja. U modelu talamo-kortikalne holinergičke denervacije kore velikog mozga pacova korišćenom u ovoj disertaciji, poremećaj motorne kontrole je naročito bio iskazan kroz generalizovani pad REM/REM1/REM2 beta koherencije ( $z \geq -4,31$ ;  $p \leq 0,04$ , **Tabela 4.5.**). Pored toga, bilateralna PPT lezija je promenom i senzomotorne i motorne kontrole izazvala pad sigma koherencije ( $z \geq -2,97$ ;  $p \leq 0,005$ ) u toku REM faze spavanja, koji je u osnovi nastao usled pada sigma koherencije u toku REM2 faze spavanja ( $z \geq -3,98$ ;  $p \leq 0,001$ , **Tabela 4.5.**). Ova promena REM2 sigma koherencije je bila praćena padom REM2 teta koherencije ( $z = -2,91$ ;  $p = 0,002$ , **Tabela 4.5.**) usled izmenjene kontrole mišića vratne muskulature iz motorne kore, a padom REM2 teta, beta i gama koherencije ( $z \geq -3,60$ ;  $p \leq 0,01$ , **Tabela 4.5.**) usled izmenjene kontrole mišića vratne muskulature iz senzomotorne kore.

Bilateralna PPT lezija je prouzrokovala pojavu patološkog REM stanja (REM1, REM bez atonije, REM sigma koherencije), ali i veoma značajno izmenila kontrolu mišića vratne muskulature u toku fiziološkog REM stanja (REM2, REM sa atonijom, REM teta koherencije) i to uglavnom preko izmenjene kontrole mišićne aktivnosti iz senzomotorne kore. Izmenjena kontrola vratnih mišića iz senzomotorne kore, za vreme fiziološkog REM spavanja (REM2), a nakon bilateralne PPT lezije, je bila izražena kao smanjenje teta, sigma, beta i gama CMC vrednosti, a izmenjena kontrola vratnih mišića iz motorne kore kao pad teta i sigma CMC vrednosti.

**Tabela 4.5. REM/REM1/REM2 kortiko-muskularne koherencije (CMC) 14 dana nakon bilateralne PPT lezije.** Grupne srednje vrednosti REM/REM1/REM2 kortiko-muskularnih koherencija u toku 6 h spavanja  $\pm$  standardna greška (SE), 14 dana nakon bilateralne PPT lezije (BiPPT lezija), u odnosu na fiziološku kontrolu (Kontrola). SMCx – senzomotorna kora, MCx – motorna kora. \* statistički značajne srednje vrednosti za  $p \leq 0,04$ .

	<b>Delta</b>	<b>Teta</b>	<b>Sigma</b>	<b>Beta</b>	<b>Gama</b>
<b>SMCx CMC</b>					
<b>REM</b>					
Kontrola	0,10 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01
BiPPT lezija	0,08 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	<b>0,08 <math>\pm</math> 0,01 *</b>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,00 *</b>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01 *</b>
<b>REM1</b>					
Kontrola	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
BiPPT lezija	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	<b>0,05 <math>\pm</math> 0,01 *</b>	0,04 $\pm$ 0,01
<b>REM2</b>					
Kontrola	0,09 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
BiPPT lezija	0,07 $\pm$ 0,01	<b>0,16 <math>\pm</math> 0,02 *</b>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01 *</b>	<b>0,03 <math>\pm</math> 0,00 *</b>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01 *</b>
<b>MCx CMC</b>					
<b>REM</b>					
Kontrola	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
BiPPT lezija	0,12 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	<b>0,09 <math>\pm</math> 0,01 *</b>	0,06 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00
<b>REM1</b>					
Kontrola	0,08 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00
BiPPT lezija	0,08 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
<b>REM2</b>					
Kontrola	0,06 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
BiPPT lezija	0,06 $\pm$ 0,01	<b>0,12 <math>\pm</math> 0,02 *</b>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01 *</b>	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00



**Slika 4.26. REM1 i REM2 kortiko-muskularne koherencije.** REM1 i REM2 grupni srednji spektri koherencije/6 h između EEG-a senzomotorne (SMCx) ili motorne kore (MCx) i EMG-a mišića vratne muskulature kod fiziološke kontrole (Kontrola) i bilateralne PPT lezije (BiPPT lezija) sa njihovim odgovarajućim grupnim relativnim amplitudskim spektrima.

## **5. DISKUSIJA**

---

## **5.1. Poremećaji spavanja u holinergičkoj denervaciji kore velikog mozga pacova ekscitotoksičnom lezijom glavnog izvora kortikalne holinergičke inervacije – lezija jedra *nucleus basalis* (NB)**

NB lezija je izazvala prolazne promene u arhitekturi spavanja i EEG mikrostrukтури, pri čemu su promene bile topografski različito izražene. Iako u slučaju fiziološke kontrole nije bilo razlika u arhitekturi spavanja između senzomotorne i motorne kore (**Slika 4.5 A**), samo bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori smanjila trajanje budnosti i povećala trajanje NREM faze spavanja (**Slika 4.3. A**), dok je u motornoj kori smanjila trajanje budnosti i povećala trajanje REM faze spavanja, dve nedelje nakon lezije (**Slika 4.4. A**). Takođe, i u unilateralnoj i bilateralnoj NB leziji je ustanovljena ista topografska razlika u arhitekturi spavanja između senzomotorne i motorne kore (**Slika 4.5. B, C**).

Analiza EEG mikrostrukture budnosti i spavanja je pre svega pokazala topografski specifične izmene teta amplitude, nezavisne od stanja i stepena neurodegeneracije. Pokazalo se da u svim eksperimentalnim grupama (fiziološka kontrola, unilateralna NB lezija, bilateralna NB lezija) senzomotorna kora ima veću teta amplitudu u toku budnosti, NREM i REM faze spavanja u odnosu na motornu koru (**Slika 4.8.**). Pored toga, bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori izazvala povećanje REM teta amplitude (**Slika 4.6.**) u trajanju od tri nedelje. Istovremeno, u motornoj kori je dve nedelje nakon unilateralne i bilateralne NB lezije teta amplituda bila povećana i u budnosti i u REM fazi spavanja, da bi se 21 dan nakon lezije obe EEG amplitude vratile na kontrolne vrednosti (**Slika 4.7.**).

Ovi rezultati pokazuju da je nakon bilateralne NB lezije REM teta amplituda u senzomotornoj kori bila značajno povećana tokom tri nedelje, iako ova promena nije bila praćena promenom dužine trajanja REM faze spavanja. Na funkcionalnom nivou, ove razlike ukazuju na različitu ulogu holinergičkih NB neurona u regulaciji kortikalne aktivnosti u toku budnosti i u toku REM faze spavanja. Pokazalo se da je za promene u arhitekturi spavanja, kao i za dugotrajno povećanje REM teta amplitude neophodno veće oštećenje NB kortikalne holinergičke inervacije, odnosno bilateralna NB lezija. Sa

druge strane, privremene i topografski različito izražene promene u arhitekturi spavanja, nastale usled holinergičkog deficita izazvanog NB lezijom, mogle bi biti posledica na različit način ostvarene reorganizacije ili izmene u senzitivnosti holinergičkih, glutamatergičkih i GABAergičkih receptora u kori velikog mozga nakon NB holinergičke denervacije. Takođe, poremećaj regulatorne funkcije holinergičkih NB neurona izazvan lezijom, mogao bi biti nadoknađen kompenzatornom funkcijom nekog od brojnih neurotransmitera uključenih u regulaciju ciklusa budnost/spavanje, koji bi preuzeo funkciju holinergičkih NB neurona. Međutim, i pored toga, bilateralna NB lezija je imala dugotrajan i različit efekat na teta amplitudu budnosti i REM faze spavanja.

Za razliku od ovih rezultata, koji dokazuju dominantno izmenjenu REM teta amplitudu, Kaur i sar. (2008) su korišćenjem dva različita ekscitotoksina, ibotenične kiseline i 192IgG-saporina, pokazali da je u oba slučaja bilateralna lezija NB jedra dovela do povećanja delta amplitude tokom svih faza spavanja, kao i da je promena u delta amplitudi bila najveća u NREM fazi spavanja i da je trajala najmanje 27 dana nakon lezije. Iako su projekcije NB neurona ka kori velikog mozga dominantno unilateralne (Semba i Fibiger, 1989), efekat lezije u ovoj studiji nije bio unilateralno izražen. Pored povećanja delta amplitude, NB lezija iboteničnom kiselinom je izazvala i prolazno povećanje NREM teta amplitude, pri čemu je maksimalna promena bila oko 7-10 dana nakon lezije (Kaur i sar., 2008). Međutim, metodološki pristup za lezije NB jedra, korišćen u ovoj studiji, je bio drugačiji u odnosu na metodološki pristup za NB leziju koji je korišćen u ekperimentalnoj proceduri ove doktorske disertacije. Naime, Kaur i sar. (2008) su za lezije koristili i poredili efekte dva ekscitotoksina, ibotenične kiseline, kao neselektivnog, i 192IgG-saporina, kao selektivnog ekscitotoksina. Ekscitotoksin u volumenu od 0,5  $\mu$ l (IBO ili 192IgG-saporin) je ubrizgavan kanilom od nerđajućeg čelika, implantiranom 2 mm iznad NB/*supstancia innominata* (A/P: -1,3; M/L: 2,5; D/V: 5,5). Ovakav pristup u upotrebi ekscitotoksina izaziva daleko veću, odnosno manje selektivnu leziju, bilo kog dubokog jedra u mozgu. U ovoj studiji IBO je na ovaj način napravila deficit GABAergičkih neurona od 43 % i holinergičkih neurona od 21 % u NB, dok je deficit holinergičkih neurona u kori velikog mozga, kao posledica ove lezije, bio 41 %. Sa druge strane, 192IgG-saporin je napravio deficit od 11 % u

slučaju GABAergičkih neurona i 69 % u slučaju holinergičkih neurona u NB, kao i deficit od 84 % holinergičkih neurona u kori velikog mozga (Kaur i sar. 2008).

U eksperimentima ove doktorske disertacije za unilateralne i bilateralne NB lezije nije korišćen selektivni 192IgG-saporin već neselektivni ekscitotoksin IBO, ali je radi postizanja veće selektivnosti pri leziji holinergičke subpopulacije NB neurona korišćena tehnika stereotaksički navođene mikroinfuzije sa Hamilton špricom, iste IBO koncentracije (0,1M IBO), ali 5 puta manjeg volumena (100 nl), za razliku od volumena koji su koristili Kaur i sar. (2008). Ovim metodološkim pristupom je u unilateralnim NB lezijama kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju NB jedra od 900  $\mu$ m napravljen deficit holinergičkih neurona veći od 28 % (**Slika 4.1. B**), sa maksimumom od  $37,88 \pm 11,86$  % u okviru stereotaksičkog opsega 1,40 – 1,60 mm posteriorno od bregme (Šaponjić i sar., 2013). U slučaju bilateralnih NB lezija, deficit holinergičkih neurona je na svakoj strani mozga bio veći od 40 % kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju NB jedra (**Slika 4.2. B**), sa maksimalnim deficitom od  $52,02 \pm 15,49$  % na jednoj, odnosno  $56,16 \pm 8,01$  % na drugoj strani, u okviru stereotaksičkog opsega 1,70 – 1,90 mm posteriorno od bregme (Šaponjić i sar., 2013).

Poznato je da holinergički kompleks bazalnog prednjeg mozga služi kao ekstratalamička veza između ushodnog retikularnog aktivirajućeg sistema moždanog stabla i kore velikog mozga i da stimuliše kortikalnu aktivaciju (Dringenberg i Olmstead, 2003; Sarter i sar., 2009). NB, kao subpopulacija neurona bazalnog prednjeg mozga, ima brojne heterogene projekcije, kako ka kori velikog mozga, tako i ka talamusu (Schliebs i Arendt, 2006). Neurohemijski i funkcionalno gledano, NB jedro zapravo predstavlja heterogenu strukturu, gde su holinergički neuroni isprepletani sa peptidergičkim, GABAergičkim i glutamatergičkim kortikopetalnim neuronima (Hur i Zabrosky, 2005). Pri tom, GABAergički neuroni koji pripadaju kompleksu bazalnog prednjeg mozga imaju pre svega ulogu interneurona, koji povezuju holinergičke neurone, ili se projektuju ka hipokampusu (Schliebs i Arendt, 2006). Sa druge strane, skoro svi NB neuroni koji se projektuju ka kori velikog mozga su holinergički (preko 95 % neurona kod primata, odnosno 80-90 % neurona kod pacova) (Szymusiak, 1995). Elektrofiziološke studije su pokazale da su holinergički i GABAergički NB neuroni važni modulatori kortikalne aktivacije (Detari, 2000) i homeostaze spavanja (Porkka-

Haiskanen i sar., 2002). Holinergički NB neuroni pokazuju najveći stepen aktivnosti tokom kortikalne aktivacije, dok su GABAergički NB neuroni najaktivniji tokom sporotalasnog spavanja (Lee i Jones, 2005). Aktivnost holinergičkih NB neurona je najveća u toku budnosti i REM faze spavanja, kada su i gama i teta EEG aktivnosti maksimalne (Lee i sar., 2005). Aktivnost ovih NB neurona je sinhronizovana sa teta oscilacijama u toku budnosti i REM faze spavanja, a minimalna tokom NREM faze spavanja (Lee i sar., 2005).

Takođe, rezultati ove doktorske disertacije su u saglasnosti sa dokazima da je nivo oslobođenog acetilholina značajno povećan tokom REM faze spavanja u odnosu na budnost, što govori u prilog tome da acetilholin oslobođen iz neurona bazalnog prednjeg mozga ima različitu ulogu u toku REM faze spavanja i u toku budnosti (Vazques i Baghdoyan, 2001). Poznato je da su projekcije pojedinačnih NB neurona ograničene na veoma male zone kore velikog mozga, ne veće od 1 – 2 mm u prečniku (Schliebs i Arendt, 2006). U eksperimentima ove doktorske disertacije antero-posteriorna udaljenost između bilateralnih EEG šraf elektroda, hronično implantiranih u motornu i senzomotornu koru, je bila 4 mm (**Slika 3.3.**). Bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori specifično izazvala porast REM teta amplitude, dok je u motornoj kori izazvala porast teta amplitude i u budnosti i u REM fazi spavanja (**Slike 4.6., 4.7.**). Ovi rezultati na funkcionalnom nivou sugerišu da bi iste holinergičke populacije NB neurona mogle različito da inervišu motornu i senzomotornu koru velikog mozga i da je, kao posledica toga, NB holinergička denervacija kore velikog mozga bila topografski različito izražena kroz arhitekturu spavanja i EEG mikrostrukturu budnosti i spavanja motorne i senzomotorne kore.

Mnoge studije svedoče o povećanoj teta aktivnosti i smanjenom volumenu hipokampusu kao tipičnim znacima AB i blagog kognitivnog poremećaja (Grunwald i sar., 2001). Osnovni izvor holinergičkih projekcija ka hipokampusu je iz kompleksa medijalni septum/dijagonalna traka. Kako u ovoj studiji nije registrovan hipokampalni EEG, a ni aktivnost pojedinačnih neurona ovog regiona, možemo samo da spekuliramo da je NB lezija moguće izmenila i hipokampalnu teta oscilaciju, kao i njen uticaj na kortikalnu teta oscilaciju.



## **5.2. Poremećaji spavanja u holinergičkoj denervaciji kore velikog mozga pacova ekscitotoksičnom lezijom glavnog izvora talamo-kortikalne inervacije – lezije jedra *nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PPT)**

Ekscitotoksična lezija PPT holinergičkih neurona je izmenila strukturu prelaznih stanja u toku spavanja i izazvala generalizovano povećanje kortikalne aktivacije tokom svih faza spavanja u trajanju od 5 nedelja. Promena strukture prelaznih stanja, podjednako izazvana i unilateralnom i bilateralnom PPT lezijom, je bila izražena kao porast broja budnost/REM i REM/budnost prelaza u trajanju od 5 nedelja. Pored toga, bilateralna PPT lezija je u poslednje dve nedelje dodatno izazvala i smanjenje broja NREM/REM i REM/NREM prelaza (**Slika 4.12.**, **Tabela 4.1.**). Sa druge strane, promene EEG mikrostrukture budnosti, NREM i REM faze spavanja (**Slike 4.13. - 4.15.**) su bile izražene kao povećana aktivacija kore velikog mozga i to kao istovremeno povećanje amplitude viših frekventnih opsega (beta i gama amplitude) i smanjenje amplitude nižih frekventnih opsega (delta amplituda).

Iako tokom perioda od 5 nedelja nije bilo promena u arhitekturi spavanja (**Slika 4.11.**) i unilateralna i bilateralna PPT lezija su izazvale „toničan” porast broja budnost/REM i REM/budnost prelaza u periodu od 14 do 35 dana nakon lezije. EEG mikrostrukturu početka PPT holinergičke neurodegeneracije (14 dana nakon lezije), izazvane unilateralnom PPT lezijom, obeležile su porast teta amplitude u toku budnosti (**Slika 4.13.**) i beta amplitude u toku REM faze spavanja (**Slika 4.15.**), dok EEG mikrostruktura NREM faze spavanja (**Slika 4.14.**) nije bila izmenjena. Unilateralna PPT lezija je dugotrajno, tokom 5 nedelja, izmenila samo EEG mikrostrukturu budnosti, gde je dugotrajni porast teta amplitude, od treće nedelje bio praćen smanjenjem delta amplitude (**Slika 4.13.**). Nasuprot tome, EEG mikrostrukturu početka PPT holinergičke neurodegeneracije (14 dana nakon lezije), izazvane bilateralnom PPT lezijom, obeležio je generalizovani porast beta amplitude u svim stanjima, kao i pad NREM delta amplitude i porast REM gama amplitude. Ove promene, koje su trajale 5 nedelja, su od treće nedelje bile praćene padom delta amplitude u toku budnosti (**Slike 4.13.-4.15.**).

U istraživanjima ove doktorske disertacije unilateralne i bilateralne PPT lezije, izvršene tehnikom mikroinfuzije 0,1 M rastvora ibotenične kiseline u volumenu od 100 nl, nisu bile kompletne (**Slike 4.9., 4.10.**). Zapravo, cilj istraživanja i nije bio da se naprave kompletne lezije PPT jedra, već da se korišćenjem kontrolisanog volumena ekscitotoksina postigne selektivnost, sa lezijom unutar granica prostiranja same strukture. Ovim metodološkim pristupom je u PPT – *pars compacta* delu jedra, kao dominantno holinergičkoj neuronskoj subpopulaciji, napravljen deficit holinergičkih neurona veći od 20 % kroz celu PPT antero-posteriornu dimenziju (Petrović i sar., 2013a). Naime, rezultati kvantifikacije unilateralne PPT lezije pokazali su da se deficit holinergičkih PPT neurona kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju PPT jedra (od 6,90 do 8,60 mm posteriorno od bregme) kretao od  $30,19 \pm 14,22$  % do  $41,58 \pm 14,42$  % (**Slika 4.9. B**). Sa druge strane, deficit holinergičkih PPT neurona nakon bilateralne PPT lezije (**Slika 4.10. B**) je bio između  $22,40 \pm 9,02$  % i  $29,65 \pm 8,35$  % na jednoj, odnosno između  $22,17 \pm 7,37$  % i  $31,79 \pm 8,61$  % na drugoj leđiranoj strani mozga (Petrović i sar., 2013a).

Prema originalnom recipročnom interaktivnom modelu regulacije REM spavanja (McCraley i Hobson, 1975) budnost i REM spavanje su dva suprotna stanja kada je u pitanju neurotransmitterska osnova, sa dominacijom monoaminergičke regulacije za vreme budnosti, odnosno dominacijom holinergičke regulacije za vreme REM spavanja (Hobson i Pace-Schott, 2002; Pace-Schott i Hobson, 2002). Teorijske osnove ovog modela su i eksperimentalno potvrđene. Anatomske i elektrofiziološke studije su potvrdile značaj holinergičkog mehanizma u regulaciji REM spavanja, obrazac oslobađanja acetilholina koji zavisi od stanja budnost/spavanje, kao i inhibitorne recipročne interakcije između serotonergičkih/noradrenergičkih i holinergičkih neurona moždanog stabla (ponsa) za vreme REM spavanja (Lydic, 1987; Losier i Semba, 1993; Rye, 1997; Hobson i Pace-Schott, 2002; Pace-Schott i Hobson, 2002). Aktuelna „flip-flop” teorija regulacije REM spavanja (Lu i sar., 2006), postavljena na osnovama starog recipročnog interaktivnog modela, monoaminergičke neurone moždanog stabla, (DR serotonergički i LC nordrenergički neuroni) definiše kao ekscitatorne, a PPT/LDT holinergičke neurone kao inhibitorne modulatore „REM-isključivač” GABA neuronske zone u ponsu.

Iako se PPT jedro smatra jednom od najznačajnijih komponenti ushodnog retikularnog aktivirajućeg sistema (Winn, 2006), čiji holinergički neuroni pojačavaju svoju aktivnost u toku buđenja i pobuđivanja, a bivaju inhibirani kako bi omogućili sporotalasne oscilacije i shodno tome NREM spavanje (Jones, 2003; Steriade, 2003), rezultati istraživanja ove doktorske disertacije su u skladu sa novijim dokazima, koji se nalaze u osnovi najnovije hipoteze koja PPT vidi kao deo kontrolnog sistema koji doprinosi aktivaciji kore velikog mozga za vreme svih faza u toku spavanja, a ne samo za vreme budnosti i REM spavanja (Mena-Segovia i sar., 2008). Prema ovoj novoj hipotezi, holinergički PPT neuroni pored uloge u regulaciji prelaza budnost/spavanje i homeostazi spavanja, imaju aktivnu ulogu i u organizaciji kortikalne aktivnosti tokom sporotalasnog spavanja (Mena-Segovia i sar., 2008). Za razliku od ove nove hipoteze, rezultati drugih istraživanja pokazuju da holinergički, GABAergički i glutamatergički PPT neuroni mogu funkcionisati na paralelan ili recipročan način i da usaglašenom, zajedničkom aktivnošću mogu da modulišu kortikalnu aktivnost kroz celokupan ciklus budnost/spavanje (Boucetta i Jones, 2009).

Međutim, u mozgu postoji više različitih sistema za pobuđivanje (kao na primer, neuronske populacije u regionu retikularne formacije moždanog stabla, talamusa, posteriornog hipotalamusa i bazalnog prednjeg mozga) koji putem ushodnih projekcija ka kori velikog mozga stimulišu kortikalnu aktivaciju, koja se odlikuje visokofrekventnom (EEG gama opseg) i niskofrekventnom (EEG teta opseg) aktivnošću (Boucetta i Jones, 2009). Istovremeno, ovi sistemi putem nishodnih projekcija utiču na mišićni tonus i mišićnu aktivnost. Kao deo sistema za pobuđivanje, talamo-kortikalni (holinergički PPT neuroni) i ekstra-talamički (holinergički NB neuroni bazalnog prednjeg mozga) holinergički sistem podstiču kortikalnu aktivaciju za vreme budnosti i REM spavanja. Sa druge strane, noradrenergički LC neuroni, kao i histaminergički neuroni posteriornog hipotalamusa, podstiču stanje pobuđenosti za vreme budnosti i sprečavaju NREM i REM spavanje, dok serotonergički DR neuroni podstiču mirno stanje budnosti (Jones, 2003). Nijedan od ovih sistema za pobuđivanje nije neophodan da bi se uspostavilo stanje budnosti, ali svaki od njih ima posebnu ulogu u buđenju i spavanju (Jones, 2003). Pored toga, pokazano je da acetilholin i noradrenalin ekscitiraju talamo-kortikalne glutamatergičke neurone, dok ih serotonin može inhibirati (McCormick, 1992; Monckton i McCormick, 2002; Jones, 2003). Sa druge strane,

talamički GABAergički retikularni neuroni su inhibirani acetilholinom i noradrenalinom (Jones, 2003). Holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga su ekscitirani glutamatom, dopaminom, histaminom i oreksinom, dok ih acetilholin i noradrenalin inhibiraju (Jones, 2003).

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije dokazuju da su budnost i REM spavanje, kao stanja sa prirodno visokom aktivnošću holinergičkih PPT neurona i visokom vanćelijskom koncentracijom acetilholina na nivou talamusa, stanja najosetljivija na poremećaj holinergičke PPT kontrole. Lakši ili početni oblik poremećaja holinergičke PPT kontrole (unilateralna PPT lezija) je od samog početka izazvao povećanje broja budnost/REM i REM/budnost prelaza koji se održao tokom 5 nedelja, sa izraženim razlikama u EEG mikrostrukturi budnosti u odnosu na EEG mirostrukturu REM spavanja. Razlikama u posledicama oslabljene PPT holinergičke inervacije doprinose i prirodne razlike u aktivnosti monoaminergičkih neurona za vreme REM spavanja u odnosu na budnost. Sa druge strane, samo je bilateralna PPT lezija (teži ili kasniji oblik poremećaja holinergičke PPT inervacije) izazvala promene u EEG mikrostrukturi i NREM i REM spavanja (stanja sa smanjenom aktivnošću monoaminergičkih neurona). Pri tom su ove promene u EEG mikrostrukturi bile praćene povećanjem broja budnost/REM i REM/budnost prelaza i smanjenjem broja NREM/REM i REM/NREM prelaza. Promene izazvane bilateralnom PPT lezijom su generalno bile izražene kao dugotrajno povećanje beta amplitude budnosti, NREM i REM spavanja (**Slike 4.13.-4.15.**), praćeno smanjenjem delta amplitude budnosti i NREM spavanja i povećanjem REM gama amplitude.

Savremene PET studije na ljudima su pokazale postojanje holinergičkog deficita na nivou talamusa kod PB pacijenata sa ili bez demencije, za razliku od AB pacijenata kod kojih takav deficit nije uočen, sugerišući da bi neurodegeneracija aferentnih holinergičkih projekcija talamusa mogla dodatno uticati na eksprimiranje specifičnih motornih i kognitivnih poremećaja koji prate ovu neurodegenerativnu bolest (Kotagal i sar., 2012b). Kortikalna i subkortikalna holinergička denervacija na nivou talamusa, nastale usled degeneracije PPT holinergičkih neurona, su povezane sa poremećajima ponašanja u toku REM spavanja (Kotagal i sar., 2012a), kao i sa poremećajima u hodu i ravnoteži, uključujući i česte padove kod PB pacijenata (Bohnen i sar., 2009; Bohnen i

Albin, 2011). Neuropatološke studije su pokazale da je kod PB pacijenata prisutna degeneracije oko 50 % holinergičkih PPT neurona, dok kod AB pacijenata nije uočeno smanjenje broja ovih neurona (Bohnen i Albin, 2011). Takođe, kliničke studije su potvrdile efikasnost terapije na bazi AchE inhibitora, donepezila, čija upotreba redukuje i do 50 % padova kod PB pacijenata (Chung i sar., 2009). Različite kliničke studije govore o različitom stepenu holinergičke denervacije kod PB pacijenata, a u skladu sa tim i nepromenjenoj kortikalnoj i/ili subkortikalnoj inervaciji kod jednih, odnosno smanjenoj kod drugih pacijenata (Shinotoh i sar., 1999; Hilker i sar., 2005; Bohnen i sar., 2012). Sve ove studije sugerišu da je PB multisistemska neurodegenerativna bolest i da razlike u stepenu neurodegeneracije u različitim delovima mozga, kao i brzina progresije neurodegenerativnih promena, mogu doprineti postojećim razlikama u kliničkom fenotipu (Bohnen i Albin, 2011). Takođe, mnogobrojne studije ukazuju na značaj duboke stimulacije PPT jedra u lečenju motornih poremećaja u Parkinsonovoj i drugim neurodegenerativnim bolestima (Alam i sar., 2011; Urbano i sar., 2014).

Na osnovu humanih studija, kao i rezultata ove doktorske disertacije, moguće je spekulirati da i u eksperimentalnom modelu PB holinergičke neuropatologije (lezija PPT jedra), poremećen, ali još uvek prisutan, kontrolni sistem holinergičkih PPT neurona doprinosi stanju generalne kortikalne aktivacije. Naime, moguće je da zbog nekompletne lezije PPT holinergičkih neurona i posledično oslabljene inhibicije noradrenergičkih LC neurona, oslabljene ekscitacije talamo-kortikalnih neurona, kao i oslabljene inhibicije GABAergičkih retikulo-talamičkih (RT) neurona, dolazi do dominacije u kontroli noradrenergičkih LC neurona na nivou talamusa (dezinhibirani LC neuroni nakon PPT lezije). Tako, LC neuroni sinergistički sa preostalim PPT holinergičkim neuronima, doprinose olakšanoj talamo-kortikalnoj transmisiji, a na taj način i pojačanoj aktivaciji kore velikog mozga (**Slika 5.1. C**). Homeostaza holinergičko-noradrenergičkih interakcija na nivou moždanog stabla i talamusa koja se uspostavlja AchE inhibitorima, može smanjiti ovu, lezijom uslovljenu, patološku generalizovanu kortikalnu aktivaciju i poboljšati spavanje.

### **5.3. Topografske razlike poremećaja spavanja u degeneracijama funkcionalno različitih holinergičkih inervacija kore velikog mozga pacova**

Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su po prvi put pokazala da je na osnovu EEG mikrostrukture budnosti i spavanja, kao i strukture prelaznih stanja u toku spavanja, moguće razlikovati poremećaje u degeneraciji funkcionalno različitih holinergičkih inervacija kore velikog mozga pacova, naročito u modelima težih, odnosno kasnijih, oblika ovih neurodegeneracija (bilateralna NB lezija u odnosu na bilateralnu PPT leziju). Ovi poremećaji su bili topografski različito izraženi u senzomotornoj u odnosu na motornu koru naročito za vreme NREM i REM spavanja (Petrović i sar., 2013b).

Za razliku od bilateralne NB lezije (poremećaj kortikalne, odnosno ekstratalamičke inervacije kore velikog mozga) koja je u senzomotornoj kori privremeno promenila trajanje budnosti i NREM spavanja, a u motornoj kori trajanje budnosti i REM spavanja, bilateralna PPT lezija (poremećaj talamo-kortikalne inervacije kore velikog mozga) nije izazvala promene u arhitekturi spavanja ni u senzomotornoj, ni u motornoj kori (**Slika 4.16.**).

Iako bilateralna PPT lezija nije promenila arhitekturu spavanja u senzomotornoj kori, izazvala je dugotrajni porast broja budnost/REM i REM/budnost prelaza, kao i promene u broju NREM/REM i REM/NREM prelaza koje nisu bile konzistentne tokom perioda od četiri nedelje. Sa druge strane, bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori tokom perioda od četiri nedelje izazvala dugotrajno smanjenje broja NREM/REM i REM/NREM prelaza (**Tabela 4.2.**). U motornoj kori bilateralna PPT lezija je, kao i u senzomotornoj kori, izazvala porast broja budnost/REM i REM/budnost prelaza i taj porast je bio praćen porastom broja NREM/REM i REM/NREM prelaza do 28 dana nakon lezije. Bilateralna NB lezija je tokom perioda od četiri nedelje u motornoj kori izazvala dugotrajni porast broja NREM/REM i REM/NREM prelaza (**Tabela 4.2.**).

Pokazano je takođe da je EEG mikrostrukturu budnosti, nakon poremećaja holinergičke inervacije usled bilateralne PPT lezije, obeležilo smanjenje delta amplitude i porast beta amplitude (**Slika 4.17. A, C**). Progresija holinergičkog deficita nastalog

usled bilateralne NB lezije je u senzomotornoj kori na kraju izazvala iste promene u EEG mikrostrukturi budnosti kao i progresija holinergičkog deficita usled bilateralne PPT lezije. Drugim rečima, 28 dana nakon lezije nije bilo razlike u EEG mikrostrukturi budnosti između bilateralne NB i bilateralne PPT lezije. Nasuprot EEG mikrostrukturi budnosti, bilateralna NB lezija je u senzomotornoj kori povećala samo REM teta amplitudu tokom tri nedelje, dok je bilateralna PPT lezija povećala NREM beta i REM beta i gama amplitudu tokom perioda od četiri nedelje (**Slike 4.18., 4.19.**).

Za razliku od EEG mikrostrukture budnosti u senzomotornoj kori, gde su se razlike između bilateralne NB i bilateralne PPT lezije izgubile nakon četiri nedelje, u motornoj kori su se ove razlike, uslovljene bilateralnom PPT lezijom, održale (**Slika 4.17.**). Četiri nedelje nakon lezija, NREM mikrostrukturu u motornoj kori su obeležile razlike u teta amplitudi, uslovljene bilateralnom NB lezijom (**Slika 4.18.**), dok su REM mikrostrukturu obeležile razlike u beta i gama amplitudi, uslovljene bilateralnom PPT lezijom (**Slika 4.19.**).

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije vezani za topografske razlike, naročito u strukturi prelaznih stanja u toku spavanja i NREM i REM EEG mikrostrukturi motorne kore, koje su nastale nakon funkcionalno različitih holinergičkih denervacija velikog mozga pacova, su u skladu sa istraživanjima koja ukazuju na to da bi topografska specifičnost holinergičke NB neuropatologije (deficit holinergičkih NB neurona), mogla nastati upravo usled različite inervacije motorne i senzomotorne kore od strane istih populacija holinergičkih NB neurona (Fournier i sar., 2004; Schliebs i Arendt, 2006), kao i sa činjenicom da je PPT glavni centar regulacije integrativne holinergičke kontrole i kontrole celokupnog REM fenomena (Datta i MacLean, 2007). Takođe je bitno napomenuti da iako su NB i PPT dominantno holinergičke populacije neurona, ipak se radi o heterogenim moždanim strukturama koje pored holinergičkih sadrže i GABAergičke i glutamatergičke neurone. Kako su u ovoj studiji lezije, napravljene korišćenjem tehnike stereotaksički navođene mikroinfuzije i neselektivnog ekscitotoksina, ibotenične kiseline, praćene samo kroz deficit holinergičkih neurona, nije moguće isključiti eventualni deficit i neholinergičkih neurona, a samim tim i mogućnost njihovog uticaja, barem delimično.

Aferentna vlakna holinergičkog sistema bazalnog prednjeg mozga imaju važnu ulogu u promeni obrasca kortikalne aktivnosti sa deaktiviranog sporotalasnog na aktivirani visokofrekventni EEG/ECOG obrazac (Dringenberg i Olmstead, 2003). Kortikalna ulazna vlakna koja potiču iz talamusa čine drugi veliki sistem uključen u regulaciju kortikalne EEG/ECOG aktivnosti. Mada lokalna talamička mreža koju čine talamički interneuroni retikularnog jedra (RT) i talamo-kortikalni projekcioni neuroni, generiše oscilacije (vretena spavanja) koje su povezane sa smanjenom aktivnošću organizama i ranim stadijumima spavanja (stadijumi 1 i 2) i blokiraju ulazne senzorne informacije (Steriade, 2000; Steriade, 2003), lezije talamičkih i RT neurona kod mačaka i pacova ukidaju ove oscilacije, ali se visokofrekventna aktivacija održava (Buzsaki i sar., 1988; Vanderwolf i Stewart, 1988). Ovi eksperimentalni dokazi ukazuju na to da očuvanost talamusa nije od suštinske važnosti za ostvarivanje kortikalne aktivacije, mada može uticati na sposobnost drugih sistema, na primer holinergičkog, da izazove kortikalnu aktivaciju. Kod pacova, holinergičke projekcije ka talamusu dolaze isključivo iz PPT jedra, sa izuzetkom RT neurona koji primaju holinergička vlakna i iz bazalnog prednjeg mozga i iz PPT jedra (Williams i sar., 1994).

Rezultati ove doktorske disertacije koji se odnose na suprotan efekat koji je bilateralna NB lezija imala na strukturu NREM/REM i REM/NREM prelaza u senzomotornoj u odnosu na motornu koru, kao i stabilan porast NREM/REM i REM/NREM prelaza u motornoj kori nakon bilateralne PPT lezije ukazuju na: razliku u holinergičkoj NB inervaciji senzomotorne i motorne kore velikog mozga pacova; direktnu potencijaciju kontrole motorne kore od strane holinergičkih NB neurona (usled različite NB inervacije senzomotorne i motorne kore) nakon denervacije (dezinhibicije) NB neurona usled bilateralne PPT lezije; potencijaciju uticaja (na nivou talamusa) neuronske mreže između kore velikog mozga i bazalnih ganglija na motornu koru nakon bilateralne PPT lezije.

Intrakranijalno registrovanje EEG aktivnosti kod ljudi je pokazalo da za vreme hodanja u snu i lucidnih snova postoji disocijacija aktivnosti različitih regiona mozga (Bassetti i sar., 2000; Voss i sar., 2009), kao i da hipokampus i kora velikog mozga u isto vreme pokazuju karakteristike i NREM i REM faze spavanja (Moroni i sar., 2012). Ova istraživanja ukazuju na to da je spavanje kompleksno ponašanje i da predstavlja



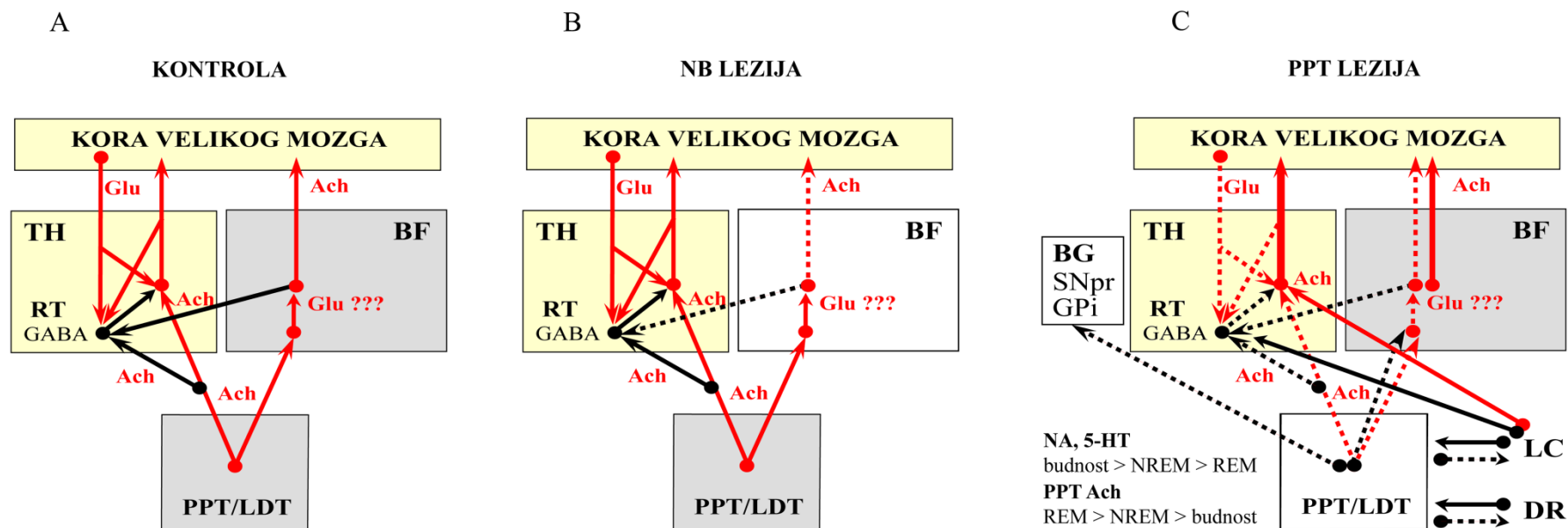
više lokalni, nego globalni fenomen (Genzel i Dresler, 2012). Na osnovu dokazanih specifičnih topografskih razlika u poremećajima funkcionalno različitih holinergičkih inervacija kore velikog mozga pacova, rezultati ove doktorske disertacije su u skladu sa lokalnim konceptom spavanja kao ponašanja i ukazuju na to da je patološka disocijacija stanja budnosti i spavanja, strukture njihovih prelaza i EEG ritmova senzomotorne kore u odnosu na motornu koru, posledica različitih poremećaja ulazno-izlaznih veza NB i PPT funkcionalnih regulatornih mreža.

Oscilatorna aktivnost u beta frekventnom opsegu (beta ritam) u normalnom EEG zapisu zdravih ljudi je povezana sa održavanjem motorne aktivnosti koja je u toku. Mada je PB patologija složena i obuhvata odumiranje neurona kroz više faza i u različitim delovima mozga, uključujući i holinergičke PPT neurone (Kotagal i sar., 2012a, 2012b), povećana oscilatorna aktivnost u beta frekventnom opsegu kortikobazalnog puta, koja se javlja kod osoba sa PB, predstavlja jedan od važnih neurofizioloških fenomena povezanih sa PB neuropatologijom (Stein i Bar-Gad, 2013). Kod zdravih životinja i ljudi beta ritam je povezan i sa kognitivnim i sa motornim funkcijama i pretpostavlja se da ima ključnu ulogu u održavanju trenutnog stanja, odnosno da održava „status quo” (Engel i Fries, 2010). U ovom kontekstu, povećana beta amplituda u PB konstantno signalizira ostatku mozga da održi trenutno stanje (ponašanje) i smanji prelaze u druga stanja, što rezultira akinezijom i bradikinezijom (Stein i Bar-Gad, 2013). Sa druge strane, pokazano je da su gama oscilacije prisutne u širokoj neuronskoj mreži, koja uključuje bazalne ganglije, talamus i motornu koru, a opisano je i njihovo prisustvo u raznim bolestima, za vreme povećane pobuđenosti i voljnih pokreta (Jenkinson i sar., 2013). Takođe, pokazano je da dopaminergička terapija podstiče gama aktivnost, a korelacija između gama amplitude i kinetike ekstremiteta ide u prilog hipotezi da je povećanje gama aktivnosti mozga važno u regulaciji započinjana pokreta (Jenkinson i sar., 2013). U zdravom mozgu, beta ritam se smatra akinetičkom oscilacijom, a gama ritam prokinetičkom oscilacijom, i njihov inverzan odnos, kao i njihov odnos prema kretanju se održava i u parkinsonizmu (Stein i Bar-Gad, 2013; Engel i Fries, 2010). Dobro je poznato da izlazna vlakna bazalnih ganglija (eferentna vlakna koja polaze iz *globus pallidus internus* - GPi i *substantia nigra pars reticulata* - SNpr) idu prvenstveno ka talamusu i odatle dalje ka frontalnoj kori, formirajući na taj način delimično zatvorenu petlju između kore velikog mozga i

bazalnih ganglija. PPT kao talamo-kortikalni holinergički sistem i kao deo uzlaznog retikularnog aktivirajućeg sistema, monosinaptički inerviše SNpr, a u manjoj meri i GP (Jenkinson i sar., 2009). Imajući u vidu PPT eferentne veze, bilateralna PPT lezija može veoma ozbiljno da utiče na retikularne talamičke (RT) neurone, neuronsku petlju između kore velikog mozga i bazalnih ganglija, kao i na NB.

Na kraju, na osnovu svih dobijenih rezultata, možemo da spekuliramo da oslabljena holinergička PPT inhibitorna kontrola LC noradrenergičkih neurona, RT talamičkih neurona, GABAergičkih neurona „REM – isključivača”, kao i oslabljena holinergička PPT ekscitatorna kontrola talamokortikalnih neurona, uz poremećaj kontrole NB holinergičkih neurona i kontrole bazalnih ganglija, doprinose toničnoj ili generalizovanoj povećanoj aktivaciji mozga (porastu EEG beta i gama amplitude) kao i toničnom porastu broja budnost/REM i REM/budnost prelaza, posebno u motornoj kori. Šema PPT i NB glavnih ushodnih holinergičkih puteva za kontrolu budnosti i REM faze spavanja u kontrolnim uslovima i u poremećajima funkcionalno različitih holinergičkih inervacija je prikazana na **Slici 5.1**.

Pored poremećaja multitransmiterskih regulacija nakon PPT holinergičke denervacije, naši skorašnji rezultati ukazuju takođe da čak i lakši oblik talamo-kortikalne holinergičke denervacije (unilateralni PPT holinergički deficit > 17% u celoj antero-posteriornoj dimenziji PPT jedra) uslovljava udaljenu astrogliozu u NB jedru (Bataveljić i sar., 2014). Obzirom da astrociti sintezom i oslobađanjem kinurenske kiseline, endogenog antagoniste  $\alpha 7$  nikotiskih Ach receptora, mogu uticati na kortikalnu holinergičku transmisiju (Zmarowski i sar., 2009), moguće je da nakon bilateralnih PPT lezija pojačana, anatomo-funkcionalna PPT-NB astroglioza dodatno slabi već oslabljenu PPT holinergičku transmisiju putem pojačanog oslobađanja kinurenske kiseline i predstavlja dodatni faktor koji doprinosi daleko ozbiljnijim poremećajima spavanja nastalim nakon bilateralne PPT lezije, kao i razlikama u poremećajima nastalim degeneracijom funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova.



**Slika 5.1.** Šematski prikaz glavnih ushodnih PPT i NB holinerških puteva za kontrolu budnosti i REM faze spavanja u kontrolnim uslovima (A) i u poremećajima holinerške inervacije velikog mozga pacova (B, C). TH – talamus; RT – retikulo-talamički neuroni; BF – bazalni prednji mozak; PPT – *nucleus pedunculopontinus tegmentalis*; LDT – *nucleus tegmentum laterodorsalis*; LC – *locus coeruleus*; DR – *nucleus raphe dorsalis*; BG – bazalne ganglije; SNpr – *nucleus substantiae nigrae pars reticulata*; GPi – *globus pallidus internus*; Ach – acetilholin; Glu – glutamat; GABA – gama-aminobuterna kiselina; NA – noradrenalin; 5-HT – serotonin. Crvene linije – ekscitatorna kontrola; Crne linije – inhibitorna kontrola.

#### **5.4. Poremećaji REM faze spavanja u talamo-kortikalnoj denervaciji velikog mozga pacova (PPT lezija)**

Rezultati ove studije po prvi put pokazuju da bilateralna PPT lezija dovodi do izdvajanja dva različita REM stanja u okviru REM faze spavanja: REM1 (REM bez atonije, patološki REM, ili REM sigma koherencije) i REM2 (REM sa atonijom, fiziološki REM, ili REM teta koherencije). Izdvajanje dva funkcionalno različita REM stanja je naročito izraženo u motornoj kori (**Slike 4.20., 4.26.**). Takođe, rezultati pokazuju da je dve nedelje nakon bilateralne PPT lezije u motornoj kori došlo do povećanja dužine trajanja REM faze spavanja i to usled povećanja dužine trajanja REM1 faze (**Slika 4.21.**). Istovremeno je u obe kore (SMCx i MCx) došlo do patološkog povećanja broja budnost/REM1/budnost prelaza i NREM/REM2/NREM prelaza (**Slike 4.22., 4.23., Tabele 4.3., 4.4.**). Pored toga, bilateralna PPT lezija je izmenila i REM EEG mikrostrukturu tako što je izazvala povećanje REM EEG beta amplitude u senzomotornoj kori (**Slika 4.24.**) i povećanje REM1 EEG teta amplitude u motornoj kori (**Slika 4.25.**).

Osim različite ukupne snage mišića dorzalne vratne muskulature, REM1 i REM2 imaju topografski različito izraženu EEG mikrostrukturu (**Slike 4.24., 4.25.**) kao i lokomotornu kontrolu mišića dorzalne vratne muskulature (**Tabela 4.5.**). Rezultati CMC analize (**Slika 4.26.**) su pokazali da se i u kontrolnim i u patološkim uslovima, REM1 stanje odlikuje najvišim sigma CMC vrednostima (REM1 – REM sigma koherencije), za razliku od REM2 stanja koje se odlikuje najvišim teta CMC vrednostima (REM2 – REM teta koherencije). Bilateralna PPT lezija je značajno izmenila kontrolu mišića dorzalne vratne muskulature za vreme REM2 stanja (fiziološki REM, REM sa atonijom, ili REM teta koherencije) i to uglavnom preko izmenjene kontrole mišićne aktivnosti iz senzomotorne kore, dok je novonastalo REM1 stanje (patološki REM, REM bez atonije, ili REM sigma koherencije), izuzev izmenjene beta koherencije usled poremećaja lokomotorne kontrole iz senzomotorne kore, ostalo stabilno. Izmenjena lokomotorna kontrola mišića dorzalne vratne muskulature iz senzomotorne kore, nastala kao posledica PPT holinergičke denervacije velikog mozga je bila izražena kao generalizovan pad REM/REM1/REM2 beta koherencije (Petrović i sar., 2014).

Postoje dokazi o tome da oscilatorna aktivnost senzomotorne kore pokazuje koherenciju sa mišićnom aktivnošću u beta frekventnom opsegu tokom slabe do umerene izometrijske mišićne kontrakcije, kako kod ljudi, tako i kod životinja. Smatra se da je ova beta kortiko-muskularna koherencija eferentni fenomen, odnosno oscilacija koja se širi od kore velikog mozga do spinalnih motoneurona preko kortiko-spinalnog puta (Ushiyama i sar., 2010; Jung i sar., 2012). CMC kvantitativno odražava vezu između kore velikog mozga i motoneurona i može se koristiti kao mera (indeks) kortikalne lokomotorne kontrole odgovarajućeg mišića (Jung i sar., 2012). Istovremeno, CMC odražava i očuvanost piramidalnog puta i ima važnu ulogu u integraciji senzomotornih informacija (Kamp i sar., 2013). CMC je ustanovljena kao mera kvantifikacije funkcionalne veze u frekventnom domenu između motorne kore i kontralateralnog perifernog mišića, odnosno kao mera integriteta piramidalnog sistema (Krause i sar., 2014). Pokazano je da je tokom slabe do umerene izometrijske kontrakcije izražena CMC u beta frekventnom domenu (Kristeva i sar., 2007). Za razliku od tremora koji je povezan sa povećanom sinhronizacijom oscilacija u beta frekventnom domenu (Krause i sar., 2014), usporavanje pokreta (bradikinezija, akinezija i rigidnost) kod PB pacijenata je povezana sa smanjenjem beta CMC vrednosti (Salenius i sar., 2002).

Rezultati ove doktorske disertacije su u skladu sa istraživanjima koja govore da degeneracija PPT holinergičkih neurona može biti uzrok motornih simptoma kod osoba sa PB i RBD (Peever i sar., 2014). Obzirom da PPT jedro ima funkciju u kontroli celokupnog REM fenomena (Datta i MacLean, 2007), uključujući i motornu kontrolu, i da preko svojih nishodnih holinergičkih projekcija izaziva pojavu atonije antigravitacione muskulature u toku REM faze spavanja (Grace i sar., 2013; Peever i sar., 2014; Torontali i sar., 2014), oštećenje ovog jedra može usloviti izdvajanje patološkog REM1 stanja. Prisustvo REM1 stanja, odnosno REM-a bez atonije, u eksperimentalnom modelu PB holinergičke neuropatologije u pacova, korišćenom u ovoj doktorskoj disertaciji, predstavlja poremećaj ponašanja u REM fazi spavanja (patološki REM) i važan je znak početka neurodegeneracije u PB.

Rezultati ove doktorske disertacije dokazuju po prvi put da je bilateralni deficit holinergičkih PPT neurona veći od 23 % kroz celokupnu antero-posteriornu dimenziju

oba PPT jedra uslovio nastanak novog, patološkog REM stanja (REM1, REM bez atonije, REM sigma koherencije) pored fiziološkog REM stanja (REM2, REM sa atonijom, REM teta koherencije). Ova dva REM stanja, koja nastaju kao posledica oslabljene PPT holinergičke kontrole, su različita stanja u odnosu na: totalnu EMG snagu mišića vratne muskulature, topografski različite EEG mikrostrukture i različite lokomotorne kontrole mišića dorzalne vratne muskulature iz senzomotorne i motorne kore (Petrović i sar., 2014).

## **6. ZAKLJUČCI**

---

U skladu sa postavljenim ciljevima i dobijenim rezultatima ove doktorske disertacije moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. Degeneracija glavnog kortikalnog izvora holinergičke inervacije velikog mozga pacova (NB lezija) izazvala je:
  - a. Topografski specifične promene u arhitekturi spavanja i relativnoj teta amplitudi budnosti i REM faze spavanja.
  - b. Za promene u arhitekturi spavanja, kao i za dugotrajno povećanje REM teta amplitude neophodno je veće oštećenje NB kortikalne holinergičke inervacije, odnosno bilateralna NB lezija.
  - c. Topografska specifičnost NB neuropatologije za vreme budnosti i REM faze spavanja ukazuje na različitu funkciju holinergičkih NB neurona za vreme ovih stanja, kao i na mogućnost različite inervacije motorne i senzomotorne kore velikog mozga pacova od strane istih populacija holinergičkih NB neurona.
  
2. Degeneracija glavnog talamo-kortikalnog izvora holinergičke inervacije velikog mozga pacova (PPT lezija) izazvala je:
  - a. Promene u strukturi prelaznih stanja u toku spavanja i generalizovano povećanje kortikalne aktivacije tokom svih faza spavanja u trajanju od 5 nedelja.
  - b. U osnovi izmenjene strukture prelaznih stanja, nastale usled talamo-kortikalne holinergičke denervacije, nalazi se porast broja budnost/REM i REM/budnost prelaza.
  - c. Povećanu kortikalnu aktivaciju tokom svih faza spavanja, nastalu usled talamo-kortikalne holinergičke denervacije, obeležilo je povećanje amplitude viših frekventnih opsega (beta i gama amplitude) i smanjenje amplitude nižih frekventnih opsega (delta amplituda).



3. Degeneracije funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova u modelima težih oblika neurodegeneracija (bilateralna NB lezija u odnosu na bilateralnu PPT leziju) dodovi do:
  - a. Topografski specifičnih promena u strukturi prelaznih stanja i EEG mikrostrukturi na osnovu kojih je moguće razlikovati poremećaje funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova.
  - b. Razlike nastale usled degeneracije funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova su naročito izražene u motornoj kori za vreme NREM i REM faze spavanja.
  - c. Oslabljena PPT holinergička kontrola uslovljava direktnu potencijaciju kontrole motorne kore od strane holinergičkih NB neurona (usled različite NB inervacije senzomotorne i motorne kore), a na nivou talamusa potencijaciju uticaja noradrenergičkih LC neurona i neuronske mreže između kore velikog mozga i bazalnih ganglija na motornu koru.
  
4. Degeneracija glavnog talamo-kortikalnog izvora holinergičke inervacije velikog mozga pacova (PPT lezija) dodatno je usloвила:
  - a. Izdvajanje dva različita REM stanja u okviru REM faze spavanja: REM1 (REM bez atonije, patološki REM, ili REM sigma koherencije) i REM2 (REM sa atonijom, fiziološki REM, ili REM teta koherencije).
  - b. Izdvojena REM stanja, REM1 i REM2, pored razlike u ukupnoj snazi mišića dorzalne vratne muskulature razlikuje i specifična topografija EEG mikrostrukture, kao i lokomotorna kontrola mišića dorzalne vratne muskulature.
  - c. PPT lezija je izazvala generalizovan pad REM/REM1/REM2 beta koherencije i dominantno izmenila kontrolu vratnih mišića iz senzomotorne kore za vreme REM2 stanja (REM sa atonijom, fiziološki REM, ili REM teta koherencije), dok je novonastalo REM1 stanje (REM bez atonije, patološki REM, REM sigma koherencije), izuzev izmenjene beta koherencije usled poremećaja lokomotorne kontrole iz senzomotorne kore, ostalo stabilno.

Rezultati ove doktorske disertacije su po prvi put pokazali da se poremećaji funkcionalno različitih inervacija velikog mozga pacova (NB lezija u odnosu na PPT leziju) mogu razlikovati na nivou EEG aktivnosti, kroz topografski specifične promene arhitekture spavanja, strukture prelaznih stanja u toku spavanja i EEG mikrostrukture budnosti, NREM i REM faze spavanja. Sve dokazane topografske razlike u arhitekturi spavanja, strukturi prelaznih stanja i EEG mikrostrukтури između senzomotorne i motorne kore velikog mozga pacova, kako u kontrolnim uslovima tako i nakon NB ili PPT lezije, ukazuju da je spavanje kao ponašanje više lokalni nego globalni fenomen.

Takođe, po prvi put je pokazano da poremećaj talamo-kortikalne inervacije velikog mozga pacova (PPT lezija) uslovljava nastanak novog, patološkog REM stanja (REM1, REM bez atonije, REM sigma koherencije). Veoma ozbiljni poremećaji u spavanju nastali usled oslabljene PPT holinergičke kontrole, za razliku od oslabljene NB holinergičke kontrole, bili su izraženi kao: porast broja budnost/REM i REM/budnost prelaza, povećana kortikalna aktivacija u toku svih faza spavanja, dva različita REM stanja, kao i dominantna izmena senzomotorne kontrole mišića dorzalne vratne muskulature iskazane kao pad REM/REM1/REM2 beta koherencije.

## **7. LITERATURA**

---

1. Alam, M., Schwabe, K., and Krauss, J.K. (2011) The pedunculopontine nucleus area: critical evaluation of interspecies differences relevant for its use as a target for deep brain stimulation. *Brain*, **134**, 11-23.
2. Alam, M.N., Szymusiak, R., Gong, H., King, J., and McGinty, D. (1999) Adenosinergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis. *The Journal of Physiology*, **521**, 679-690.
3. Amzica, F., and da Silva, F.H.L. (2011) Cellular Substrates of Brain Rhythms. In: *Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, 6<sup>th</sup> ed. (Eds. D.L. Schomer, F.H.L. da Silva), 33-63. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
4. Arendash, G.W., Millard, W.J., Dunn, A.J., and Meyer, E.M. (1987) Long-term neuropathological and neurochemical effects of nucleus basalis lesions in the rat. *Science*, **238**, 952-956.
5. Aserinsky, E., and Kleitman, N. (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*, **118**, 273-274.
6. Bassetti, C., Vella, S., Donati, F., Wielepp, P., and Weder, B. (2000) SPECT during sleepwalking. *Lancet*, **356**, 484-485.
7. Bataveljic, D., Petrovic, J., Lazic, K., Saponjic, J., and Andjus, P. (2014) Glial response in the rat models of functionally distinct cholinergic neuronal denervations. *Journal of Neuroscience Research*, DOI: 10.1002/jnr.23483.

8. Bayer, T.A. (2013) Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders? *European Neuropsychopharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.03.007>.
9. Bezard, E., and Przedborski, S. (2011) A tale on animal models of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, **26**, 993-1002.
10. Bixler, E.O., Vgontzas, A.N., Lin, H.M., Calhoun, S.L., Vela-Bueno, A., and Kales, A. (2005) Excessive daytime sleepiness in a general population sample: The role of sleep apnea, obesity, diabetes and depression. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 4510-4515.
11. Bjelobaba, I., and Saponjic, J. (2013) High volume microinfusion suppresses local astrocyte response within nucleus basalis of rat. *Archives Italiennes de Biologie*, **151**, 24-32.
12. Blandini, F., and Armentero, M.T. (2012) Animal models of Parkinson's disease. *The FEBS Journal*, **279**, 1156-1166.
13. Boeve, B.F. (2013) Idiopathic REM sleep behaviour disorder in the development of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, **12**, 469-482.
14. Boeve, B.F., Silber, M.H., Saper, C.B., Ferman, T.J., Dickson, D.W., Parisi, J.E., Benarroch, E.E., Ahlskog, J.E., Smith, G.E., Caselli, R.C., Tippman-Peikert, M., Olson, E.J., Lin, S.C., Young, T., Wszolek, Z., Schenck, C.H., Mahowald, M.W., Castillo, P.R., Del Tredici, K., and Braak, H. (2007) Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain*, **130**, 2770-2788.

15. Bohnen, N.I., and Albin, R.L. (2011) The cholinergic system and Parkinson disease. *Behavioural Brain Research*, **221**, 564-573.
16. Bohnen, N.I., Kaufer, D.I., Hendrickson, R., Ivanco, L.S., Lopresti, B., Davis, J.G., Constantine, G., Mathis, C.A., Moore, R.Y., and DeKosky, S.T. (2005) Cognitive correlates of alterations in acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, **380**, 127-132.
17. Bohnen, N.I., Muller, M.L., Koeppe, R.A., Studenski, S.A., Kilbourn, M.A., Frey, K.A., and Albin, R.L. (2009) History of falls in Parkinson disease is associated with reduced cholinergic activity. *Neurology*, **73**, 1670-1676.
18. Bohnen, N.I., Muller, M.L., Kotagal, V., Koeppe, R.A., Kilbourn, M.R., Gilman, S., Albin, R. L., and Frey, K.A. (2012) Heterogeneity of cholinergic denervation in Parkinson's disease without dementia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **32**, 1609-1617.
19. Boucetta, S., and Jones, B.E. (2009) Activity profiles of cholinergic and intermingled GABAergic and putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of urethane-anesthetized rats. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 4664-4674.
20. Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, **24**, 197-211.

21. Braidy, N., Munoz, P., Palacios, A.G., Castellano-Gonzalez, G., Inestrosa, N.C., Chung, R.S., Sachdev, P., and Guillemin, G.J. (2012) Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. *Journal of Neural Transmission*, **119**, 173-195.
22. Bremer, F. (1936) Nouvelles recherches sur le mecanisme du sommeil. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, **122**, 460-464.
23. Bringmann, A. (1995) Different functions of rat's pedunculopontine tegmental nucleus are reflected in cortical EEG. *NeuroReport*, **6**, 2065-2068.
24. Buzsaki, G. (1996) The hippocampo-neocortical dialogue. *Cerebral Cortex*, **6**, 81-92.
25. Buzsaki, G., Bickford, R.G., Ponomareff, G., Thal, L.J., Mandel, R. and Gage, F.H. (1988) Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *The Journal of Neuroscience*, **8**, 4007-4026.
26. Cape, E.G., and Jones, B.E. (2000) Effects of glutamate agonist versus procaine microinjections into the basal forebrain cholinergic cell area upon gamma and theta EEG activity and sleep-wake state. *European Journal of Neuroscience*, **12**, 2166-2184.
27. Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J.A., Williams, S.C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T.E., Nakazato, M., Hammer, R.E., Saper, C.B., and Yanagisawa, M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, **98**, 437-451.

28. Chen, M.C., Yu, H., Huang, Z.L., and Lu, J. (2013) Rapid eye movement sleep behavior disorder. *Current Opinion in Neurobiology*, **23**, 793-798.
29. Chung, K.A., Lobb, B.M., Nutt, J.G., and Horak, F. (2009) Cholinergic augmentation in frequently fallings subjects with Parkinson's disease. *Movement Disorders* **24**, S259.
30. Crick, F., and Mitchison, G. (1983) The function of dream sleep. *Nature*, **304**, 111-114.
31. Datta, S. (1997) Cellular basis of pontine ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **17**, 341-365.
32. Datta, S., and MacLean, R.R. (2007) Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **31**, 775-824.
33. Datta, S., and Siwek, D.F. (1997) Excitation of the brain stem pedunculopontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *Journal of Neurophysiology*, **77**, 2975-2988.
34. Dawson, T.M., Bredt, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M., and Snyder, S.H. (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 7797-7801.



35. Day, J., Damsma, G., and Fibiger, H.C. (1991) Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **38**, 723-729.
36. Deboer, T., Vansteensel, M.J., Detari, L., and Meijer, J.H. (2003) Sleep states alter activity of suprachiasmatic nucleus neurons. *Nature Neuroscience*, **6**, 1086-1090.
37. Dement, W. (1958) The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **10**, 291-296.
38. Dement, W., and Kleitman, N. (1957) Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **9**, 673-690.
39. Detari, L. (2000) Tonic and phasic influence of basal forebrain unit activity on the cortical EEG. *Behavioural Brain Research*, **115**, 159-170.
40. Detari, L., and Vanderwolf, C.H. (1987) Activity of identified cortically projecting and other basal forebrain neurones during large slow waves and cortical activation in anaesthetized rats. *Brain Research*, **437**, 1-8.
41. Dringenberg, H.C. (2000) Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' - evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behavioural Brain Research*, **115**, 235-249.

42. Dringenberg, H.C., and Olmstead, M.C. (2003) Integrated contributions of basal forebrain and thalamus to neocortical activation elicited by pedunculopontine tegmental stimulation in urethane-anesthetized rats. *Neuroscience*, **119**, 839-853.
43. Duty, S., and Jenner, P. (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology*, **164**, 1357-1391.
44. Engel, A.K., and Fries, P. (2010) Beta-band oscillations--signalling the status quo? *Current Opinion in Neurobiology*, **20**, 156-165.
45. Feenstra, M.G., Botterblom, M.H., and Mastebroek, S. (2000) Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience*, **100**, 741-748.
46. Fournier, G.N., Semba, K., and Rasmusson, D.D. (2004) Modality- and region-specific acetylcholine release in the rat neocortex. *Neuroscience*, **126**, 257-262.
47. Garcia-Rill, E. (1991) The pedunculopontine nucleus. *Progress in Neurobiology*, **36**, 363-389.
48. Garcia-Rill, E., Charlesworth, A., Heister, D., Ye, M., and Hayar, A. (2008) The developmental decrease in REM sleep: the role of transmitters and electrical coupling. *Sleep*, **31**, 673-690.

49. Genzel, L., and Dresler, M. (2012) Sleep - more local and complex than previously thought? *Frontiers in Neurology*, **3**, (89), 1-2.
50. Giannakopoulos, P., Kovari, E., Gold, G., von Gunten, A., Hof, P.R., and Bouras, C. (2009) Pathological substrates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, **24**, 20-29.
51. Gower, A.J. (1986) Lesioning of the nucleus basalis in the rat as a model of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **12**, 432-434.
52. Grace, K.P., Hughes, S.W., and Horner, R.L. (2013) Identification of the mechanism mediating genioglossus muscle suppression in REM sleep. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **187**, 311-319.
53. Grunwald, M., Busse, F., Hensel, A., Kruggel, F., Riedel-Heller, S., Wolf, H., Arendt, T., and Gertz, H.J. (2001) Correlation between cortical theta activity and hippocampal volumes in health, mild cognitive impairment, and mild dementia. *Journal of Clinical Neurophysiology*, **18**, 178-184.
54. Guan, Z., Vgontzas, A.N., Bixler, E.O., and Fang, J. (2008) Sleep is increased by weight gain and decreased by weight loss in mice. *Sleep*, **31**, 627-633.
55. Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., and Sakurai, T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, **30**, 345-354.
56. Herholz, K., Carter, S.F., and Jones, M. (2007) Positron emission tomography imaging in dementia. *The British Journal of Radiology*, **80**, S160-167.

57. Hess, R., Jr., Koella, W.P., and Akert, K. (1953) Cortical and subcortical recordings in natural and artificially induced sleep in cats. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **5**, 75-90.
58. Hess, W.R. (1954) The diencephalic sleep centre. In: *Brain Mechanisms and Consciousness* (Ed. J.F. Delafresnaye), 117-136. Blackwell, Oxford.
59. Hilker, R., Thomas, A.V., Klein, J.C., Weisenbach, S., Kalbe, E., Burghaus, L., Jacobs, A.H., Herholz, K., and Heiss, W.D. (2005) Dementia in Parkinson disease: functional imaging of cholinergic and dopaminergic pathways. *Neurology*, **65**, 1716-1722.
60. Hobson, J.A. (2005) Sleep is of the brain, by the brain and for the brain. *Nature*, **437**, 1254-1256.
61. Hobson, J.A., McCarley, R.W., and Wyzinski, P.W. (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, **189**, 55-58.
62. Hobson, J.A., and Pace-Schott, E.F. (2002) The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nature Reviews Neuroscience*, **3**, 679-693.
63. Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M., and Vincent, S.R. (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 2811-2814.

64. Hur, E.E., and Zaborszky, L. (2005) Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, **483**, 351-373.
65. Inglis, W.L., and Semba, K. (1997) Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid, AMPA, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Research*, **755**, 17-27.
66. Iranzo, A., Molinuevo, J.L., Santamaria, J., Serradell, M., Marti, M.J., Valldeoriola, F., and Tolosa, E. (2006) Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *The Lancet Neurology*, **5**, 572-577.
67. Iranzo, A., Tolosa, E., Gelpi, E., Molinuevo, J.L., Valldeoriola, F., Serradell, M., Sanchez-Valle, R., Vilaseca, I., Lomena, F., Vilas, D., Llado, A., Gaig, C., and Santamaria, J. (2013) Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *The Lancet Neurology*, **12**, 443-453.
68. Jenkinson, N., Kuhn, A.A., and Brown, P. (2013) gamma oscillations in the human basal ganglia. *Experimental Neurology*, **245**, 72-76.
69. Jenkinson, N., Nandi, D., Muthusamy, K., Ray, N.J., Gregory, R., Stein, J.F., and Aziz, T.Z. (2009) Anatomy, physiology, and pathophysiology of the pedunculopontine nucleus. *Movement Disorders*, **24**, 319-328.
70. Jones, B.E. (2003) Arousal systems. *Frontiers in Bioscience*, **8**, s438-451.

71. Jouviet, M., Michel, F., and Courjon, J. (1959a) Sur la mise en jeu de deux mécaismes à expression électro-encéphalographique différente au cours du sommeil physiologique chez le Chat. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances de l'Academie des Sciences*, **248**, 3043-3045.
72. Jouviet, M., Michel, F., and Courjon, J. (1959b) Sur un stade d'activité électrique rapide au cours du sommeil physiologique. *Comptes Rendus Des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, **153**, 1024-1028.
73. Jouviet-Mounier, D., Astic, L., and Lacote, D. (1970) Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Developmental Psychobiology*, **2**, 216-239.
74. Jung, K.Y., Cho, J.H., Ko, D., Seok, H.Y., Yoon, H.K., Lee, H.J., Kim, L., and Im, C.H. (2012) Increased Corticomuscular Coherence in Idiopathic REM Sleep Behavior Disorder. *Frontiers in Neurology*, **3**, (60), 1-6.
75. Kamp, D., Krause, V., Butz, M., Schnitzler, A., and Pollok, B. (2013) Changes of cortico-muscular coherence: an early marker of healthy aging? *Age*, **35**, 49-58.
76. Kaur, S., Junek, A., Black, M.A., and Semba, K. (2008) Effects of ibotenate and 192IgG-saporin lesions of the nucleus basalis magnocellularis/substantia innominata on spontaneous sleep and wake states and on recovery sleep after sleep deprivation in rats. *The Journal of Neuroscience*, **28**, 491-504.
77. Klaue, R. (1937) Die bioelektrische Tätigkeit der Grosshirnrinde im normalen Schlaf und in der Narkose durch Schlafmittel. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, **47**, 510-531.

78. Kok, S.W., Overeem, S., Visscher, T.L., Lammers, G.J., Seidell, J.C., Pijl, H., and Meinders, A.E. (2003) Hypocretin deficiency in narcoleptic humans is associated with abdominal obesity. *Obesity Research*, **11**, 1147-1154.
79. Kotagal, V., Albin, R.L., Muller, M.L., Koeppe, R.A., Chervin, R.D., Frey, K.A., and Bohnen, N.I. (2012a) Symptoms of rapid eye movement sleep behavior disorder are associated with cholinergic denervation in Parkinson disease. *Annals of Neurology*, **71**, 560-568.
80. Kotagal, V., Muller, M.L., Kaufer, D.I., Koeppe, R.A., and Bohnen, N.I. (2012b) Thalamic cholinergic innervation is spared in Alzheimer disease compared to parkinsonian disorders. *Neuroscience Letters*, **514**, 169-172.
81. Krause, V., Wach, C., Sudmeyer, M., Ferrea, S., Schnitzler, A., and Pollok, B. (2014) Cortico-muscular coupling and motor performance are modulated by 20 Hz transcranial alternating current stimulation (tACS) in Parkinson's disease. *Frontiers in Human Neuroscience*, **7**, 1-10.
82. Kristeva, R., Patino, L., and Omlor, W. (2007) Beta-range cortical motor spectral power and corticomuscular coherence as a mechanism for effective corticospinal interaction during steady-state motor output. *NeuroImage*, **36**, 785-792.
83. LaFerla, F.M., and Green, K.N. (2012) Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**, a006320.
84. Laposky, A., Easton, A., Dugovic, C., Walisser, J., Bradfield, C., and Turek, F. (2005) Deletion of the mammalian circadian clock gene *BMAL1/Mop3* alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep*, **28**, 395-409.

85. Lee, M.G., Hassani, O.K., Alonso, A., and Jones, B.E. (2005) Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 4365-4369.
86. Lee M.G., and Jones, B.E. (2005) Role of basalo-cortical system in modulating cortical activity and sleep/wake states. In: *Sleep: Circuits and Functions, Methods and New Frontiers in Neuroscience Series, Frontiers in Neuroscience* (Ed. P.H. Luppi), 25-43. CRC Press, Boca Raton.
87. Liu, Z.W. and Gao, X.B. (2007) Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *Journal of Neurophysiology*, **97**, 837-848.
88. Loomis, A.L., Harvey, E.N., and Hobart, G. (1937) Cerebral states during sleep, as studied by human brain potentials. *Journal of Experimental Physiology*, **21**, 127-144.
89. Loomis, A.L., Harvey, E.N., and Hobart, G. (1938) Distribution of disturbance-patterns in the human electroencephalogram, with special reference to sleep. *Journal of Neurophysiology*, **1**, 413-430.
90. Loomis, A.L., Harvey, E.N., and Hobart, G. (1935) Potential Rhythms of the Cerebral Cortex during Sleep. *Science*, **81**, 597-598.
91. Losier, B.J., and Semba, K. (1993) Dual projections of single cholinergic and aminergic brainstem neurons to the thalamus and basal forebrain in the rat. *Brain Research*, **604**, 41-52.



92. Lu, J., Bjorkum, A.A., Xu, M., Gaus, S.E., Shiromani, P.J. and Saper, C.B. (2002) Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *The Journal of Neuroscience*, **22**, 4568-4576.
93. Lu, J., Sherman, D., Devor, M., and Saper, C.B. (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*, **441**, 589-594.
94. Luppi, P.H., Clement, O., Sapin, E., Gervasoni, D., Peyron, C., Leger, L., Salvert, D., and Fort, P. (2011) The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Medicine Reviews*, **15**, 153-163.
95. Lydic, R. (1987) State-dependent aspects of regulatory physiology. *FASEB Journal*, **1**, 6-15.
96. Lydic, R., and Baghdoyan, H.A. (1993) Pedunculopontine stimulation alters respiration and increases ACh release in the pontine reticular formation. *The American Journal of Physiology*, **264**, R544-554.
97. Martinez, A., Lahiri, D.K., Giacobini, E., and Greig, N.H. (2009) Advances in Alzheimer therapy: understanding pharmacological approaches to the disease. *Current Alzheimer Research*, **6**, 83-85.
98. McCarley, R.W. (2007) Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Medicine*, **8**, 302-330.
99. McCarley, R.W., and Hobson, J.A. (1975) Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science*, **189**, 58-60.

100. McCormick, D.A. (1992) Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Progress in Neurobiology*, **39**, 337-388.
101. McGinty, D.J., and Harper, R.M. (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Research*, **101**, 569-575.
102. Mena-Segovia, J., Bolam, J.P., and Magill, P.J. (2004) Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends in Neurosciences*, **27**, 585-588.
103. Mena-Segovia, J., Sims, H.M., Magill, P.J., and Bolam, J.P. (2008) Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *The Journal of Physiology*, **586**, 2947-2960.
104. Mileykovskiy, B.Y., Kiyashchenko, L.I. and Siegel, J.M. (2005) Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, **46**, 787-798.
105. Mistlberger, R.E. (2005) Circadian regulation of sleep in mammals: role of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research Reviews*, **49**, 429-454.
106. Mochizuki, T., Yamatodani, A., Okakura, K., Horii, A., Inagaki, N., and Wada, H. (1992) Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiology and Behavior*, **51**, 391-394.
107. Monckton, J.E., and McCormick, D.A. (2002) Neuromodulatory role of serotonin in the ferret thalamus. *Journal of Neurophysiology*, **87**, 2124-2136.

108. Monti, J.M., Pellejero, T., and Jantos, H. (1986) Effects of H1- and H2-histamine receptor agonists and antagonists on sleep and wakefulness in the rat. *Journal of Neural Transmission*, **66**, 1-11.
109. Moroni, F., Nobili, L., De Carli, F., Massimini, M., Francione, S., Marzano, C., Proserpio, P., Cipolli, C., De Gennaro, L., and Ferrara, M. (2012) Slow EEG rhythms and inter-hemispheric synchronization across sleep and wakefulness in the human hippocampus. *NeuroImage*, **60**, 497-504.
110. Morrison, A.R. (1998) The pathophysiology of REM-sleep behavior disorder. *Sleep*, **21**, 446-449.
111. Moruzzi, G., and Magoun, H.W. (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **1**, 455-473.
112. Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research*, **827**, 243-260.
113. Newman, S.M., Paletz, E.M., Obermeyer, W.H., and Benca, R.M. (2009) Sleep deprivation in pigeons and rats using motion detection. *Sleep*, **32**, 1299-1312.
114. Nishino, S., Tafti, M., Reid, M.S., Shelton, J., Siegel, J.M., Dement, W.C., and Mignot, E. (1995) Muscle atonia is triggered by cholinergic stimulation of the basal forebrain: implication for the pathophysiology of canine narcolepsy. *The Journal of Neuroscience*, **15**, 4806-4814.

115. Nussbaum, R.L., and Ellis, C.E. (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, **348**, 1356-1364.
116. Obal, F., Jr., and Krueger, J.M. (2004) GHRH and sleep. *Sleep Medicine Reviews*, **8**, 367-377.
117. Pace-Schott, E.F., and Hobson, J.A. (2002) The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nature Reviews Neuroscience*, **3**, 591-605.
118. Pace-Schott, E.F., Hobson, J.A., and Stickgold, R. (2008) Sleep, Dreaming, and Wakefulness. In: *Fundamental Neuroscience*, 3rd ed. (Eds. L. Squire, D. Berg, F. Bloom, S. du Lac, A. Ghosh, and N. Spitzer), 959-985. Elsevier, Academic Press, London UK.
119. Paxinos, G., and Watson, C. (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
120. Paxinos, G., Watson, C., Carrive, P., Kirkcaldie, M., and Ashwell, K.W.S. (2009) *Chemoarchitectonic Atlas of The Rat Brain*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, London, UK.
121. Peever, J., Luppi, P.H., and Montplaisir, J. (2014) Breakdown in REM sleep circuitry underlies REM sleep behavior disorder. *Trends in Neurosciences*, **37**, 279-288.

122. Petrovic, J., Ciric, J., Lazic, K., Kalauzi, A., and Saponjic, J. (2013a) Lesion of the pedunclopontine tegmental nucleus in rat augments cortical activation and disturbs sleep/wake state transitions structure. *Experimental Neurology*, **247**, 562-571.
123. Petrovic, J., Lazic, K., Ciric, J., Kalauzi, A., and Saponjic, J. (2013b) Topography of the sleep/wake states related EEG microstructure and transitions structure differentiates the functionally distinct cholinergic innervation disorders in rat. *Behavioural Brain Research*, **256**, 108-118.
124. Petrovic, J., Lazic, K., Kalauzi, A., and Saponjic, J. (2014) REM sleep diversity following the pedunclopontine tegmental nucleus lesion in rat. *Behavioural Brain Research*, **271**, 258-268.
125. Pienaar, I.S., and van de Berg, W. (2013) A non-cholinergic neuronal loss in the pedunclopontine nucleus of toxin-evoked parkinsonian rats. *Experimental Neurology*, **248**, 213-223.
126. Pienaar, I.S., Harrison, I.F., Elson, J.L., Bury, A., Woll, P., Simon, A.K. and Dexter, D.T. (2014) An animal model mimicking pedunclopontine nucleus cholinergic degeneration in Parkinson's disease. *Brain Structure and Function*, <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-013-0669-5>.
127. Porkka-Heiskanen, T., Alanko, L., Kalinchuk, A., and Stenberg, D. (2002) Adenosine and sleep. *Sleep Medicine Reviews*, **6**, 321-332.

128. Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., and McCarley, R.W. (2000) Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience*, **99**, 507-517.
129. Postuma, R.B., Gagnon, J.F., and Montplaisir, J.Y. (2012) REM sleep behavior disorder: from dreams to neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, **46**, 553-558.
130. Radulovacki, M. (1985) Role of adenosine in sleep in rats. *Reviews in Clinical and Basic Pharmacology*, **5**, 327-339.
131. Radulovacki, M. (2005) Adenosine sleep theory: how I postulated it. *Neurological Research*, **27**, 137-138.
132. Raggi, A., Bella, R., Pennisi, G., Neri, W., and Ferri, R. (2013) Sleep disorders in Parkinson's disease: a narrative review of the literature. *Nature Reviews Neuroscience*, **24**, 279-291.
133. Rechtschaffen, A., and Bergmann, B.M. (2002) Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*, **25**, 18-24.
134. Resta, O., Foschino Barbaro, M.P., Bonfitto, P., Giliberti, T., Depalo, A., Pannacciulli, N., and De Pergola, G. (2003) Low sleep quality and daytime sleepiness in obese patients without obstructive sleep apnoea syndrome. *Journal of Internal Medicine*, **253**, 536-543.
135. Rye, D.B. (1997) Contributions of the pedunculopontine region to normal and altered REM sleep. *Sleep*, **20**, 757-788.

136. Sabbatini, M., Bronzetti, E., Felici, L., Fringuelli, C., Sagratella, S., and Amenta, F. (1999) NADPH-diaphorase histochemistry in the rat cerebral cortex and hippocampus: effect of electrolytic lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Mechanisms of Ageing and Development*, **107**, 147-157.
137. Sakai, K., Yoshimoto, Y., Luppi, P.H., Fort, P., el Mansari, M., Salvert, D., and Jouvet, M. (1990) Lower brainstem afferents to the cat posterior hypothalamus: a double-labeling study. *Brain Research Bulletin*, **24**, 437-455.
138. Sakurai, T. (2005) Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Medicine Reviews*, **9**, 231-241.
139. Salenius, S., Avikainen, S., Kaakkola, S., Hari, R., and Brown, P. (2002) Defective cortical drive to muscle in Parkinson's disease and its improvement with levodopa. *Brain*, **125**, 491-500.
140. Saper, C.B., Scammell, T.E., and Lu, J. (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, **437**, 1257-1263.
141. Sapin, E., Lapray, D., Berod, A., Goutagny, R., Leger, L., Ravassard, P., Clement, O., Hanriot, L., Fort, P., and Luppi, P.H. (2009) Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PloS one*, **4**, e4272.
142. Saponjic, J. (2009) Neurohemijski mehanizmi regulacije spavanja. *Glas Srpske akademije nauka i umetnosti*, **50**, 97-109.

143. Saponjic, J. (2011) Selektivne stimulacije i lezije moždanih jedara pacova kao modeli u istraživanjima mehanizama humane patologije spavanja. Glas Srpske akademije nauka i umetnosti, 51, 85-97.
144. Saponjic, J., Cvorovic, J., Radulovacki, M., and Carley, D.W. (2005a) Serotonin and noradrenaline modulate respiratory pattern disturbances evoked by glutamate injection into the pedunculopontine tegmentum of anesthetized rats. *Sleep*, **28**, 560-570.
145. Saponjic, J., Petrovic, J., Kalauzi, A., Ciric, J., Lazic, K., Radulovacki, M., and Carley, D.W. (2013) Sleep-state related EEG amplitude distribution in the rat model of cortical cholinergic innervation disorder. *Sleep and Biological Rhythms*, **11**, 105-115.
146. Saponjic, J., Radulovacki, M. and Carley, D.W. (2003) Respiratory pattern modulation by the pedunculopontine tegmental nucleus. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, **138**, 223-237.
147. Saponjic, J., Radulovacki, M., and Carley, D.W. (2005b) Injection of glutamate into the pedunculopontine tegmental nuclei of anesthetized rat causes respiratory dysrhythmia and alters EEG and EMG power. *Sleep and Breathing*, **9**, 82-91.
148. Saponjic, J., Radulovacki, M., and Carley, D.W. (2006) Modulation of respiratory pattern and upper airway muscle activity by the pedunculopontine tegmentum: role of NMDA receptors. *Sleep and Breathing*, **10**, 195-202.
149. Saponjic, J., Radulovacki, M., and Carley, D.W. (2007) Monoaminergic system lesions increase post-sigh respiratory pattern disturbance during sleep in rats. *Physiology and Behavior*, **90**, 1-10.



150. Sarter, M., and Bruno, J.P. (2000) Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience*, **95**, 933-952.
151. Sarter, M., and Bruno, J.P. (2004) Developmental origins of the age-related decline in cortical cholinergic function and associated cognitive abilities. *Neurobiology of Aging*, **25**, 1127-1139.
152. Sarter, M., Parikh, V., and Howe, W.M. (2009) Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nature Reviews Neuroscience*, **10**, 383-390.
153. Schenck, C.H., and Mahowald, M.W. (2002) REM sleep behavior disorder: clinical, developmental, and neuroscience perspectives 16 years after its formal identification in SLEEP. *Sleep*, **25**, 120-138.
154. Schliebs, R., and Arendt, T. (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, **113**, 1625-1644.
155. Schliebs, R., and Arendt, T. (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural Brain Research*, **221**, 555-563.
156. Semba, K. (1993) Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **330**, 543-556.

157. Semba, K., and Fibiger, H.C. (1989) Organization of central cholinergic systems. *Progress in Brain Research*, **79**, 37-63.
158. Shinotoh, H., Namba, H., Yamaguchi, M., Fukushi, K., Nagatsuka, S., Iyo, M., Asahina, M., Hattori, T., Tanada, S., and Irie, T. (1999) Positron emission tomographic measurement of acetylcholinesterase activity reveals differential loss of ascending cholinergic systems in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Annals of Neurology*, **46**, 62-69.
159. Siegel, J.M. (2008) Do all animals sleep? *Trends in Neurosciences*, **31**, 208-213.
160. Simic, G., Stanic, G., Mladinov, M., Jovanov-Milosevic, N., Kostovic, I., and Hof, P.R. (2009) Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **35**, 532-554.
161. Skaggs, W.E., and McNaughton, B.L. (1996) Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience. *Science*, **271**, 1870-1873.
162. Spillantini, M.G., and Goedert, M. (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, **12**, 609-622.
163. Stein, E., and Bar-Gad, I. (2013) beta oscillations in the cortico-basal ganglia loop during parkinsonism. *Experimental Neurology*, **245**, 52-59.
164. Steininger, T.L., Alam, M.N., Gong, H., Szymusiak, R., and McGinty, D. (1999) Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Research*, **840**, 138-147.

165. Steriade, M. (2000) Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience*, **101**, 243-276.
166. Steriade, M. (2003) The corticothalamic system in sleep. *Frontiers in Bioscience*, **8**, d878-899.
167. Steriade, M., Timofeev, I., and Grenier, F. (1999) Intracellular activity of various neocortical cell-classes during the natural wake-sleep cycle. *Society for Neuroscience, Abstr.*25:1661.
168. Szymusiak, R. (1995) Magnocellular nuclei of the basal forebrain: substrates of sleep and arousal regulation. *Sleep*, **18**, 478-500.
169. Takahashi, K., Lin, J.S., and Sakai, K. (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *The Journal of Neuroscience*, **26**, 10292-10298.
170. Takakusaki, K., Habaguchi, T., Saitoh, K., and Kohyama, J. (2004) Changes in the excitability of hindlimb motoneurons during muscular atonia induced by stimulating the pedunculopontine tegmental nucleus in cats. *Neuroscience*, **124**, 467-480.
171. Ticho, S.R., and Radulovacki, M. (1991) Role of adenosine in sleep and temperature regulation in the preoptic area of rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **40**, 33-40.
172. The International Classification of Sleep Disorders, 2nd ed. Diagnostic and coding manual. American Academy of Sleep Medicine, 2005.

173. Tobler, I., Borbely, A.A., and Groos, G. (1983) The effect of sleep deprivation on sleep in rats with suprachiasmatic lesions. *Neuroscience Letters*, **42**, 49-54.
174. Toledano, A., and Alvarez, M.I. (2004) Lesions and dysfunctions of the nucleus basalis as Alzheimer's disease models: general and critical overview and analysis of the long-term changes in several excitotoxic models. *Current Alzheimer Research*, **1**, 189-214.
175. Toledano, A., and Alvarez, M.I. (2011) Lesion-Induced Vertebrate Models of Alzheimer Dementia. In: *Animal Models of Dementia* (Eds. P.P. De Deyn, and D. Van Dam), 295-345. Humana Press, c/o Springer Science, New York, NY, USA.
176. Torontali, Z.A., Grace, K.P., Horner, R.L., and Peever, J.H. (2014) Cholinergic involvement in control of REM sleep paralysis. *The Journal of Physiology*, **592**, 1425-1426.
177. Urbano, F.J., D'Onofrio, S.M., Luster, B.R., Beck, P.B., Hyde, J.R., Bisagno, V., and Garcia-Rill, E. (2014) Pedunculo-pontine nucleus gamma band activity-preconscious awareness, waking, and REM sleep. *Frontiers in Neurology*, **5**, (210), 1-12.
178. Ushiyama, J., Takahashi, Y., and Ushiba, J. (2010) Muscle dependency of corticomuscular coherence in upper and lower limb muscles and training-related alterations in ballet dancers and weightlifters. *Journal of Applied Physiology*, **109**, 1086-1095.
179. Vanderwolf, C.H., and Stewart, D.J. (1988) Thalamic control of neocortical activation: a critical re-evaluation. *Brain Research Bulletin*, **20**, 529-538.

180. Vazques, J., and Baghdoyan, H.A. (2001) Basal forebrain acetylcholine release during REM sleep is significantly greater than during waking. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **280**, R598-R601.
181. Vertes, R.P. (1984) Brainstem control of the events of REM sleep. *Progress in Neurobiology*, **22**, 241-288.
182. Vgontzas, A.N., Bixler, E.O., Tan, T.L., Kantner, D., Martin, L.F., and Kales, A. (1998) Obesity without sleep apnea is associated with daytime sleepiness. *Archives of Internal Medicine*, **158**, 1333-1337.
183. Vincent, S.R., Satoh, K., Armstrong, D.M., and Fibiger, H.C. (1983) NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation. *Neuroscience Letters*, **43**, 31-36.
184. Voss, U., Holzmann, R., Tuin, I., and Hobson, J.A. (2009) Lucid dreaming: a state of consciousness with features of both waking and non-lucid dreaming. *Sleep*, **32**, 1191-1200.
185. White, D.P. (2006) The Pathogenesis of Obstructive Sleep Apnea: Advances in the Past 100 Years. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **34**, 1-6.
186. Whitwell, J.L., Weigand, S.D., Shiung, M.M., Boeve, B.F., Ferman, T.J., Smith, G.E., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Benarroch, E.E., Josephs, K.A., and Jack, C.R., Jr. (2007) Focal atrophy in dementia with Lewy bodies on MRI: a distinct pattern from Alzheimer's disease. *Brain*, **130**, 708-719.

187. Williams, J.A., Comisarow, J., Day, J., Fibiger, H.C., and Reiner, P.B. (1994) State-dependent release of acetylcholine in rat thalamus measured by in vivo microdialysis. *The Journal of Neuroscience*, **14**, 5236-5242.
188. Winn, P. (2006) How best to consider the structure and function of the pedunculopontine tegmental nucleus: evidence from animal studies. *Journal of the Neurological Sciences*, **248**, 234-250.
189. Woolf, N.J. (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology*, **37**, 475-524.
190. Yan, M.M., Xu, X.H., Huang, Z.L., Yao, M.H., Urade, Y., and Qu, W.M. (2011) Selection of optimal epoch duration in assessment of rodent sleep–wake profiles. *Sleep and Biological Rhythms*, **9**, 46-55.
191. Zmarowski, A., Wu, H.Q., Brooks, J.M., Potter, M.C., Pellicciari, R., Schwarcz, R., Bruno, J.P. (2009) Astrocyte-derived kynurenic acid modulates basal and evoked cortical acetylcholine release. *European Journal of Neuroscience*, **29**, 529-538.

**PRILOZI**

---

## **PRILOG A**

**Dozvole izdavača za korišćenje i modifikaciju slika zaštićenih  
autorskim pravom u uvodu doktorske disertacije**



# NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 16, 2014

This is a License Agreement between Jelena Petrovic ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	3470691205020
License date	Sep 16, 2014
Order Content Publisher	Nature Publishing Group
Order Content Publication	Nature
Order Content Title	A putative flip-flop switch for control of REM sleep
Order Content Author	Jun Lu, David Sherman, Marshall Devor and Clifford B. Saper
Order Content Date	May 10, 2006
Volume number	441
Issue number	7093
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Fig. 3. The interrelationship of the two halves of the REM switch.
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	SLEEP AND ELECTROENCEPHALOGRAPHIC RHYTHMS AS AN INDICATORS OF THE FUNCTIONALLY DISTINCT CHOLINERGIC INNERVATION DISORDERS IN RAT BRAIN
Expected completion date	Dec 2014
Estimated size (number of pages)	150
<b>Total</b>	<b>0.00 USD</b>

## Terms and Conditions

### Terms and Conditions for Permissions

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

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized

separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

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

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Special Terms:  
v1.1

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

**Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.**

---

---

# NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 16, 2014

This is a License Agreement between Jelena Petrovic ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	3470690845584
License date	Sep 16, 2014
Order Content Publisher	Nature Publishing Group
Order Content Publication	Nature Reviews Neuroscience
Order Content Title	Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on
Order Content Author	Martin Sarter, Vinay Parikh and W. Matthew Howe
Order Content Date	May 1, 2009
Volume number	10
Issue number	5
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Fig. 1. The cortical cholinergic input system.
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	SLEEP AND ELECTROENCEPHALOGRAPHIC RHYTHMS AS AN INDICATORS OF THE FUNCTIONALLY DISTINCT CHOLINERGIC INNERVATION DISORDERS IN RAT BRAIN
Expected completion date	Dec 2014
Estimated size (number of pages)	150
<b>Total</b>	<b>0.00 USD</b>

## Terms and Conditions

### Terms and Conditions for Permissions

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

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

provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Special Terms:

v1.1

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

**Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.**

---

---

# NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 16, 2014

This is a License Agreement between Jelena Petrovic ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	3470690618879
License date	Sep 16, 2014
Order Content Publisher	Nature Publishing Group
Order Content Publication	Nature Reviews Neuroscience
Order Content Title	The Neurobiology of Sleep: Genetics, cellular physiology and subcortical networks
Order Content Author	Edward F. Pace-Schott and J. Allan Hobson
Order Content Date	Aug 1, 2002
Volume number	3
Issue number	8
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Fig. 3. The reciprocal-interaction model of REM–NREM alternation.
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	SLEEP AND ELECTROENCEPHALOGRAPHIC RHYTHMS AS AN INDICATORS OF THE FUNCTIONALLY DISTINCT CHOLINERGIC INNERVATION DISORDERS IN RAT BRAIN
Expected completion date	Dec 2014
Estimated size (number of pages)	150
<b>Total</b>	<b>0.00 USD</b>

## Terms and Conditions

### Terms and Conditions for Permissions

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

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your

initial request in the calculation of a print run).NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

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

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Special Terms:

v1.1

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

**Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.**

---

---

# ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 16, 2014

This is a License Agreement between Jelena Petrovic ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Jelena Petrovic
Customer address	Despot Stefan Blvd. 142 Belgrade, None 11060
License number	3470681146133
License date	Sep 16, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Progress in Neurobiology
Licensed content title	Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord
Licensed content author	Nancy J. Woolf
Licensed content date	1991
Licensed content volume number	37
Licensed content issue number	6
Number of pages	50
Start Page	475
End Page	524
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	serbian
Title of your thesis/dissertation	SLEEP AND ELECTROENCEPHALOGRAPHIC RHYTHMS AS AN INDICATORS OF THE FUNCTIONALLY DISTINCT CHOLINERGIC INNERVATION DISORDERS IN RAT BRAIN
Expected completion date	Dec 2014
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Price	0.00 USD

VAT/Local Sales Tax

0.00 USD / 0.00 GBP

**Total**

**0.00 USD**

[Terms and Conditions](#)

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:  
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com))
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.
16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A



hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

**For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above: Permission granted is limited to the author accepted manuscript version\* of your paper.

**\*Accepted Author Manuscript (AAM) Definition:** An accepted author manuscript (AAM) is the author's version of the manuscript of an article that has been accepted for publication and which may include any author-incorporated changes suggested through the processes of submission processing, peer review, and editor-author communications. AAMs do not include other publisher value-added contributions such as copy-editing, formatting, technical enhancements and (if relevant) pagination.

You are not allowed to download and post the published journal article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

**Posting to a repository:** Authors may post their AAM immediately to their employer's institutional repository for internal use only and may make their manuscript publically available after the journal-specific embargo period has ended.

Please also refer to [Elsevier's Article Posting Policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

Elsevier publishes Open Access articles in both its Open Access journals and via its Open Access articles option in subscription journals.

Authors publishing in an Open Access journal or who choose to make their article Open Access in an Elsevier subscription journal select one of the following Creative Commons user licenses, which define how a reader may reuse their work: Creative Commons Attribution License (CC BY), Creative Commons Attribution – Non Commercial -ShareAlike (CC BY NC SA) and Creative Commons Attribution – Non Commercial – No Derivatives (CC BY NC ND)

#### **Terms & Conditions applicable to all Elsevier Open Access articles:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation.

The author(s) must be appropriately credited.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** You may distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, including for commercial purposes without permission from Elsevier

**CC BY NC SA:** For non-commercial purposes you may distribute and copy the article, create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article and license new adaptations or creations under identical terms without permission from Elsevier

**CC BY NC ND:** For non-commercial purposes you may distribute and copy the article and include it in a collective work (such as an anthology), provided you do not alter or modify the article, without permission from Elsevier

Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Promotional purposes (advertising or marketing)
- Commercial exploitation ( e.g. a product for sale or loan)
- Systematic distribution (for a fee or free of charge)

Please refer to [Elsevier's Open Access Policy](#) for further information.

21. **Other Conditions:**

v1.7

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

**Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.**

---

---

# ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 16, 2014

This is a License Agreement between Jelena Petrovic ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Jelena Petrovic
Customer address	Despot Stefan Blvd. 142 Belgrade, None 11060
License number	3470680575380
License date	Sep 16, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Neuroscience & Biobehavioral Reviews
Licensed content title	Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep–wake behavior: Reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence
Licensed content author	Subimal Datta, Robert Ross MacLean
Licensed content date	2007
Licensed content volume number	31
Licensed content issue number	5
Number of pages	50
Start Page	775
End Page	824
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	3
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	serbian
Title of your thesis/dissertation	SLEEP AND ELECTROENCEPHALOGRAPHIC RHYTHMS AS AN INDICATORS OF THE FUNCTIONALLY DISTINCT CHOLINERGIC INNERVATION DISORDERS IN RAT BRAIN
Expected completion date	Dec 2014
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12

Price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
<b>Total</b>	<b>0.00 USD</b>

## Terms and Conditions

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:  
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com))
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

**16. Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.  
Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

**For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above: Permission granted is limited to the author accepted manuscript version\* of your paper.

**\*Accepted Author Manuscript (AAM) Definition:** An accepted author manuscript (AAM) is the author's version of the manuscript of an article that has been accepted for publication and which may include any author-incorporated changes suggested through the processes of submission processing, peer review, and editor-author communications. AAMs do not include other publisher value-added contributions such as copy-editing, formatting, technical enhancements and (if relevant) pagination.

You are not allowed to download and post the published journal article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

**Posting to a repository:** Authors may post their AAM immediately to their employer's institutional repository for internal use only and may make their manuscript publically available after the journal-specific embargo period has ended.

Please also refer to [Elsevier's Article Posting Policy](#) for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**20. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

Elsevier publishes Open Access articles in both its Open Access journals and via its Open Access articles option in subscription journals.

Authors publishing in an Open Access journal or who choose to make their article Open Access in an Elsevier subscription journal select one of the following Creative Commons user licenses, which define how a reader may reuse their work: Creative Commons Attribution License (CC BY), Creative Commons Attribution – Non Commercial -ShareAlike (CC BY NC SA) and Creative Commons Attribution – Non Commercial – No Derivatives (CC BY NC ND)

#### **Terms & Conditions applicable to all Elsevier Open Access articles:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation.

The author(s) must be appropriately credited.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** You may distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, including for commercial purposes without permission from Elsevier

**CC BY NC SA:** For non-commercial purposes you may distribute and copy the article, create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article and license new adaptations or creations under identical terms without permission from Elsevier

**CC BY NC ND:** For non-commercial purposes you may distribute and copy the article and include it in a collective work (such as an anthology), provided you do not alter or modify the article, without permission from Elsevier

Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from

Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Promotional purposes (advertising or marketing)
- Commercial exploitation ( e.g. a product for sale or loan)
- Systematic distribution (for a fee or free of charge)

Please refer to [Elsevier's Open Access Policy](#) for further information.

21. **Other Conditions:**

v1.7

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

**Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.**





**ELSEVIER**

Dear Jelena Petrovic

We hereby grant you permission to reprint the material below at no charge **in your thesis, in print and on the University of Belgrade Serbia web site** subject to the following conditions:

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

Kind regards

---

Steph Norton :: Rights Associate :: Global Rights :: **ELSEVIER**  
T: +44 (0)1865 843325 :: F: +44 (0)1865 853333  
E: [s.norton@elsevier.com](mailto:s.norton@elsevier.com)

Please note I am in the office on Tuesdays, Thursdays & Fridays

**From:** jelena.petrovic@ibiss.bg.ac.rs [mailto:jelena.petrovic@ibiss.bg.ac.rs]

**Sent:** 16 September 2014 12:56

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

**Subject:** Obtain Permission - Book request

**Title:** M.S.  
**First name:** Jelena  
**Last name:** Petrovic  
**Institute/company:** Institute for biological research - Sinisa Stankovic  
**Address:** Despot Stefan Blvd. 142  
**Post/Zip Code:** 11060  
**City:** Belgrade  
**Country:** Serbia and Montenegro  
**Telephone:** +381 11 2078 465  
**Email:** [jelena.petrovic@ibiss.bg.ac.rs](mailto:jelena.petrovic@ibiss.bg.ac.rs)

**Please select the type of publication:** Book  
**Book - Title:** Fundamental Neuroscience  
**Book - ISBN:** 978-0-12-374019-9  
**Book - Author(s):** Squire, L., Berg, D., Bloom, F., du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N.  
**Book - Year:** 2008  
**Book - Pages from:** 963  
**Book - Pages to:** 963  
**Book - Chapter Num:** CHAPTER 42  
**Book - Chapter Title:** Sleep, Dreaming, and Wakefulness

**I would like to use (please select one of the following options):** Figure(s)  
**If using figures/tables or illustrations please specify the quantity:** one figure Fig. 42.4. Electroencephalograms showing electrical activity of the human brain during different stages of sleep.  
**Are you the author of the material?:** No  
**If not, is the author involved with your project:** No  
**In what format will you use the material?:** Print and Electronic  
**Will you be translating the material?:** Yes, not including English language  
**If yes, please specify the languages:** serbian  
**Information about your proposed use:** thesis  
**Proposed use text:** The thesis "SLEEP AND ELECTROENCEPHALOGRAPHIC RHYTHMS AS AN INDICATORS OF THE FUNCTIONALLY DISTINCT CHOLINERGIC INNERVATION DISORDERS IN RAT BRAIN" will be posted in a digital repository of the University of Belgrade Serbia, hopefully next 2015 year.



**Additional  
comments/Information:**

Please, may I get the permission for reuse of this figure ASAP. Thanks for understanding.

---

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

## **Biografija autora**

Jelena Petrović je rođena 27.02.1981. godine u Paraćinu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na studijskoj grupi biologija, završila je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,15 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na smeru Neurobiologija, modul Neurofiziologija sa biofizikom upisala je 2010. godine. Od 2011. godine zaposlena je na Odeljenu za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”. Zvanje istraživač saradnik stiče 2012. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja” (projekat OI 173022), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom dr Jasne Šaponjić, naučnog savetnika.

Jelena Petrović je koautor u 6 radova objavljenih u međunarodnim vodećim časopisima i ima 8 saopštenja na međunarodnim i 9 saopštenja na domaćim naučnim skupovima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани- а \_\_\_\_\_ Јелена Петровић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3001/2010 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Спавање и електроенцефалографски ритмови као индикатори поремећаја  
функционално различитих холинергичких инервација великог мозга пацова**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

*Петровић Јелена*

У Београду, \_\_\_\_\_ 02.12.2014. \_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Петровић

Број индекса Б3001/2010

Студијски програм Биологија

Наслов рада **Спавање и електроенцефалографски ритмови као индикатори поремећаја функционално различитих холинергичких инервација великог мозга пацова**

Ментор др Јасна Шапоњић, проф. Павле Анђус

Потписани/а Јелена Петровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

Петровић Јелена

У Београду, 02.12.2014.

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Спавање и електроенцефалографски ритмови као индикатори поремећаја функционално различитих холинергичких инервација великог мозга пацова**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

**3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

*Петровић Јелена*

У Београду, 02.12.2014.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.