

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Željko Z. Grubač

**FRAGMENTACIJA SPAVANJA
IZAZVANA EKSPERIMENTALNO PO MODELU
APNEJE U SPAVANJU: BIHEJVIORALNE,
ELEKTROFIZIOLOŠKE, BIOHEMIJSKE I
STRUKTURNE PROMENE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Željko Z. Grubač

**EXPERIMENTAL SLEEP FRAGMENTATION
MODELLED BY SLEEP APNEA: BEHAVIORAL,
ELECTROENCEPHALOGRAPHIC, BIOCHEMICAL
AND STRUCTURAL CONSEQUENCES**

Doctoral thesis

Belgrade, 2023.

MENTORI

1. **Prof. dr Dragan Hrnčić**, vanredni profesor i naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **Prof. dr Nela Puškaš**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. **Prof. dr Olivera Stanojlović**, redovni profesor, predsednik
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **Prof. dr Tatjana Simić**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, dopisni član SANU
3. **Prof. dr Aleksandra Rašić-Marković**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
4. **Prof. dr Dušan Mladenović**, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
5. **Prof. dr Vesna Martić Popović**, redovni profesor
Univerzitet Odbrane u Beogradu, Medicinski fakultet Vojno Medicinske Akademije

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Izrada moje doktorske teze bi bila značajno teža bez neizmerne podrške svih članova Neurofiziološke laboratorije kao i podrške uvaženih kolega iz drugih organizacionih jedinica Medicinskog fakulteta u Beogradu, pa smatram da je neophodno da neke od njih pomenem:

Rukovodiocu Laboratorije za neurofiziologiju Instituta za Medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ i dragoj profesorki *Oliveri Stanojlović* veliko hvala na svim savetima i kritikama, kao i danima, mesecima i godinama uloženim u moj stručni i naučni razvoj.

Uvaženom akademiku, profesorki *Tatjani Simić*, i njenim kolegama sa Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, naročito doktorki *Sonji Šuvakov* i dragoj prijateljici asistentkinji *Đurđi Jerotić*, za pruženu pomoć u učenju biohemijskih tehnika koje su korišćene u eksperimentima veznim za hormonske analize i oksidativni stres.

Uvaženoj profesorki *Aleksandri Rašić-Marković* na vremenu provedenom u osmišljavanju i realizaciji bihejvioralnih testova koji su predmet ove disertacije.

Dragom profesoru *Đuru Macutu* sa Klinike za endokrinologiju i bolesti metabolizma, UKCS, kao i profesorki *Nataši Petronijević* i doktorki *Milici Velimirović* sa Instituta za medicinsku biohemiju za podršku i pomoć u evaluaciji hormonskih analiza i interleukina.

Želim, ovim povodom, da se zahvalim i ostalim prijateljima i kolegama iz neurofiziološke laboratorije Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“: doktorki *Anidi Ademović*, asistentu *Aleksi Lekoviću*, doktoru *Božu Kneževiću* i doktoru *Aleksi Zubeliću* za pomoć u laboratorijskom radu.

Dragom prijatelju asistentu *Nikoli Šutuloviću* za podršku i pomoć u konceptualizaciji i izvođenju bihejvioralnih eksperimenata.

Zahvalnost dugujem i uvaženim članovima komisije, na kritikama, savetima i podršci bez kojih bi izrada ove teze bila značajno teža.

Dragoj mentorki, profesorki *Neli Puškaš*, sa Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“, na pomoći prilikom izvođenja i tumačenja rezultata imunohistohemijskih analiza, kao i pomoći prilikom izolacije struktura centralnog nervnog sistema.

Naposletku, *prof. dr Draganu Hrnčiću*, mentoru i prijatelju, izražavam posebnu zahvalnost na konstantnoj podršci koju mi je pružao prilikom mog profesionalnog razvoja, i svim savetima i pomoći tokom istraživačkog rada. Bez njegovog zalaganja, ništa od ovoga ne bi bilo moguće, a njegov mentorski rad pomogao mi je da dostignem svoj puni potencijal, kako u profesionalnom, tako i u naučnom smislu.

Želim da se zahvalim i svojoj porodici, posebno majci Nadi, ocu Zdravku, bratu Marku i supruzi Ani, koji su bili tu za mene još od studentskih dana, i pržali mi neizmernu podršku tokom celog ovog perioda.

Doktorska teza je sprovedena kao deo projekta resornog Ministarstva za nauku br. 175032/200110 (rukovodilac O. Stanojlović) i međunarodnog projekta FA4LIN (MNTR i TUBITAK, rukovodilac D. Hrnčić), čiji članovi učestvuju u EU COST akcijama TEATIME i ANDRONET (MC: D. Hrnčić).

Posvećeno mojoj porodici

Naziv doktorske disertacije

FRAGMENTACIJA SPAVANJA IZAZVANA EKSPERIMENTALNO PO MODELU APNEJE U SPAVANJU: BIHEJVORALNE, ELEKTROFIZIOLOŠKE, BIOHEMIJSKE I STRUKTURNE PROMENE

Sažetak

Poremećaj arhitekture spavanja, naročito visokofrekventna fragmentacija spavanja po modelu opstruktivne apneje u spavanju (OSA), je često udružen sa različitim neuropsihijatrijskim komorbiditetima, a mehanizmi ove interakcije su još uvek nerazjašnjeni.

Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrđivanje funkcionalnih i biohemijskih promena u centralnom nervnom sistemu (CNS), koje su nastale usled akutne, subakutne i hronične fragmentacije spavanja po modelu OSA. Posebna pažnja posvećena je pronalasku mehanizama nastanka uočenih promena.

Ispitivan je uticaj fragmentacije spavanja na ekscitabilnost CNS-a, bihevioralna obeležja karakteristična za anksioznost i depresiju, kao i uticaj na učenje i pamćenje. Biohemijskom analizom obuhvaćeni su parametri oksidativnog stresa i nivo citokina u hipokampusu, talamusu i korteksu, kao i hormonski status nakon fragmentacije. Takođe, istraživan je i proces neurogeneze i gliogeneze u hipokampusu eksperimentalnih životinja.

Životinje kojima je fragmentisano spavanje bilo akutno ili hronično, razvile su hiperekscitabilnost CNS-a i veću podložnost za nastanak konvulzivnih napada. Dodatno, kontinuirano su eksprimirale ponašanje karakteristično za anksioznost i depresiju, kao i kognitivni deficit direktno proporcionalan vremenu za koje je arhitektura spavanja bila narušena. U hipokampusu, talamusu i korteksu životinja sa fragmentisanim spavanjem detektovana je pojava oksidativnog stresa, a nivoi IL- β i IL-6 bili su poremećeni u moždanim strukturama nakon hroničnog tretmana. Takođe, fragmentacija spavanja uzrokovala je i hormonski disbalans. Imunohistohemijskom analizom nisu opservirane promene u neurogenezi dentatnog girusa u hipokampusu.

Fragmentacija spavanja uzrokovala je značajne neuropsihijatrijske promene, kako u akutnom, tako i u hroničnom tretmanu koje su se manifestovale povećanom ekscitabilnošću CNS-a, karakterističnim bihevioralnim obrascima za anksioznost i depresiju u svim eksperimentalnim testovima, kao i biohemijskim i imunohistohemijskim promenama koje potencijalno mogu predstavljati mehanizam ove interakcije.

Ključne reči: Fragmentacija spavanja, OSA, epilepsija, anksioznost, depresija, kognicija, oksidativni stres, hormoni, interleukini

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK broj: _____

The title of doctoral thesis

EXPERIMENTAL SLEEP FRAGMENTATION MODEL BY SLEEP APNEA: BEHAVIORAL, ELECTROENCEPHALOGRAPHIC, BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL CONSEQUENCES

Abstract

Sleep architecture disorder, particularly high-frequency sleep fragmentation in the model of obstructive sleep apnea (OSA), is often associated with various neuro-psychiatric comorbidities, and the mechanisms of this interaction are still unclear.

The objectives of this study were to determine the functional and biochemical changes that occur in the central nervous system (CNS) as a result of acute, subacute, and chronic sleep fragmentation in the OSA model, as well as to investigate potential mechanisms leading to these changes. Functional assessments included the impact of sleep fragmentation on the excitability of CNS neurons, behavioral characteristics associated with anxiety and depression, and cognitive abilities. Biochemical assessments included parameters of oxidative stress and levels of proinflammatory cytokines in brain structures, as well as hormonal status after fragmentation. Immunohistochemical analysis examined the processes of neurogenesis and gliogenesis in the hippocampus.

Animals with acute or chronic sleep fragmentation developed hyperexcitability of CNS neurons and increased susceptibility to convulsive seizures. They also exhibited behaviors associated with anxiety and depression, as well as cognitive dysfunction proportional to the duration of sleep architecture disruption. Oxidative stress was observed in the hippocampus, thalamus, and cortex of animals with fragmented sleep, and levels of IL- β and IL-6 were disrupted in brain structures after chronic treatment. Sleep fragmentation also caused hormonal imbalance. No changes in neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus were observed.

Sleep fragmentation resulted in significant neuropsychiatric changes, both in acute and chronic treatment, manifested by increased excitability of CNS neurons, characteristic behavioral patterns of anxiety and depression in all experimental tests, as well as biochemical and immunohistochemical changes that potentially represent the mechanism of this interaction.

Key words: Sleep fragmentation, OSA, epilepsy, anxiety, depression, cognition, oxidative stress, hormones, interleukins

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Physiological Sciences

UDC number: _____

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Spavanje-vitalni fiziološki proces.....	2
1.1.1. Arhitektura i polisomnografske odlike spavanja.....	3
1.1.2. Mehanizmi spavanja.....	6
1.1.3. Značaj kvaliteta spavanja za zdravlje.....	10
1.2. Poremećaji spavanja.....	11
1.2.1. Hipersomnija.....	12
1.2.1.1. Deprivacija spavanja.....	12
1.2.1.2. Narkolepsija.....	13
1.2.1.3. Apneja u spvanju (Fragmentacija spavanja).....	14
1.2.2. Insomnija.....	16
1.2.3. Poremećaji cirkadijalnog ritma.....	17
1.2.4. Parasomnije.....	17
1.3. Razlika između deprivacije i fragmentacije spavanja.....	18
1.4. Ekonomski i sociomedicinski aspekti.....	19
1.5. Spavanje i epilepsija: bidirekcionni odnos.....	20
1.6. Spavanje, kognitivne funkcije i mentalno zdravlje.....	22
1.6.1. Odnos poremećaja spavanja i depresije.....	23
1.6.1.1. Insomnija i depresija.....	23
1.6.1.2. Deprivacija i fragmentacija spavanja i depresija.....	25
1.6.2. Poremećaji spavanja i anksioznost.....	26
1.7. Eksperimentalni modeli u somnologiji.....	28
1.7.1. Deprivacija vs. Fragmentacija spavanja.....	28
1.7.2. Eksperimentalni modeli modulacije spavanja.....	29
1.7.2.1. Pažljivo rukovanje.....	29
1.7.2.2. Tehnika penduluma.....	30
1.7.2.3. Metoda pojedinačnih platformi.....	30
1.7.2.4. Metoda sa više platformi.....	31
1.7.2.5. Forsirana lokomocija (tehnika rotirajućeg bubnja).....	31
1.7.2.6. Tehnika rotirajućeg diska.....	32
1.7.2.7. Tredmil za male životinje.....	33
1.8. Poremećaji spavanja i hormonski disbalans.....	34
1.8.1. Poremećaji spavanja i kortikosteron.....	35
1.8.2. Poremećaji spavanja i testosteron.....	35
1.8.3. Poremećaji spavanja i estrogen.....	36
1.8.4. Poremećaji spavanja i progesteron.....	36
1.9. Uticaj poremećaja spavanja na neuroinflamaciju, oksidativni stres i neurogenezu.....	36
1.9.1. Poremećaji spavanja i neuroinflamacija.....	36
1.9.2. Poremećaji spavanja i oksidativni stres.....	37
1.9.3. Poremećaji spavanja i neurogeneza.....	39

2. Ciljevi istraživanja	42
3. Materijal i metode	44
3.1. Eksperimentalne životinje	45
3.2. Fragmentacija spavanja	45
3.3. Eksperimentalni dizajn	46
3.3.1. Uticaj fragmentacije spavanja na ekscitabilnost centralnog nervnog sistema i epileptogenezu	46
3.3.2. Uticaj fragmentacije spavanja na anksioznost	48
3.3.3. Uticaj fragmentacije spavanja na depresiju i kognitivne funkcije	50
3.4. Procena konvulzivne aktivnosti	51
3.4.1. Opservacija bihevioralnih parametara konvulzivnog ponašanja	51
3.4.2. Operativna implantacija elektroda, registrovanje i analiza EEG aktivnosti	51
3.5. Bihevioralni testovi	52
3.5.1. Uzdignuti krstasti lavirint	52
3.5.2. Test svetlo tama	53
3.5.3. Test otvorenog polja	54
3.5.4. Test forsiranog plivanja	55
3.5.5. Modifikovani test uzdignutog krstastog lavirinta	56
3.6. Biohemijske analize	57
3.6.1. Optimizacija biološkog materijala po ekstrakciji	57
3.6.2. Protokol izolacije moždanih struktura	57
3.6.3. Kvantifikacija proteina	58
3.6.4. Određivanje koncentracije IL-1 β i IL-6	58
3.6.5. Određivanje koncentracije hormona u serumu	59
3.6.6. Određivanje parametara oksidativnog stresa	59
3.7. Imunohistohemijske analize	60
3.7.1. Imunohistohemijsko određivanje ekspresije markera neuro- i glija- geneze	60
3.7.2. Kvantifikovanje imunoreaktivnih ćelija	61
3.8. Statistička analiza i obrada podataka	62
4. Rezultati	64
4.1. Uticaj akutne fragmentacije spavanja na ekscitabilnost	65
4.1.1. Analiza konvulzivnog ponašanja	65
4.1.2. Analiza EEG	67
4.2. Uticaj hronične fragmentacije spavanja na ekscitabilnost	70
4.2.1. Analiza konvulzivnog ponašanja	70
4.2.2. Analiza EEG	73
4.3. Mehanizmi interakcije hronične fragmentacije spavanja i ekscitabilnosti	76
4.3.1. Analiza interleukina	76
4.4. Uticaj akutne fragmentacije spavanja na anksioznost i potencijalni mehanizmi	78
4.4.1. Rezultati bihevioralnih testiranja nakon fragmentacije spavanja	78

4.4.2. Hormonska analiza nakon fragmentacije spavanja.....	80
4.5. Uticaj hronične fragmentacije spavanja na anksioznost i potencijalni mehanizmi.....	81
4.5.1. Analiza bihevioralnih parametara.....	81
4.5.2. Oksidativni stres u moždanim strukturama.....	85
4.5.3. Korelaciona analiza bihevioralnih i biohemijskih testova.....	86
4.5.4. Analiza hipokampalnih PV+ interneurona.....	87
4.6. Uticaj fragmentacije spavanja na ponašanje karakteristično za depresivni poremećaj i mehanizmi interakcije.....	89
4.6.1. Fragmentacija spavanja i telesna masa eksperimentalnih životinja.....	89
4.6.2. Fragmentacija spavanja i ponašanje povezano sa depresijom.....	90
4.6.3. Fragmentacija spavanja i kognitivne funkcije (učenje i pamćenje).....	92
4.6.4. Hronična fragmentacija spavanja i serumski nivoi testosterona i kortikosterona.....	93
4.6.5. Hronična fragmentacija spavanja i imunohistohemijaska ekspresija markera neurogeneze i glijageneze u hipokampusu.....	95
4.6.5.1. Hronična fragmentacija spavanja i ekspresija Ki-67+ u hipokampusu.....	95
4.6.5.2. Hronična fragmentacija spavanja i ekspresija DCX+ ćelija u hipokampusu.....	96
4.6.5.3. Hronična fragmentacija spavanja i ekspresija GFAP+ astrocita u hipokampusu.....	97
5. Diskusija.....	98
6. Zaključci.....	125
7. Literatura.....	127

1. UVOD

1.1. Spavanje-vitalni fiziološki proces

„Čovek provede trećinu svog života spavajući. Ako to nije apsolutno vitalan proces, onda je to najveća greška evolucije“

Allan Rechtschaffen

Jedna od omiljenih rečenica svakog somnologa je svakako gore navedeni Rechtschaffenov citat. Ovo je bila prva rečenica sa kojom sam se i ja susreo kada sam započeo upoznavanje sa medicinom spavanja u Neurofiziološkoj laboratoriji Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Spavanje svakako jeste vitalan fiziološki proces i skoro trećinu života provedemo spavajući. Postoje brojne definicije spavanja, a može se definisati i kao periodično, reverzibilno i fiziološko stanje smanjene budnosti, koje se odlikuje umanjenom percepcijom i odloženom reakcijom na spoljašnje podražaje. Spavanje odlikuju brojni fiziološki procesi kao što su smanjenje aktivnosti skeletnih mišića, izostanak ili produženje reakcije na spoljašnje draži, smanjenje autonomnih funkcija (puls, krvni pritisak, telesna temperatura) kao i promena u bioelektričnoj aktivnosti mozga. Bihevioralne promene moguće je direktno opservirati, dok se za registrovanje fizioloških (prvenstveno neurofizioloških) promena tokom spavanja, u naučne ili dijagnostičke svrhe, koristi polisomnografija (elektroencefalografija-EEG, elektromiografija-EMG, elektrookulografija-EOG i elektrokardiografija-EKG) (Abad i sar., 2003). Oporavak integriteta neurona i maturacija sinapsi se uvek ističu kao glavni benefiti spavanja, a restorativna uloga spavanja omogućava konsolidaciju pamćenja i olakšava učenje (Stich i sar., 2022).

U brojnim studijama pokazano je da su poremećaji spavanja, kako kvantitativni tako i kvalitativni, povezani sa brojnim bolestima, kao što su bolesti srca i mentalne bolesti, uključujući psihoze, bipolarnu poremećaje i epilepsije (Day i sar., 1999). Da bi se ispoljio pozitivan efekat spavanja, spavanje treba bude kontinuirano ili neprekinuto određen vremenski period kako bi se pozitivni efekti zadržali (Stich i sar., 2022).

Razumevanje sistema koji kontrolišu spavanje omogućava da poboljšamo kvalitet i trajanje spavanja (kvantitet) a tako i kvalitet života. U samom centru regulacije perioda budnosti i spavanja nalazi se ciklus svetla i tame, budući da je ljudska vrsta „programirana“ da bude aktivna tokom dana a da spava tokom noći. Ipak, sama kontrola procesa spavanja je nešto kompleksnija i zavisi kako od cirkadijalnog ritma tako i od pritiska spavanja. Ova dva sistema su međusobno isprepletana i određuju kada odlazimo na spavanje, kada se budimo i kako se osećamo nakon buđenja (Cajochen i sar., 2003). Pritisak spavanja je jednostavan fenomen povezan sa maturacijom sinapsi i nagomilava se paralelno sa dužinom vremena provedenog u budnom stanju. Smanjuje se spavanjem, dostižući minimum nakon kvalitetno prespavane noći. Kada je pritisak spavanja visok, spavanje je dublje u fiziološkim uslovima. Ipak, na ovaj proces mogu da utiču brojni faktori, kao što su infekcije, različita oboljenja ili obavljanje mentalno zahtevnih radnji te se može zaključiti da je on delimično pod voljnom kontrolom. Kada dolazi do nagomilavanja pritiska spavanja, a spavanje se voljno odlaže nastaje „dug spavanja“. Ovaj fenomen značajno utiče kako na moždane tako i na telesne funkcije, i što je veći, to je efikasnost i produktivnost osobe proporcionalno manja.

U drugoj polovini XX veka otkriveno je da adenzin može smanjiti budnost i dovesti do povećanja pospanosti kao i podsticanja dubljih faza spavanja (Portas i sar., 1997). Moguće je da pritisak spavanja proizilazi iz nakupljanja adenzina u moždanim strukturama. Tokom budnog stanja u centralnom nervnom sistemu se troši velika količina energije u formi adenzin-trifosfata (ATP), koji nastaje isključivo iz glikogena. On se oslobađa iz neurona i nervnih ćelija, a

zatim se razgrađuje u ekstrasinaptičkom prostoru. Visoka aktivnost neurona povezana je sa značajnim povećanjem otpuštanja neurotransmitera i sekvencijalnim otpuštanjem ATP-a iz zaliha glikogena, što rezultuje stvaranjem više adenozina. Nakon oslobađanja, adenzin se može vezati na neki od četiri adenzinska receptora u bazalnom delu frontalnog režnja. Istraživanja ukazuju da samo dva od četiri receptora imaju ulogu u regulaciji spavanja A1 i A2A (Lazarus i sar., 2019). A1 receptori dovode do inhibicije neurona odgovornih za budnost u različitim moždanim strukturama, dok su A2A receptori lokalizovani u preoptičkom području hipotalamusa i dovode do ekscitacije neurona koji izazivaju spavanje. Simultanim ekscitatornim i inhibitornim ulogama, posredstvom receptora, adenzin podstiče spavanje. Administraciju adenozina u preoptičku regiju hipotalamusa eksperimentalnih životinja dovodi do modifikacije aktivnosti neurona i promena u ponašanju životinja tokom spavanja (Strecker i sar. 2000). U drugim studijama deprivacija spavanja dovela je do dostizanja platoa u bazalnim nivoima adenozina u frontalnim regionima, no adenzin je nastavio rasti i u drugim moždanim strukturama, povećavajući tako potrebu za spavanjem u budnom periodu. Sve ovo navodi na pitanje kako se onda budimo. Osim činjenice da nam biološki sat nakon određenog perioda izaziva buđenje, tokom spavanja dolazi do stvaranja novih molekula ATP-a iz adenozina, što dovodi do smanjenja pritiska spavanja. Ovaj proces je suprotan od onoga što se događa tokom perioda budnosti. Pritisak spavanja je uglavnom povezan sa dubokim spavanjem koje se javlja u ranim periodima spavanja. Budući da duboko spavanje zahteva manju moždanu aktivnost, pretpostavlja se da se obnavljanje glikogena, a time i ATP-a događa baš u ovom periodu (Dworak i sar., 2010). Stvaranje ATP-a iz adenozina takođe može objasniti inerciju spavanja-pospanost ili omamljenost, koju osećamo neposredno nakon buđenja. Ova omamljenost se uglavnom može pripisati tome što naše telo nije u stanju transformisati kompletan adenzin, proizveden tokom sati budnosti u ATP, ostavljajući tako višak adenozina čak i nakon cele noći spavanja. Ovo može objasniti zašto mnogi ljudi osećaju potrebu za kofeinom kako bi započeli dan (Porkka-Heiskanen i sar., 1997).

1.1.1. Arhitektura i polisomnografske odlike spavanja

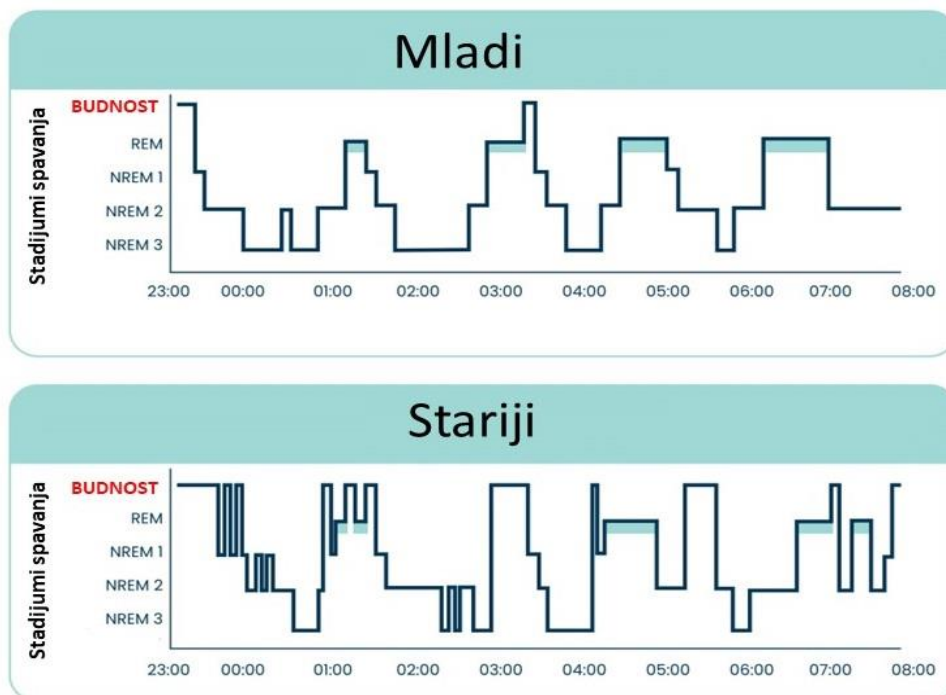
Spavanje se odvija u više ciklusa (Day i sar., 1999; Franken i sar., 2001; Hodoba 2002), koji u fiziološkim uslovima traju do 90 minuta i sukcesivno se ponavljaju, a sastoje se iz REM faze (eng. *rapid eye movement*), ili paradoksalno spavanje, i NREM, ili NREM faze (eng. *nonrapid eye movement*), koja se još naziva i sporotalasno (eng. *slow wave sleep*, SWS) spavanje (Rosenwasser 2009). Fiziološke promene koje se dešavaju u organizmu tokom NREM faze podrazumevaju smanjenje perifernog vaskularnog tonusa-vazodilataciju i pad perifernog vaskularnog otpora koja dovodi do pada krvnog pritiska, tahipneje usled relaksacije mišića gornjih respiratornih puteva i smanjenja nivoa bazalnog metabolizma za oko 30%.

Ranije je bilo ustaljeno verovanje da, tokom ove faze, izostaje sanjanje, što nije u potpunosti tačno. Na osnovu posmatranja moždane aktivnosti uočeno je da postoje snovi, ali sa odsustvom integracije (konsolidacije). Prema novoj klasifikaciji Američke akademije za medicinu spavanja (eng. *American Academy for Sleep Medicine*) iz 2004. godine definisane su tri faze sporotalasnog spavanja, što je promena u odnosu na prethodnu klasifikaciju u kojoj je NREM spavanje bilo podeljeno na četiri faze: N1, N2, N3 i N4. Nova klasifikacija objedinjuje najdublje faze sporotalasnog spavanja N3 i N4 u jednu fazu N3 (Iber i sar., 1998). Jedan ciklus sporo-talasnog spavanja ukupno traje od 30 do 45 minuta i tokom ovog vremenskog intervala organizam prođe kroz sve tri faze ciklusa N1-N3, i obrnuto N3-N1, gde se umesto NREM javlja REM spavanje, čime se završava jedan ciklus. Ukupno trajanje sporotalasnog spavanja tokom jednog ciklusa se, kako vreme spavanja odmiče, skraćuje tako da su prvih nekoliko ciklusa su najduži.

Pored toga, kako se ciklusi sporotalasnog spavanja smenjuju, dolazi do smanjenja frekvencije i povećanja amplitude talasa predstavljenih EEG zapisom, što svedoči o povećanju dužine spavanja i dovodi do podizanja praga za buđenje. Smanjenje frekvencije ukazuje da je

električna aktivnost, odnosno aktivnost neurona neokorteksa sinhronizovana. Stadijumi 3 i 4 spadaju u sporotalasno spavanje, a karakterišu ih najsporiji EEG talasi (0,3-5 Hz), najviše amplitude ili delta talasi (δ).

- Prvi stadijum traje 5-10 minuta i u EEG zapisu je uočljivo iščezavanje alfa talasa koga prati redukcija mišićnog tonusa. Alfa talasi se odlikuju frekvencom u opsegu od 8 do 13 Hz i amplitudom od 20 do 60 μV i javljaju se kada je osoba u miru zatvorenih očiju (Khealani, 2006). Uz alfa talase prisutni su još i beta i teta talasi. Na EOG-u se registruju pendularni pokreti bulbusa, dok se EMG karakteriše minimalnom aktivnošću muskulature. Generalno, prag podražaja za buđenje u ovoj fazi je nizak, a ukoliko se probude, osobe se ne sećaju da su spavale.
- Na prvi stadijum se nadovezuje drugi stadijum koji se karakteriše niskom amplitudom EEG talasa: pojavom sporih sinusoidnih talasa (K kompleksi) sa pikovima visoke amplitude 7-14 Hz u ukupnom trajanju od oko 3 sekunde kao i vretena spavanja. Vretena spavanja pojavljuju se mestimično i tokom kasnijih stadijuma sporo-talasnog spavanja, a njihova pojava ukazuje na postojanje sinhronizacije EEG talasa koja nastupa zbog ritmičke aktivacije jedara talamusa i aktivacije neurona. Ovo je ujedno i najduža faza spavanja i traje do 30 minuta. EOG i EMG karakteriše oskudna aktivnost a prag podražaja je nizak.
- Stadijum tri (prethodno stadijumi tri i četiri) odlikuje se pojavom sinhronizovanih sporih delta talasa niske frekvence (0,3-5 Hz) i velike amplitude (20-200 μV), koji zauzimaju oko 50% EEG zapisa, sa mestimičnom pojavom vretena spavanja (Carley i Farabi, 2016). I ovde EOG i EMG karakteriše oskudna aktivnost, a prag podražaja je visok, s tim da je primećeno da je nešto niži kada su u pitanju auditivni svrsishodni stimulusi, naročito kod dece.



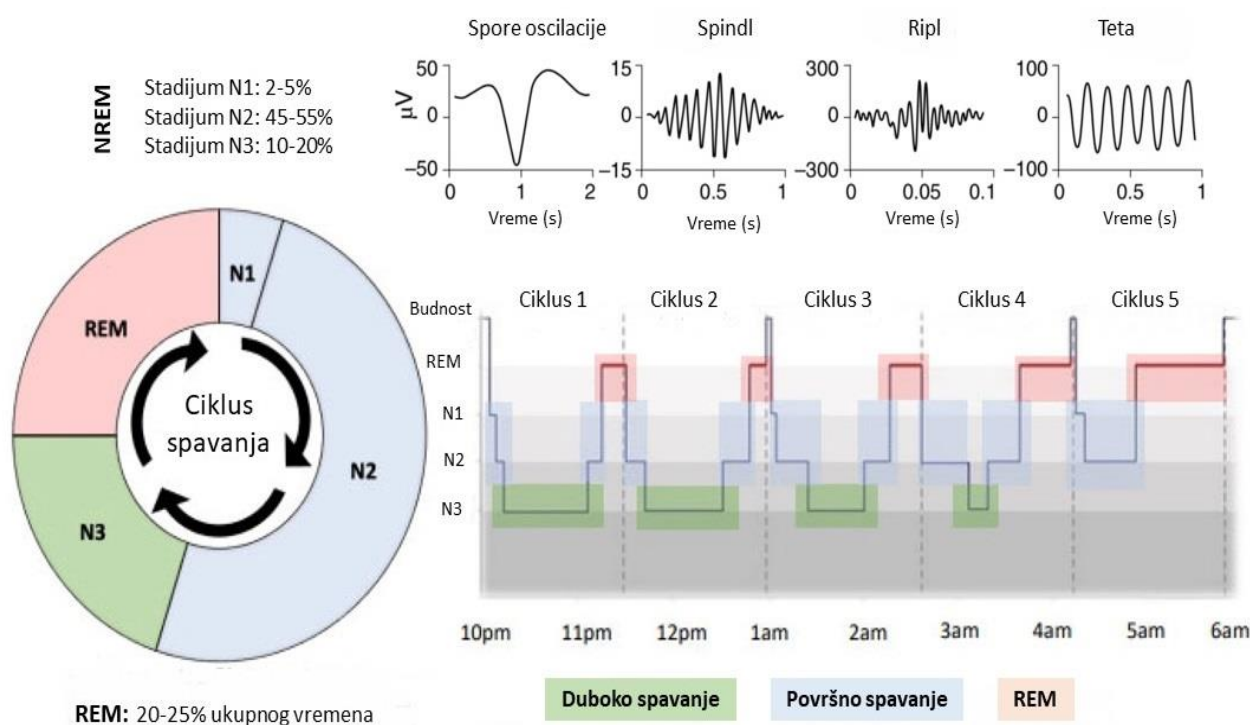
Slika 1.1. Šematski prikaz razlika u hipnogramu kod osoba različitog uzrasta

Na slici su reprezentativni hipnogrami za mlađu i stariju populaciju. Prikazane su razlike u pojedinim fazama spavanja i odnosima faza u odnosu na starosnu dob.

Trajanje REM faze spavanja varira u zavisnosti od uzrasta, i dok kod novorođenčadi REM spavanje čini oko 50% ukupnog trajanja spavanja, kod odraslih iznosi 20-25% (Slika 1.1.).

Epizode REM spavanja javljaju se otprilike svakih 90 minuta nakon sporotalasnog spavanja. Za razliku od NREM-a, REM spavanje ima svoje toničke i fazične karakteristike (Sudhansu, 2009).

Toničke karakteristike prisutne su tokom REM faze i karakteriše ih desinhronizovani EEG zapis, atonija mišića i nedostatak termoregulacije. Sa druge strane, fazične karakteristike se javljaju periodično i čine ih brzi pokreti očiju, PGO talasi i snovi (Slika 1.2.). Osim povremenih trzaja, skeletni mišići i aktivnosti okularnih mišića i dijafragme, svi ostali skeletni mišići su potpuno relaksirani (jedina fiziološka atonija i arefleksija). Regulacija telesne temperature privremeno prestaje tokom REM spavanja i za kratko vreme čovek postaje poikiloterman.



Slika 1.2. Ciklusi spavanja: Procentualni udeo i trajanje faza sa karakterističnim EEG zapisom

Na slici je prikazan ciklus spavanja, procentualni udeo pojedinih faza spavanja u tom ciklusu, kao i karakteristični EEG talasi koji se javljaju u pojedinim fazama. Modifikovano prema Driller i sar. (2023).

Pojava teta talasa u EEG zapisu svedoči o ekscitaciji moždane kore impulsima koji stižu iz subkortikalnih struktura i limbičkog sistema, a posebno hipokampusa. Dužina REM faze obuhvata interval od 5 do 30 minuta u zavisnosti od količine akumuliranog umora tokom dana, tako da se trajanje REM faze smanjuje sa povećanjem osećaja umora. Prelazak organizma u stanje budnosti dejstvom senzornih stimulusa dešava se teže nego tokom NREM spavanja. Ipak, najčešće je buđenje tokom REM faze. Paradoksalna REM faza predstavlja period spavanja u kome se metabolička aktivnost mozga povećava za oko 20%, što je ekvivalentno aktivnosti u budnom stanju, a sa druge strane skeletni mišići su u potpunoj atoniji.

Pretpostavlja se da je mogući uzrok ovog paradoksalnog stanja aktivnost holinergičkog sistema i stvaranje acetilholina u velikim neuronima retikularne formacije gornjeg dela moždanog stabla. Nastavci ovih neurona su razgranati i ekscitiraju mnoge, međusobno

udaljene, delove mozga, ali ne i čitavo moždano tkivo. Ovo dovodi do prekomerne aktivnosti pojedinih delova mozga, ali ne i nastupanja budnog stanja. Tokom REM spavanja dolazi do aktivnog sanjanja, što može dovesti do nepravilnog disanja i rada srca. Inhibicija spinalnih motoneurona i perifernih mišića uzrokuje smanjenje mišićnog tonusa, osim kod mišića oka i mišića disajnog sistema. Ovaj tip spavanja dobio je naziv po brzim skadičnim pokretima očiju. REM spavanje je manje okrepljujuće od NREM spavanja, ali se smatra da ima značajnu ulogu u razvoju mozga, obzirom na to da se broj i trajanje REM faze smanjuje sa godinama. Purves i saradnici (2001) navode da se broj i trajanje REM faze smanjuju od 8 sati na rođenju, preko 2 sata kod 20-godišnjaka, do samo 45 minuta u osoba starijih od 70 godina.

1.1.2. Mehanizmi spavanja

Razumevanje mehanizama spavanja oduvek je bilo centralno pitanje u somnologiji. Iako postoje mnogi različiti centri koji su uključeni u proces spavanja, ventrolateralno preoptičko jedro se smatra centralnim u regulaciji i uspostavljanju mehanizama spavanja (Lu i sar., 2000). Nervne ćelije koje pripadaju ovom jedru proizvode gama-aminobuternu kiselinu (GABA) i njihova aktivnost se povećava sa početkom spavanja. Međutim, neurotransmiteri kao što su serotonin, dopamin, acetilholin i noradrenalin, koji su prisutni u ascendentnom sistemu održavanja budnosti, deluju inhibitory na nervne ćelije ventrolateralnog preoptičkog jedra (Gallopini i sar., 2004). Ovo omogućava inhibiciju sistema za održavanje budnosti u hipotalamusu i moždanom stablu, čime se brzo i potpuno prelazi iz budnosti u spavanje (Saper i sar., 2010). Pored neurona ventrolateralnog preoptičkog jedra, grupa ćelija koje pripadaju medijalnom preoptičkom jedru je takođe identifikovana kao važan faktor održavanja spavanja. Aktivnost ovih ćelija povećava se tokom spavanja, ali i kada je potrebno inicirati spavanje, što ukazuje na njihovu ulogu u akumulaciji potrebe za spavanjem. Slično neuronima ventrolateralnog preoptičkog jedra, ove ćelije takođe proizvode inhibitorne neurotransmitere (Saper i sar., 2005; Scammell i sar., 2017). Neurotransmiteri poput histamina, dopamina i noradrenalina igraju važnu ulogu u održavanju stanja budnosti, dok se proces spavanja inicira putem GABA-ergičke i serotoninergičke aktivnosti (DeLacea i Eban-Rothschild, 2017). Posebna grupa neurona smeštenih na granici između rostralnog dela ponsa i kaudalnog dela srednjeg mozga identifikovana je kao ključni element u održavanju budnosti (Fuller i sar., 2011). Iako su ovi neuroni inicijalno posmatrani kao deo retikularne formacije, kasnija istraživanja su pokazala da pripadaju monoaminergičkom i holinergičkom sistemu, zajedno sa pridruženim glutaminergičkim i GABA-ergičkim neuronima. Kao takvi, oni bi trebalo da budu klasifikovani u zasebnu grupu koja, zajedno sa moždanim regionima koje inerviše, čini sistem za regulaciju smene budnosti i spavanja (Scammell i sar., 2017).

Holinergička vlakna bogato inervišu talamus, ali takođe ostvaruju komunikaciju i sa drugim delovima mozga, uključujući lateralni hipotalamus, prefrontalni korteks i bazalni deo prednjeg mozga. Holinergički neuroni se nalaze u pedunkulopontinskom i laterodorzalnom tegmentalnom jedru, a takođe i u bazalnom delu prednjeg mozga (Manns i sar., 2001). Ovi neuroni su pretežno holinergički ili GABA-ergički i imaju važnu ulogu u održavanju budnosti. Holinergički neuroni aktiviraju piramidalne neurone moždane kore, dok GABA-ergičke nervne ćelije deluju inhibitory na aktivnost moždanog korteksa (Henny i Jones, 2008; Jones, 2004). Aktivnost holinergičkih neurona je povećana tokom budnosti i REM faze spavanja, dok opada tokom NREM faze spavanja.

Interakcija monoaminergičkih i holinergičkih neurona igra ključnu ulogu u smeni stadijuma spavanja, a razlika u aktivnosti ovih neurona tokom REM i NREM faze spavanja ukazuje na ovu interakciju (Saper i sar., 2010). Merjenja ekspresije *Fos* gena identifikovala su tri populacije neurona koje su odgovorne za REM spavanje: neuroni iz sublaterodorzalnog nukleusa, *precoeruleus* regiona i medijalnog parabrahijalnog nukleusa (Saper i sar., 2010). Tokom NREM faze spavanja, ovi neuroni su inhibirani GABA-ergičkim stimulusima iz ventrolateralne

periakvaduktalne sive mase i lateralnog dela dorzalnog ponsa, koji su pod kontrolom ventrolateralnog paraorbitalnog jedra i neurona iz lateralnog hipotalamusa (Biossard i sar., 2003; Lu i sar., 2006). Ovaj proces je usmeren ka sprečavanju pojave REM faze. Nasuprot tome, tokom REM faze, sublaterodorzalni nukleus šalje GABA-ergičke inhibicione signale u ventrolateralnu periakveduktalnu sivu masu i lateralni deo ponsa, čime se sprečava NREM spavanje tokom trajanja REM faze (Lu i sar., 2006). Ovaj sistem recipročne inhibicije omogućava pravilnu smenu između REM i NREM spavanja. Pored GABA-ergičkih, u oblasti sublaterodorzalnog nukleusa identifikovana su i glutaminiergička vlakna koja se aktiviraju tokom REM faze spavanja (Lu i sar., 2006). Ove ćelije proizvode neurotransmiter glutamin, koji aktivira inhibitorne interneurone u meduli i kičmenoj moždini, što dovodi do mišićne atonije tokom REM faze spavanja. Glutaminiergička aktivnost tokom REM faze spavanja dovodi i do desinhronizacije EEG signala koji su karakteristični za REM fazu spavanja (Lu i sar., 2006).

Noradrenergički neuroni iz *locus coeruleus*-a i serotonergička aktivnost *nucleus dorsalis raphe* inhibiraju nastanak REM faze i održavaju NREM stadijuma tako što ekscitiraju neurone koji su fiziološki neaktivni tokom REM faze poput GABA-ergičkih neurona ventrolateralne periakvaduktalne sive mase i lateralnog dela dorzalnog ponsa; i inhibiraju neurone koji su normalno aktivni tokom REM faze poput GABA-ergičkih i glutaminiergičkih neurona iz sublaterodorzalnog jedra, *pre-coeruleus* regiona medijalnog parabrahijalnog nukleusa (Saper i sar., 2010; Lu i sar., 2006). Tokom REM faze noradrenergički i serotonergički sistemi su utišani čime omogućavaju održavanje REM stadijuma (Saper i sar., 2010). Holinergička jedra deluju suprotno od dejstva serotonergičkog i noradrenergičkog sistema jer podržavaju odvijanje REM faze, a tokom NREM faze su utišana (Saper i sar., 2010).

U zadnjoj polovini lateralnog hipotalamusa nalaze se neuroni koji sintetišu oreksin i glutamin, a imaju važnu ulogu u održavanju budnosti organizma. Oni ostvaruju direktno aktivirajuće dejstvo na strukture moždane kore i bazalnog dela prednjeg mozga, te deluju ekscitatorno na neurone monoaminergičkog i holinergičkog sistema koji pripadaju centru za održavanje budnosti (Inutsuka i sar., 2013). Takođe, ovi neuroni inhibiraju nastanak REM stadijuma tako što aktiviraju neurone koji su inače neaktivni tokom REM faze, čime održavaju postojanje faze sporo-talasnog spavanja (Saper i sar., 2010).

Oreksin, poznat i kao hipokretin, je neuropeptid koji se sintetiše u neuronima lateralne hipotalamusne regije. Do sada su proučena dva tipa ovog hormona: oreksin A (hipokretin 1) i oreksin B (hipokretin 2). Osim u hipotalamusu, oreksin ima uticaj na različite neuronske grupe u mozgu koje su uključene u regulaciju spavanja i budnosti. Na primer, neuronske grupe serotonergičkog *nucleus dorsalis raphe*, noradrenergičkog jedra *locus coeruleus*, dopaminergičkih neurona ventralne tegmentalne aree i histaminergičkog tuberomamilarnog jedra poseduju receptore za oreksin (Inutsuka i sar., 2013).

Osim toga, neuroni koji proizvode oreksin uspostavljaju sinapse sa holinergičkim neuronima laterodorzalnog tegmentalnog jedra i pedunkulo-pontinskog tegmentalnog jedra. Ova holinergička jedra kontrolišu stanje budnosti i REM fazu spavanja, pa se pretpostavlja da oreksin reguliše aktivnost ovih neurona i time modifikuje ciklus spavanja i budnosti (Inutsuka i sar., 2013).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da odpuštanje oreksina stimuliše prelazak iz REM i NREM faze spavanja u budno stanje, produžava vreme provedeno u budnom stanju i smanjuje trajanje i REM i NREM faze spavanja (Adamantidis i sar., 2007; Sasaki i sar., 2011). Smanjen broj nervnih ćelija koje proizvode oreksin i pad koncentracije oreksina u cerebrospinalnoj tečnosti primećeni su kod osoba koje boluju od narkolepsije, što ukazuje na važnost oreksina u regulaciji ciklusa spavanja i budnosti (Nishino i sar., 2000; Peyron i sar., 2000).

Uloga serotonina u regulaciji procesa spavanja još uvek nije potpuno razjašnjena, jer zavisi od složene interakcije serotoninergičkog sistema sa drugim neurotransmiterskim sistemima. Prema dosadašnjim istraživanjima, ekstracelularna koncentracija serotonina je direktno proporcionalna aktivnosti serotoninergičkih neurona u *nucleus dorsalis raphe*. Ovi neuroni pokazuju povećanu aktivnost u budnom stanju koja se smanjuje tokom sporotalasnog spavanja, a potpuno nestaje tokom REM faze spavanja. Serotonin deluje u sinergiji sa noradrenalinom i acetilholinom kako bi se postiglo budno stanje i moguće je da učestvuje u inhibiciji REM faze spavanja (Portas i sar., 2000).

Melatonin je neurohormon koji se sintetiše u pinealnoj žlezdi. Njegova produkcija i oslobađanje u cirkulaciju se odvijaju ritmično tokom dnevno-noćnog ciklusa, pri čemu koncentracija u krvi počinje da raste uveče i dostiže vrhunac u periodu od 2 do 4 sata nakon ponoći (Arendt i sar., 2008). Pinealna žlezda je inervisana simpatičkim, centralnim, parasimpatičkim i peptidergičkim nervima koji učestvuju u regulaciji biosinteze melatonina. Najbolje proučena je sinaptička inervacija koja dolazi iz gornjeg cervikalnog gangliona, a čija aktivnost i sinteza neurotransmitera noradrenalina podležu kontroli od strane suprahijazmatskog jedra u hipotalamusu. Ono se moduliše impulsima koji potiču od ganglijskih ćelija retine i prenose se monosinaptičkim retinotalamičkim putem (Macchi i Bruce, 2004). Melatonin se sintetiše iz aminokiseline triptofana u procesima hidrosilacije i dekarboksilacije u pinealocitima, uz pomoć enzima N-acetil transferaze i hidroksiindol-0-metil transferaze (Erland i Saxena, 2017; Tan i sar., 2016).

Serotonin igra ključnu ulogu u ovoj sintezi, budući da se prvo prevodi u N-acetil serotonin pre nego što se metilacijom pretvara u melatonin. Melatonin, ima širok spektar dejstava na organizam. Uz to što poseduje antioksidativna svojstva, deluje hipotenzivno i hipotermički, a takođe ima uticaj na reproduktivne funkcije. Međutim, njegova glavna uloga je u regulaciji cirkadijalnog ritma i adaptaciji na sezonske promene u trajanju obdanice i noći (Erland i Saxena, 2017). Melatonin je takođe uključen u regulaciju efikasnosti imunskog odgovora (Mauriz i sar., 2013). U pogledu spavanja, melatonin priprema organizam za ovaj proces, a to uključuje smanjenje telesne temperature, usporavanje srčanog rada, povećanu pospanost i sklonost ka spavanju, kao i razvoj subjektivnog osećaja potrebe za snom i konsolidaciju noćnog spavanja (Macchi i Bruce, 2004). Insomnija i drugi poremećaji spavanja povezani su sa narušenom homeostazom melatonina, što ukazuje na značaj ovog neurohormona u održavanju fiziološkog kvaliteta i kvantiteta spavanja (Erland i Saxena, 2017).

Jedan od mehanizama delovanja melatonina je regulacija ekspresije „clock” gena u ciljnim tkivima koji poseduju receptore za ovaj hormon. Ova regulacija omogućava sinhronizaciju metaboličkih procesa unutar ciljnog tkiva, reguliše produkciju hormona i srčani rad (Charrier i sar., 2017).

Svi organizmi podležu periodičnim bioritmičkim oscilacijama koje uslovljavaju odvijanje metaboličkih, bihevioralnih i fizioloških procesa, a povezani su sa rotacijom Zemlje, smenjivanjem dana i noći, promenom godišnjih doba i drugim ritmovima koji su kraći od dnevno-noćnih ciklusa (Buijs i sar., 2006). Ipak, dnevno-noćni ritam, koji traje 24 sata, je osnovni sinhronizator svih bioloških fluktuacija i od esencijalne je važnosti za vremensku usklađenost svih procesa jednog organizma sa spoljašnjom sredinom (odnosno spoljašnjim vremenskim odrednicama) ali i koordinaciju unutrašnjih procesa u vremenu (Buijs i sar., 2019).

Dakle, cirkadijalni ritam diktira izmenu aktivnosti i mirovanja, odnosno pobuđenosti i spavanja. Pojedine vrste različito su se prilagodile dnevno-noćnim promenama, i dok neke većinu fiziološki aktivnih funkcija obavljaju noću, a danju spavaju, čovek je „programiran“ za aktivnost po danu, a noć je predodređena za spavanje (Hodoba i sar., 2002).

Suprahijazmatsko jedro (SCN) kod ljudi obrađuje informacije o ciklusu svetlo-tama i kontroliše cirkadijalni ritam organizma. SCN preko monosinaptičkog retino-hipotalamičkog puta (RTH) prima elektromagnetske signale direktno iz ganglijskih ćelija retine (čine 5%). Oštećenja ovog regiona povezana su sa poremećajima ciklusa svetlo-tama i cirkadijalnog ritma, poremećajem sinhronizacije sa spoljnom okolinom (Luppi i sar., 2017).

Cirkadijalni ritam održava unutrašnju homeostazu organizma omogućavajući adaptaciju organizma na promene u okolini. Učestvuje u regulaciji mnogih bioloških i bihevioralnih procesa. Centar za uspostavljanje cirkadijalnog ritma je suprahijazmatski centar hipotalamusa koje direktno ili indirektno komunicira sa ostalim delovima organizma čime je omogućeno usklađivanje i optimizacija funkcije svih organa kako bi se organizam što bolje prilagodio promenama sredine. Dejstvo ovog sistema zavisi od endogenih i egzogenih faktora. U egzogene faktore spadaju promene u okolini kao što su smena obdanice i noći i sezonske promene u njihovom trajanju, smenjivanje stanja budnosti i spavanja, promene temperature. Endogena komponenta cirkadijalnog ritma su geni koji nose informaciju za sintezu proteinskih produkata, koji kontrolišu transkripciju drugih gena koji kodiraju različite metaboličke enzime, kao i sintezu i aktivnost mnogih transkripcionih faktora (Charrier i sar., 2017). Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi cirkadijalnog ritma su ćelijske autonomne transkripcijsko-translacijske povratne sprege koje se sastoje od grupe jedarnih „clock” gena: brain muscle aryl nuclear translocase like 1 (*Bmal1*), *circadian locomotor output cycles kaput* (*Clock*), *Period* (*Per1*, *Per2* i *Per3*) i kriptohrom (*Cry1* i *Cry2*). *Bmal1* i *Clock* se heterodimerizuju rano tokom cirkadijalnog dana i aktiviraju transkripciju *Per* i *Cry* sa svojim promotorima. Tokom rane cirkadijalne noći kompleksi koji sadrže *Per* i *Cry* potiskuju *Bmal1-Clock* posredovanu transkripciju. Tokom kasnije cirkadijalne noći *Per-Cry* kompleksi se degradiraju i ciklus ponovo počinje (Patke i sar., 2020).

Istraživanja su pokazala da mutacije gena koji učestvuju u regulaciji cirkadijalnih promena u organizmu mogu da izazovu poremećaj homeostaze spavanja (Franken i sar., 2007). Smatra se da su cirkadijalni geni uključeni u kontrolu odvijanja ne-REM faze spavanja, kao i u uspostavljanje odgovarajućeg odgovora organizma na deprivaciju spavanja (Franken i sar., 2007). Sa druge strane, postoje podaci koji svedoče o uticaju koji deprivacija spavanja može imati na cirkadijalne gene. Dosadašnja saznanja pokazuju da nedostatak spavanja može dovesti do epigenetskih promena DNK, koje podrazumevaju hipermetilaciju delova DNK koji odgovaraju transkripcionim regionima gena *Per1* i *Cry1* gena, i smanjenu ekspresiju *Bmal1* i *Cry1* gena u skeletnim mišićima. Posledično nastaje metabolička disregulacija i poremećena je energetska homeostaza organizma (Cedernaes, 2015).

Glavni izvor energije za nervno tkivo je glukoza koja biva korišćena za sintezu energije procesom glikolize ili se skladišti u astrocitima u obliku glikogena koji se razgrađuje procesom glikogenolize uz oslobađanje energije. Energetske potrebe nervnog tkiva se menjaju u zavisnosti od jačine moždane aktivnosti. U budnom stanju oslobađaju se neurotransmiteri poput vazoaktivnog intestinalnog petida (VIP), noradrenalina, serotonina, histamina i adenzina koji se vezuju za odgovarajuće receptore na astrocitima i iniciraju glikogenolizu posredstvom signalnog molekula cikličnog adenzin monofosfata (cAMP). Razgradnjom glikogena obezbeđuje se dovoljna količina energije koja je potrebna za moždane aktivnosti tokom budnosti. Tokom REM i NREM faze spavanja suprimirano je lučenje ovih neurotransmitera, smanjene su energetske potrebe organizma i omogućena je obnova rezervi glikogena procesom sinteze glikogena iz raspoložive količine glukoze.

U slučajevima kada su metabolički putevi poremećeni javlja se nemogućnost ostvarivanja adekvatnih cirkadijalnih promena u energetske snabdevanju mozga. Smanjenje količine raspoloživog ATP-a, praćeno porastom koncentracije AMP-a, svedoči o niskom energetske statusu organizma koji može biti posledica, između ostalog i nepravilnosti u odvijanju

metaboličkih procesa. AMP posreduje u sintezi adenozina koji dovodi do sistemskih promena u cilju obnove energije. Deluje vazodilatatorno na krvne sudove perifernih tkiva, a na nivou nervnog tkiva deluje tako što uvodi ćelije u hiperpolarizaciju jer indukuje povećan izlazak kalijuma iz ćelije i intracelularno naelektrisanje postaje još negativnije. Posledično, nadražljivost neurona opada, što se ispoljava kao osećaj umora i pospanosti tokom budnog stanja, a praćeno je otežanim izvođenjem kognitivnih radnji (Franken i sar., 2007). Za razliku od pomenutih cirkadijalnih gena ekspersija *Per* gena se povećava paralelno sa produžetkom trajanja budnosti i posledičnim pojačanjem potrebe za snom (Franken i sar., 2007).

1.1.3. Značaj kvaliteta spavanja za zdravlje

Najčešći simptom neadekvatnog spavanja je pojava pospanosti (Goel i sar., 2009), zajedno sa produženim vremenom reagovanja na spoljne stimulse (Goel i sar., 2009) i skraćanjem anaerobnog kapaciteta metaboličke aktivnosti (Abedelmalek i sar., 2013).

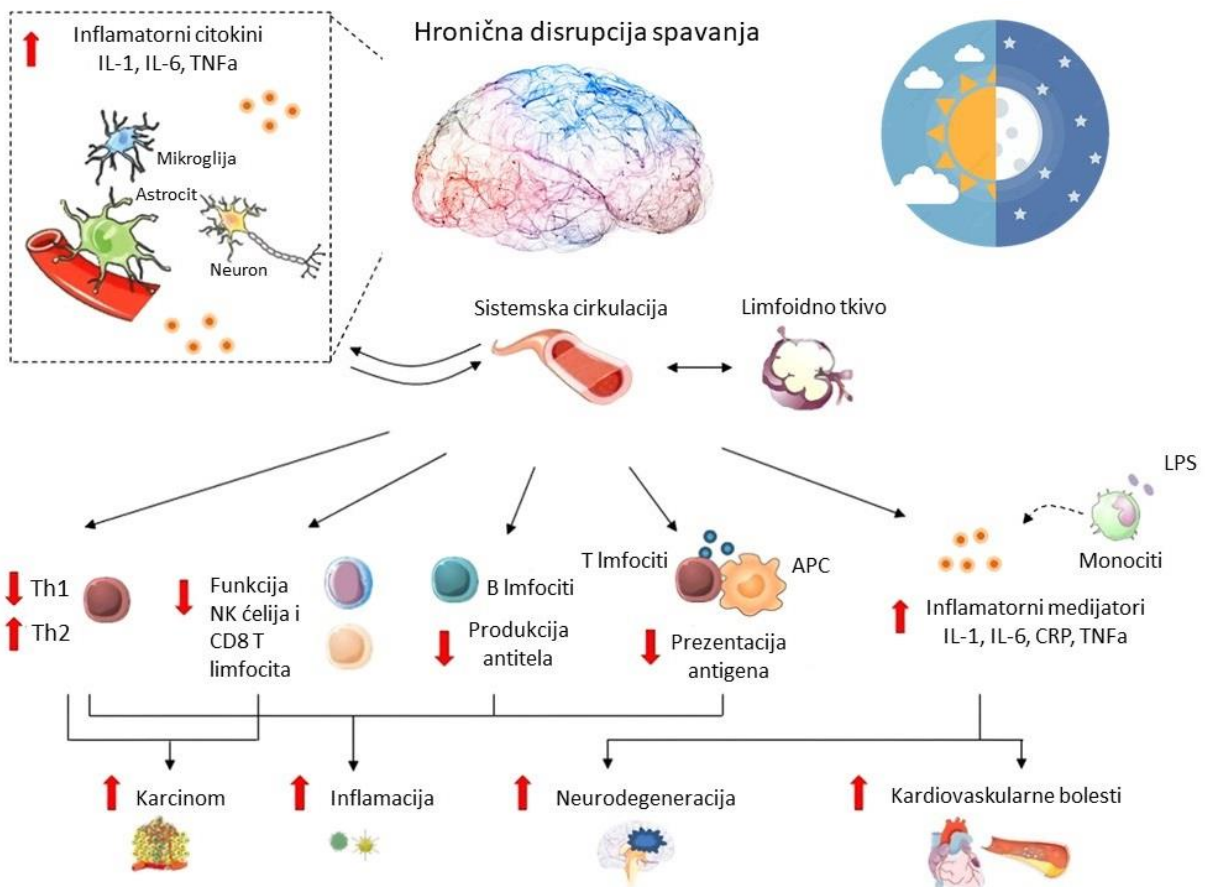
Kao posledica poremećaja u spavanju još se javljaju i pad u kognitivnim funkcijama kao što su sposobnost vizuelnog praćenja, pažnje, odlučnosti, raspoloženja (Underwood, 2010) i emocionalnog reagovanja, naročito kod adolescenata (Cortese i sar., 2013). Ovde je neophodno napomenuti i bidirekcionu povezanost između spavanja i mentalnog zdravlja (Cain i Gradisar, 2010), sa primarnim fokusom na anksioznost i depresiju kao posledice hroničnih poremećaja spavanja (Slika 1.3.). Ipak, pojedine studije opovrgavaju povezanost anksioznosti i depresije sa poremećajem spavanja i zastupaju stanovište da su ova oboljenja isključivo pridruženi faktori, a ne posledice neadekvatnog spavanja (Lovato i Gradisar, 2014).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je proces spavanja primarno regulisan sa dva mehanizma: homeostatskim procesom S, koji se primarno oslanja na stadijume spavanja i budnosti i cirkardijalnim procesom C, baziranim na endogenom pejsmejkeru, koji je odgovoran za regulaciju praga ulaska u faze spavanja (Achermann, 2004). Interakcija ova dva mehanizma određuje dužinu perioda spavanja i budnosti i odgovorna je za fluktuacije dubine spavanja (Alhola i sar., 2007).

Taub i Berger su pokazali da pojedini stadijumi u arhitekturi spavanja mogu predvideti našu efikasnost u budnosti, a sposobnost da se period spavanja (ili nedostatak istog) prilagodi svakodnevnim aktivnostima i ustali u određen period dana, neizbežno utiče na naše svakodnevno funkcionisanje. Tako i pomeranje ustaljenog perioda spavanja (napred ili nazad) za samo tri sata ima negativan efekat na raspoloženje i efikasnost narednog jutra (Taub i Berger, 1976).

U današnje vreme postoji mnogo razloga koji dovode do poremećaja spavanja, polazeći od onih trivijalnijih do ozbiljnih oboljenja (Slika 1.3.). Studija Caina i Gradisara iz 2010. je pokazala da upotreba elektronskih uređaja, naročito neposredno pre spavanja, može uzrokovati ozbiljne poremećaje (Cain i Gradisar 2010). Kasnije je ova teorija i dokazana u brojnim drugim studijama, te je objavljena čitava lista uređaja koji mogu da utiču na kvalitet spavanja kao što su televizori (Punamaki et al., 2007) i mobilni telefoni (Baum i sar., 2014).

Kada su u pitanju oboljenja koja mogu da utiču na kvalitet spavanja, najčešće su respiratorne (Day i sar., 1999) ili kardiovaskularne etiologije (Barry i sar., 1991). Uprkos činjenici da poremećaji spavanja značajno utiču na veći deo svetske populacije, do različitog stepena, evidentan je nedostatak naučnih podataka o ovom uticaju u mnogim oblastima.



Slika 1.3. Prikaz posledica koje se javljaju usled hronične disrupcije spavanja sa prikazom molekularnih mehanizama

Na slici su prikazani uticaji disrupcije spavanja na metaboličke sisteme, imunološke i imunohistohemijske promene kao i pojedine organske sisteme.

1.2. Poremećaji spavanja

Poremećaji spavanja su česti u opštoj populaciji i uključuju probleme u trajanju i kvalitetu spavanja. Međutim, nedavno se pojavio potpuno novi entitet koji karakteriše promene u kontinuitetu spavanja i koji se definiše kao disrupcija spavanja (Medic i sar., 2017). Konvencionalna podela poremećaja spavanja podrazumeva skraćanje trajanja spavanja, bilo da se radi o potpunoj nesanicu ili nedostatku pojedinih faza spavanja kod parcijalne i totalne deprivacije spavanja. Kod poremećaja kontinuiteta, ukupno vreme provedeno u spavanju nije značajno skraćeno, ali postoji poremećaj u odnosu normalnog trajanja faza spavanja ili poremećaj arhitekture spavanja.

Prva klasifikacija ovih poremećaja objavljena je 1979. godine od strane Američke asocijacije za poremećaje spavanja, a do danas ih je definisano preko 100. Klasifikacija poremećaja spavanja se uopšteno vrši korišćenjem kompleksnih metoda u odnosu na uzrok, simptome, psihološke i fiziološke efekte i druge faktore. Međutim, većina poremećaja spavanja karakteriše se sa jednim ili više od sledeća četiri znaka: teškoće pri uspavlivanju ili održavanju spavanja, nesposobnost da ostanemo budni tokom dana, poremećaj cirkadijalnog ritma koji remeti fiziološki period za spavanje, i podložnost neobičnim bihevioralnim obrascima koji remete spavanje. Ako je prisutan bilo koji od ovih znakova, može se postaviti dijagnoza poremećaja spavanja.

Iako ih ima mnogo, većinu poremećaja spavanja možemo grupisati u 4 kategorije: hipersomnija, insomnija, poremećaji cirkadijalnog ritma i parasomnije. Ove kategorije se često koriste za klasifikaciju poremećaja spavanja i koriste se za procenu i lečenje.

1.2.1. Hipersomnija

Hipersomnija je poremećaj spavanja koji može biti uzrokovan različitim faktorima. Najčešći uzrok hipersomnije je nedovoljna količina spavanja i voljna deprivacija spavanja usled socioekonomskih razloga (Morgenthaler i sar., 2007). Pored toga, hipersomnija može biti posledica narkolepsije (Mignot, 2012). Drugi mogući uzrok hipersomnije je opstruktivna apneja u spavanju, koja se javlja kada se gornji disajni putevi privremeno blokiraju tokom spavanja, što dovodi do prekida disanja i smanjenja količine kiseonika u krvi, što opet utiče na kvalitet spavanja i tokom dana dovodi do povećane pospanosti (Jordan i sar., 2014).

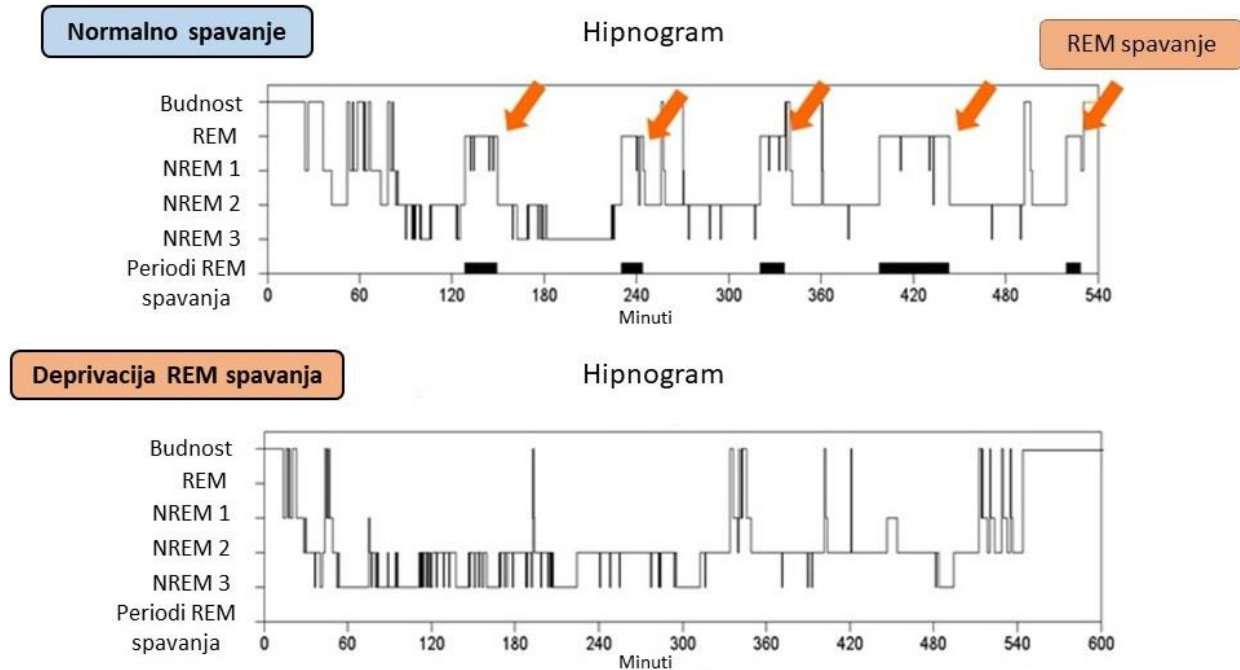
Osobe sa hipersomnijom često imaju teškoće u obavljanju svakodnevnih aktivnosti, a pospanost i umor mogu negativno uticati na njihovu radnu sposobnost, društveni život i kvalitet života. Lečenje hipersomnije može uključivati promene u načinu života, lekove za poboljšanje budnosti i druge terapijske modalitete, u zavisnosti od uzroka hipersomnije (Morgenthaler i sar., 2007).

1.2.1.1. Deprivacija spavanja

Deprivacija spavanja predstavlja kvantitativni poremećaj spavanja (Slika 1.4.). Obično se javlja kao akutni poremećaj, ali može postati i hronično stanje. U zavisnosti od načina na koji je ukupno vreme spavanja skraćeno, može se podeliti na parcijalnu i totalnu deprivaciju (Alhola 2007). Postoje dva glavna razloga zbog kojih je proučavanje deprivacije široko zastupljeno: da bi se ispitalo kako ljudi funkcionišu i koliko su efikasni u obavljanju svakodnevnih aktivnosti sa značajno narušenim spavanjem, i kako bi saznali više o samoj ulozi spavanja i efektu iste na homeostazu organizma.

Opšte je poznato da deprivacija spavanja ima brojne negativne efekte na ljude. Dovodi do povećane pospanosti, smanjenja koordinacije i problema sa održavanjem adekvatne telesne težine. Ipak, kod pojedinih ljudi pokazano je da deprivacija može dovesti do povećanja razdražljivosti, te je usled ovog efekta korišćena kao terapijska opcija za depresivne poremećaje (Riemann i sar., 2001). U eksperimentalnim uslovima deprivacija se može podeliti na totalnu, kod koje su životinje deprivirane od obe faze spavanja (NREM i REM) i parcijalnu, kod koje postoji nedostatak samo jedne od faza (NREM ili REM). Efekti totalne deprivacije spavanja su u velikoj meri slični onima kod akutne insomnije, dok se kada su u pitanju efekti REM deprivacije spavanja mišljenja razlikuju.

Kada je u pitanju parcijalna deprivacija spavanja, iako su efekti manje izraženi nego kod totalne deprivacije, ipak je uticaj na organizam značajan. Nekoliko studija je pokazalo da deprivacija REM faze spavanja može dovesti do emocionalne disfunkcije, problema sa pamćenjem i učenjem, a takođe može uticati na neke fiziološke funkcije kao što su promene u hormonskoj ravnoteži, disfunkcija metabolizma glukoze, itd. (Walker i sar., 2002; Walker i Stickgold, 2010). Sa druge strane, nedostatak NREM faze spavanja može dovesti do smanjenja motoričkih sposobnosti, umora i pospanosti, kao i smanjenja sposobnosti za obradu kompleksnih informacija (Horne i Shackell, 1989).



Slika 1.4. Prikaz hipnograma kod deprivacije REM spavanja

Na slici je prikazan karakterističan hipnogram za paradoksalnu deprivaciju spavanja kao i poređenje sa normalnim hipnogramom.

1.2.1.2. Narkolepsija

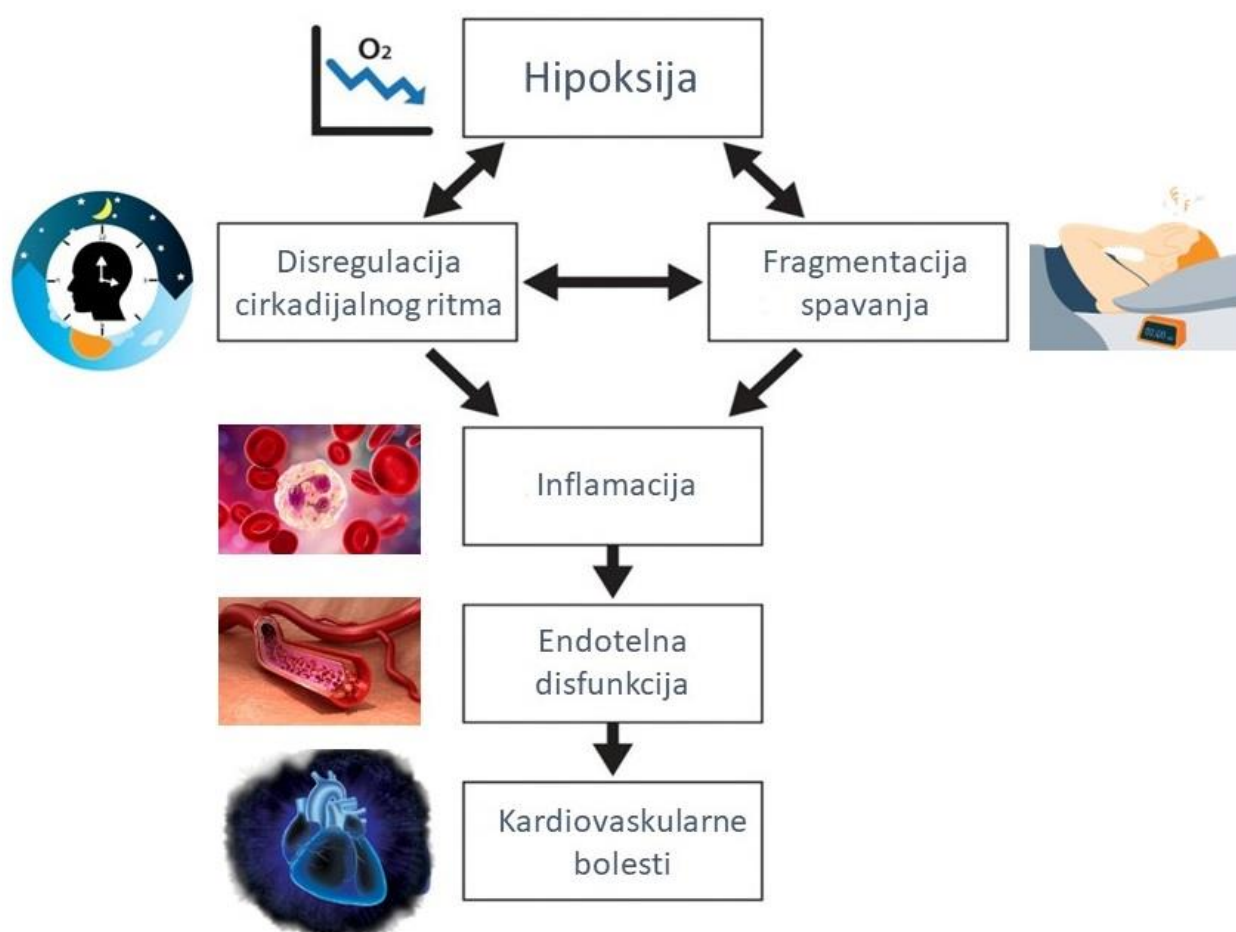
Narkolepsija predstavlja hronični poremećaj spavanja koji se karakteriše napadima iznenadnog nekontrolisanog spavanja tokom dana, naročito u periodima motoričke smirenosti. Osim prekomerne pospanosti tokom dana (eng. *excessive daytime sleepiness*, EDS), javlja se i tetrada simptoma poput katapleksije, paralize spavanja, hipnagognih i hipnopompnih halucinacija, te fragmentacija spavanja (Billard i sar., 2006). Katapleksija je iznenadni parcijalni ili potpuni gubitak mišićnog tonusa uzrokovan intenzivnim emocijama, nastaje usled inhibicije motornih neurona u kičmenoj moždini, a karakterističan je samo za narkolepsiju tip 1. Poremećaji spavanja u REM fazi spavanja su takođe jedna od karakteristika poremećaja narkolepsija tip 1. Kada, iz još uvek nepoznatog razloga, dolazi do gubitka atonije mišića koja je normalno prisutna tokom REM faze, pacijent je u stanju da odglumi sopstvene snove što se manifestuje verbalizacijom i agresivnom pokretima (najčešće ruku i nogu). Patofiziološka pozadina nastajanja ovih poremećaja je još uvek nedovoljno istražena, ali je poznato da gubitak neurona iz hipotalamusa koji sintetišu hipokretin (oreksin) dovodi do nastanka narkolepsije tip 1. Hipokretin posreduje u regulaciji unosa hrane, motivaciji, odgovoru na stres i deluje na histaminski, noradrenergički, acetilholinski i serotoninergički sistem. Gubitak neurona je najverovatnije posledica autoimunog poremećaja i dovodi do smanjenja koncentracije oreksina u organizmu, što za posledicu ima pojavu katapleksije (Khan i sar., 2015). Paraliza spavanja je nemogućnost kretanja tela neposredno pre uspavlivanja ili neposredno nakon buđenja. Izuzetak predstavlja respiratorna muskulatura i bulbomotorni mišići. Vrlo često su prisutne i auditivne halucinacije koje mogu biti hipnagogne (pojavljuju se neposredno pre spavanja) ili hipnopompne (pojavljuju se prilikom buđenja). Osoba je uglavnom svesna da su u pitanju senzorne obmane, uprkos činjenici da deluju hiperrealno.

Narkolepsija ima prevalenciju 20-50/100 000 stanovnika u Sjedinjenim Američkim Državama, sa podjednakom incidencom kod muškaraca i žena, a karakteriše je javljanje uglavnom kod mlađih ljudi starosti između 20 i 40 godina (Hodoba i sar., 2017).

1.2.1.3. Apneja u spavanju (fragmentacija spavanja)

Prevalenca apneje u spavanju u opštoj populaciji sveta iznosi između 9 i 38% i veća je kod muškaraca, dok je u starijoj populaciji 90% kod muškaraca i 78% kod žena (Senaratna i sar., 2017). Pacijenti sa opstruktivnom apnejom u spavanju imaju rekurentne zastoje u disanju tokom spavanja usled stenozе gornjeg respiratornog trakta ili smanjenog tonusa mišića koji održavaju prohodnost gornjih respiratornih puteva. Ovi pacijenti mogu imati kolaps respiratornih puteva tokom spavanja, što može dovesti do potpunog (apneje) ili parcijalnog zastoja disanja (hipopneje).

Povećan pritisak u gornjem respiratornom traktu uzrokuje refleksno povećanje mišićne aktivnosti, ali kada je to nedovoljno za adekvatnu oksigenaciju, promene koncentracije gasova u krvi (snižena vrednost O₂ i povišena vrednost CO₂) će naterati pacijenta da izvede akt inspirijuma kroz zatvoreni gornji respiratorni sistem, što često uzrokuje razbuđivanje i, naposljetku, fragmentaciju spavanja (Peker i sar., 2015).



Slika 1.5. Kardiovaskularni poremećaji koji se javljaju kod fragmentacije spavanja ili opstruktivne apneje u spavanju (OSA)

Na slici su prikazane posledice fragmentacije spavanja i njeno delovanje na organske sisteme.

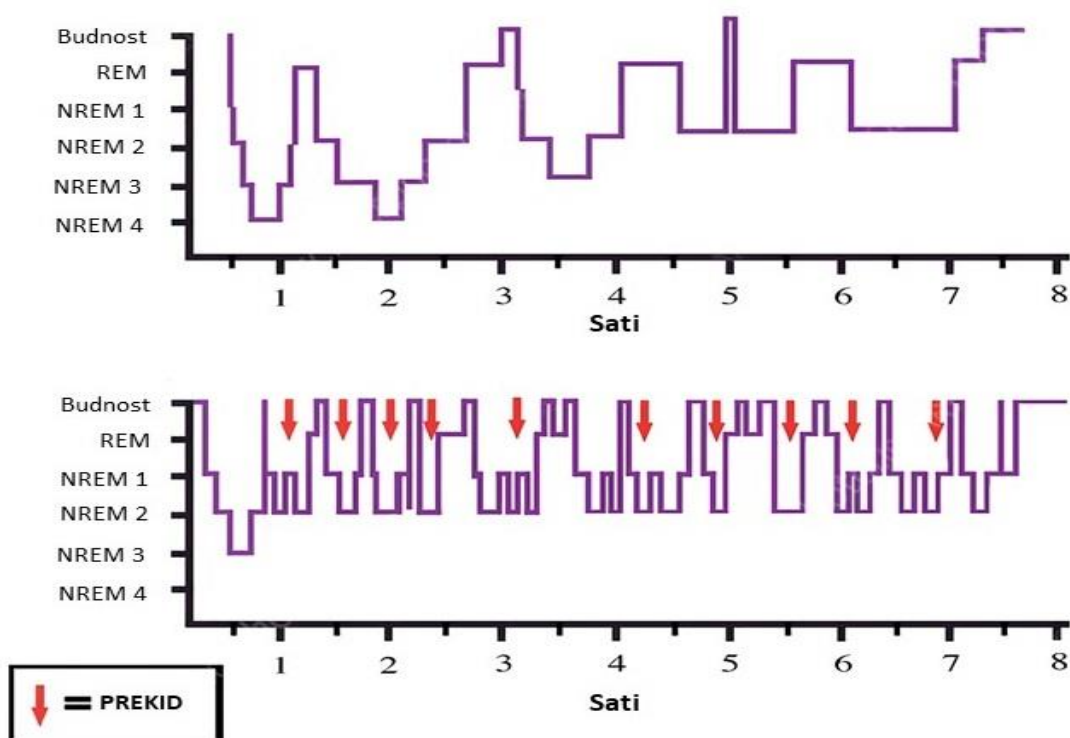
Fragmentacija spavanja se smatra kvalitativnim poremećajem spavanja (Slika 1.6.), koji se javlja kod pacijenata sa brojnim psihijatrijskim i respiratornim problemima, a naročito je česta kod pacijenata koji boluju od opstruktivne apneje u spavanju (Franken i sar., 2001; Levine i sar., 1987). Ova pojava se karakteriše povećanom pospanošću tokom dana, nedostatkom pažnje i smanjenim kognitivnim sposobnostima (Hoyt, 2005; Toth i Roehrs, 1996). Iako ukupno vreme

spavanja nije značajno skraćeno kod fragmentacije, većina istraživača smatra da su posledice fragmentisanog spavanja uglavnom povezane sa restrukturiranjem arhitekture spavanja i frekventnim prekidima spavanja te posledičnim stresom koji ti prekidi uzrokuju (NHLBI, 2009; Devinsky i sar., 1994).

Dostupna literatura ukazuje na povezanost fragmentacije spavanja sa raznim psihološkim i somatskim poremećajima, uključujući kardiovaskularne bolesti, metabolički sindrom, depresiju, anksioznost i bol (Ohayon i Roth, 2003; Spiegelhalder i sar., 2010; Vgontzas i sar., 2013)(Slika 1.5.). Studija koja je uključivala pacijente sa opstruktivnom apnejom u spavanju (OSA) otkrila je da su pacijenti sa fragmentacijom spavanja imali povećanu pospanost tokom dana, nedostatak pažnje i smanjenje kognitivnih sposobnosti (Banno i sar., 2018). Takođe, povezanost fragmentacije spavanja s povišenim krvnim pritiskom, metaboličkim sindromom i povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti ukazuje na važnost dijagnostifikovanja i lečenja ovog poremećaja spavanja (Bixler i sar., 2000; Glos i sar., 2019; Spiegelhalder i sar., 2010).

Postoji nekoliko različitih metoda za procenu fragmentacije spavanja, uključujući indeks budnosti tokom spavanja, indeks prekida spavanja i indeks uzastopnih intervala buđenja (Iber i sar., 2007). Sve ove metode koriste se za kvantifikovanje broja prekida u spavanju i različitih oblika buđenja tokom noći.

Uz to, dugotrajna fragmentacija spavanja može dovesti do hroničnog umora, lošijeg kvaliteta života i lošijeg zdravstvenog ishoda (Talbot i sar., 2014).



Slika 1.6. Prikaz normalnog hipnograma kao i hipnograma kod osobe sa fragmentacijom spavanja

Na slici je prikazan hipnogram kod fragmentisanog spavanja i poređenje sa normalnim hipnogramom.

1.2.2. *Insomnija*

Insomnija predstavlja najčešći poremećaj spavanja, ali procene o njenoj učestalosti uveliko zavise od korišćenih kriterijuma, kao i od ciljne populacije. Ipak, smatra se da oko 30% odraslih u opštoj populaciji sveta ima najmanje jedan od simptoma insomnije (Roth, 2007). Prevalenca ovog poremećaja linearno raste sa uzrasnom dobi. Insomnija predstavlja primarni poremećaj spavanja i ne može da se pripíše drugim medicinskim i psihijatrijskim uzrocima, iako može biti uzrokovana brojnim medicinskim stanjima kao što su hronični bol, srčana insuficijencija, hipertireoidizam i zloupotreba lekova (Wilson, 2008). Frekventni uzrok insomnije je sindrom nemirnih nogu (eng. *restless leg syndrome*, RLS) ili Wills-Ekbom-ova bolest. To je hronični i progresivni senzomotorni poremećaj koji u većini slučajeva dovodi do težih smetnji prilikom spavanja. Simptomi RLS-a podrazumevaju neugodan osećaj u nogama, rukama, pa i celom telu koji je opisan kao osećaj bockanja, žarenja, gmizanja, nenasnosne vrućine ili boli, te se javlja uveče kada oboleli miruje. Najčešći simptomi uključuju teškoće sa započinjanjem spavanja, probleme sa pronalaskom adekvatnog položaja za spavanje, buđenje tokom noći i nemogućnost osobe da ponovo zaspi i drugi. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, kao mogući razlozi učestalih depresivnih poremećaja kod osoba sa sindromom nemirnih nogu navode se fragmentacija spavanja koja vodi opadanju kvaliteta života, oslobađanje proinflammatoryh citokina, povećana simpatička aktivnost, deficijencija dopamina i oksidativni stres (Gupta i sar., 2013). Povećanje koncentracije acetilholin-esteraze i pad koncentracije lipidne hidroperoksidaze ukazuju na nastojanje organizma da održi dopaminergičku aktivnost u centralnom nervnom sistemu. Povećana simpatička aktivnost pomaže u otklanjanju neželjenih simptoma ovog poremećaja spavanja, ali istovremeno dovodi do porasta vrednosti ukupnog oksidativnog statusa (Cikrikcioglu i sar., 2011).

Postoje različiti terapijski pristupi ovom poremećaju, ali najefektivnijim se smatra uspostavljanje higijene spavanja, kao deo kognitivnog bihevioralnog tretmana (Morin i sar., 2006).

Osobe koje pate od insomnije imaju uočljiv porast učestalosti visoko-frekventnih talasa u EEG zapisu, abnormalnu hormonalnu sekreciju, povišenu metaboličku aktivnost na nivou mozga i celog organizma, ubrzan srčani rad i pojačanu simpatičku aktivnost tokom spavanja (Bonnet i sar., 2010). Smatra se da osnovu ovog poremećaja čini povećana somatska, kognitivna i kortikalna aktivnost. Prisutne su promene metabolizma, funkcije i građe struktura koje ulaze u sastav centralnog nervnog sistema: ascendentnog retikulo-aktivacijskog puta koga čine moždano stablo, talamus i hipotalamus, amigdale, hipokampus, insule, parijetalnog i frontalnog korteksa, i *nucleus caudatus*-a, što dovodi do njihove povećane ili smanjene funkcionalne povezanosti (Yan i sar., 2018). Povezano sa povećanom aktivnošću prednje insule, javljaju se visoko frekventni gama talasi tokom spavanja kod osoba sa insomnijom. Alfa talasi tokom prvog stadijuma su redukovani, ali uz nemogućnost njihovog potpunog iščezavanja tokom kasnijih stadijuma spavanja ili nastanka alfa bloka tokom budnosti (Chen i sar., 2014).

Simptomima insomnije pridružuje se i karakterističan kognitivni model prisutan kod mnogih bolesnika sa insomnijom, a koji se zasniva na produženoj negativnoj kognitivnoj aktivnosti vezanoj za njihovo spavanje (Levenson i sar., 2015). Pacijenti bivaju previše zabrinuti vezano za sopstveno spavanje i posledice po sveukupno zdravlje, koje, nastale nepravilnosti tokom spavanja mogu ostaviti, provode dosta vremena analizirajući razloge lošeg spavanja, osećaju se bespomoćno i zabrinuto, imaju negativna očekivanja i strepe od nastupanja sledećeg perioda spavanja (Harvey 2002). Ovakav način razmišljanja otežava tretman poremećaja spavanja, a može da deluje i stresogeno i dovede do nastanka dodatnog gubitka spavanja (Harvey 2002). Ovakav negativni kognitivni model učestaliji je kod bolesnika kod kojih su simptomima insomnije pridruženi depresivni poremećaji (Levenson i sar., 2015).

Pokazano je da uspostavljanje adekvatne higijene spavanja pomaže da se značajno ublaže ili čak potpuno eliminišu simptomi insomnije, ali uprkos efektivnosti ove metode pojedini specifični poremećaji spavanja, naročito ukoliko su udruženi sa nekim drugim medicinskim stanjem često zahtevaju dodatne terapijske pristupe (Caruso, 2012).

1.2.3. Poremećaji cirkadijalnog ritma

Ovi poremećaji se dele na primarne i sekundarne. Grupa primarnih obuhvata perzistentne probleme usklađivanja cirkadijalnog ritma spavanja sa cirkadijalnim ritmom većine drugih osoba a karakterističan primer je sindrom odgođene faze spavanja, odnosno sindrom pomaka faze spavanja unapred. Sekundarni se uglavnom odnose na poteškoće u prilagođavanju na nove sredinske uslove poput poremećaja kod smenskog rada ili prilikom putovanja kroz vremenske zone (eng. *jet lag*). Pacijenti sa sindromom odgođene faze spavanja će se osećati budno i sveže kasno uveče. Njihov kvantitet i kvalitet spavanja je nepromenjen, međutim spavanje je potpuno neusklađeno sa ritmom svetlo/tama, te je rano buđenje, usled socijalnih okolnosti, povezano sa umorom, pospanošću i osećajem ošamućenosti. Za ovu grupu ljudi često se koristi termin "noćne sove", obzirom da oni sa odmicanjem dana postaju odmorniji. Kada je u pitanju sindrom pomaka faze spavanja on je ređi nego prethodni. Pacijent se obično žali da zaspi u 9 sati uveče i da se budi između 4 i 6 sati ujutro. Radnici, čija organizacija posla zahteva smenski rad, se žale na teškoće započinjanja i održavanja spavanja, kao i slabiji kvalitet spavanja. Oni obično pate od hroničnog umora, pospanosti ili mogu zadremati prilikom rada. Uočen je veći broj akcidenata na poslu i grešaka usled poremećene pažnje, a povećana je i incidenca hronične depresije, emocionalne disregulacije, problema u porodici i prekomernih uživanja u psihoaktivnim supstancama u odnosu na ukupnu populaciju (Reite i sar., 1997).

Jet lag poremećaj je privremeno stanje koje se javlja nakon putovanja kroz različite vremenske zone. Simptomi poput insomije (ili pospanosti tokom dana) se javljaju zbog asinhronizacije endogenog cirkadijalnog sata sa eksternom sredinom. Pored insomnije ostali simptomi uključuju generalnu slabost i gastrointestinalne poremećaje.

1.2.4. Parasomnije

Parasomnije predstavljaju kompleksne poremećaje spavanja, sa različitim manifestacijama, koji se javljaju tokom spavanja ili u prelazima između stanja spavanja i budnosti. Ovi poremećaji obično proizilaze iz disfunkcije u regulaciji ciklusa spavanje/budnost. Narkolepsija, zajedno sa drugim parasomnijama, podržava teoriju da spavanje i budnost nisu strogo odvojeni procesi, a da spavanje ne obuhvata sve aspekte mozga (Mahowald i sar., 2005).

Obuhvataju jako širok spektar poremećaja a mogu se manifestovati raznovrsnim nesvrshodnim pokretima, poremećajima ponašanja, neadekvatnim emocionalnim reakcijama i perceptivnim fenomenima. Osnovna klasifikacija parasomnija temelji se na fazi spavanja u kojoj se manifestuju, pa se dele na NREM i REM parasomnije. Termin "NREM parasomnija" označava poremećaj buđenja koji proizilazi iz nepotpunog buđenja iz NREM faze spavanja, obično u prvom delu noći. Ovo kao posledicu može imati agitirano ponašanje praćeno emocionalnim reakcijama poput straha ili besa. Tokom ovih epizoda, uočena je i elektroencefalografska aktivnost karakteristična za budnost u različitim delovima korteksa, što ukazuje na poremećaj ravnoteže između aktivacije i inhibicije.

Somnambulizam predstavlja disocijativni poremećaj svesti koji se obično javlja tokom dubokog spavanja, posebno kod dece i adolescenata. Osobe koje mesečare obično imaju otvorene oči, ponavljajuće i nesvrshodne pokrete, ali često zadržavaju svest o okolini i sposobnost razmišljanja. Probuditi osobu koja mesečari može biti teško, a kad se to postigne, osoba može biti zbunjena i često agresivna. Prevalencija somnambulizma varira u zavisnosti od

uzrasta, sa najvišom kod dece od 12 godina (16,7%) i ukupnom od oko 2% kod odraslih osoba (Hodoba i sar., 2002).

Noćni strahovi nastupaju neočekivano tokom spavanja i karakterišu se epizodama uznemirenosti, agitacije i izražene motoričke aktivnosti. Osobe koje dožive noćne strahove teško se bude i obično nemaju percepciju o događajima ili im je pamćenje fragmentirano. Ove epizode često prate autonomna hiperaktivacija, ubrzan srčani ritam, crvenilo i pojačano znojenje. Noćni strahovi se češći kod dece, dok se kod odraslih povezuju sa mentalnim poremećajima ili alkoholizmom. Iako često benigni, ponašanje tokom noćnih strahova može biti agresivno i potencijalno opasno za pojedinca ili partnere koji su u blizini.

Poremećaj ponašanja tokom REM spavanja (eng. *REM behavior disorder*, RBD) karakteriše odsustvo mišićne atonije koja je inače prisutna u REM fazi, što omogućuje motoričke manifestacije sadržaja snova. Ove epizode mogu uključivati različite motoričke aktivnosti, uključujući govor, trzanje udova, vrištanje, udaranje i pokušaje hvatanja predmeta ili osoba. Prevalencija RBD-a u opšoj populaciji procenjuje se na 1-2% (Kang i sar., 2013). Ovaj poremećaj može se javiti u akutnom obliku kao nuspojava određenih lekova, poput selektivnih inhibitora ponovnog preuzimanja serotonina (SSRI), ili u hroničnom obliku, često kao manifestacija neurodegenerativnih oboljenja poput Parkinsonove bolesti ili demencije. U nekim slučajevima, RBD se može pojaviti i deset godina pre drugih simptoma ovih bolesti (Mahowald i sar., 2005).

1.3. Razlika između deprivacije i fragmentacije spavanja

Individualni period spavanja tokom 24 sata varira od osobe do osobe, ali prosečno vreme spavanja iznosi između 7 i 8,5 sati dnevno (Kripke i sar., 2002; Kronholm i sar., 2006; Shneerson, 2000). Da bi se postigao pozitivan uticaj spavanja, potrebno je da ono ne bude prekinuto u određenom minimalnom periodu. U suprotnom, restorativna funkcija spavanja može biti narušena ili izgubljena (Bonnet, 1986; Franken i sar., 2001). Postavlja se pitanje koliki je minimalni period vremena u kojem spavanje ne bi smelo da bude prekinuto?

Mnogi istraživači su se bavili ovim pitanjem, uglavnom kvantifikujući dnevnu pospanost koja se javlja nakon poremećaja spavanja. Rezultati dobijeni na ovaj način pokazuju da se ozbiljne posledice fragmentacije spavanja javljaju kada je interval prekida spavanja jedan put u minuti, što je gotovo identično efektima totalne deprivacije spavanja. Osim toga, frekvencija od jednog prekida u minuti predstavlja granicu između deprivacije i fragmentacije spavanja, a svaka veća frekventnost prekida od ove uvodi organizam u totalnu deprivaciju spavanja (Bonnet, 1986; Levine i sar., 1987).

Ukoliko je frekvencija prekida 1/10 minuta ili manja, restorativna uloga spavanja ostaje očuvana (Levine i sar., 1987; Downey i Bonnet, 1987). Dakle, zaključak je da se fragmentacija spavanja kao entitet odnosi isključivo na interval prekida od 1/1 minuta do 1/10 minuta, a svaka veća ili manja učestalost prekida ne može se smatrati ovim poremećajem.

Deprivacija spavanja se odnosi na nedostatak spavanja u celini, dok fragmentacija spavanja predstavlja učestale prekide spavanja koji narušavaju kontinuitet spavanja (Bonnet, 1986). Istraživanja su pokazala da je fragmentacija spavanja povezana sa smanjenim kvalitetom spavanja, a time i sa povećanom dnevnom pospanošću i umorom (Levine i sar., 1987; Bonnet, 1986). U poređenju sa deprivacijom spavanja, fragmentacija spavanja može imati manje dramatične posledice na ukupno zdravlje i performanse, ali ipak utiče na mnoge aspekte života (Bonnet, 1986).

Uz to, postoji i veza između fragmentacije spavanja i različitih zdravstvenih problema. Neki istraživači su pokazali da je fragmentacija spavanja povezana sa povećanim rizikom od

različitih zdravstvenih problema, uključujući kardiovaskularne bolesti, metabolički sindrom, depresiju i anksioznost (Spiegelhalder i sar., 2010; Redline i sar., 2010; Lallukka i sar., 2013).

S druge strane, deprivacija spavanja može biti posledica različitih faktora, uključujući stres, anksioznost, depresiju, fizičku bolest ili obaveze koje oduzimaju vreme za spavanje (Franken i sar., 2001). Ovaj nedostatak spavanja može dovesti do niza posledica, uključujući smanjenje kognitivnih funkcija, pažnje i performansi, povećanje rizika od saobraćajnih nesreća i drugih nezgoda, a takođe može imati negativan uticaj na mentalno zdravlje (Gupta et al., 2013; Pilcher i Huffcutt, 1996).

1.4. Ekonomski i sociomedicinski aspekti poremećenog spavanja

Istraživanja na ekperimentalnim životinjama su pokazala da je smrt neizbežna posledica dugotrajne deprivacije spavanja (Shneerson, 2000). Kada su u pitanju ljudi, epidemiološke studije su uspostavile vezu između značajnog skraćanja ili produžavanja vremena spavanja i mortaliteta. Kratkotrajno spavanje (manje od 5 sati) i dugotrajno spavanje (preko 9 sati) povezani su sa povećanim rizikom za smrtni ishod (Kripke i sar., 2002). Poremećaji spavanja svakako imaju i jasan negativan uticaj na zdravlje. Na primer, insomija je povezana sa povećanim rizikom za razvoj depresivnih poremećaja (Kronholm i sar., 2006), dok je sindrom opstruktivne apneje u spavanju često udružen sa kardiovaskularnim bolestima i hipertenzijom (Polonis i sar., 2017).

Centar za kontrolu bolesti i prevenciju (*Center for Disease Control and Prevention-CDC*) je proglasio neadekvatno spavanje javno-zdravstvenim problemom. Naime, više od trećine odraslih osoba u Americi ne spavaju dovoljno na dnevnom nivou (Liu i sar., 2014). Ipak to nije ekskluzivno rezervisano za SAD, već je primećeno i u drugim razvijenim državama poput Velike Britanije, Japana, Nemačke i Kanade. Nedovoljno trajanje spavanja ili poremećeno spavanje je povezano sa sedam od petnaest vodećih uzroka smrti uključujući kardiovaskularna oboljenja, maligne neoplazme, cerebrovaskularne bolesti, nesreće, dijabetes, septikemiju i hipertenziju (Kochanek i sar., 2014). Poremećeno spavanje je povezano i sa značajnim smanjenjem produktivnosti na radnom mestu što dovodi do saobraćajnih nesreća, industrijskih havarija i medicinskih grešaka (Nuckols i sar., 2009; Pack i sar., 1995). Pokazano je da je nedostatak spavanja igrao ulogu u brojnim katastrofama uključujući nuklearnu eksploziju u Černobilju, Nuklearni incident *Three Mile Island*, Curenje *Exxin Valdez* i tragediju svemirskog šatla *Challenger* (Dinges i sar., 1986; Moss i Sills, 1981; Walsh i sar., 2011). Svaki od ovih incidenata, ne samo da je koštao milione dolara već je i imao značajan uticaj na životnu sredinu i zdravlje lokalnih zajednica. Neurobihevioralni uticaj je daleko veći od samog poremećaja kognicije (pažnja i smanjeno reakciono vreme) i uključuje greške u rasuđivanju i donošenju odluka. Efekti poremećenog spavanja na rad uključuju i nevoljnu pojavu „*mikrosleep*“ segmenata. Pažnja prilikom izvođenja intezivnog rada je izrazito nestabilna sa povećanjem rizika od propusta i previda, a reakciono vreme se značajno produžava. Smanjuje se i sposobnost izvođenja više zadataka u isto vreme, produženo je vreme učenja, kompenzatorni efekti za bihevioralnu prihvatljivost su povećani. Čak i ako se ispunjavaju zadaci, učinkovitost je značajno smanjena, a vreme potrebno za izvođenje zadatka produženo.

Nacionalna Fondacija za spavanje je objavila da je samo-prijavljena pospanost tokom vožnje porasla od 51% 2001. godine na 60% 2005. (NSF, 2011). Nesreće usled uspavljanja tokom vožnje se uglavnom javljaju u dva perioda dana koji koincidiraju sa cirkardijalnim varijacijama u pospanosti, u ranu zoru (2:00 do 08:00h) (Pack i sar., 1995; Connor i sar., 2002) i tokom poslepodneva (Horne i Rayner 1995; Carskadon, 2004). Najčešći razlozi za nesreće usled spavanja su rad na više poslova, noćne smene i trajanje spavanja manje od 5 sati (Stutts i sar., 2003). Apneja u spavanju je zaslužna za značajan procenat automobilskih nesreća, naročito kod

vozača ispod 25 godina starosti (Sassani i sar., 2004). Osobe sa apnejom u spavanju imaju dvostruko veći rizik da imaju saobraćajnu nesreću u odnosu na zdrave pojedince. Naime, veći apneja/hipopneja indeks podrazumeva veći rizik (Young i sar., 1997).

Kada je u pitanju kvalitet života, u više studija je pokazano da spavanje ima značajnu ulogu. Leger i sar. su pokazali da osobe sa insomnijom imaju značajno smanjenje vrednosti svih osam segmenata SF-36 upitnika (Leger i sar., 2001). Sniženje kvaliteta života je bilo slično onome kod kongestivnog oštećenja srca i depresije (Katy i McHorney, 2002). Kada su u pitanju pacijenti sa OSA, i oni su imali značajno smanjenje kvaliteta života koje je kod njih udruženo sa smanjenjem vitalnosti (Baldwin i sar., 2001). Dok su oni koji su imali dobar odgovor na CPAP terapiju pokazali poboljšanje u svih osam segmenata SF-36 dva meseca nakon započinjanja terapije (Redline i sar., 1998). Ono što je takođe primećeno jeste da CPAP samo delimično popravlja kvalitet života u smislu smanjenja dnevne pospanosti, i veće efikasnosti spavanja (Parish i Lyng, 2003).

Pacijenti sa poremećajima spavanja imaju između 10 i 20% veće korišćenje zdravstvene zaštite u odnosu na zdrave osobe (Kapur i sar., 2003). Ovo je naročito izraženo kod pacijenata sa insomnijom koja predstavlja dugotrajan teret za zdravstveni sistem, nakon postavljanja inicijalne dijagnoze (Katz i McHorney, 1998). Kada je u pitanju OSA, medicinski troškovi jednog pacijenata sa OSA su duplo veći u odnosu na zdrave osobe (2720\$ vs 1384\$) (Kapur i sar., 1999). Nasuprot ovome, još veći problem predstavlja činjenica da 80-90% pacijenata sa OSA nemaju postavljenu dijagnozu i adekvatn tretman (Young i sar., 1997). Kanadska analiza na pacijenima sa teškom opstruktivnom apnejom u spavanju pokazala je da je broj dana hospitalizacije, godinu dana pre postavljanja dijagnoze, više od dvostruko veći kod pacijenata sa OSA u poređenju sa kontrolama (251 vs. 90), što povećava cenu usluga sa 49000\$ na 99000\$ po pacijentu (Kryger i sar., 1996).

Smatra se da bi, ukoliko bi želeli da lečimo sve osobe u SAD sa apnejom u spavanju, bilo potrebno preko 3 milijarde dolara (Sassani i sar., 2004), dok su indirektni troškovi usled svih nuspojava narušenog spavanja značajno veći i procenjuju se na preko 200 milijardi dolara godišnje (Leger, 1994).

1.5. Spavanje i epilepsija: bidirekcionni odnos

Epilepsije su grupa neuroloških poremećaja koji se javljaju zbog iznenadne i prekomerne aktivnosti neurona, kao rezultat prevage ekscitabilnih nad inhibitornim fenomenima u centralnom nervnom sistemu (CNS), sa karakterističnim manifestacijama u vidu epileptičnih napada i pojavom specifične iktalne aktivnosti na elektroencefalogramu (EEG) (Fisher i sar., 2014). Ujedno, epilepsija je jedan od najčešćih neuroloških poremećaja danas (Fisher i sar., 2014; Thurman i sar., 2011). Odnos između jedne od osnovnih funkcija CNS-a (spavanja) i jedne od osnovnih disfunkcija (epilepsije) je i danas predmet istraživanja (Stanojlovic i sar., 2007).

Nedostatak spavanja može da izmeni pojavu i tok epileptičnih napada i da menja njihovu učestalost (Strine i Chapman, 2005). Svako prekidanje i skraćivanje spavanja umanjuje njegove pozitivne efekte (Akerstedt i sar., 2003). Čak 8-10% današnje populacije pati od hronične insomnije, dok još 20-30% pokazuje simptome karakteristične za insomniju (Bonnet i sar., 2003). U studiji o bihevioralnom morbiditetu kod opstruktivne apneje u spavanju (Day i sar., 1999), pokazano je da deprivacija spavanja, kao i fragmentacija, mogu biti faktor rizika za pojavu brojnih oboljenja, u prvom redu gojaznosti, kardiovaskularnih i mentalnih bolesti, uključujući psihoze, bipolarne poremećaje i epilepsije. Sa druge strane, različiti poremećaji spavanja se javljaju i kao posledica brojnih neuroloških, psihijatrijskih, kao i respiratornih

oboljenja (Day i sar., 1999; Roth i Roehrs, 1996). Etiološki, prevaga ekscitatornih nad inhibitornim fenomenima u CNS-u je multikauzalna, ali svakako je neophodno spomenuti ulogu „clock“ gena koji ne samo da regulišu cirkadijalni ritam, već takođe doprinose sklonosti ka epilepsiji (Matos i sar., 2018). Clock geni mogu ritmički poremetiti ekscitatornu i inhibitornu ravnotežu, što dovodi do pojave periodičnih konvulzija (Leite Goes Gatai i sar., 2019). U animalnom modelu mezijalne epilepsije temporalnog režnja nakon status epilepticusa, utvrđena je disregulacija ekspresije clock gena tokom epileptogeneze: ekspresija *Per1* i *Cry1* povećava se u ranom periodu nakon statusa epilepticusa i smanjuje se na bazalni nivo tokom konvulzija, dok se ekspresija *Bmal1*, *Clock* i *Cry2* postepeno smanjuje tokom epileptogeneze (Matos i sar., 2018). Ipak, tačna uloga ovih gena u samom procesu epileptogeneze još uvek je nepoznanica. Takođe, na animalnom modelu generalizovanih konvulzija izazvanih električnom stimulacijom prag neurona za nadražaje je značajno niži kod *Bmal1* knock-out miševa u poređenju sa *wild-type* životinjama (Gerstener i sar., 2014). Zanimljivo je da je ekspresija „clock“ gena u u uzorcima korteksa kod slučajeva fokalne kortikalne displazije i kompleksa tuberozne skleroze, smanjena u epileptogenom tkivu u poređenju sa kontrolnim tkivom. Osim toga, *Emx-Cre*, *Clockfox/flox* miševi sa uslovnom delecijom *Clock-a* u ekscitatornim neuronima češće imaju konvulzije povezane sa spavanjem (Li i sar., 2017). Ovi rezultati sugerišu da poremećaj funkcije ili ekspresije „clock“ gena ima značajnu ulogu u stvaranju fokalne epilepsije. U zavisnosti od faze spavanja epileptiformna pražnjenja mogu biti aktivirana ili inhibirana. Obično se epileptiformne promene propagiraju tokom NREM faza spavanja, budući da je ovo više sinhronizovano stanje sa arhitekturom koju karakterišu vretena spavanja i delta talasi visokih amplituda na hipnogramu. Nasuprot tome, tokom REM faze postoje asihroni obrasci neuronskog pražnjenja, što propagaciju konvulzivnih pražnjenja čini manje verovatnom. Već je pokazano da su generalizovana epileptiformna pražnjenja češća tokom NREM faza (Malow i sar., 1998), sa tendencijom inteziviranja sa produbljanjem NREM faza. Takođe, primećeno je da NREM spavanje aktivira epileptiformne abnormalnosti kod pacijenata sa fokalnom epilepsijom sa više skokova vidljivih tokom dubljih NREM faza, dok je za REM spavanje karakteristično ograničavanje ovih abnormalnosti (Rossi i sar., 1984). Kao rezultat REM spavanje može imati korisnu lokalizirajuću ulogu primarnih epileptogenih žarišta kod epilepsija temporalnog režnja.

Pored toga, poremećaji spavanja se javljaju i kao posledica brojnih neuroloških, psihijatrijskih i respiratornih oboljenja. Apneja u spavanju, koja je poremećaj sa abnormalnim prekidima disanja, pojavljuje se u ciklusima od 30 ili više puta u jednom satu kod teških i veoma teških formi adultne apneje u spavanju (American Academy of Sleep Medicine Task Force, 1999; International Classification of Sleep Disorders 3rd edition, 2014).

Apneja u spavanju može biti povezana sa epilepsijom, posebno kod farmako-rezistentnih pacijenata. Malow i saradnici su utvrdili da jedna trećina pacijenata sa farmako-rezistentnom epilepsijom ima simptome apneje u spavanju (2000). Postoje dokazi o multikauzalnoj patogenetskoj povezanosti apneje u spavanju i konvulzivnih napada (Devinsky i sar., 1994). Lečenje apneje u spavanju može doprineti boljoj kontroli epileptičnih napada ako se ova dva oboljenja javljaju udruženo (Malow i sar., 2000; Chihorek i sar., 2007).

Poremećaj strukture spavanja, posebno REM faze, izazvan učestalim prekidima (fragmentacija spavanja) i hipoksemijom, može biti jedan od značajnih faktora za pojavu hiperekscitabilnosti CNS-a kod pacijenata sa apnom u spavanju (Seyal i sar., 2010; Foldvary-Schaefer i sar., 2012). Međutim, sama fragmentacija spavanja, naročito odnos fragmentacije koja prati apneju u spavanju i epilepsije, još uvek su nedovoljno istraženi (Chihorek i sar., 2007; Foldvary-Schaefer i sar., 2012), a posebno u malobrojnim eksperimentalnim modelima.

Kod mnogih osoba obolelih od epilepsije, celonoćni gubitak spavanja, učestalo kasno započinjanje spavanja ili opšti nedostatak spavanja, mogu biti predisponirajući faktori za

pojavu napada. To opravdava i razlog zašto se često zahteva EEG snimanje nakon delimično ili potpuno neprespavane noći. Još su Gibs i Gibs (1947) pokazali da deprivacija spavanja povećava stepen otkrivanja IED (eng. *inter-ictal epileptiform discharges*) na elektroencefalogramu.

Međutim, debata se nastavlja o tome da li deprivacija spavanja povećava IED nezavisno od činjenice da snimamo moždanu aktivnost tokom spavanja. U novije vreme deprivacija spavanja je postala jedna od ustaljenih metoda facilitiranja epileptičnih napada tokom snimanja EEG-a (Katagal i Yardi, 2008). Studije koje su upoređivale EEG snimljen kod grupe životinja sa depriviranim spavanjem, i EEG kod spavanja indukovano lekovima, dovele su do kontradiktornih otkrića (Touchon i sar., 1991).

Klinička studija, izvedena na 400 pacijenata sa epilepsijom je ukazala da pored deprivacije spavanja, stres i umor takođe imaju značajan efekat u facilitaciji napada, pa stoga da jedan epileptički napad *per se* nastaje akumulacijom svih ovih efekata (Frucht i sar., 2000). Potvrdu ove teorije, da deprivacija spavanja sama po sebi nema značajan efekat na pojavu konvulzija, dala je studija koja je pokazala da deprivacija spavanja nije promenila učestalost fokalnih napada, kod osoba istog uzrasta i pola sa istim „*epileptogenic focal site*“. Ovi podaci ukazuju da sama deprivacija spavanja ne bi facilitirala pojavu epileptičnih napada, bez ostalih udruženih faktora, a posebno stresa kome su pacijenti svakodnevno izloženi (Malow i sar., 2002).

1.6. Spavanje, kognitivne funkcije i mentalno zdravlje

Poremećaji kvantiteta i kvaliteta spavanja utiču na budnost, hormonsku regulaciju, pamćenje, i dovode do promena u emocionalnoj regulaciji koja obuhvata modulacije u ekspresiji emocija, primanju i opservaciji emocionalnih informacija. U više različitih studija je pokazano da je deprivacija spavanja i kod ljudi i kod životinja povezana sa smanjenjem pažnje, usporavanjem vremena reakcije na stimulse kao i da značajno utiče na sposobnost rasuđivanja i donošenja odluka (Belenky i sar., 2003; Harrison i Horne, 2000; Van Dogen i sar., 2003). Takođe, deprivacija spavanja ima negativan uticaj na konsolidaciju memorije i pamćenje.

Usled svega rečenog, najvažnije odlike spavanja su:

- očuvanje pažnje i pravovremenog reagovanju na spoljašnje draži
- optimizacija neuronskih mreža,
- konsolidacija naučenog,
- integracija iskustveno stečenog znanja

Vizuelni i drugi oblici učenja su, sa gubitkom spavanja, značajno narušeni (Stickgold i sar., 2000). Takođe, značajno je spomenuti da je REM spavanje povezano sa:

- aktivacijom limbičkih struktura, što sugeriše na ulogu u procesuiranju emocija (Nofzinger i sar., 1997).
- akumulacijom znanja stečenog deklarativno ili iskustveno
- direktnim doprinosom samom učinku u kognitivnom i afektivnom domenu.

Imajući ovo u vidu, možemo zaključiti da je spavanje od fundamentalne važnosti za fiziološku homeostazu mentalne aktivnost kod ljudi (Ilankovic i Ilankovic, 1999). PET studija (glukoza) sprovedena na ljudima sa depriviranim spavanjem je pokazala da je nakon 24 sata kontinuirane budnosti metabolička aktivnost mozga značajno smanjena (do 6% celog mozga, i do 11% pojedinih kortikalnih regija i bazalnih ganglija). Smanjeno trajanje spavanja je disproporcionalno uticalo na više kognitivne funkcije, što se manifestovalo u postepenom smanjenju brzine, preciznosti i tačnosti odgovora na podražaje. Spavanje od 7 sati noću, tokom

sedam dana, rezultovalo je smanjenjem brzine izvršenja zadataka, kao i potrebom za dužim vremenskim periodom za rešavanje zahtevnog matematičkog problema. Dužina spavanja od 5 sati noću, tokom sedam dana, smanjila je brzinu reakcije, značajno redukovala tačnost, kao i uzrokovala značajan poremećaj u obavljanju svakodnevnih aktivnosti (Gomes i sar., 2011). Jedno od objašnjenja za smanjenje efikasnosti nakon deprivacije je takozvani „*microsleep*“ fenomen, kratki segmenti delta ili teta aktivnosti koji se smenjuju sa beta ili alfa EEG talasima buđenja, koji se značajno frekventnije pojavljuju povećavanjem dužine deprivacije. Ipak, važno je spomenuti da pojava „*microsleep*“ segmenata ne korelira uvek sa polisomnografskim nalazom kod pacijenata sa smanjenjem sposobnosti nakon deprivacije. Kao rezultat PET-glukoza studije može se zaključiti da su kognitivne posledice deprivacije najverovatnije uzrokovane smanjenjem metabolizma u parijetalnom i frontalnom delu mozga nakon deprivacije spavanja u trajanju od 24 sata (Baird i sar., 2011).

Nedostatak spavanja je ipak relativan pojam. Manji poremećaji spavanja (npr. 1 sat spavanja manje tokom dužeg perioda) uzokuje suptilne kognitivne poremećaje koji često ne mogu biti primećeni, pa tako ni opservirani. Sa druge strane značajna redukcija spavanja tokom jedne nedelje ili dužeg perioda, dovodi do dubokih kognitivnih deficita sličnih onima koji se javljaju kod ljudi sa cerebrovaskularnim insultima, ali koji ipak i dalje nisu vidljivi pojedincu kod koga je poremećeno spavanje (Thorne i sar., 1998).

Poremećeno spavanje utiče i na emocionalno zdravlje kod dece, naročito u razvojnom periodu, ne samo tako što dovodi do negativnih emocija, već i alteracijom pozitivnih emotivnih iskustava. Sa samo dve noći „lošeg“ spavanja uzrokuju da deca imaju smanjen intezitet doživljaja pozitivnih iskustava i teže se prisećaju istih nakon nekog perioda.

Prolongiran poremećaj spavanja neizbežno dovodi do pojave ozbiljnijih psihijatrijskih poremećaja kao što su anksioznost i depresija (Borbely, 1982). Poremećaj spavanja nekada predstavlja i prvi simptom depresije. U više studija je pokazano da da 15-20% osoba sa insomnijom će razviti veliki depresivni poremećaj (Goel i sar., 2009). I dok naučnici još uvek istražuju mehanizme povezanosti između poremećenog spavanja i depresije, pokazano je da većina osoba sa ovom dijagnozom ima poremećeno spavanje (Taheri i Arabameri, 2012).

1.6.1. Odnos poremećaja spavanja i depresije

1.6.1.1. Insomnija i depresija

Kao što je pokazano u studiji Riemanna i Volderholzera (Riemann et Volderholzer, 2003) povezanost između primarne insomnije i depresije je uvek bila pretpostavljena, ali jaka etiološka veza između ova dva poremećaja nikada nije dokazana, s obzirom da su oba poremećaja multifaktorijelna i time teška za proučavanje (Riemann i Volderholzer, 2003). Ipak, dokazano je da oko 90% pacijenata sa depresijom ima narušeno spavanje manjeg ili većeg stepena (Mendelson, 1997). Prvi naučnici koji su ustanovili da je insomnija nezavistan faktor za pojavu depresivnog poremećaja su Ford i Kamerow 1989. god. Od tada, više studija je sprovedeno ako bi se istražila ova povezanost. Pregledom literature od 1966.-2000. godine pokazano je da su pacijenti sa insomnijom koja traje duže od dve nedelje imali povećan rizik za razvoj depresije narednih 1-3 godine (Riemann i Volderholzer, 2003).

Kao jedan od glavnih razloga komorbidnog nastupanja insomnije i depresivnih poremećaja izdvaja se hiperaktivnost hipotalamo-hipofizo-adrenalne osovine koja kontroliše sintezu kortizola. Kortizol dovodi do višestrukih promena na nivou imunskog sistema, metaboličkih procesa u organizmu, a ostvaruje dejstvo i na centralni nervni sistem. Kortizol učestvuje u regulaciji neurogeneze, spavanja i sanjanja, konsolidaciji memorije, dovodi do funkcionalnih i morfoloških promena hipokampusa. Ovaj hormon moduliše sistemski odgovor organizma na psihički i fizički stres.

Kod osoba koje boluju od depresije dokazan je povišen nivo kortizola u krvi, ali i u drugim uzorcima poput urina i salive gde je kortizol slobodan, nevezan za proteinske nosače (Stetler i Miller, 2011; Rodenbeck i Hajak, 2001), ali pojačana funkcija hipotalamo-hipofizo-adrenalne osovine ne mora nužno nastati kao posledica depresivnih promena u ponašanju. Hiperaktivnost može nastati i pre nastupanja depresivnih poremećaja zbog neurobioloških abnormalnosti koje su prethodile razvoju depresivnog oboljenja (Pariante i Lightman, 2008). Hiperaktivnost ovog sistema može biti posledica poremećaja glavnog regulatornog mehanizma hipotalamo-hipofizo-adrenalne ose, negativne povratne sprege. Povratna sprega se zasniva na vezivanju kortizola iz krvi za glukokortikoidne receptore lokalizovane u hipokampusu, hipotalamusu i hipofizi. Negativna povratna sprega može biti oštećena zbog mutacija koje nastaju kao posledica delovanja proinflamatornih citokina i epigenetskih promena na nivou gena koji nose informaciju za sintezu ovih receptora i nemogućnost kortizola da prevaziđe krvno-moždanu barijeru i dospe do odgovarajućih receptora. Glukokortikoidna rezistencija i nemogućnost glukokortikoidnih hormona da ostvare dejstvo na ciljno tkivo dovodi do kompenzatorne hiperaktivnosti hipotalamo-hipofizo-adrenalne osovine (Pariante i Lightman, 2008).

Iako je insomnija predstavljena kao jedan od čestih simptoma depresivnih poremećaja (Geoffroy i sar., 2018), postaje sve jasnije da insomniju samu po sebi možemo smatrati faktorom rizika za nastanak depresije (Nadorff i sar., 2014). U prilog pretpostavki govore i sprovedena istraživanja koja su uočila da glavni simptomi insomnije - smetnje koje se javljaju tokom noćnog spavanja i prateća dnevna pospanost i umor – doprinose pojavi depresivnog raspoloženja kod osoba koje pate od ove vrste poremećaja spavanja, pri čemu je istaknuto da dnevna pospanost i umor tokom budnog stanja imaju veći uticaj na raspoloženje osobe nego druge manifestacije insomnije, jer otežavaju normalno dnevno funkcionisanje (Jaussent i sar., 2011). Istraživanja sprovedena nad starijom populacijom, pokazala su da nastanak i razvoj depresivnih poremećaja više zavisi od težine i učestalosti simptoma insomnije kao što su otežano uspavljanje i teškoće u održavanju stanja spavanja praćene čestim buđenjem, nego od samog posledičnog pada kvaliteta spavanja (Jaussent i sar., 2011; Li i sar., 2018). Pored toga, prisustvo insomnije otežava lečenje osoba sa depresivnim poremećajima i povećava rizik za ponovno pojavljivanje depresije (Nadorff i sar., 2014). Zato se kod ovakvih pacijenata koriste različite terapijske metode kojima se istovremeno pristupa lečenju depresije i tretmanu poremećaja spavanja. Terapija obuhvata, pored primene antidepresivnih lekova, i inhibitore transmembranskih transportnih proteina za povratak neurotransmitera serotonina i noradrenalina u presinaptičku ćeliju, kao i lekove za spavanje koji deluju tako što inhibiraju serotonergičke i histaminergičke receptore (Sutton, 2014).

Produkcija kortizola je usklađena sa cirkadijalnim ritmom. Tokom večeri i noći nivo kortizola u krvi opada u odnosu na dnevne vrednosti. Tokom noćnog spavanja koncentracija kortizola počinje postepeno da raste sredinom perioda spavanja, sekretuje se pulsatorno u vremenskim intervalima koji se poklapaju sa nastupanjem REM faze kako bi u ranim jutarnjim časovima dostigao najvišu vrednost (Payne i Nadel, 2004). Kod osoba sa primarnom insomnijom uočen je povišen nivo kortizola u krvi u večernjim satima i tokom noći koji, u zavisnosti od stepena povećanja, dovodi do češćih buđenja i prekida u noćnom spavanju. Kada je insomnija udružena sa depresivnim poremećajima, hiperaktivnost hipotalamo-hipofizo-adrenalne osovine je još veća, a fragmentacije spavanja kao patofiziološka manifestacija postaje još intenzivnija.

Depresivna oboljenja mogu doprineti nastanku kardiovaskularnih oboljenja jer pojačavaju aktivnosti hipotalamo-hipofizo-adrenalne osovine, a pojačana adrenergička aktivnost ubrzava srčani rad i može da dovede do nastanka hipertenzije. Kada su depresivnim oboljenjima pridruženi poremećaji spavanja poput insomnije dolazi do još većeg porasta aktivnosti simpatičkog nervnog sistema i hipotalamo-hipofizo-adrenalne osovine (Gangwisch i sar.,

2010). Tokom spavanja krvni pritisak i srčana frekvenca opada, a kada je, zbog poremećaja spavanja, vreme provedeno u spavanju skraćeno, pad u krvnom pritisku će trajati kraće nego što bi trebalo ili će u nekim slučajevima izostati, pa će zato na dnevnom – dvadesetčetvoročasovnom nivou doći do porasta krvnog pritiska, udarnog volumena i srčane frekvence. Kada nepravilnosti u spavanju traju duže vreme, organizam se može adaptirati na postignuto stanje i kardiovaskularni sistem će uskladiti svoju funkciju sa novonastalim povišenim vrednostima (Gangwisch i sar., 2010). Pored toga, poremećaji u spavanju doprinose nastanku poremećaja metaboličkih puteva što vodi povećanom apetitu, gojaznosti, pojavi insulinske rezistencije i dijabetesa što povećava rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja.

1.6.1.2. Deprivacija i fragmentacija spavanja i depresija

Cirkadijalni ritam reguliše većinu bioloških i bihevioralnih funkcija. Korelacija između poremećenog cirkadijalnog ritma i nastanka depresivnih poremećaja je polje koje je otvoreno za dalja istraživanja. Jedan od mogućih uzroka ove povezanosti je i poremećena homeostaza spavanja praćena umorom i pospanošću, koja ostvaruje negativan uticaj na raspoloženje, kognitivne procese, emocije i emocionalne reakcije, motivaciju. Nepravilnosti u cirkadijalnom ritmu mogu se negativno odraziti na komunikaciju u društvu, kao i na adaptaciju pojedinca na okruženje u kojem se nalazi, a smanjena socijalna komunikacija može voditi nastanku depresivnih poremećaja. Istraživanja u oblasti cirkadijalnih gena ustanovila su da oni igraju važnu ulogu u formiranju sinapsi, razvoju i sazrevanju mozga.

Promene arhitekture spavanja koje remete normalnu regulaciju emocionalnog ponašanja vode nastanku psihijatrijskih poremećaja. Na kvalitativne i kvantitativne osobine spavanja utiču mnogi faktori iz okruženja koji se mogu svrstati u smetnje pri spavanju, a koje za posledicu imaju teškoće pri uspavlivanju ili održavanju stanja spavanja, prerano buđenje i disfunkcije koje se javljaju tokom spavanja kao što su mesečarenje i košmari. Opstruktivna apneja tokom spavanja je jedan od najčešćih poremećaja disanja tokom spavanja, a klinički se manifestuje kao hrkanje praćeno produženom dnevnom pospanošću. Osobe sa opstruktivnom apnejom tokom spavanja su pod većim rizikom ili su već razvile komorbiditete poput kardiovaskularnih bolesti i gojaznosti, a takođe mogu imati poteškoće u socijalnoj komunikaciji što može da doprinese nastanku ili pogoršanju postojećih depresivnih poremećaja. Karakteriše ga smanjeno disanje (hipopneja) ili prestanak disanja (apneja) tokom spavanja. Opstruktivna apneja je definisana kao prekid protoka vazduha kroz oronazalne disajne puteve u trajanju od najmanje 10 sekundi koji odgovara potpunoj opstrukciji gornjih disajnih puteva uprkos neprekidnom radu glavne i pomoćne disajne muskulature. Opstruktivna hipopneja predstavlja parcijalnu opstrukciju gornjih disajnih puteva u trajanju od najmanje 10 sekundi, što kao posledicu ima pad u protoku vazduha kroz oronazalne disajne puteve za više od 50% (Schroder i O Hara, 2005). Iako je kod osoba muškog pola češće dijagnostikovana opstruktivna apneja tokom spavanja, učestalost depresivnih poremećaja je veća kod osoba ženskog pola sa dijagnozom opstruktivne apneje (Chen i sar., 2013). Povezanost između pojave depresivnih poremećaja i dijagnostikovane opstruktivne apneje tokom spavanja je još uvek nejasna, mada se kao mogući uzroci navode fragmentacija spavanja koja dovodi do produžene dnevne pospanosti i hipoksija usred desaturacije krvi koseonikom koja može delovati na promenu raspoloženja, uznemirenost, pad koncentracije, otežano pamćenje i razvoj osećaja nezadovoljstva (Yosunkaya i sar., 2016). U prvim studijama o povezanosti ova dva poremećaja primećeno je da 25-40% pacijenata sa OSA, takođe ispunjava dijagnostičke kriterijume za depresivni poremećaj (Vgontzas i sar., 2008). U kohortnoj studiji objavljenoj 2013. godine pokazano je da je incidenca depresivnog poremećaja čak dva puta veća kod pacijena koji boluju od OSA (Chen i sar., 2013). U revijskom radu iz 2016, takođe je pokazana snažna povezanost između depresije i OSA, kako u zajednici, tako i u specijalizovanim ustanovama, kao i činjenica da većina pacijenata pokazuje poboljšanje simptoma depresije nakon primene CPAP (BaHamam, 2016). Ono što je i dalje nepoznanica jeste da li je uzrok pojave depresivnog poremećaja poremećena arhitektura spavanja, ili je u

pitanju hipoksija i hiperkapnija koje predstavljaju glavno obeležje OSA. U većini sprovedenih studija kao mehanizam interakcije naveden je poremećaj gasne razmene. U našoj studiji koncentrisali smo se isključivo na poremećaj spavanja po modelu OSA.

Patofiziološka pozadina ovog poremećaja obuvata mnogo faktora, od kojih je najznačajniji otežana dilatacija glatke muskulature gornjih disajnih puteva usled redukovane serotonergičke aktivnosti (Veasey, 2003). Poremećaji strukture spavanja koji se dešavaju tokom opstruktivne apneje obuhvataju značajno produženje trajanja stadijuma 1 sporotalasnog spavanja uz skraćenje trajanja i učestalosti ostalih stadijuma (stadijumi 2, 3- 4), kao i skraćenje REM faze. Stadijum 1 je prelazno stanje između budnosti i spavanja čija se učestalost i dužina trajanja povećava zbog fragmentacije spavanja kod pacijenata sa opstruktivnom apnejom, uz posledično skraćenje trajanja ostalih faza spavanja. Arhitektura spavanja kod pacijenata sa depresivnim poremećajima narušena je na način da je povećan intenzitet i brzina pokreta očiju tokom REM faze spavanja, uz raniju pojavu prve epizode REM spavanja koja vodi uvećanju ukupnog vremena spavanja provedenog u REM fazi. Pacijenti koji imaju dijagnostikovanu opstruktivnu apneju i depresivni poremećaj imaju smanjenu učestalost spavanja i veći deo vremena proveden u REM fazi tokom spavanja. Upravo ovo je dovelo do pokušaja primene deprivacije REM spavanja kao terapijskog tretmana za depresivni poremećaj. Prvi koji su predložili ovaj nekonvencionalni tretman depresivnog poremećaja bili su Giedke i Schwaerzler (Giedke i sar., 2003). Ipak, vremenom je primećeno da totalna deprivacija pokazuje značajnije poboljšanje u simptomatologiji u odnosu na parcijalnu (Schroder i O Hara, 2005). Glavna indikacija za terapijsku upotrebu deprivacije spavanja je primarna depresija. Upotreba ove metode na sekundarnim formama je još uvek nedovoljno istražena, s tim da je dokazano da primena deprivacije spavanja ima pozitivne efekte kod depresije nastale usled shizofrenije ili shizoafektivnog poremećaja (Upthegrove i sar., 2016) Uprkos svim sprovedenim istraživanjima antidepresivni efekat deprivacije spavanja je u najboljem slučaju kontradiktoran. Babson i sar. su na velikom uzorku pokazali da deprivacija spavanja kod zdravih osoba dovodi do pojave inezivnih simptoma anksioznosti i depresije (Babson i sar., 2010).

Uzimajući u obzir potencijale pozitivne efekte, deprivacija spavanja se još uvek koristi u tretmanu depresije ali sa strogo definisanim indikacijama. Oko 60% pacijenata sa velikim depresivnim poremećajem pokazalo je kliničko poboljšanje nakon jedne noći deprivacije spavanja (Clark i Golshan, 2007). Poboljšanje je primećeno i kod pacijenata sa suicidalnim tendencijama, ali deprivacija je najbolje rezultate pokazala na onima koji su imali diurnalne alteracije raspoloženja (Giedke i sar., 1992). Ipak, ovako postignut terapijski efekat ima ograničeno vreme trajanja. Kod nekih traje nekoliko sati, kod drugih čitav dan, a veoma retko do nekoliko dana. Oko 50-80% ovih pacijenata veoma brzo ponovo dobije iste simptome ili su čak većeg inteziteta, ipak kod 20-50% simptomi su manje izraženi ali to se uglavnom odnosi na one koji su pored deprivacije spavanja tretirani i antidepresivima (Smith i sar., 2009).

1.6.2. Poremećaji spavanja i anksioznost

Najčešće i najzastupljenije psihijatrijske poremećaje kako u dečijem uzrastu, tako i kod odraslih, predstavljaju neurotski, sa stresom povezani i somatoformni poremećaji (grupa F4 prema MKB-10). Uzevši u obzir da se najčešće javljaju u mlađem životnom uzrastu i da značajno, negativno, utiču na svakodnevno i profesionalno funkcionisanje osoba, ovi poremećaji predstavljaju veliki socijalni, ekonomski, društveni i medicinski problem (Nedić i Živanović, 2009). Kada je reč o etiologiji anksioznih poremećaja, smatra se da oni nastaju kao posledica sadejstva sledećih faktora: biološki faktori, psihološki faktori, psihosocijalni faktori. Pri čemu, treba naglasiti da postoji različito učešće ovih faktora u nastanku različitih anksioznih poremećaja kod različitih osoba (Nedić i Živanović, 2009).

Anksioznost se može definisati kao unutrašnja napetost ili nemir, sa odsustvom realne opasnosti. Upravo ova karakteristika razlikuje anksioznost od pojma strah, jer strah obično ima spoljni objekat. Dakle, anksioznost nema spoljni objekat, ni spoljnu opasnost, već predstavlja specifičnu reakciju na unutrašnju opasnost (intrapsihički konflikt, impuls neprihvatljiv za Ego, potisnute misli, itd.) (Marić, 2005).

Ono što je važno naglasiti jeste da se svaka osoba gotovo svakodnevno susreće sa anksioznošću, koja se u narodu još naziva nervoza, strah, trema, ali koja je poželjna i korisna u izvesnim situacijama. Dakle, takva anksioznost koja se javlja u određenim životnim situacijama i ima za cilj mobilisanje potencijala date osobe u cilju rešavanja date situacije, ne pripada psihopatologiji i sastavni je deo života. Međutim, problem nastaje kada je anksioznost po svom intenzitetu ili trajanju onesposobljavajuća, koja ne samo da ne olakšava, nego i ne dopušta celishodno ponašanje i bitno umanjuje kvalitet života (Antony, 2008).

Anksioznost predstavlja stanje koje karakteriše osećaj mučnog i neugodnog iščekivanja, predosećanja, strepnje i neizvesnosti. Anksioznost se ispoljava brojnim telesnim i psihološkim simptomima. Pri čemu su telesni i psihološki simptomi povezani i međusobno utiču jedni na druge (Nedić i Živanović, 2009). Pojedine procene ukazuju da prevalenca anksioznih poremećaja u opštoj populaciji iznosi 10-25%. Takođe, rezultati epidemioloških istraživanja ukazuju na visoku prevalencu poremećaja spavanja kod osoba sa anksioznim poremećajima. Pojedini podaci ukazuju da se gotovo 1/3 odraslih osoba tokom svog života susreće sa poremećajima spavanja, a sami poremećaji spavanja se smatraju drugim najčešćim zajedničkim simptomom psihijatrijskih poremećaja (Ohayon i Roth, 2003; Staner, 2003). Postoje brojna istraživanja koja su se bavila pitanjem odnosa anksioznosti i poremećaja spavanja u opštoj populaciji. Insomnija, hipersomnija, noćne more i noćna panika su najčešće povezani sa anksioznim poremećajima. U prošlosti se verovalo da je insomnija simptom, ili epifenomen psihijatrijskih oboljenja, a naročito anksioznih poremećaja. Međutim, novija istraživanja ukazuju da postoji bidirekciona veza između insomnije i drugih psihijatrijskih bolesti (Antony, 2008).

Osnovu odnosa anksioznosti i poremećaja spavanja predstavlja činjenica da svakodnevna anksioznost negativno utiče na ciklus budnost-spavanje. Brojna eksperimentalna istraživanja su dokazala da ukoliko dođe do smanjenja dnevne anksioznosti, istovremeno dolazi i do poboljšanja spavanja, odnosno povećanje dnevne anksioznosti kod ispitanika je dovelo do poremećaja spavanja (Harvey i Payne, 2002). U longitudinalnom istraživanju Breslow i saradnici su ustanovili da je u opštoj populaciji prevalencija za insomniju 16,6%, za hipersomniju 8,2%, a za insomniju u kombinaciji sa hipersomnijom 8%. Pri čemu se poremećaji spavanja najčešće javljaju kod opsesivno-kompulzivnog poremećaja, paničnog poremećaja i generalizovanog anksioznog poremećaja (Breslau i sar., 1996).

Papadimitro i Linkovski, takođe, ukazuju na jaku povezanost poremećaja spavanja i anksioznih poremećaja, a pre svega sa paničnim poremećajima, generalizovanim anksioznim poremećajem, opsesivno-kompulzivnim poremećajem, posttraumatskim stresnim poremećajem (Papadimitriou i Linkowski, 2005). U istraživanju koje su sproveli Ohayon i Roth utvrđeno je da je istorija psihijatrijskih oboljenja povezana sa težinom i hronicitetom trenutne insomnije. Ohayon i Roth, u svom istraživanju odnosa poremećaja spavanja i anksioznih poremećaja, navode da se u 18% slučajeva insomnija javila pre anksioznog poremećaja, u 38,6% slučajeva se insomnija javila istovremeno sa anksioznim poremećajima, a u 43,5% slučajeva je najpre nastao anksiozni poremećaj pa onda insomnija (Ohayon i Roth, 2003).

Pored toga što anksiozni poremećaji mogu dovesti do nastanka poremećaja spavanja, i sami poremećaji spavanja mogu prouzrokovati i pogoršati anksiozne poremećaje. Postoje brojne

studije koji dokazuju uticaj spavanja na dnevno raspoloženje osobe, što može pogoršati anksioznost kod date osobe (Antony, 2008).

1.7. Eksperimentalni modeli u somnologiji

1.7.1. Deprivacija vs. Fragmentacija spavanja

Bonnet i Arand (Baum i sar., 2014; Bonnet i Arand, 1995) su sugerisali da čak i relativno malo skraćivanje vremena spavanja za 1,3 do 1,5 sata tokom jedne noći, povećava pospanost za 32%, korišćenjem „*Multiple sleep latency*“ testa (MSLT) (Gillberg i sar., 1994). Čini se da subjektivna pospanost nakon deprivacije spavanja ne zavisi samo od perioda deprivacije, već i od faktora kao što su doba dana ili faze cirkadijalnog ritma, a osim toga, iz svakodnevnog iskustva poznato je da subjektivna pospanost varira tokom dana. Druga istraživanja pokazala su da je nivo subjektivne dnevne pospanosti u korelaciji sa trajanjem potpune deprivacije, i dalje naglasila da stepen pospanosti varira tokom dana, najviši je između 14:00 i 18:00 časova, a najmanji u popodnevni satima, između 18:00 i 20:00 sati i pre podne oko 10:00 sati (Babkoff i sar., 1991). Prekomerna dnevna pospanost je takođe jedna od glavnih karakteristika sindroma opstruktivne apneje, a često i glavni razlog zašto pacijenti sa OSA zahtevaju medicinsku pomoć. Često se javlja sa pospanošću u blažem ili težem obliku, blažom nakon jela, dok osoba leži ili gleda televiziju i težem, u situacijama koje zahtevaju veći nivo budnosti (mentalno zahtevni zadaci), značajno narušavajući životni i radni kapacitet pacijenata (American Academy of Sleep Medicine, 2005). U studiji sprovedenoj na velikom uzorku pacijenata sa OSA (Roure i sar., 2008), prevalenca prekomerne pospanosti prema sopstvenim izveštajima bila je oko 57%. Pretpostavlja se da, s tim u vezi, važnu ulogu imaju demografske karakteristike, stavovi i način definisanja pospanosti ispitanika, stepen uskraćenosti i fragmentacije spavanja kao i dužina i intenzitet respiratornih događaja.

Kada je u pitanju arhitektura spavanja, imamo poremećaj u arhitekturi tokom spavanja na jednoj strani (fragmentacija), i nakon spavanja sa druge strane. Homeostatska regulacija spavanja uopšteno se sastoji u kompenzacionom povećanju dubine i trajanja spavanja nakon perioda gubitka istog. Pokazano je da fragmentacija spavanja tokom prvih 6 sati svetlosne faze menja arhitekturu na način sličan eksperimentalnoj metodi „nežnog rukovanja“ za deprivaciju spavanja, koja se koristi u mnogim studijama o poremećaju spavanja kod glodara. Međutim, važna razlika je u tome što fragmentacija spavanje ne uzrokuje potpuni gubitak spavanja. Bez obzira na to, kao i u studijama koje su koristile nežno rukovanje da izazovu potpunu deprivaciju (Baracchi i Opp, 2008; Huber i sar., 2000; Jhaveri i sar., 2007), fragmentacija spavanja (6 h) je povezana sa prolaznim povećanjem udela vremena provedenog u sporotalasnom spavanju u REM fazi tokom nekoliko 2-časovnih intervala unutar 18h perioda nakon fragmentacije spavanja, u poređenju sa kontrolnom grupom (Trammell i sar., 2014).

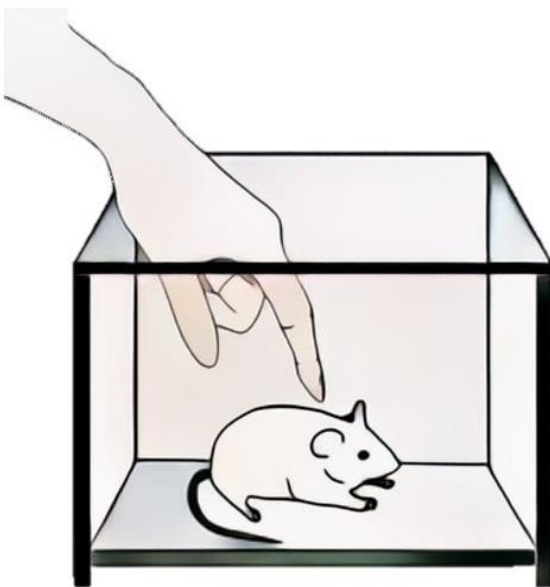
Kada je u pitanju deprivacija spavanja, studije su pokazale veći uticaj na arhitekturu spavanja u poređenju sa trajanjem, u noćima oporavka. Nakon parcijalnog ili potpunog gubitka spavanja, udeo sporotalasnog spavanja (SWS) u ukupnom vremenu spavanja je značajno povećan (Carskadon i sar., 1981), slično kao kod NREM deprivacije (Gaudreau i sar., 2001). U prvoj noći oporavka nakon potpune deprivacije, nadoknađuje se značajan deo faze 4 spavanja sa kraćim trajanjem faze 1, a u drugoj noći nadoknada takođe postoji, ali je u manjoj meri izražena (Carskadon i sar., 1981). U mnogim radovima je pokazano da selektivna REM deprivacija praćena povećanom tendencijom za nadoknadom tokom i nakon same deprivacije, što kao posledicu izaziva raniji početak i povećanu učestalost REM faze spavanja u svakoj sledećoj noći sa deprivacijom. U prvih nekoliko noći, po završetku REM deprivacije, više vremena se provodi u REM fazi spavanja. Nadalje, istraživanja pokazuju da selektivno lišavanje REM faze spavanja ima efekat sličan totalnoj deprivaciji, što je verovatno i razlog povećanja

udela faze 4 u prvoj noći oporavka (Ferrara i sar., 1999; Agnew i sar., 1967). U drugom istraživanju pokazano je da 6 sati deprivacije spavanja prati nadoknada oko 50% kratkotalasnog spavanja (SWS) u narednih 4h spavanja (Roth, 2007). Podržavajući stav da spavanje promoviše konsolidaciju memorije, homeostaza sporotalasnog spavanja je lokalno regulisana u motornom korteksu nakon motoričkog učenja i korelira sa naknadnim poboljšanjem ponašanja (Baoud i sar., 2015).

U istraživanjima koja su uključivala eksperimentalne poremećaje spavanja, naučnici su najčešće pokušavali da uklone jedan ili više stadijuma spavanja, a da u isto vreme ne utiču značajno na smanjenje ukupnog vremena spavanja ili ostale faze spavanja. Jedini izuzetak od ovog je totalna deprivacija spavanja. Postoji više metoda koje se koriste da bi se postigla deprivacija spavanja bilo da je u pitanju totalna, paradoksalna ili deprivacija sporotalasnog spavanja. Istraživači se i danas suočavaju sa neprestanim naporima da proniknu u fiziološki značaj, mehanizam nastanka i održavanje spavanja. Deprivacija spavanja, koja se pokazala kao efektivan i značajan eksperimentalni metod, može biti postignuta korišćenjem više različitih metoda: metoda pažljivog rukovanja (eng. *gentle handling*), metoda pojedinačne platforme, pendulum, metoda sa više platformi, metoda rotirajućeg diska i uz pomoć tredmila za male životinje. Uprkos velikoj međusobnoj sličnosti svaka od ovih metoda se značajno razlikuje od druge i ima svoje prednosti i mane. Kada je u pitanju fragmentacija spavanja, ona se danas smatra potpuno različitim entitetom, uprkos tome što su metode za izazivanje fragmentacije spavanja slične onima kod deprivacije.

1.7.2. Eksperimentalni modeli modulacije spavanja

1.7.2.1 Pažljivo rukovanje



Slika 1.7. Ilustracija metode pažljivog rukovanja

Ova metoda (Slika 1.7.) predstavlja alternativu automatizovanim SD metodama (pojedinačna i više platformi). Ranije je njena primena bila veoma zastupljena (Borbely i Neuhaus, 1979, Wirz-Justice et al., 1981), ali danas se sve više pribegava nekim drugim metodama (Bodosi i sar., 2004; Grassi Zucconi i sar., 2006; Deboer i sar., 2007). Ova tehnika je prvi put primenjena od strane Damenta na ljudima za deprivaciju REM spavanja, ali se danas uglavnom koristi za manipulaciju spavanja kod životinja (Singh i Mallick, 1996; Birendra i sar., 2011).

Osnovna prednost ove metode jeste to što je životinjama dozvoljeno da borave u standardnim uslovima života, a intervencija tj. buđenje nastaje kada se na EEG zapisu primete znaci ulaska u REM fazu. Metoda se izvodi isključivo na životinjama sa implantiranim elektrodama za registrovanje EEG i EMG aktivnosti, koje se nalaze u kavezima. Tokom perioda deprivacija spavanja, životinja i njen polisomnografski snimak se kontinuirano posmatraju. Kada se na polisomnografu registruju signali ulaska u REM fazu, životinja se blago stimuliše. Stimulacije koje se koriste su veoma blage i cilj im je samo da izazovu kortikalnu

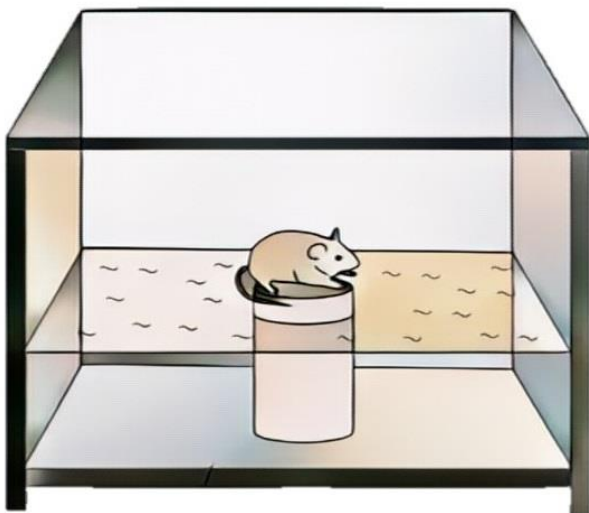
desinhronizaciju bez bihevioralnih promena. Ako tehniku koristimo za totalnu deprivaciju spavanja, životinje se konstantno posmatraju i održavaju budnima simultanim senzornim stimulusima, čim se bihevioralni i polisomnografski znaci spavanja pojave (Franken i sar., 1991; Tobler i sar., 1997). Modifikovana verzija "gentle handling-a" sastoji se u održavanju budnosti dodirivanjem osoba četkicom kada pokažu znake ulaska u spavanje (Graves i sar., 2003; Modirrousta i sar., 2005). Direktna manipulacija životinjama treba da bude minimalizovana da bi se sprečio uticaj stresa na istraživanje (Longordo i sar., 2011). Negativna strana ove metode, osim stresa koji se izaziva konstantnom eksternom manipulacijom, je što tehnika može biti korišćena samo za kratkotrajnu deprivaciju, kao i činjenica da je neophodan konstantan monitoring polisomnografskih parametara.

1.7.2.2. Tehnika penduluma

Ova metoda je dizajnirana tako da životinje mogu i dalje da borave u svojim kavezima, ali su kavezi podešeni tako da se ljuljaju nalik na „pendulum“. Usled posturalnog gubitka ravnoteže životinje su u konstantnom pokretu, što uzrokuje totalnu deprivaciju spavanja. U odnosu na tehniku pažljivog rukovanja kod ove metode nije potrebna eksterna intervencija što predstavlja prednost. Ipak tehnika ne omogućuje manipulaciju pojedinim fazama spavanja, već samo totalnu deprivaciju što je ujedno i njena najveća mana. Ono što takođe predstavlja problem je činjenica da životinje nemaju neograničen pristup hrani i vodi, kao i da je simultana deprivacija više životinja izuzetno tehnički zahtevna, a često i nemoguća, te je dizajniranje adekvatnih kontrolnih grupa takođe otežano (Van Hulzen i Coenen, 1980).

Sa ciljem da se otklone nedostaci prethodno opisanih tehnika dizajnirana je metodologija pojedinačnih platformi (eng. *Flower pot*). Prvi put je upotrebljena na mačkama 1964. godine (Jouvet i sar., 1964), a nakon toga je široko prihvaćena i korišćena kod mačaka, pacova i miševa za deprivaciju REM spavanja (Hicks i sar., 1977; Oniani i sar., 1988).

1.7.2.3. Metoda pojedinačnih platformi



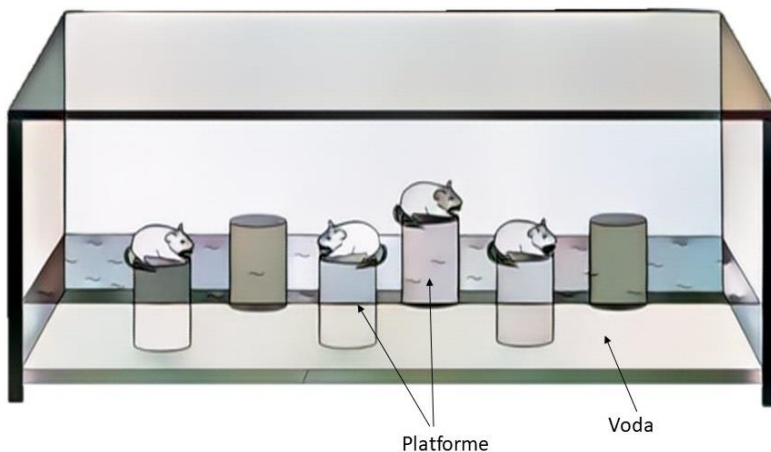
Slika 1.8. Ilustracija metode pojedinačnih platformi

Tokom perioda deprivacije spavanja, životinja se postavlja na bazu platforme, čiji je dijametar manji od veličine životinje (Slika 1.8.). Platforma se stavlja u veliku kadu napunjenu vodom do 1 cm iznad dna. Životinja se može odmarati na platformi, i može čak spavati u NREM fazi ali čim iz NREM faze pređe u REM, zbog atonije mišića, životinja će pasti u vodu i brzo se popeti nazad na bazu platforme. Procedura uglavnom traje 72-96 h. Ova tehnika je korisna jedino za proučavanje uticaja deprivacije REM faze spavanja na različite pojave (Fabio i sar., 2009). Postoje brojne prednosti ove metodologije, zbog kojih je ona toliko često korišćena kao što su jednostavnost same procedure, ekonomska prihvatljivost, pogodnost za postizanje i dugotrajnih deprivacija spavanja (dužih od 48h), i jednostavan dizajn kontrolnih grupa. Ono što je najvažnije sama metodologija deprivacije je bazirana na glavnoj fiziološkoj osobini REM spavanja-atonija, te zbog toga, bilo kakva vrsta eksterne manipulacije ili monitoringa nije neophodno.

Moguće je i prilagoditi količinu REM deprivacija koja želi da se postigne smanjenjem veličine platforme u odnosu na težinu životinje. Manu ove metode predstavlja činjenica da se procedura odvija u okruženju koje nije standardno za životinju što samo po sebi uzrokuje određen nivo stresa.

1.7.2.4. Metoda sa više platformi

U nastojanju da se smanji nivo stresa koji je izazvan ograničenjem kretanja u metodi pojedinačne platforme, istraživači su razvili "Multiple platform" metod deprivacije REM spavanja (Van Hulzen i Coenen, 1981). U ovoj konfiguraciji životinja se nalazi unutar velikog rezervoara sa više platformi, čime se eliminiše stres izazvan ograničenjem pokreta u ranijoj metodi (Slika 1.9). Međutim, čak i pod ovim uslovima nivo stresa ostaje povećan sudeći po



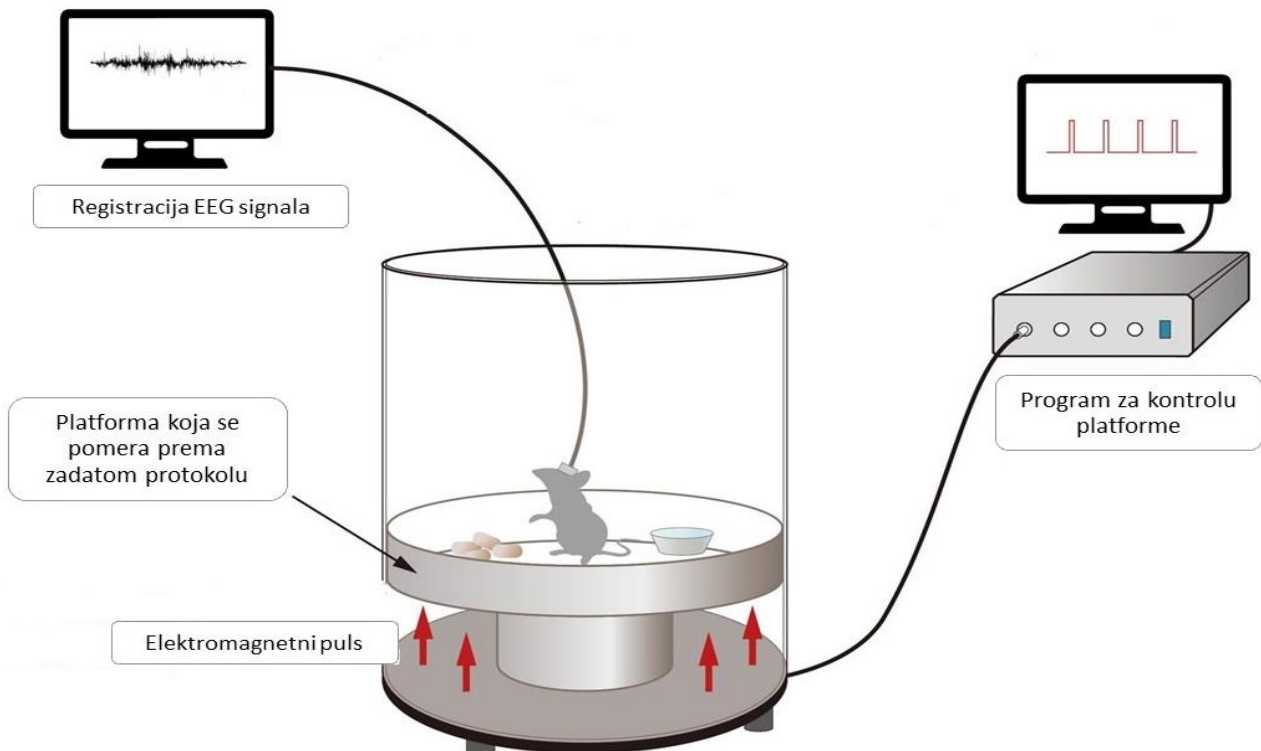
Slika 1.9. Ilustracija metode sa više platformi

adrenalnoj hipertrofiji i gubitku težine (Coenen i Van Luijtelaa, 1985). Štaviše, gubitak REM spavanja se takođe javlja u kontrolnoj grupi životinja na velikim platformama (Mendelson i sar., 1974), a i količina NREM spavanja je redukovana u odnosu na kontrolne grupe u kavezima (Ruskin i sar., 2004).

1.7.2.5. Forsirana lokomocija (tehnika rotirajućeg bubnja)

Ova tehnika (Slika 1.10.) se najčešće koristi za totalnu deprivaciju spavanja. Metodološki se sprovodi tako što pacove stavimo u komoru za deprivaciju spavanja, koja se sastoji od rotirajućeg bubnja, podeljenog na dva semicirkularna odeljka pomoću centralnog zida. Bubanj je zapečaćen perforiranom parafinskom pločom, i zagrevan lampom na temperaturi inkubatora. Centralni zid sadrži 13 rupa, koje omogućuju socijalnu interakciju između dva pacova, što sprečava uticaj stresa, nastalog socijalnom izolacijom, na ishod eksperimenta. Bubanj, zid i poklopci su napravljeni od pleksigasa, a dno se sastoji od odgovarajuće podloge koja sprečava pacove da proklizaju. Voda i hrana su preko cevi vezane za centralni zid.

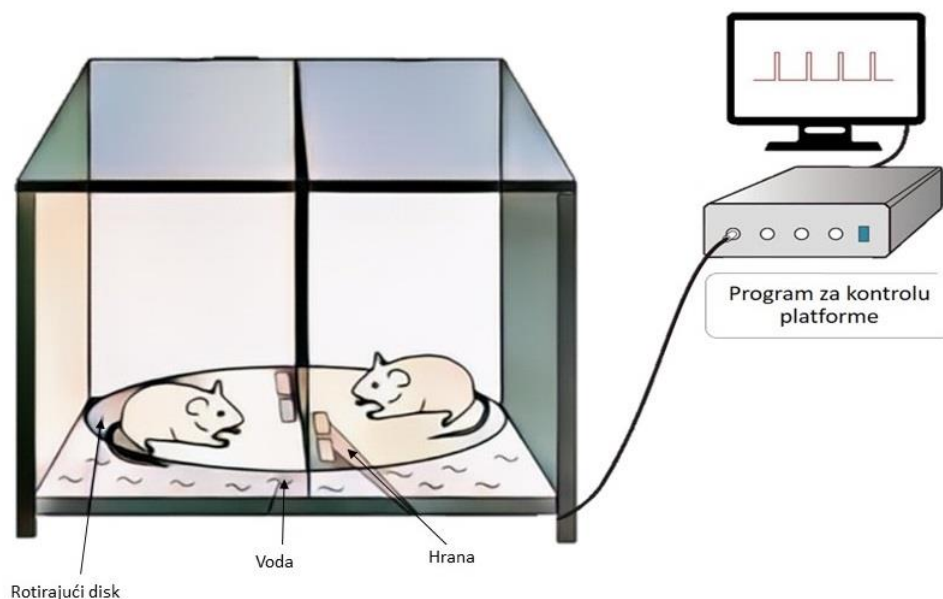
Uređajem upravlja kompjuterski kontrolisan motor, koji se kreće bidirekciono, i menja brzinu, prema unapred kompjuterski programiranoj šemi. Procedura je efikasnija ukoliko se u istom bubnju deprivira više pacova (recimo 2, ili više), zato što ih, u tom slučaju, rotacije bubnja prisiljavaju da se penju jedni preko drugih, što ih onemogućava da se adaptiraju na rotacione pokrete. Pokreti pacova takođe mogu biti odgovorni i za povećan nivo kortikosterona koji se javlja u toku deprivacije (Roman i sar., 2006). Ova vrsta deprivacije obično traje nekoliko sati, i nije pogodna za dužu deprivaciju zbog stresogenog efekta koga izaziva zamor pacova (Marcos i sar., 1998).



Slika 1.10. Šematski prikaz metode forsirane lokomocije

1.7.2.6. Tehnika rotirajućeg diska

Ova metoda takođe zahteva softversku kontrolu. Princip je sličan kao kod kod prethodno opisane tehnike, s tim da se kod ove tehnike koriste dva odvojena plastična kaveza kojima dno čini rotirajući disk (Slika 1.11.). Pokretanje diska, njegova brzina, ali i smer kretanja se unapred određuje u softveru, a kompletna procedura je, tokom celog trajanja manipulacije spavanja, kompjuterski kontrolisana. Ova tehnika se može koristiti i za deprivaciju REM spavanja i za totalnu deprivaciju. Životinje kojima se manipuliše su pod konstantnim EEG



Slika 1.11. Šematski prikaz metode rotirajućeg diska

nadzorom. Prednosti tehnike uključuju mogućnost poređenja faza spavanja, s obzirom da su i eksperimentalna i kontrolna grupa izložene istoj programskoj šemi, te su individualne varijacije među životinjama svedene na minimum. Ono što je takođe prednost je činjenica da se metoda može koristiti i za duže manipulacije (Bindera i sar., 2011). Mane ove tehnike uključuju neophodnost kompjuterske kontrole kompletnog procesa, postojanje adekvatnog softverskog rešenja, neophodnost EEG monitoringa i potrebu za više kontrolnih grupa usled individualnih varijacija u buđenju kod životinja (Bergmann i sar., 1989).

1.7.2.7. Tredmil za male životinje

Dve poslednje metode dovele su do razvoja nove metodologije uz pomoć tredmila za male eksperimentalne životinje, koja se osim za deprivaciju može koristiti i za fragmentaciju spavanja. Prednosti i mane tehnike koja uključuje tredmil su skoro identične kao kod dve prethodno opisane metode. Tredmil za pacove predstavlja pokretnu traku prilagođenu anatomskim karakteristikama malih eksperimentalnih životinja. Ovaj uređaj se koristi za izvođenje raznovrsnih funkcionalnih ispitivanja fizičkog vežbanja i treninga, kao i za procenu njihovog uticaja na različite fiziološke i patofiziološke procese. Kroz pravilno podešavanje sistema, moguće je izazvati modulaciju arhitekture spavanja kod eksperimentalnih životinja, što ovaj sistem čini korisnim i u oblasti somnologije.

Sastavni deo ovog sistema je pokretna traka koja se sastoji od četiri odvojena, ali vizuelno povezana kompartmana, čije su dimenzije optimalne za pacove. Na jednom kraju trake nalazi se električni stimulator koji funkcioniše kao sistem za negativno potkrepljenje, dok postoji i mogućnost primene pozitivnog potkrepljenja na suprotnom kraju. Sistem omogućava prilagođavanje nagiba, smeru i brzine kretanja trake, kao i jačine stimulusa.

Upravljanje ovim sistemom može se vršiti manuelno, direktno preko panela na samom tredmilu. Takođe, zahvaljujući sposobnosti komunikacije sa računarem, postoji opcija digitalnog upravljanja pomoću specijalizovanog softvera, putem kojeg se mogu unapred definisati protokoli rada trake za duže vremenske periode.

Tredmil je implementiran u tri različite varijante upravljanja i kontrole parametara:

1. Prva varijanta omogućava digitalno podešavanje brzine trake putem BCD preklopnika i upravljanje startovanjem i zaustavljanjem trake pomoću tastera.
2. Druga varijanta uključuje displej za prikaz zadate brzine kretanja trake, vreme trajanja eksperimenta i ukupno pređenu udaljenost nakon završetka eksperimenta. Takođe, postoje tasteri za podešavanje brzine, startovanje i zaustavljanje.
3. Treća varijanta omogućava povezivanje tredmila sa personalnim računarem, a odgovarajući softver kontroliše rad uređaja i evidentira sve potrebne parametre. Svi parametri imaju grafički prikaz na monitoru, i po zahtevu korisnika, mogu se prilagoditi pojedinačnim potrebama i eksperimentalnim postavkama.

Obzirom da je upravo ova metodologija korišćena u svim eksperimentima koji su sprovedeni, detalji i sam način fragmentacije spavanja će biti objašnjeni u delu **Materijal i Metode**.

Postojeće metode su veoma korisne, ali sve ostavljaju prostor za unapređenje, prateći tok vremena i automatizacije, naravno uz poštovanje odeređenih ograničenja. Ovde su opisana i dva nova metoda za automatsko lišavanje spavanja (sleep device i treadmill) koji rade na sličnom principu. Glavna razlika sa prethodno opisanim metodama, kao što je recimo metoda forsirane lokomocije je što je omogućena šira i efikasnija manipulacija s obzirom da se

programskom šemom može upravljati brzinom i smerom kretanja trake i diska, mogućnost dugotrajne manipulacije i smanjenje stresa kojem su izložene životinje imajući u vidu da je interakcija sa ljudima svedena na minimum (Cathalijn i sar., 2011).

Glavni ciljevi automatizovanih metoda spavanja su: 1) postizanje što preciznije manipulacije spavanja, bilo da je u pitanju parcijalna ili totalna deprivacija ili fragmentacija spavanja, 2) održavanje nivoa kortikosterona unutar dozvoljenih granica, 3) što manja lokomotorna aktivnost životinja tokom eksperimenta, 4) nepromenjena motivacija životinja da ispune zadatak, što je od suštinskog značaja za većinu kognitivnih funkcija, 5) standardizacija metodologije i 6) automatizovana upotreba uz pomoć adekvatnog softvera bez interakcije izvođača u toku samog eksperimenta (Tobler i sar., 1997). Automatizovane metode manipulacije spavanjem su značajno efikasnije u odnosu recimo na metod forsirane lokomocije, gde pacovi ipak uspevaju da spavaju kratak period vremena (5,7-8,6 %)(Gong i sar., 2004; Guzman-Marin i sar., 2005) ili metode pažljivog rukovanja gde uspevaju da spavaju oko 6% vremena (Deboer i sar., 2007).

1.8. Poremećaji spavanja i hormonski disbalans

Poremećaji spavanja, kao što su deprivacija spavanja ili apneja u spavanju, pokazali su značajne uticaje na hormonsku regulaciju u ljudskom telu. Hormoni igraju ključnu ulogu u održavanju homeostaze, uključujući metabolizam, imunološku funkciju i regulaciju raspoloženja. Stoga, promene u hormonskoj regulaciji usled poremećaja spavanja mogu doprineti nizu negativnih zdravstvenih ishoda. Jedan od ključnih hormonskih sistema koji je pogođen poremećajima spavanja je hipotalamo-hipofizno-adrenalna (HPA) osovina. HPA osovina je odgovorna za prilagođavanje organizma na stres i uključuje oslobađanje hormona stresa kortizola. Nedostatak spavanja pokazao se kao faktor koji dovodi do povećanja nivoa kortizola, čak i u odsustvu stresora (Chennaoui i sar., 2015). Osim toga, hronični nedostatak spavanja može dovesti do desenzitizacije HPA osovine, što dovodi do smanjenja nivoa kortizola i smanjenog odgovora na stres (McEwen, 2006).

Osim kortizola, problemi sa spavanjem takođe utiču na druge hormone, poput insulina i leptina, koji su uključeni u metaboličku regulaciju. Nedostatak spavanja povezan je sa smanjenom osetljivošću na insulin i povećanom otpornošću na insulin, što može doprineti razvoju metaboličkih poremećaja poput gojaznosti i dijabetesa tipa 2 (Taheri i sar., 2004). Osim toga, pokazao se kao faktor koji dovodi do smanjenja nivoa leptina i povećanja grelina, što dovodi do povećanja apetita i unosa hrane (Spiegel i sar., 2004). Apneja u spavanju, često prisutan poremećaj spavanja koji se karakteriše prekidima disanja tokom spavanja, takođe je povezana sa hormonalnim promenama, naročito povećanim nivoima hormona stresa kortizola i smanjenim nivoima hormona rasta (GH) (Vgontzas i sar., 2003). Osim toga, ovaj poremećaj se pokazao i kao faktor koji dovodi do smanjenja nivoa testosterona kod muškaraca, što može doprineti seksualnoj disfunkciji i smanjenju mišićne mase (Luboshitzky i sar., 2002). Poremećaji u HPA osi i drugim hormonskim sistemima mogu uticati na menstrualne cikluse i plodnost kod žena i doprineti erektilnoj disfunkciji i smanjenom kvalitetu sperme kod muškaraca (Ehrmann et al., 2015).

Poremećaji spavanja takođe mogu uticati na regulaciju raspoloženja promenom nivoa neurotransmitera poput serotonina i dopamina. Nedovoljno vreme spavanja je povezano sa smanjenim nivoima serotonina, neurotransmitera koji je uključen u regulaciju raspoloženja i ciklusa spavanja i buđenja, što može doprineti razvoju poremećaja raspoloženja kao što je depresija (Wisor et al., 2001). Takođe, apneja u spavanju je povezana sa smanjenim nivoima dopamina, što može uticati na motivaciju i procesuiranje nagrada (Khan et al., 2017).

U suštini, poremećaji spavanja imaju širok spektar uticaja na regulaciju hormona, imunološku funkciju, regulaciju raspoloženja i reproduktivno zdravlje. Ovi poremećaji mogu dovesti do promena u nivoima kortizola, insulina, leptina, testosterona i hormona rasta, kao i uticati na imunološki sistem i funkciju neurotransmitera. Nastale hormonalne promene mogu doprineti negativnim zdravstvenim ishodima, uključujući metaboličke poremećaje, poremećaje raspoloženja i seksualnu disfunkciju. Međutim, još uvek nisu rasvetljeni tačni mehanizmi preko kojih dolazi do ovih hormonskih promena. Animalni modeli modulisanog spavanja, u tom smisu, mogu dati značajne odgovore.

1.8.1. Poremećaji spavanja i kortikosteron

Tokom spavanja, organizam reguliše proizvodnju hormona, uključujući kortikosteron. Istraživanja su pokazala da poremećaji spavanja, poput nesanice, apneje u spavanju i sindroma nemirnih nogu, mogu poremetiti sposobnost organizma da reguliše proizvodnju kortikosterona, što dovodi do negativnih zdravstvenih ishoda. Studije su pokazale da nedostatak spavanja može dovesti do povećanja nivoa kortikosterona u organizmu. Na primer, jedna studija je otkrila da su učesnici nakon samo jedne noći bez spavanja imali značajno više nivoa kortikosterona u poređenju sa kada su spavali celu noć (Yoo i sar., 2007). Druga studija je pokazala da je kod pacova, koji su bili u stanju hronične deprivacije spavanja, zabeleženo povećanje nivoa kortikosterona (Magalhães i sar., 2010). Pored toga, poremećaji spavanja su povezani sa disfunkcijom hipotalamo-hipofizno-adrenalna (HPA) osovine, koja je odgovorna za regulaciju organizma u odnosu na stres. Disfunkcija HPA osovine može dovesti do prekomerne proizvodnje kortikosterona, što može imati negativne efekte na organizam. Na primer, dugotrajno izlaganje visokim nivoima kortikosterona je povezano sa povećanim rizikom od depresije, anksioznosti i drugih poremećaja raspoloženja.

Dodatno, poremećaji spavanja mogu uticati na sposobnost organizma da se oporavi od stresnih situacija. Studije su pokazale da osobe koje imaju poremećaje spavanja manje mogu da se nose sa stresorima i da imaju sporiji period oporavka u poređenju sa osobama koje spavaju dovoljno (Brosschot i sar., 2018). Ovo može dovesti do ciklusa u kojem poremećaji spavanja dovode do povećanog stresa i anksioznosti, što može dalje narušiti spavanje i pogoršati negativne efekte kortikosterona na organizam.

1.8.2. Poremećaji spavanja i testosteron

Pokazano je da poremećaji spavanja značajno utiču na nivo testosterona. Studije su otkrile da poremećaji spavanja poput *sleep* apneje mogu dovesti do smanjenja nivoa testosterona kod muškaraca (Luboshitzky i sar., 2002). U stvari, jedna studija je otkrila da su zdravi mladi muškarci nakon samo jedne nedelje restrikcije spavanja doživeli pad nivoa testosterona za 10-15% (Leprout i sar., 2011). Poremećaji u spavanju su takođe povezani sa smanjenjem nivoa testosterona i kod žena (Prasad i sar., 2015).

Odnos između spavanja i testosterona je dvosmeran, što znači da niski nivoi testosterona takođe mogu uticati na kvalitet spavanja. Niski nivoi testosterona povezani su sa smanjenim kvalitetom spavanja, povećanim noćnim buđenjima i skraćanjem REM faze (Luboshitzky i sar., 2002). Jedan od mehanizama putem kojih poremećaji spavanja mogu uticati na nivo testosterona je preko poremećaja hipotalamo-hipofizo-gonadalne (HPG) osovine. HPG osa je odgovorna za regulisanje proizvodnje testosterona, a poremećaji u ovom sistemu mogu dovesti do smanjenja nivoa testosterona. Pokazano je da poremećaji spavanja poput apneje u spavanju mogu ometati HPG osovinu i doprineti smanjenju nivoa testosterona (Luboshitzky i sar., 2002).

Pored toga, poremećaji spavanja mogu uticati i na regulaciju drugih hormona koji doprinose proizvodnji testosterona. Na primer, poremećaji u regulaciji kortizola, hormona koji proizvodi nadbubrežna žlezda, mogu doprineti smanjenju nivoa testosterona. Studije su pokazale da

deprivacija spavanja može dovesti do povećanih nivoa kortizola, što naposljetku može smanjiti nivoje testosterona (Leproult i sar., 2011).

1.8.3. Poremećaji spavanja i estrogen

Estrogen je odgovoran za razvoj i održavanje ženskog reproduktivnog sistema, zdravlje kostiju i različite metaboličke funkcije.

U studiji Bakera i sar. pokazano je da žene koje su imale subjektivno loš kvalitet spavanja imaju niže nivoje estrogena u poređenju sa ženama koje su navele da su uredno spavale (Baker i sar., 2012). Drugo istraživanje je pokazalo da žene koje pate od apneje u spavanju imaju značajno niže nivoje estradiola, u poređenju sa ženama koje nemaju ovaj poremećaj (Kim i sar., 2017). Ovi nalazi ukazuju da poremećaj spavanja može poremetiti proizvodnju estrogena i doprineti negativnim zdravstvenim ishodima kod žena. Takođe, poremećaji u regulaciji kortizola, mogu doprineti smanjenju nivoa estrogena. Studije su pokazale da deprivacija spavanja može dovesti do povećanja nivoa kortizola, što može na kraju smanjiti nivoje estrogena (Spiegel i sar., 1999).

Pokazano je da su poremećaji spavanja povezani sa povećanim rizikom od raka dojke, koji je povezan sa nivoima estrogena. Studija je pokazala da su postmenopauzalne žene koje su prijavile loš kvalitet spavanja imale više nivoje estrogena i bile su izložene povećanom riziku od razvoja karcinoma dojke (Wang i sar., 2016).

1.8.4. Poremećaji spavanja i progesteron

Progesteron igra ključnu ulogu u reproduktivnom zdravlju žena. On je odgovoran za pripremu i održavanje materice za trudnoću, regulaciju menstrualnog ciklusa i različite druge reproduktivne funkcije. Istraživanja su pokazala da poremećaji spavanja, kao što su nesanica, apneja u spavanju i sindrom nemirnih nogu, mogu poremetiti sposobnost organizma da reguliše proizvodnju progesterona. U već pomenutom istraživanju Bakera i sar. (2012), žene koje su subjektivno imale loš kvalitet spavanja su imale niže nivoje progesterona u odnosu na one koje nisu imale tegobe sa spavanjem. Drugo istraživanje je pokazalo da žene sa apnejom u spavanju imaju značajno niže nivoje progesterona u poređenju sa ženama bez ovog poremećaja (Liu i sar., 2015). Ovi nalazi ukazuju da nedostatak sna može poremetiti proizvodnju progesterona i doprineti negativnim zdravstvenim ishodima kod žena.

1.9. Uticaj poremećaja spavanja na neuroinflamaciju, oksidativni stres i neurogenezu

1.9.1. Poremećaji spavanja i neuroinflamacija

Dobro je poznato da poremećaji spavanja mogu značajno uticati na naše opšte zdravlje, utičući na raspoloženje, kognitivne funkcije i fizičko blagostanje. Jedan od ključnih faktora koji mogu biti pogođeni poremećajima spavanja je neuroinflamacija, kompleksan proces koji uključuje aktivaciju imunih ćelija u mozgu, što može dovesti do proizvodnje raznih citokina, uključujući interleukine.

Brojne studije su pokazale da poremećaji spavanja, poput nesaničice ili fragmentacije spavanja, mogu dovesti do povećane neuroinflamacije u mozgu (Haack i sar., 2007; Zielinski i sar., 2014). Na primer, studija Haack i sar. (2007) je otkrila da nesanica kod zdravih dobrovoljaca povećava proizvodnju interleukina-6 (IL-6), proinflamatornog citokina koji je uključen u regulaciju imunskih i inflamatornih odgovora. Slično tome, Zielinski i sar. (2014) su

dokazali da hronična fragmentacija spavanja kod miševa dovodi do povećane aktivacije mikroglije, imunih ćelija u mozgu koje igraju ključnu ulogu u neuroinflamaciji.

Odnos između poremećaja spavanja i neuroinflamacije je kompleksan i obostran. S jedne strane, neuroinflamacija može narušiti normalne obrasce spavanja, što dovodi do daljih poremećaja spavanja. Na primer, istraživanja su pokazala da povišeni nivoi IL-6, ključnog citokina koji je uključen u neuroinflamaciju, mogu narušiti arhitekturu spavanja i smanjiti kvalitet spavanja (Vgontzas i sar., 2004). S druge strane, poremećaji spavanja mogu dovesti do aktivacije imunskih ćelija u mozgu, što pokreće neuroinflamaciju. Na primer, studija Vgontzas i sar. (2004) je otkrila da nesanica kod zdravih dobrovoljaca dovodi do povećanih nivoa IL-6 i drugih proinflamatornih citokina.

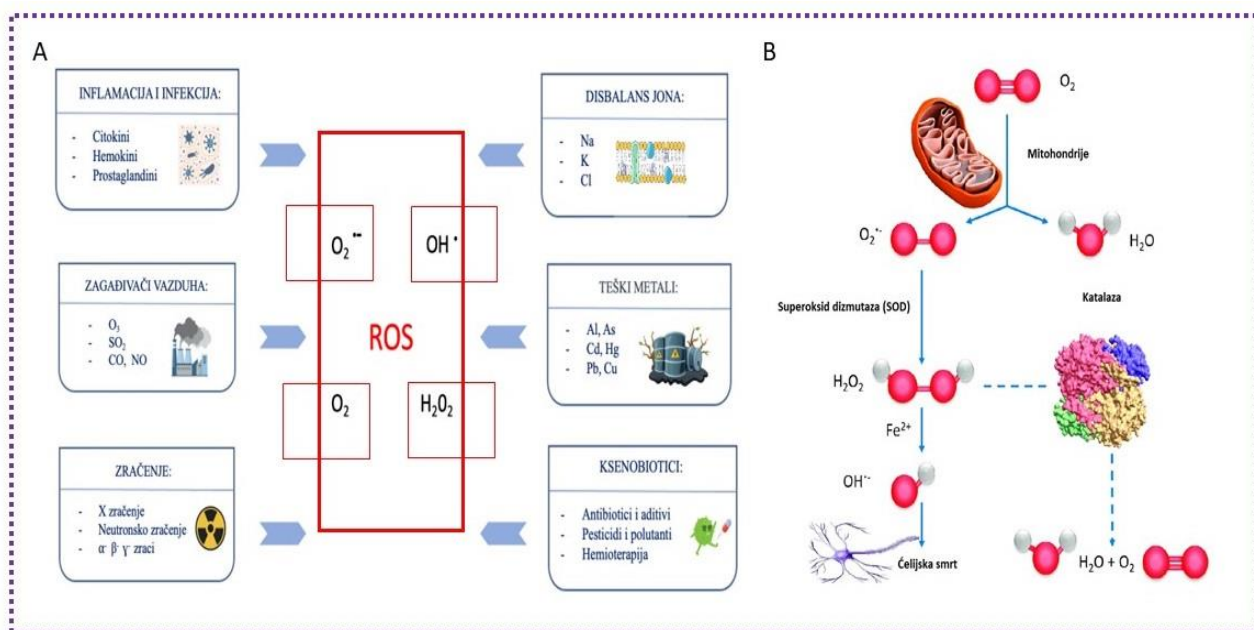
Interleukini, klasa citokina koji su uključeni u regulaciju imunskih i inflamatornih odgovora, posebno su važni u kontekstu spavanja i neuroinflamacije. IL-1 β , IL-6 i tumor nekroza faktor-alfa (TNF- α) su među najistraživanijim interleukinima u kontekstu spavanja i neuroinflamacije (Krueger i sar., 2010). Ovi citokini proizvode se od strane imunskih ćelija u mozgu, uključujući mikrogliju i astrocite, i mogu uticati na spavanje i budnost putem raznih mehanizama (Krueger i sar., 2010).

Neuroinflamacija je ključni proces koji igra presudnu ulogu u održavanju normalnog funkcionisanja mozga, ali poremećaji normalnog obrasca spavanja mogu dovesti do povećane inflamacije i proizvodnje citokina. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se u **potpunosti** razumela složena veza između spavanja i neuroinflamacije i razvile efektivne intervencije za rešavanje poremećaja spavanja i njihovog uticaja na zdravlje mozga.

1.9.2. Poremećaji spavanja i oksidativni stres

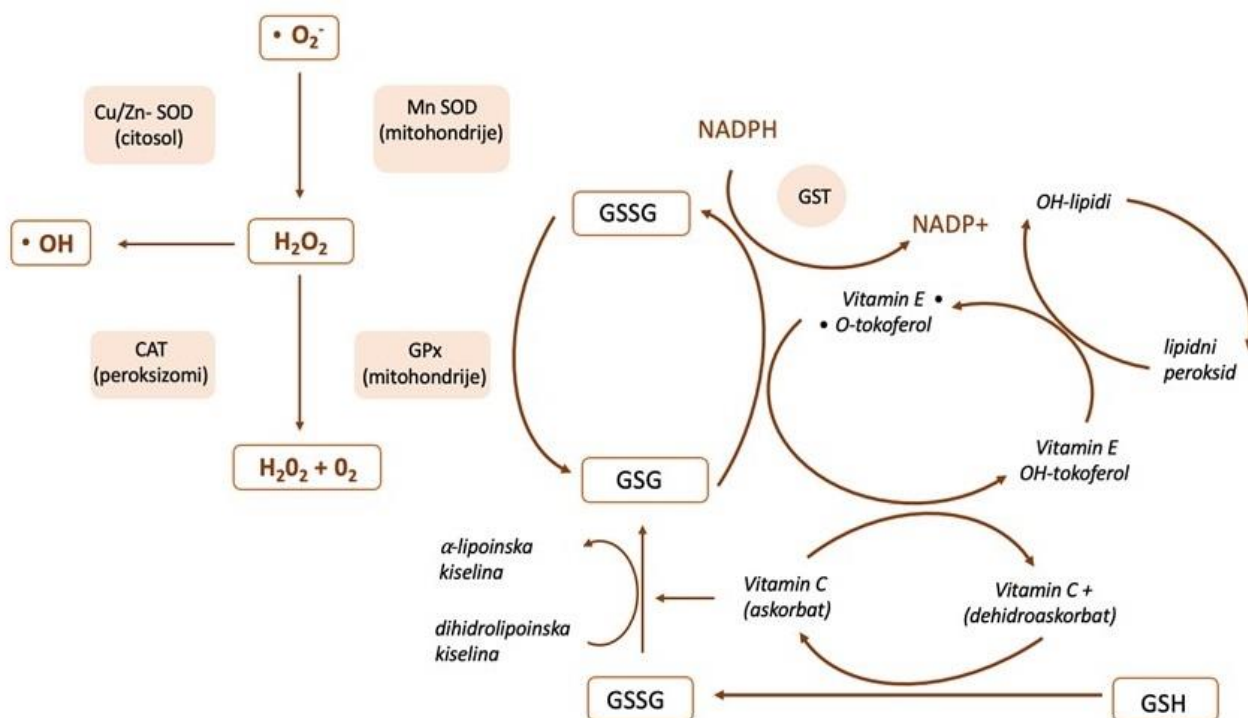
Poremećaji spavanja imaju značajan uticaj na celokupno zdravlje i dobrobit čoveka. Dok je poznato da spavanje igra ključnu ulogu u regeneraciji organizma, sve veći broj istraživanja ukazuje na vezu između poremećaja spavanja i prisustva oksidativnog stresa i reaktivnih kiseoničnih radikala (ROS) (Hill i sar., 2018). Narušeni balans mehanizama antioksidativne zaštite i formiranje slobodnih radikala identifikuje se kao oksidativna disrupcija ili disbalans redoks sistema. Slobodni radikali se kategorizuju kao reaktivni azotni oblici (eng. *Reactive nitrogen species* -RNS) i reaktivni kiseonični oblici (eng. *Reactive oxygen species* -ROS). Reaktivni kiseonični oblici predstavljaju kompleksnu grupu entiteta koji nastaju tokom procesa oksidativnog metabolizma (Finkel, 2011), a zavisno od prisustva slobodnih elektrona, od čega inače i proizilazi njihova reaktivnost, oni mogu biti ili radikali ili neradikali (Pizzino i sar. 2017).

Najreaktivniji radikalski oblik ROS je hidroksilni radikal (OH \cdot), stvoren reakcijom O $_2^{\cdot-}$ sa H $_2$ O $_2$ u Fentonovoj reakciji, uz učešće Fe $^{2+}$ ili Cu $^+$ jona (Walling i sar., 2021). Formiranje ROS može biti posledica unutrašnjih (imunološke reakcije, inflamacija, tkivna ishemija, infekcije, tumori, starenje i hronični stres) i spoljašnjih faktora (teški metali, lekovi, organski rastvarači, radijacija i upotrebu duvana) (Slika 1.12.; Zhang i sar., 2021a). ROS imaju razne fiziološke uloge, uključujući uništavanje patogena unutar fagolizozoma nakon fagocitoze i ulogu signalnih molekula u brojnim signalnim putevima, održavanje aktivnosti sinapsi, uništavanje patogena i maligno alterisanih ćelija (Beckhauser i sar., 2016).



Slika 1.12. Faktori koji utiču na nastanak slobodnih radikala (A) i odbrana organizma endogenim enzimima (B)

Prema Rakotoarisoa i sar., 2019. Za detalje pogledati poglavlje Uvod 1.9.2.



Slika 1.13. Mehanizmi antioksidativne zaštite

Kiseonički hiperoksidni radikali ($O_2^{\cdot-}$) nastao putem redukcije jednog elektrona u molekulu kiseonika (O_2) putem katalitičke interakcije transformiše se u vodonikov peroksid, koji se pod dejstvom katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) preobražava u H_2O i O_2 . Kroz proces Fentonove reakcije, iz H_2O_2 se generiše hidrosilni radikali (OH^{\cdot}), aktivno uključen u kompleksni lanac slobodnih kiseoničnih reakcija. Reakcija katalizovana od strane GPx, kao i interakcije sa slobodnim radikalsima, rezultira potrošnjom redukovano glutationa (GSH) i formiranjem oksidovanog glutationa (GSSG). GSSG se može regenerisati do GSH uz posredstvo enzima glutation transferaze (GST), pri čemu dolazi do potrošnje NADPH i formiranja NADP⁺. Vitamin C i α-lipoinjska kiselina su sposobni da oksidirani GSSG regenerišu u redukovani GSH. Vitamin E eliminiše lipidne peroksidi i okončava lanac oksidativnih procesa, istovremeno doprinoseći redukciji Vitamina C. Izmenjeno prema referenci Sindhu i sar. (2022).

Endogeni sistem zaštite od oksidativnog stresa može se manifestovati kao enzimski (inicijalni) ili neenzimski (antioksidansi). Enzimski sistem zaštite se ostvaruje posredstvom superoksid dismutaze (katalizuje pretvaranje $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 i $O_2^{\bullet\bullet}$; H_2O_2 koji nastaje dalje se eliminiše putem enzimske aktivnosti katalaze i glutathion peroksidaze), katalaze (razlaže H_2O_2 u H_2O i O_2^{\bullet}), glutathion reduktaze, glutathion peroksidaze (uklanja H_2O_2 u niskim koncentracijama) i glutathion-S-transferaze (Slika 1.13.), dok neenzimski predstavljaju supstance sposobne za zaustavljanje oksidacije supstrata (Irshad i Chaudhuri 2002).

Neenzimski antioksidansi obuhvataju heterogenu grupu endogeno sintetisanih ili egzogenih jedinjenja (Irshad i Chaudhuri 2002). Reaktivni kisonični radikali sa nesparenim elektronima, reaguju s biološkim makromolekulima (ugljeni hidrati, proteini, lipidi) kada su hiperprodukovani, formirajući nove slobodne radikale koji dalje učestvuju u hemijskim reakcijama. Najreaktivniji slobodni radikal, OH^{\bullet} , brzo reaguje s biološkim makromolekulima, nanoseći im štetu.

Vremenski raspon postojanja slobodnih radikala je izrazito kratak, što ih čini teško merljivim pod standardnim laboratorijskim okolnostima. Stoga se za procenu oksidativnog stresa koriste biomarkeri lipidne peroksidacije, i oksidativnog oštećenja proteina i DNK (Irshad i Chaudhuri 2002), čija kvantifikacija omogućava bolje razumevanje patofizioloških mehanizama oštećenja tkiva pod uticajem oksidativnog stresa (Sandhu i Birnboim 1997; Yavuzer i sar., 2016; Gaweł i sar., 2004; Murphy i sar., 2022).

Nervno tkivo karakterišu visok metabolizam, potreba za kiseonikom, obilje mitohondrija i visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (Watts i sar., 2018), što ga čini veoma osetljivim na oštećenja izazvana povećanim ROS.

Poremećaji spavanja, kao što su nesanica, apneja tokom spavanja i poremećaji cirkadijalnog ritma, mogu dovesti do povećane osetljivosti organizma na oksidativni stres. Na primer, istraživanja su pokazala da osobe koje pate od nesаницe često imaju smanjen nivo antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD) i glutathion peroksidaza (GPx). Smanjena sposobnost organizma da neutrališe ROS može dovesti do akumulacije štetnih slobodnih radikala i oksidativnog oštećenja. Apneja tokom spavanja, koja se karakteriše prekidima u disanju tokom spavanja, takođe može doprineti oksidativnom stresu. Tokom apneje dolazi do promene u nivou kiseonika u krvi, što može izazvati povećanu produkciju ROS. Oksidativni stres može dalje oštetiti disajne puteve i povećati inflamaciju, stvarajući začarani krug koji dodatno pogoršava poremećaj disanja tokom spavanja.

Poremećaji cirkadijalnog ritma, kao što su promene u radu noću ili čest putovanja preko vremenskih zona, takođe mogu poremetiti ravnotežu između antioksidativnih sistema i ROS. Cirkadijalni ritam igra ključnu ulogu u regulaciji proizvodnje antioksidativnih enzima i detoksikacije. Poremećaji ovog ritma mogu dovesti do nedovoljne produkcije antioksidanata, povećane proizvodnje ROS i povećane osetljivosti ćelija na oksidativni stres (Feng i sar., 2022).

Iako istraživanja ukazuju na jasnu vezu između poremećaja spavanja i oksidativnog stresa, kompleksnost ove interakcije zahteva dalja istraživanja. Razumevanje mehanizama preko kojih poremećaji spavanja dovode do povećane produkcije ROS može imati važne implikacije za razvoj terapija koje ciljaju smanjenje oksidativnog stresa kod osoba sa poremećajima spavanja.

1.9.3. Poremećaji spavanja i neurogeneza

Neurogeneza, proces stvaranja novih neurona, ključna je za normalno funkcionisanje mozga tokom celog života. Mnoga istraživanja su pokazala da nedostatak i poremećaji spavanja mogu negativno uticati na neurogenezu, što može dovesti do poremećaja u kognitivnim i emocionalnim funkcijama mozga.

Jedan od ključnih faktora koji može uticati na neurogenezu je nivo stresa. Stres može uticati na proizvodnju novih neurona u hipokampusu, delu mozga koji je važan za učenje i pamćenje. Nekoliko studija je pokazalo da hronični stres može dovesti do smanjenja neurogeneze u hipokampusu (Czeh i sar., 2007; McEwen, 1999). Međutim, nedostatak spavanja takođe može biti faktor koji doprinosi smanjenju neurogeneze.

Nedostatak spavanja može negativno uticati na neurogenezu na nekoliko načina. Prvo, može dovesti do povećanja nivoa kortizola, hormona stresa koji može uticati na neurogenezu (Mirescu i sar., 2006). Drugo, nedostatak spavanja može uticati na ekspresiju gena koji su važni za neurogenezu (Havekes i sar., 2012). Konačno, može uticati na različite neurotransmitere koji su uključeni u neurogenezu, uključujući serotonin i dopamin (Wadhwa i sar., 2021).

Međutim, postoji i suprotna strana. Nekoliko studija je pokazalo da spavanje nakon učenja može pozitivno uticati na konsolidaciju memorije i povećanje neurogeneze (Diekelmann i Born, 2010; Mander i sar., 2013). Tokom spavanja, mozak obrađuje informacije koje su primljene tokom dana, a nedostatak spavanja može dovesti do slabije konsolidacije memorije i smanjene neurogeneze.

Nedostatak spavanja može negativno uticati na neurogenezu, što može dovesti do različitih poremećaja u funkcijama mozga. Međutim, spavanje nakon učenja može pozitivno uticati na konsolidaciju memorije i povećanje neurogeneze. Dalja istraživanja su potrebna kako bi se razumela kompleksna veza između spavanja i neurogeneze.

Astroцити imaju ključnu ulogu u podršci neuronske funkcije i održavanju opšte homeostaze. Ove ćelije ekprimiraju glialni fibrilarni kiseli protein (GFAP) i imaju različite funkcije, uključujući regulaciju nivoa neurotransmitera, pružanje metaboličke podrške neuronima i održavanje krvno-moždane barijere. Nedavna istraživanja su se fokusirala na odnos između poremećaja spavanja i astrocita, posebno GFAP-pozitivnih. Bellesi i sar. (2017) su pokazali da produžena budnost povećava ekspresiju GFAP-a u astroцитима, što ukazuje na potencijalnu vezu između neadekvatnog spavanja i aktivacije astrocita. Takođe, uključeni su u regulaciju ciklusa spavanje/budnost kroz ulogu u homeostazi adenoizina, kao što je pokazano u sudiji Halassa i sar. (2009). Poremećaji spavanja mogu ometati eliminaciju adenoizina od strane astrocita, što dovodi do povećane pospanosti i promenjenih obrazaca spavanja. Disrupcija spavanja je takođe povezana sa povećanim nivoima proinflatornih citokina u mozgu, koji mogu indukovati astrogliozu, proliferaciju i aktivaciju astrocita, uključujući GFAP-pozitivne astroците. Parhizkar i sar. (2023) su pokazali da hronična deprivacija spavanja dovodi do povećane astroglioze i ekspresije GFAP-a u hipokampusu, što ukazuje na potencijalnu vezu između poremećaja spavanja, inflamacije i odgovora astrocita. Efekti poremećenog spavanja na GFAP-pozitivne astroците imaju šire implikacije na neurološku funkciju. Aktivirani astroцити, usled poremećenog spavanja, utiču na sinaptičku transmisiju i neuronsku funkciju, čime se mogu ometati kognitivni procesi kao što su konsolidacija memorije, učenje i regulacija raspoloženja.

Dablkortin (DCX) je protein koji se pretežno eksprimira u nezrelim neuronima i široko se koristi kao marker u istraživanjima neurogeneze. DCX ima ključnu ulogu u migraciji neurona, diferencijaciji i razvoju dendrita, značajno doprinoseći plastičnosti i prilagodljivosti mozga. Poremećaji spavanja značajno mogu uticati na ekspresiju DCX-a i neurogenezu. Meerlo i saradnici (2009) su pokazali da nedostatak spavanja kod glodara dovodi do smanjenja ekspresije DCX-a u hipokampusu, što sugerira da poremećaji spavanja mogu ometati stvaranje i sazrevanje novih neurona. Poremećeni obrasci spavanja, koji se viđaju kod insomnije i deprivacije spavanja, imaju negativan uticaj na neurogenezu u hipokampusu i ekspresiju DCX-a. Istraživanje koje su sproveli Mueller i sar. (2008) ukazuje da deprivacija spavanja smanjuje preživljavanje DCX-pozitivnih neurona u hipokampusu, što potencijalno utiče na kognitivne funkcije kao što su prostorna memorija i prepoznavanje obrazaca. Uticaj poremećaja spavanja

na DCX-pozitivne neurone ima ozbiljne kognitivne posledice. Promene u ekspresiji DCX-a usled poremećaja spavanja mogu poremetiti sinaptičnu plastičnost, dovodeći do kognitivnih deficita i poremećaja raspoloženja (Sahay i sar., 2011).

Parvalbumin (PV) pozitivni neuroni su subpopulacija inhibiornih interneurona koji se nalaze u različitim regionima mozga, posebno u cerebralnom korteksu i hipokampusu. Oni imaju ključnu ulogu u regulisanju ravnoteže između excitacije i inhibicije. PV-pozitivni interneuroni se karakterišu ekspresijom parvalbumina, proteina koji vezuje kalcijum i pomaže u kontroli intracelularnog nivoa kalcijuma, doprinoseći brzom okidanju akcionog potencijala. Njihova osnovna funkcija je sinhronizacija neuronske aktivnosti i održavanje preciznosti obrade informacija. Novija istraživanja su pokazala kako poremećaji spavanja mogu uticati na PV-pozitivne interneurone i njihove funkcije. Hronični nedostatak spavanja i disrupcija spavanja su povezani sa promenama u aktivnosti PV-pozitivnih interneurona. Vecsey i sar.(2009) su pokazali da deprivacija spavanja dovodi do smanjenja ekspresije PV u hipokampusu miševa, što je bilo udruženo sa poremećajem kognitivnih funkcija. PV-pozitivni interneuroni su od suštinskog značaja za generisanje gama oscilacija, ključnog neuronskog ritma povezanog sa različitim kognitivnim procesima, uključujući pažnju, radnu memoriju i senzornu percepciju. Poremećaji spavanja mogu uticati na gama oscilacije, potencijalno putem promena u aktivnosti PV-pozitivnih interneurona. Naime, deprivacija spavanja kod glodara narušava sinhronizaciju tih neurona i smanjuje gamma oscilacije, što upućuje na potencijalni mehanizam koji se nalazi iza kognitivnih oštećenja povezanih sa poremećajima spavanja (Sohal i sar., 2009). Poremećaji spavanja često su udruženi sa neurološkim i psihijatrijskim poremećajima, uključujući shizofreniju i depresiju. PV-pozitivni interneuroni su povezani sa patofiziologijom ovih stanja.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su da se ispita uticaj fragmentacije spavanja, eksperimentalno izazvane po modelu apneje u spavanju, na:

1. Podložnost za epileptogenezu analizirajući bihevioralne i elektroencefalografske karakteristike konvulzija izazvanih lindanom.
2. Ponašanje povezano sa anksioznošću i ponašanje povezano sa depresijom na osnovu odgovarajućih bihevioralnih testova za procenu anksioznosti i depresije kod eksperimentalnih životinja.
3. Nivo proinflammatoryh citokina (IL-1 β i IL-6), kao i redoks status u serumu i moždanim strukturama: hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu
4. Serumske nivoe hormona kortikosterona, estradiola, progesterona i testosterona.
5. Proces neurogeneze u dentatnom girusu hipokampusa, analizom markera proliferacije, proteina Ki-67 i markera mladih neurona, dabl kortina (DCX), zatim proces gliogeneze u dentatnom girusu hipokampusa, analizom ekspresije glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), citoskeletnog intermedijernog proteina, koji predstavlja marker astrocita, kao i aktivnost inhibitornih interneurona u svim regionima hipokampusa, analizom ekspresije parvalbumina (PV), markera inhibitornih interneurona.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su upotrebljeni mužjaci pacova soja Wistar albino starosti 10-11 nedelja na početku eksperimenta, težine 220-240g. (Vivarijum Vojnomedicinske akademije u Beogradu). Nakon pristizanja u laboratoriju, smeštene su u transparentne kaveze od pleksiglasa, obložene piljevinom, i imale su stalno dostupnu hranu i vodu (ad libitum), pri konstantnim, strogo kontrolisanim, ambijentalnim uslovima (temperatura od 22 ± 2 °C; vlažnost od 55 ± 5 %; ciklus svetla-tame od 12 sati, sa početkom svetlosnog perioda u 08:00 h).

Svaka životinja je prošla period aklimatizacije na laboratorijske uslove, trajanja 7 dana, uključujući prilagođavanje na standardne ambijentalne uslove i navikavanje na eksperimentatora, zbog bihejvioralne prirode istraživanja, gde strah od manipulacije može značajno uticati na eksperimentalne varijable. Svi bihejvioralni eksperimenti, kao i manipulacija životinjama, tokom postupaka, bili su sprovedeni od strane iskusnog i obučenog istraživača, na koga su životinje prethodno prilagođene. Sve supstance su administrirane intraperitonealnim putem (i.p.), ukoliko drugačije nije naznačeno.

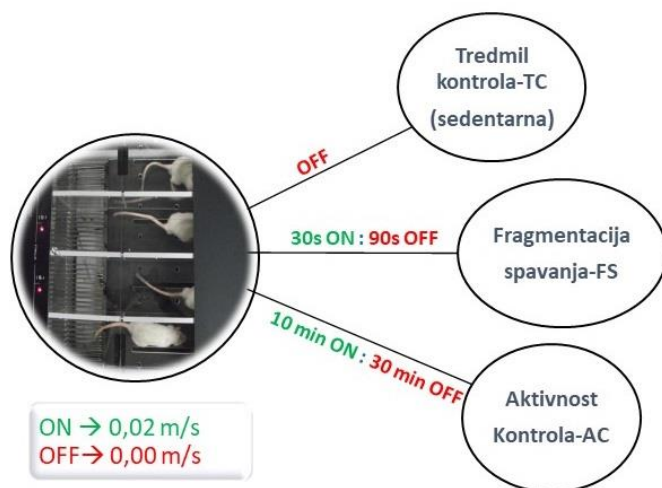
Svi eksperimentalni postupci sprovedeni u okviru ove disertacije bili su u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta (2010/63/EU), važećim etičkim i etološkim principima i legislativom i odobreni su od strane relevantnih institucionalnih i nacionalnih etičkih tela (Odluka Komisije za zaštitu dobrobiti eksperimentalnih životinja br. 8026/2 i Rešenje Uprave za veterine Ministarstva za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu br. 323-07-05290/2017-05).

3.2. Fragmentacija spavanja

Fragmentacija spavanja postignuta je modifikovanom metodom na pokretnoj traci (McKenna i sar., 2007). Aparat sa pokretnom trakom za male eksperimentalne životinje ili tredmil (NeuroSciLaBG-Treadmill, Elunit, Srbija), koji je korišćen u ovim eksperimentima, čini pokretna traka čije je kretanje u dužem vremenskom periodu kontrolisano pomoću unapred definisanog eksperimentalnog protokola, odgovarajućim kompjuterskim programom. Sva softverska rešenja kao i kretanje trake prethodno su provereni u pilot studiji, uz saradnju sa

Elektrotehničkim fakultetom, Univerziteta u Beogradu.

Prema prethodnim studijama, unapred su definisana dva režima aktivnosti aparata i to ON i OFF, tako da ON označava kretanje trake brzinom od 0,02 m/s, a OFF režim mirovanje trake (stajanje, brzina 0,00 m/s). Sve životinje su, pre tretmana, adaptirane na rad aparata tokom dva dana u sesijama od po 1h, sa naizmeničnim smenjivanjem ON i OFF režima rada svakih 5 min (5 min ON : 5 min OFF; 1h). Intervali fragmentacije spavanja su podešeni da odgovaraju spavanju pacijenata sa teškom apnejom u spavanju. U tim uslovima u toku jednog sata postoji 30 prekida spavanja, što odgovara



Slika 3.1. Eksperimentalne grupe i protokol rada pokretne trake tredmila

Prikazane su ekperimentalne grupe i režim rada pokretne trake u zavisnosti od grupe kojoj su životinje pripadaju.

fragmentima od po 2 min u kojima se naizmenično smenjuje ON i OFF aktivnost pokretne trake. Stoga je tredmil programiran tako da se naizmenično smenjuju 30s ON i 90s OFF režim rada trake (fragmentacija spavanja: grupa SF).

Korespondentnu aktivnost/stres kontrolnu grupu činile su životinje koje su boravile u aparatu sa pokretnom trakom sa aktivnošću podešenom da ukupna količina pokreta tj. ukupno kretanje pacova bude jednako kretanju životinja u SF grupi, a da im se ne fragmentiše spavanje. Stoga je režim rada pokretne trake podešen u ciklusima od 10 min ON i 30 min OFF (stres "activity" kontrolna: grupa AC).

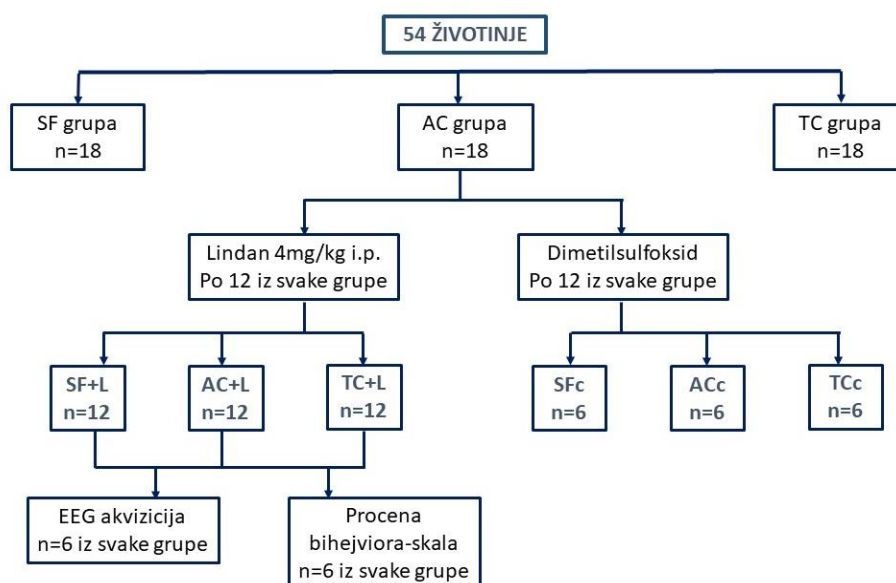
Pacovi koji su boravili u aparatu pri mirovanju trake sa uslovima ekvivalentnim njihovom boravku u kavezima činili su sedentarnu kontrolnu grupu TC. (Slika 3.1.). Kompletan eksperimentalni dizajn, kao i metoda fragmentacije spavanja planirani su prema već ustaljenom protokolu i standardizovanom režimu kretanja trake (McKenna i sar., 2007; Guzman-Marin i sar., 2007; McCoy i sar., 2007; Ward i sar., 2009).

3.3. Eksperimentalni dizajn

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije realizovana su kroz tri eksperimentalna bloka.

3.3.1. Uticaj fragmentacije spavanja na ekscitabilnost centralnog nervnog sistema i epileptogenezu

Ispitivanje uticaja akutnih i hroničnih efekata fragmentacije spavanja na podložnost za razvoj epileptičnih napada i moždanu ekscitabilnost sprovedeno je praćenjem bihejvioralnih (Stanojlović i sar.,2009) i elektroencefalografskih karakterisitika epileptičnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana. Akutna fragmentacija spavanja je sprovedena jednokratno tokom prvih šest sati svetle faze ciklusa svetlo/tama. U eksperimentu je korišćeno 54 životinje, po 18 u svakoj od tri grupe, od čega je kod 12 životinja iz SF, AC i TC grupa administriran lindan u subkonvulzivnoj dozi 4 mg/kg, i.p. čime su formirane SF+L, AC+L i TC+L grupe (n=6 u svakoj), a po 6 životinja iz svake grupe rastvarač dimetilsulfoksid pri čemu su formirane SFc, ACc i TCc grupe (n=6 u svakoj).



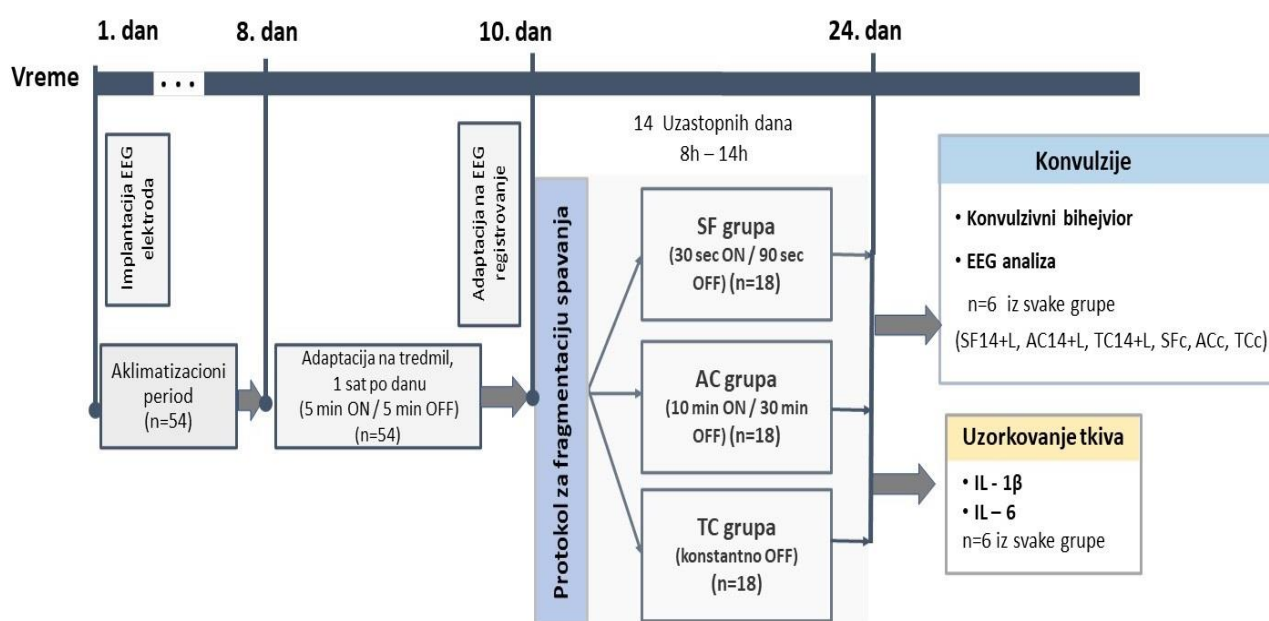
Slika 3.2. Šematski prikaz raspodele životinja nakon akutne fragmentacije spavanja po grupama i tretmana životinja u zavisnosti od grupe u kojoj se nalaze.

Za dalje objašnjenje pogledati tekst.

Materijal i metode

Monitoring bihevioralnih karakteristika konvulzivnih napada i akvizicija EEG signala vršeni su tokom narednih 30 min nakon administracije lindana (Slika 3.2.). Od 12 životinja iz svake grupe koje su dobile Lindan, 6 je upotrebljeno za bihevioralnu analizu, dok je preostalih 6 imalo prethodno implantirane elektrode i korišćeno je za akviziciju EEG signala.

Hronična fragmentacija spavanja je sprovedena tokom 14 uzastopnih dana u prvom delu svetle faze u trajanju od po 6 sati. Eksperimentalni dizajn prikazan je shematski na Slici 3.3. U ovom delu eksperimenta učestvovalo je ukupno 54 eksperimentalne životinje, koje su nakon već opisane aklimatizacije i adaptacije na tredmil bile podvrgnute jednom od tri protokola (n=18 u svakom) na tredmilu, tokom 6 sati svetlog perioda (između 8h ujutro i 14h) narednih 14 dana uzastopno. Neposredno po završetku ovih protokola fragmentacije spavanja (24. dan), životinje su podeljene tako da je jedna trećina životinja (n=6) tretirana subkonvulzivnom dozom lindana 4mg/kg intraperitonealno (SF14+L, AC14+L, TC14+L), druga trećina životinja (n=6) je tretirana dimetilsulfoksidom (kontrolna grupa za hemokonvulzant, SFC, ACC i TCC). Ovih 12 je imalo prethodno implantirane elektrode za EEG akviziciju. Preostala trećina životinja (n=6) je neposredno po završetku 14-dnevnog protokola žrtvovana i uzorkovani su serum i mozak za analizu citokina IL1- β i IL6.

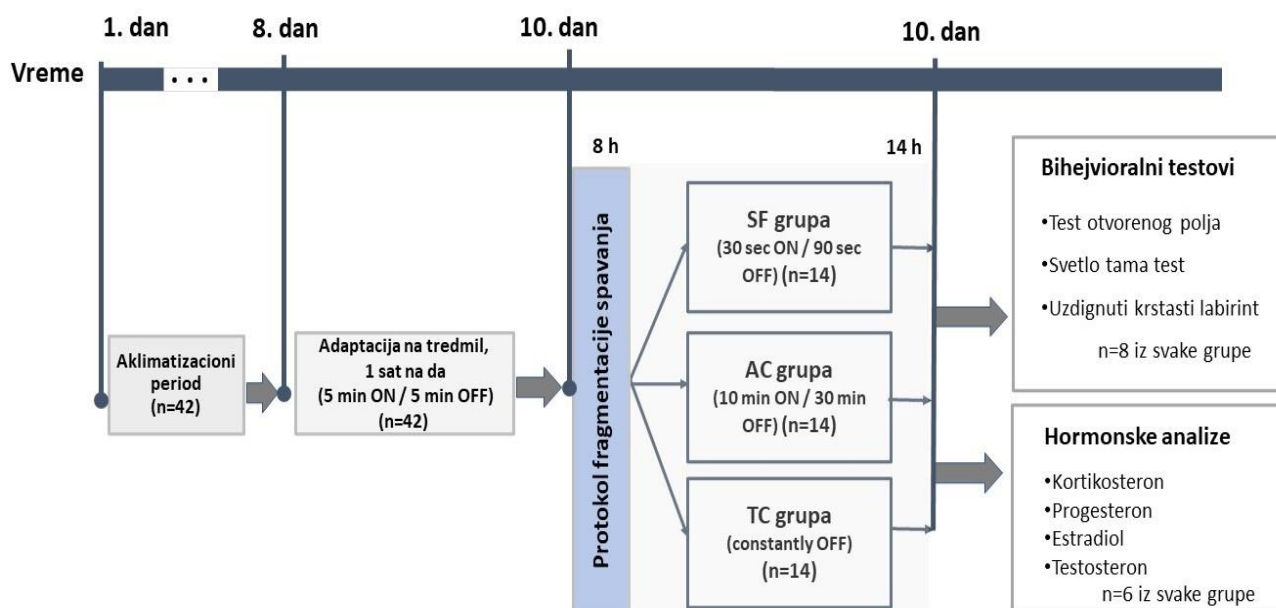


Slika 3.3. Šematska ilustracija eksperimentalnog dizajna.

Po dolasku u laboratoriju, životinje su narednih sedam dana aklimatizovane na laboratorijske uslove. Fragmentacija spavanja je postignuta upotrebom tredmila za male eksperimentalne životinje. Prethodno fragmentaciji, životinje su adaptirane na kretanje tredmil trake tokom dva dana u sesijama od 1 sata. Za proceduru fragmentacije spavanja (početak je na šemi obeležen kao dan 10 na vremenskoj osi), životinje (n=54) su podvrgnute jednom od tri protokola (n=18 u svakom) na tredmilu, tokom 6 sati svetlog perioda (između 8h ujutro i 14h) narednih 14 dana uzastopno: eksperimentalna grupa-protokol za fragmentaciju spavanja (SF: 30s OFF: 90s ON režim, 30 prekida na sat); kontrolna grupa za aktivnost (AC: 10min ON: 30min OFF režim; 1.5 prekida spavanja na sat); sedentarna (tredmil) kontrola (TC: konstantno OFF režim, 0 prekida spavanja na sat). 24tog dana, jedna trećina životinja iz svih grupa je dobila DMSO čineći tako SFc, ACC i TCC grupe (n=6 po grupi), koje su služile kao kontrolne grupe za hemokonvulzant. Preostala trećina životinja iz svake od grupa (SF, AC i TC) su odmah nakon fragmentacije žrtvovane u cilju uzimanja seruma i izolacije moždanih struktura (korteks, hipokampus, talamus) kako bi se odredili citokini (IL-1 β , IL6).

3.3.2. Uticaj fragmentacije spavanja na anksioznost

Ispivanje uticaja fragmentacije spavanja na anksioznost sprovedeno je takođe u dva segmenta. Prvi segment je činila akutna fragmentacija spavanja koja je sprovedena uz pomoć tredmila za male životinje na prethodno opisan način, nakon čega su testirane sa tri reprezentativna bihevioralna testa za ispitivanje anksioznosti: test otvorenog polja (OPF), uzdignuti krstasti lavirint (EPM) i test svetlo/tama (LD). Odvojena grupa životinja koja je prošla fragmentaciju spavanja je upotrebljena za hormonsku analizu: kortikosteron, estradiol, testosteron i progesteron (Slika 3.4.).



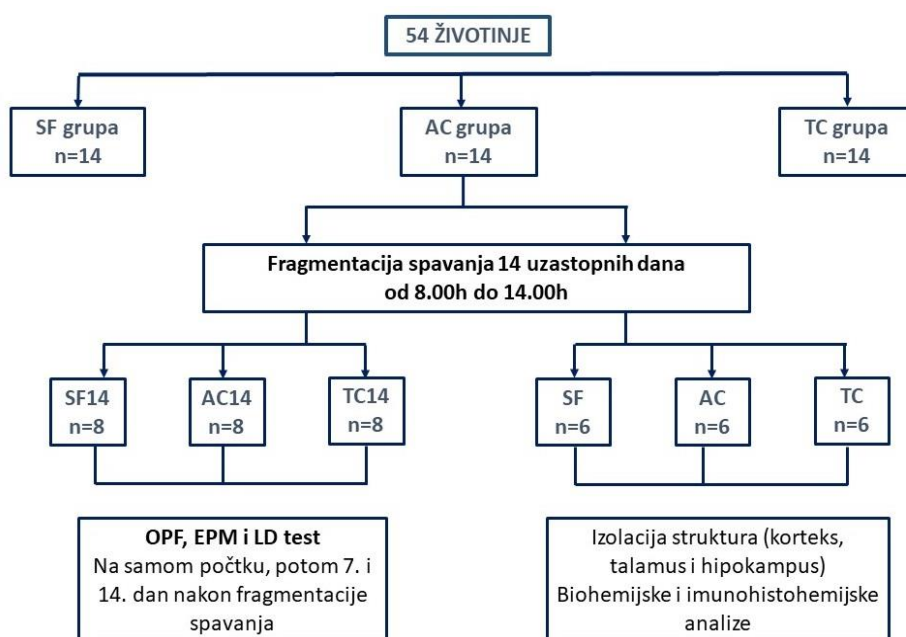
Slika 3.4. Šematska ilustracija eksperimentalnog dizajna.

Eksperimentalne životinje (n=42) su inicijalno, po pristizanju u laboratoriju, aklimatizovane na laboratorijske uslove u trajanju od 7 dana. Adaptacija na pokretnu traku tredmila je sprovedena u segmentima od po 1 sat tri uzastopna dana nakon adaptacije po ustaljenom režimu rada trake (5 min ON i 5 min OFF radni režim, sa brzinom kretanja trake od 0.02 m/s u ON režimu, i 0.00 m/s u OFF režimu). Nakon toga je sproveden protokol za fragmentaciju spavanja i životinje su podeljene u tri grupe (n=14 u svakoj grupi) i podvrgnute jednom od tri eksperimentalna protokola na tredmilu tokom 6 sati svetle faze: 1) fragmentacija spavanja (30s OFF:90s ON režim; 30 prekida spavanja po satu, SF grupa), 2) kontrolna grupa za aktivnost (10 min ON: 30 min OFF režim, 1.5 prekida spavanja na sat, AC grupa), 3) sedentarna-tredmil kontrola (konstantno OFF režim, 0 prekida spavanja na sat, TC grupa). Po završetku protokola za fragmentaciju spavanja jedna kohorta životinja (n=8 iz svake grupe) je podvrgnuta in vivo etiološkim testovima za ispitivanje anksioznosti (test otvorenog polja, svetlo/tama test i test uzdignutog krstastog lavirinta), dok je druga kohorta životinja (n=6 iz svake grupe) žrtovana za uzimanje uzoraka krvi i dalje određivanje hormonskog statusa uz pomoć ELISA (testosteron, progesteron, estradiol, kortikosteron).

U hroničnom delu eksperimenta protokol fragmentacije spavanja je sproveden na 42 životinje koje su podeljene u tri grupe sa po 14 životinja u svakoj (Slika 3.5.). Pre početka eksperimenta po 8 životinja iz sve tri grupe su testirane na tri bihevioralna testa (OPF, EPM i LD) koja se koriste za ispitivanje ponašanja povezanog sa anksioznošću, što je korišćeno kao bazalna vrednost. Nakon toga je započet protokol za fragmentaciju spavanja koji je trajao 14 uzastopnih dana od 8.00h do 14.00h. Istih 8 životinja je testirano još u dva navrata prvi put 7. dana nakon fragmentacije i 14. dana po završetku protokola. Po šest životinja iz svake grupe koje nisu bile podvrgnute bihevioralnim testovima, po završetku protokola fragmentacije je žrtvovano radi uzorkovanja moždanih struktura (korteks, talamus i hipokampus) i biohemijsku

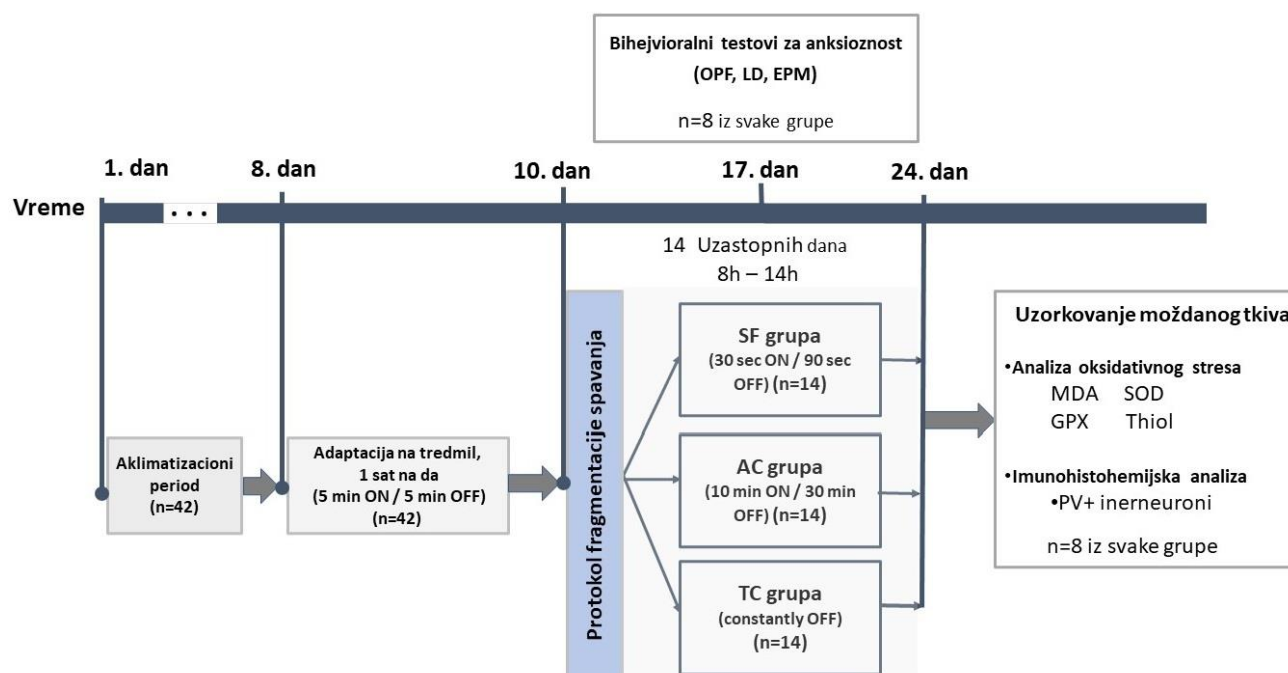
Materijal i metode

analizu oksidativnog stresa (MDA, SOD, GPx i Thiol) i imunohistohemijsku analizu. Eksperimentalni protokol je shematski prikazan na Slici 3.6.



Slika 3.5. Šematski prikaz raspodele životinja po grupama i tretmana životinja u zavisnosti od grupe u kojoj se nalaze.

Za dalje objašnjenje pogledati tekst.



Slika 3.6. Šematska ilustracija eksperimentalnog dizajna.

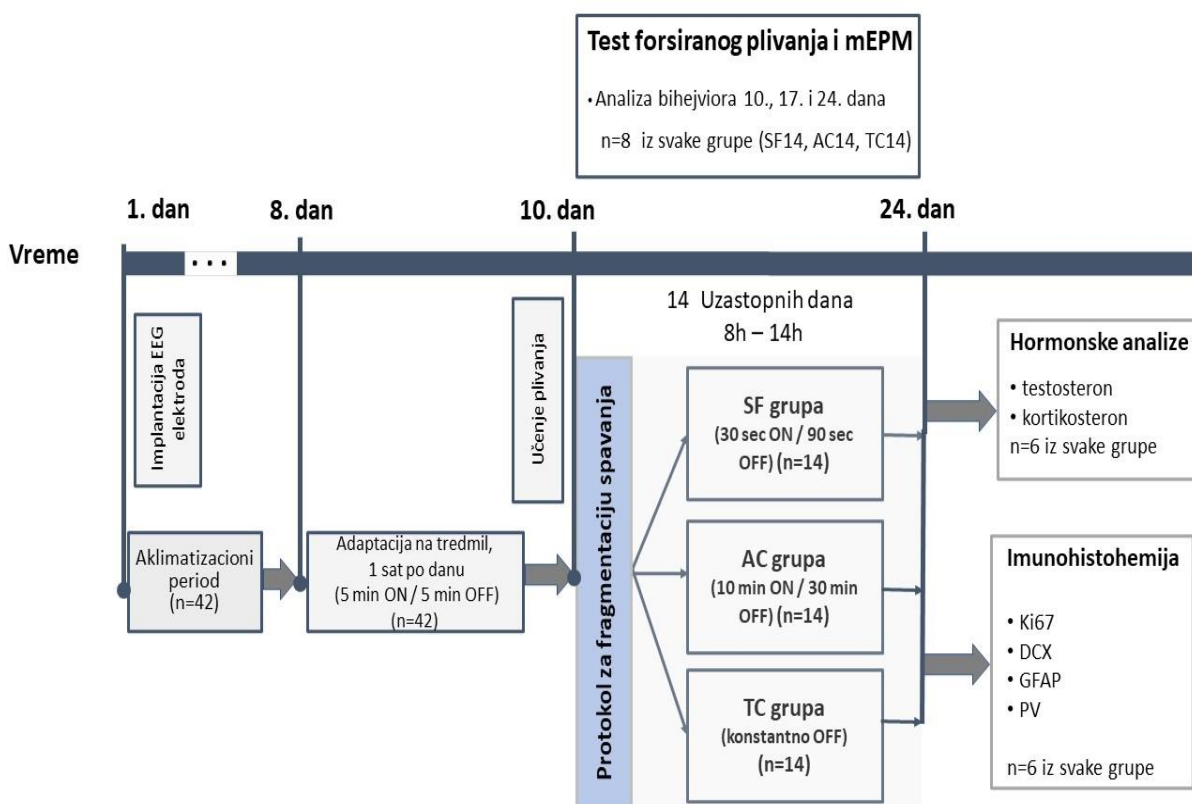
Životinje koje su provele ovaj period u tredmilu, bez kretanja trake (TC) i one koje su imale jednaku količinu kretanja na traci ali bez menjanja arhitekture spavanja (AC) su predstavljale kontrolne grupe. Bihevioralno testiranje za prisustvo anksioznosti je sprovedeno desetog dana (bazalni nivo), kao i 17. i 24. dana nakon početka eksperimentalnog protokola. Dvadesetčetvrtog dana, kada je eksperiment završen, sve životinje su žrtvovane u cilju izolacije moždanih struktura. Jedna od moždanih hemisfera (naizmenično desna ili leva) je korišćena za analizu oksidativnog stresa, dok je druga korišćena za imunohistohemijsku analizu broja hipokampalnih PV+ interneurona.

3.3.3. Uticaj fragmentacije spavanja na depresiju i kognitivne funkcije

Ispitivanje uticaja fragmentacije spavanja na depresiju sprovedeno je u jedinstvenom eksperimentu u kome je učestvovalo 42 životinje.

Bihevioralna analiza izvršena je testom forsiranog plivanja i modifikovanim testom uzdignutog krstastog lavirinta, koji će biti detaljno opisan i to akutno (nakon prvog dana fragmentacije spavanja, subakutno-nakon 7. dana fragmentacije spavanja i hronično-nakon 14. dana fragmentacije spavanja). Po 6 životinja iz svake grupe nije podvrgnuto bihevioranom testiranju i nakon fragmentacije korišćeno je za hormonske analize po završetku protokola od 14 dana (testosteron, kortikosteron) i imunohistohemijske analize iz moždanih struktura (Ki67, DCX, GFAP, PV).

Eksperimentalni protokol je shematski prikazan za Slici 3.7.



Slika 3.7. Šematska ilustracija eksperimentalnog dizajna.

Aklimatizacija na laboratorijske uslove je započeta odmah po pristizanju životinja u laboratoriju i trajala je 7 uzastopnih dana (od 1. do 8. dana na šemi). Nakon toga je sprovedena adaptacija na pokretnu traku tredmila po ustaljenom protokolu. Spavanje je fragmentisano tokom 14 uzastopnih dana u eksperimentalnoj grupi (SF). Životinje koje su provele ovaj period u tredmilu, bez kretanja trake (TC) i one koje su imale jednaku količinu kretanja na traci, ali bez menjanja arhitekture spavanja (AC) su predstavljale kontrolne grupe. Bihevioralno testiranje za prisustvo depresije je sprovedeno 10. dana, kao i 17. i 24. dana nakon početka eksperimentalnog protokola. Dvadesetčetvrtog dana, kada je eksperiment završen, sve životinje su žrtvovane u cilju izolacije moždanih struktura. Prethodno je uzorkovan serum za analizu testosterona i kortikosterona. Jedna od moždanih hemisfera (naizmenično desna ili leva) je korišćena za imunohistohemijsku analizu.

3.4. Procena konvulzivne aktivnosti

3.4.1. Opservacija bihevioralnih parametara konvulzivnog ponašanja

Tokom 30 min od intraperitonealne primene subkonvulzivne doze lindana (4mg/kg; *Sigma Aldrich Co, SAD*) posmatrani su bihevioralni parametri konvulzivnih napada:

- **incidenca** (procenat životinja koje konvulziraju u grupi),
- **latentni period** (vreme do prve konvulzivne epizode),
- **intenzitet i broj** konvulzivnih epizoda po životinji.

Upotrebljena je modifikovana deskriptivna skala sa gradusima od 0 do 4. Gradusi su definisani:

- **gradus 0**- nema napada;
- **gradus 1**- trzaj glave i donje vilice;
- **gradus 2**- mioklonus celog tela (reakcija vrele ploče) i bilateralni klonus prednjih ekstremiteta sa potpunim uspravljanjem (Kengur položaj);
- **gradus 3**- progresija i generalizovane kloničke konvulzije sa toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa;
- **gradus 4**- status epilepticus (Stanojlović i sar., 2009). Letalitet je registrovan posle 30 min i 24h od administracije subkonvulzivne doze lindana.

Letalitet je registrovan posle 30 min i 24h od administracije subkonvulzivne doze lindana.

3.4.2. Operativna implantacija elektroda, registrovanje i analiza EEG aktivnosti

U cilju registrovanja EEG aktivnosti, životinjama u opštoj anesteziji u intraperitonealnoj anesteziji (Nesdonal, 40 mg/Kg, i.p.) su postavljene u stereotaksički ram (David Kopff, Tujunga, SAD) sa gornjom šipkom sekutića na -5,0 mm.

Kako bi se EEG registrovao hronično su postavljene su pozlaćene elektrode iznad:

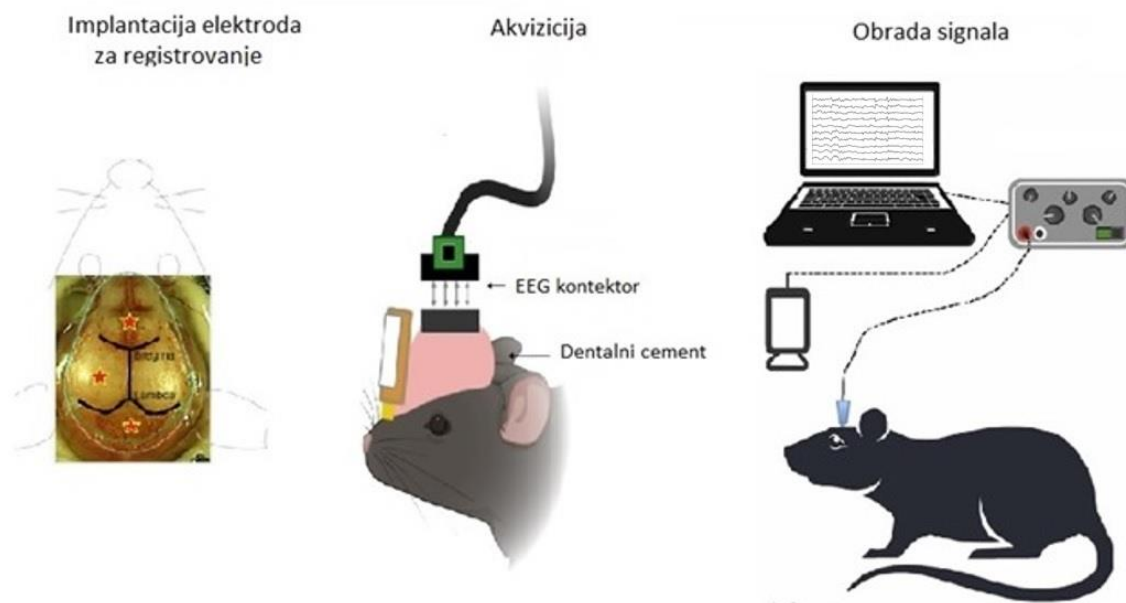
- frontalnog (2 mm ispred bregme i 2mm lateralno od srednje linije),
- parijetalnog (2mm ispred lambde i 2mm lateralno od srednje linije)
- i okcipitalnog (2 mm iza lambde) korteksa.

Bipolarna registrovanja su vršena na 8-kanalnom EEG aparatu (*RIZ Zagreb, Hrvatska*) dok je analogno-digitalna konverzija učinjena pomoću 8-kanalne, 16-bitne AD kartice SCB-68 (*National Instruments Co, Austin, Texas, USA*). Frekvencija uzorkovanja iznosila je 512 Hz, filtriranje signala u opsegu 0,3 – 80 Hz, dok je ambijentalni šum uklonjen pomoću filtera od 50 Hz. Za digitalno snimanje i obradu EEG signala upotrebljen je *NeurophysiologyLaBG* softver razvijen u našoj laboratoriji pomoću koga se signali EEG-a trajno i kontinuirano beleže na tvrdom disku računara (Stanojlović i sar., 2009; Hrnčić i sar., 2011).

EEG zapisi su analizirani vizuelno i pomoću opisanog softvera (Slika 3.8.). EEG aktivnost je registrovana od 120 do 180 minuta, a trajanje analiziranih EEG epoha iznosilo je 4s. Određivano je vreme do pojave EEG promena: latenca, broj i trajanje epileptiformnih promena i amplituda napada.

Epileptiformne promene su definisane kao:

- pojedinačni izolovani visokovoltazni šiljci;
- multipli šiljci;
- šiljak- talas kompleksi;
- šiljak – talas pražnjenja (*eng. spike-wave discharge, SWD*).



Slika 3.8. Šematski prikaz implantacije elektroda i akvizicije EEG signala

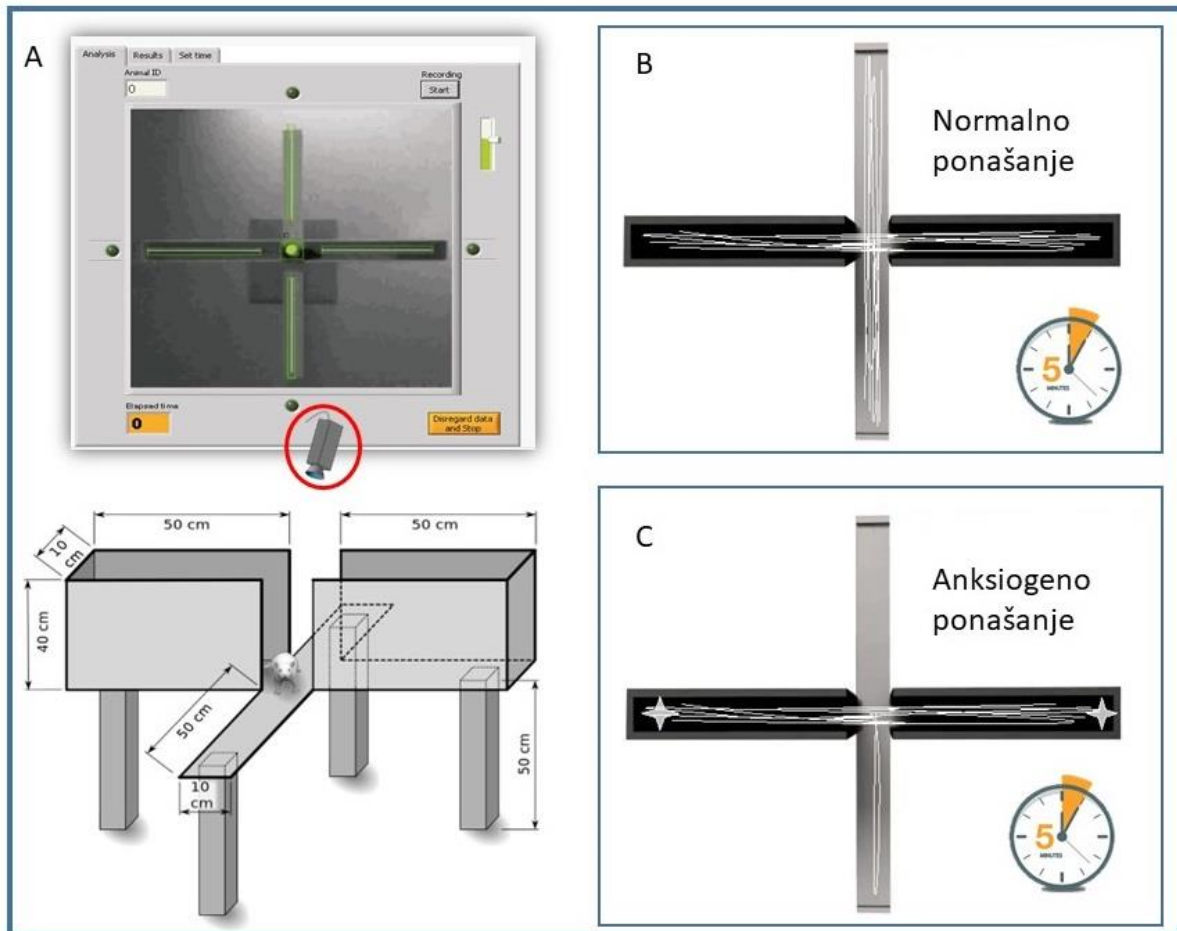
3.5. Bihevioralni testovi

3.5.1. Uzdignuti krstasti lavirint

Test omogućava ispitivanje anksioznosti kod životinja, a zasnovan je na urođenom nagonskom ponašanju i potrebi životinje da istražuje novu sredinu kao i urođenom strahu od otvorenih područja koja su predstavljena otvorenim kracima i potrage za skrovitom sredinom (zatvoreni kraci). Upravo na odnosu ova dva urođena instinkta je utemeljena naučna vrednost ovog testa. Nokse koje mogu da utiču na promenu odnosa mogu da budu izuzetno suptilne zato se test izvodi u mračnoj, zvučno izolovanoj sobi (Pellow i sar., 1985). Registrovani bihevioralni obrasci ponašanja mogu da ukazuju na različite oblike anksioznog ponašanja (Slika 3.9.).

Ukupan broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova su pokazatelj lokomotorne aktivnosti, dok je povećanje vremena provedenog u otvorenim kracima pokazatelj povećane anksioznosti. Pored pomenutih, uvedene su i druge etološke varijable, kao što je procena rizika poniranja glave ispod nivoa međa, propinjanje na zadnje noge, defekacija (Hogg, 1996). U našim eksperimentima test je izvođen u lavirintu koji se sastoji od četiri kraka uzdignuta na stalak visine 40cm. Dva naspramna kraka (50x10x40 cm) su zatvorena bočnim zidovima, dok su druga dva otvorena (50x10 cm). U centru se nalazi platforma (10x10 cm) na koju se inicijalno postavlja životinja glavom okrenutom ka zatvorenom kraku.

Ponašanje životinja se prati tokom 5 min i registruje kamerom (HicVision Bullet 2612) postavljenom iznad lavirinta. Parametri ponašanja koji se analiziraju su broj ulazaka i vreme provedeno u otvorenim i zatvorenim kracima. Radi smanjenja spoljnog uticaja svaka pojedinačna sesija je snimljena infracrvenom kamerom visoke rezolucije a snimci su naknadno analizirani. Nakon svake životinje aparat je kompletno obrisano 70% alkoholom radi neutralizacije eventualnih zaostalih mirisa.

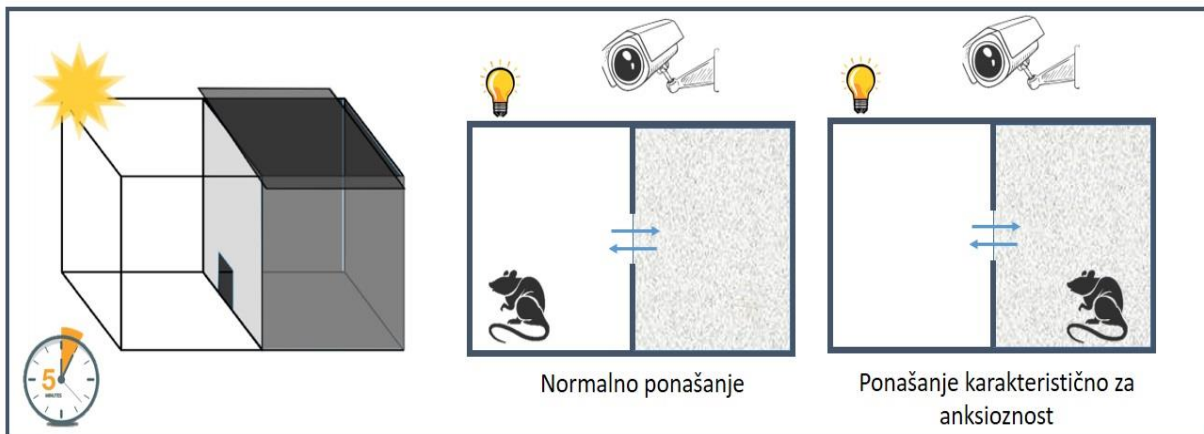


3.9. Uzdignuti krstasti lavirint-tehničke karakteristike

A. Softverski program za praćenje ponašanja životinja u lavirintu; B. Trajektorija kretanja životinja u fiziološkim uslovima; C. Bihevioralni parametri karakteristični za anksiogeno ponašanje u lavirintu.

3.5.2. Test svetlo-tama

Kao pokazatelj anksioznosti u ovom testu određivalo se ukupno vreme koje životinja provodi u svetlom delu test kutije (27x27x27cm, sve bele površine) koji je sa tamnim delom



Slika 3.10. Test svetlo tama (eng. light/dark test)

Normalno ponašanje i ponašanje karakteristično za anksioznost.

(27x18x27cm, sve crne površine) povezan otvorom dimenzija 8x8 cm (Elunit, Beograd, Srbija). Životinja je spuštена u centar svetlog dela i narednih 5 min video kamerom snimano je njeno ponašanje (Bourin i Hascoet, 2003).

Životinja urođeno preferira tamni kompartman, s obzirom da su pacovi noćne životinje, ipak suočavanje sa novom sredinom pobuđuje eksplorativni instinkt (Slika 3.10.). Pacovi koji ispoljavaju elemente anksioznog poremećaja će većinu ili kompletno posmatrano vreme provesti u tamnom kompartmanu (Borsini i sar., 2002).

3.5.3. Test otvorenog polja

Za registrovanje horizontalne (pređeni put i vreme ambulatornog kretanja) i vertikalne (broj propinjanja na zadnje ekstremitete) lokomotorne aktivnosti u otvorenom polju koristio se automatizovani sistem opremljen infracrvenim senzorima (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska) sa pripadajućim softverskim paketom (Conducta System v 1.0, Experimetria Ltd., Budimpešta, Mađarska).

Aparat za testiranje je zvučno izolovana kutija čiju osnovu čini „otvoreno polje“ podeljeno virtuelno softverski na 16 kvadrata od kojih su 4 središnja i označena kao centar polja i obasjana crvenom svetlošću jačine 12 luxa. Površina centra polja je 50% ukupne površine i okružena je perifernim i ugaonim kvadratima.

Izmereno je vreme koje je životinja provela u centru otvorenog polja, te izračunat indeks tigmotaksije kao odnos ambulatornog kretanja u perifernim i ugaonim zonama, te ukupnog pređenog puta tokom ambulatornog kretanja, izražen u procentima. Kompletan aparat je opremljen infracrvenim senzorima, a visina zidova aparata iznosi 40 cm.

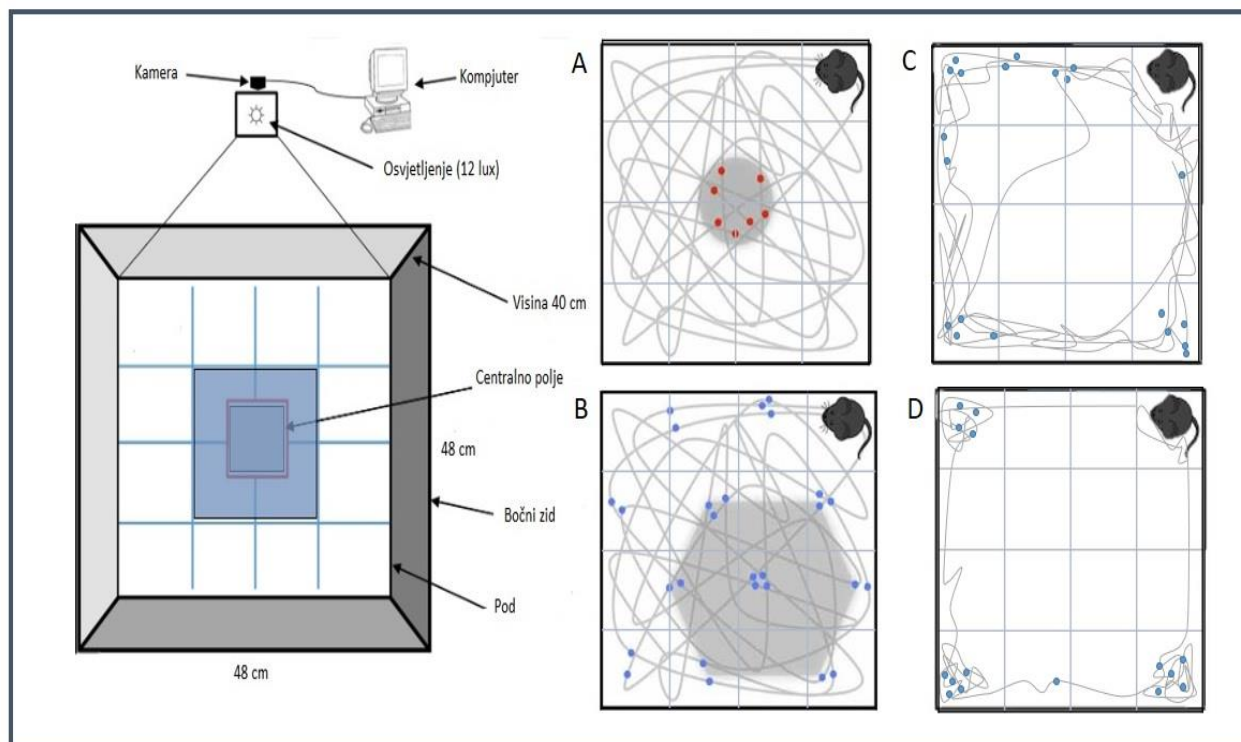
Sistem služi za opservaciju eksplorativnog ponašanja životinja koje uključuje:

- ukupan pređeni put
- i vreme ambulancije,
- broj ulazaka i
- vreme provedeno u centralnom polju
- broj propinjanja na zadnje ekstremitete
- i indeks tigmotaksije.

Kao pokazatelji ponašanja povezanog sa anksioznošću određivali su se vreme koje životinja provede u centru polja, indeks tigmotaksije i broj propinjanja na zadnje ekstremitete.

Jedna od glavnih karakteristika ponašanja povezanog sa anksioznošću je izostanak eksplorativnog biheviora, a anksiozne životinje uglavnom će imati značajno smanjenu lokomotornu aktivnost i težiti da borave u skrovitim područjima (Slika 3.11.).

Kada je u pitanju indeks tigmotaksije on predstavlja jedan od najznačajnijih pokazatelja anksioznosti (Simon i sar., 1996).



Slika 3.11. Test otvorenog polja (eng. *Open field test*)

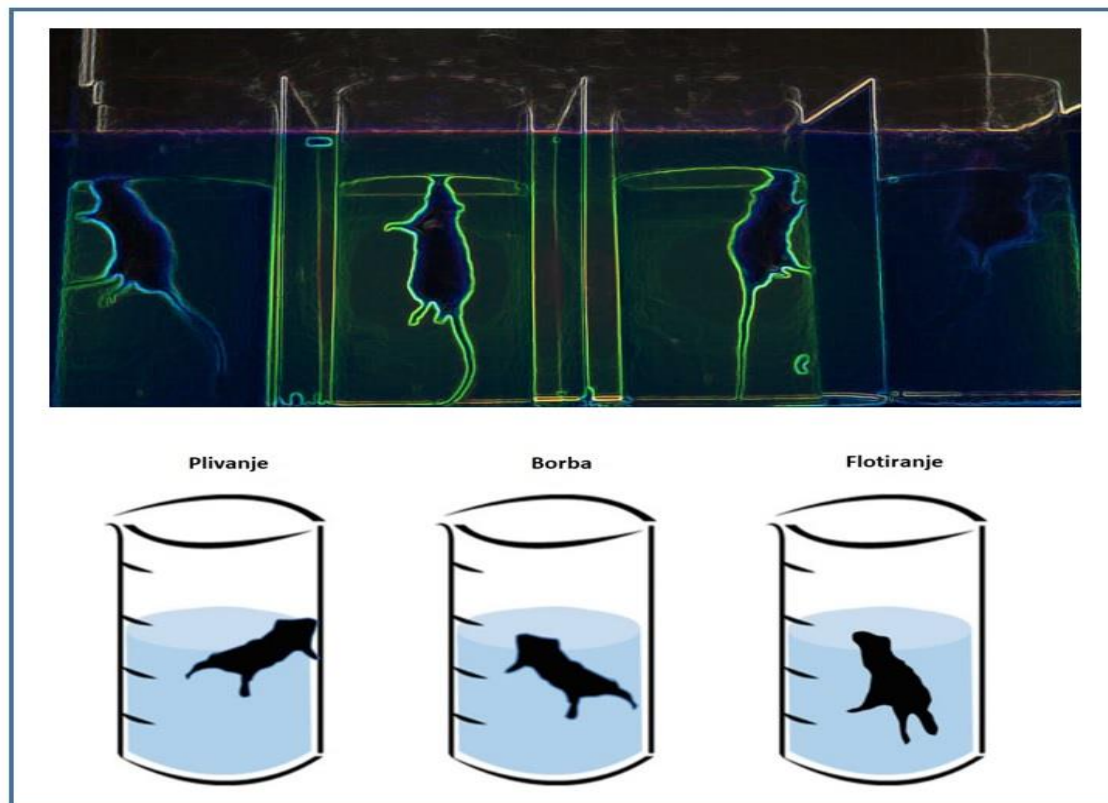
A. Period proveden u centralnom delu polja; B. Trajektorija kretanja u otvorenom polju u fiziološkim uslovima; C. Bihevioralni obrasci kretanja karakteristični za anksioznost; D. Izrazita anksioznost-izostanak kretanja životnje i boravak u uglovima polja

3.5.4. Test forsiranog plivanja

Test forsiranog plivanja metodom po Presoltu, služio je za opserviranje parametara ponašanja povezanih sa depresijom (Porsolt i sar. 1979), a podrazumevao je upotrebu cilindričnih posuda visine 50 cm i prečnika 25 cm od providnog materijala (Elunit, Beograd, Srbija). Posude su ispunjene vodom (35 cm) čija je temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Samo jedna životinja boravi u svakoj od posuda, a opservacija ponašanja se vrši upotrebom kamere kojom se snima aktivnost životinja kako bi se izvršila kasnija analiza (Logitech C210, Lozana, Švajcarska). Trajanje pasivnog plivanja (plutanje), trajanje aktivnog plivanja i trajanja snažne borbe za izbegavanje meri se tokom 5 min.

Ponašanje životinja tokom testa se opsuje kao: 1. flotiranje koje podrazumeva horizontalno plutanje po površini vode (podrazumeva samo pokretanje neophodno za održavanje na površini); 2. aktivno plivanje koje podrazumeva motoričku aktivnost karakterističnu za normalno plivanje; 3. borba koja podrazumeva izraženu motoričku aktivnost svih ekstremiteta, pri čemu prednje šape udaraju o površinu vode pri pokretima koji podsećaju na penjanje ili grebanje po zidu (Slika 3.12.).

Nakon završetka testa, životinje su pažljivo uklonjene iz cilindara i osušene u zagrejanom kućištu a zatim su pebačene u kaveze. Distribucija različitih oblika ponašanja: pasivno plivanje (plutanje), aktivno plivanje i borba, tokom petominutnog testa je utvrđena analizom video snimaka. Kako bi se izbeglo dobijanje pogrešnih rezultata, životinje su dan pre samog testiranja adaptirane na uslove FST u trajanju od 15 min (pretest).



Slika 3.12. Šematski prikaz obrazaca ponašanja u testu forsiranog plivanja (eng. Forced swimming test-FST)

3.5.5. Modifikovani test uzdignutog krstastog lavirinta

Za procenu kognitivnog ponašanja korišćena je modifikovana verzija testa uzdignutog krstastog lavirinta (Elunit, Beograd, Srbija), u skladu sa prethodno opisanim protokolom (Kruk et al., 2011). Platforma je bila uzdignuta 50 cm iznad podloge i sastojala se od centralnog polja (10x10 cm) koja se presećala pod pravim uglom sa dva identična otvorena kraka (50x10 cm) i dva identična zatvorena kraka (50x10x40 cm). Infracrvena kamera (HikVision Bullet 2612, Hangzhou, Kina) postavljena je iznad platforme kako bi pratila ponašanje životinje i bila povezana sa računarnom.

Test se zasnivao na prirodnoj odbojnosti pacova ka svetlim i otvorenim prostorima (analogno otvorenim kracima) i njihovoj tendenciji da traže sigurno sklonište (analogno zatvorenim kracima). Stoga, kognitivna sposobnost životinje odražavala se u vremenu koje joj je bilo potrebno da zapamti i nauči raspored otvorenih i zatvorenih krakova.

Test je sproveden tako što je svaka životinja individualno postavljena na kraj otvorenog kraka, okrenuta prema centralnoj platformi, i postupak je ponavljan tokom dva uzastopna dana. Na prvom danu (pretest), nakon postavljanja, životinji je dozvoljeno da istražuje platformu do 90 sekundi, a zabeleženo je vreme transfera (T1), odnosno vreme koje je životinji bilo potrebno da uđe u zatvoreni krak, bilo levi ili desni. Ako životinja nije uspela da pronade zatvoreni krak

u roku od 90 sekundi, stavljena je u zatvoreni krak sa dozvolom da istražuje narednih 60 sekundi. U ovom slučaju, T1 vrednost je automatski iznosila 90 sekundi.

Drugog uzastopnog dana, nakon intervala od 24 sata, ponovljen je isti postupak (retencija), i zabeleženo je vreme retencije (T2), odnosno vreme koje je životinji bilo potrebno da uđe u zatvoreni krak. Ako životinja nije uspeła da pronađe zatvoreni krak u periodu od 90 sekundi tokom drugog dana, T2 vrednost je bila 90 sekundi.

Skraćenje T2 u odnosu na T1 smatralo se retencijom i neposrednim pamćenjem prostornog rasporeda platforme, uzimajući u obzir tendenciju životinja da idu u zatvoreni prostor, tako da je veći T1-T2 parametar ujedno značio veću retenciju i bolju kognitivnu sposobnost i obrnuto.

3.6. Biohemijske analize

3.6.1. *Optimizacija biološkog materijala po ekstrakciji*

Nakon što su eksperimentalne životinje dekapitirane, uzeta je krv u količini od 3 ml. Glave životinja su stavljene na led tokom perioda od 60 minuta. Krv je ostavljena na sobnoj temperaturi 30 minuta kako bi se spontano zgrušala. Nakon toga, krv je centrifugirana na 3000 obrtaja u minuti tokom 15 minuta kako bi se razdvojili krvni elementi i serum iz krvi (Centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Nakon dobijanja plazme, ona je prebačena u Eppendorf tube i zatim je zamrznuta na temperaturi od -80°C kako bi se očuvala njena struktura i smanjio rizik od propadanja ili degradacije. Ovaj postupak zamrzavanja omogućava dugotrajno skladištenje plazme do naredne upotrebe.

3.6.2. *Protokol izolacije moždanih struktura*

Po uzorkovanju iz glava životinja je preciznim hirurškim postupcima izolovan mozak. U literaturi i dalje postoji dilema da li ovakva disekcija treba da se sprovodi na smrznutom ili svežem tkivu. Kod disekcije svežeg tkiva bolje su uočljive strukturne abnormalnosti, diskoloracije i slično dok je kod smrznutog disekcija daleko tehnički lakša, a sama izolacija struktura je preciznija, te smo se zbog samog cilja eksperimenta odlučili za „frozen“ disekciju. Kod same disekcije korišćen je standardan set hirurških instrumenata koji je obuhvatao hirurške makaze (oštre i tupe) 12 cm, tupi hirurški forceps-zakrivljeni 12cm, 2x1.25 mm, metalnu ploču 10x10 cm, 5-30 mm debljine, zatim set zakrivljenih hirurških forcepsa 1x0.9 mm, 0.8x0.7mm i 0.5x0.4 mm, skalpel (p11) i korespondentni držač skalpela.

Protokol uzorkovanja mozga:

1. Dekapitacija je korišćena kako bi se sprečili pre i postsinaptički efekti anestezije, nakon čega je uz pomoć makaza napravljena medijalna incizija na koži poglavine. Po uklanjanju kožnog flapa sve do bulbusa i ekspaniranju kalvarije, učinjena je mala incizija u kaudalnom segmentu interparijetalnog spoja koja je proširena na prednji deo do između bulbusa.
2. Zakrivljenim frcepsom pažljivo su uklonjenje parietalne kosti upotrebom tupe sile, sa čuvanjem meningealnih omotača. Kod nekih životinja bilo je neophodno ukloniti i delove drontalne kosti kako bi se mozak izolovao u celosti bez opasnosti rupture struktura.
3. Nakon izolacije mozga i oslobađanja od meningealnih omotača mozak je prebačen na hladnu metalnu ploču, a eventualni višak krvi je uklonjen. Kompletna procedura trajala je manje od 2 min u proseku.

Protokol izolacije struktura (Spijker i sar., 2011):

1. Radi lakšeg pristupa željenim strukturama inicijalno je uklonjen *cerebellum*. Mozak je pozicioniran dorzalnom stranom ka metalnoj ploči, a potom je pozicioniran mali forceps između cerebralnih lobusa i cerebeluma, a potom učinjena disekcija cerebeluma od *colliculus inferior-a*. Procedura je trajala 1 minut.

2. Obzirom na prirodu analiza koje smo radili nije bilo potrebno izolovati hipokampus u celosti te je učinjena sagitalna incizija ventralno pozicioniranog mozga na metalnoj ploči duž sagitalnog sulkusa kako bi se presekao *corpus callosum*. Jedna moždana hemisfera, alternativno leva ili desna je odmah poslata na imunohistohemijsku analizu. Beličasto prebojena formacija, semilunarnog oblika, neposredno ispod *corpus callosum-a* je hipokampus. Pažljivim preparisanjem forcepsom počev od anteriornog dela, u smeru suprotnom kazaljki na satu pod uglom 30-40 stepeni pažljivo je odvojen anteriorni segment hipokampusa od korteksa. Nakon toga ista procedura je ponovljena put kaudalno do dobijanja kompletne polovine hipokampusa.

3. Korteks koji je zaostao prilikom preparisanja hipokampusa takođe je korišćen za biohemijsku analizu.

4. Izolacija talamusa je izvršena tupom tehnikom na sličan način kao i hipokampusa. S obzirom da je ovalna siva struktura lako uočljiva time je i pristup kao i hirurška procedura bila dosta jednostavnija.

Hipokampus, korteks i talamus su po izolaciji odvojeno prebačeni u 8 volumena puferskog rastvora koji je sadržao inhibitor proteaza (cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics GmbH, Manhajm, Nemačka)- RIPA (50 mM Tris-HCL pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% IGEPAL; 0,5% Natrijum deoskiholat; 10% SDS), nakon čega je izvršena homogenizacija (The TeSeE™ PRECESS, Bio-Rad, Herkjuliz, Kalisofnija, SAD). Tako dobijeni homogenati su inicijalno inkubirani tokom perioda od 20 min (mešanje na vorteksu svakih 5 min), nakon čega su centrifugirani na 14000 obrtaja u min u periodu od 30 min na temperaturi +4 °C. Supernatant je u Eppendorf tubama uskladišten na temperaturi -80 °C do dalje upotrebe.

3.6.3. Kvantifikacija proteina

U cilju određivanja koncentracije proteina, korišćen je Bicinchoninic Acid Protein Assay (BCA) kit proizvođača Thermo Fisher Scientific iz Laforbo-a, Ujedinjeno Kraljevstvo, u saglasnosti sa uputstvima. Ova metoda se zasniva na merenju smanjenja bakarnih jona od strane proteina u uzorku u alkalnoj sredini. Količina smanjenih bakarnih jona u Cu^{1+} proporcionalna je koncentraciji proteina u uzorku, a ova količina se meri kolorimetrijski pomoću BCA.

U prvom koraku, 10 μl svakog uzorka sa proteinima u različitim razblaženjima (0,5-2 mg/ml) standarda govedeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) i negativne kontrole aplikovani su u duplikatu u mikrotitarskoj pločici sa 96 "bunara". Na svako mesto u mikrotitarskoj pločici dodato je 200 μl radnog reagensa, a ona je inkubirana u periodu od 30 minuta na temperaturi od 37 °C. Da bi se utvrdila koncentracija proteina u uzorcima, merene su apsorbance na talasnoj dužini od 562 nm pomoću čitača (FLUOstar® Omega plate reader proizvođača BMG Labtech, Ortenberg, Nemačka). Za izračunavanje koncentracije proteina u uzorcima u gramima po litru (g/L), primenjivana je BSA standardna kriva, uz pomoć programa Curve Expert 1.4 (Hyams Development, Čatanuga, Tenesi, SAD).

3.6.4. Određivanje koncentracije IL-1 β i IL-6

U serumu i strukturama mozga, čija je izolacija opisana ranije, merena je koncentracija IL-1 β i IL-6. Za određivanje koncentracije su korišćeni komercijalni ELISA kitovi (Rat IL-1 beta ELISA kit # RAB0277-1KT i Rat IL-6 ELISA kit # RAB0311-1KT, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri,

SAD) prema navedenim instrukcijama, bez izolacije specifičnih proteina. Uzorci su obrađivani u duplikatima, uz minimalnu detektibilnu koncentraciju: za IL-1 β -80 pg/mL (opseg detekcije: 68,59-50000 pg/mL), za IL-6 -30 pg/mL (opseg detekcije: 40,96-10000 pg/mL). Posle inkubacije, svi „bunari“ ELISA kita su ispitani četiri puta sa po 300 μ L pufera. Nakon toga, u svaki bunar smo dodali po 100 μ L detektujućih biotin-konjugovanih antitela, u cilju stvaranja kompleksa koji je sadržao primarno antitelo - IL-1 β ili IL-6 - biotin-konjugat. Nakon toga, u svaki bunar dodato je 100 μ L konjugata streptavidina i peroksidaze rena (HRP), a ploča je inkubirana 45 minuta na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. U daljem toku analize ploča je ispirana puferom i u svaki „bunar“ dodato je 100 μ L tetrametilbenzidina (eng. *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*, TMB). Ploča je nakon toga pokrivena i inkubirana u zatamnjenoj prostoriji na sobnoj temperaturi uz lagano mešanje tokom 30 minuta. Završetak reakcije je ostvaren dodavanjem 50 μ L rastvora za prekidanje hemijske reakcije u svaki „bunar“. U toku reakcije, streptavidin konjugovan sa enzimom HRP vezuje se za biotin, a supstrat za peroksidazu rena je tetrametilbenzidin. Kao rezultat reakcije, došlo je do promene boje rastvora iz plave u žutu. Nakon prekida hemijske reakcije, apsorbance žute boje se očitava na talasnoj dužini od 450 nm pomoću čitača (Sunrise absorbance micro plate reader, TECAN, Mannedorf, Švajcarska). Koncentracije IL-1 β i IL-6 se izražavaju u pg/mL i izračunavaju se primenom standardne krive koja je konstruisana u programskom paketu Curve Expert 1.4 (Hyams Development, Čatanuga, Tenesi, SAD).

3.6.5. Određivanje koncentracije hormona u serumu

Koncentracija hormona kortikosterona, testosterona, estradiola i progesterona u serumu, merena je primenom odgovarajućih ELISA kitova (Testosteron-Cusabio, Houston, USA, Senzitivnost testa manja od 0.06ng/ml); Estradiol-Cusabio, Houston, USA (Senzitivnost testa 40pg/ml-1400pg/ml); Progesterone-Cusabio, Houston, USA (Senzitivnost testa manja 0.02ng/ml) i Cortocosteron-IDS, American Laboratory Products Co /Senzitivnost teksta manja 0.17 ng/ml)). U ovom eseju se primenjuje "sendvič" tehnika, koja podrazumeva dodavanje standarda, kontrola i razblaženih uzoraka plazme u ELISA mikrotitarske pločice, gde se vrši analiza koncentracije hormona u "bunarima". Tokom inkubacije, hormoni se vezuju za imobilisana primarna antitela. Nakon inkubacije primarnog antitela sa hormonima, bunari ELISA mikrotitarske pločice su pažljivo isprani adekvatnim puferom za ispiranje. Nakon toga, dodata su detektujuća biotin-konjugovana antitela kako bi se formirao "sendvič" koji čine primarno antitelo-hormon-biotin-konjugat. Zatim je uklonjen rastvor iz bunara ploče i izvršeno je ponovljeno ispiranje puferom. Nakon toga, konjugat streptavidina i HRP dodati su u svaki bunar, a nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi uz blago mešanje, rastvor se odbacio, a bunari su ponovo isprani puferom. Tada je u svaki bunar dodat TMB supstrat i bunari su pokriveni i inkubirani u zatamnjenoj prostoriji na sobnoj temperaturi uz blago mešanje tokom 30 minuta. Nakon inkubacije i razvijanja boje u pločama, hemijska reakcija je prekinuta dodavanjem rastvora za prekidanje reakcije u svaki "bunar". Apsorbance boje je zatim odmah očitana na talasnoj dužini od 450 nm pomoću Sunrise absorbance mikročitača (TECAN, Mannedorf, Švajcarska). Koncentracije kortikosterona i testosterona, izražene u ng/mL, izračunate su upotrebom standardne krive napravljene u programskom paketu Curve Expert 1.4 (Hyams Development, Čatanuga, Tenesi, SAD).

3.6.6. Određivanje parametara oksidativnog stresa

U homogenatu struktura mozga, koji je prethodno detaljno opisan, određivani su parametri oksidativnog stresa: koncentracija malondialdehida (eng. *malondialdehyde*, MDA) i proteinskih tiol grupa (eng. *protein thiol groups*, P-SH), kao i aktivnost enzima superoksid dismutaze (eng. *superoxide dismutase*, SOD) i glutation peroksidaze (eng. *glutathione peroxidase*, GPx) .

merena Kolorimetrijskom metodom prema Dousset i sar. (1983) je merena koncentracija malondialdehida (MDA). Tokom procesa lipidne peroksidacije, MDA se oslobađa iz polinezasićenih masnih kiselina, nakon čega se konjuguje sa tiobarbiturinskom kiselinom (TBARS) u kiseloj sredini. Rezultujuće kompleksno jedinjenje MDA-TBARS je crvene boje i može se kvantitativno meriti kolorimetrijski pomoću čitača (*Sunrise absorbance micro plate reader*, TECAN, Mannedorf, Švajcarska-talasna dužina 532 nm, apsorpcioni koeficijent $1,56 \times 10^5 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$). Koncentracija MDA se izražava u $\mu\text{mol/L}$.

Koncentracija proteinskih tiol grupa (P-SH) se određuje spektrofotometrijskom metodom prema postupku prema Jocelyn i sar. (1987). U reakciji se koristi Ellman-ov reagens (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoinska kiselina), DTNB) koji biva redukovano od strane P-SH i dovodi do stvaranja žutog nitromerkaptobenzoičnog kiselog anjona (5-tio-2-nitrobenzoinska kiselina, TNB-) čija je molarna apsorpciona sposobnost $13,6 \times 10^3 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$, a meri se apsorbancom pomoću čitača na talasnoj dužini od 412 nm. Ova hemijska reakcija se odvija u zatamnjenoj sredini, jer svetlost može nespecifično redukovati DTNB. Koncentracija P-SH se izražava u $\mu\text{mol/g}$ proteina.

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određivana je prema Misra i Fridovich (1972), koja se zasniva na sposobnosti SOD-a da inhibira autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini (pH 10,2). Adrenalin je stabilan u rastvorima kiselog pH, ali se oksiduje u zavisnosti od porasta pH. Autooksidaciju adrenalina započinju tragovi teških metala koji su prisutni kao kontaminanti u reagensima. Krajnji produkt ove hemijske reakcije je obojeni adrenohrom koji se formira u reakcionoj smeši (10 mmol/L adrenalina rastvorenog u 20 mmol/L HCl, 1 mmol/L EDTA i 0,05 mmol/L natrijum karbonata pri pH 10,2) sa uzorcima proteina ili bez njih (kontrola). Ukupna aktivnost SOD-a određena je kinetički kao promena apsorbanca na čitaču (*Sunrise absorbance micro plate reader*, TECAN, Mannedorf, Švajcarska) na talasnoj dužini od 480 nm. Aktivnost SOD-a izražena je u U/L, pri čemu je jedna jedinica (U) definisana kao količina enzima koja inhibira autooksidaciju adrenalina za 50%.

Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) je određena prema Günzler i sar. (1974). Reakciona smeša se sastojala od 870 μl Tris pufera pH 7,6, 20 μl glutation reduktaze (GR), glutationa (GSH), nikotin-amid-adenin dinukleotid-fosfata (NADPH), tert-butil hidroperoksida (t-BOOH) i ekstrakta ćelijskih proteina. Metoda se zasniva na oksidaciji redukovanog GSH uz iskorišćavanje redukovanog NADPH u reakciji koju katalizuje GR. Aktivnost GPx se meri u kuplovanju reakciji sa GR, a izražava se kao promena apsorbanca merena na čitaču pri talasnoj dužini od 340 nm sa molarnim apsorpcionim koeficijentom od $6,22 \times 10^3 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ kao posledica naknadne oksidacije NADPH pomoću t-BOOH kao supstrata. Aktivnost GPx se izražava u U/L.

3.7. Imunohistohemijske analize

3.7.1. Imunohistohemijsko određivanje ekspresije markera neuro- i glija- geneze

Za potrebe histološke analize, tkivo mozga je nakon fiksacije u 4% rastvoru paraformaldehida (PFA) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) standardno procesuirano za kalupljenje u parafinu i sečeno na rezove debljine 4 μm , sa minimalnim rastojanjem između dva sukcesivna preseka 200 μm . Nakon deparafinizacije i rehidratacije preseka u opadajućim koncentracijama alkohola, demaskiranje antigena je vršeno u mikrotalasnoj pećnici u citratnom puferu (pH 6,0), a blokiranje endogene peroksidaze u 3% rastvoru vodonik-peroksida. Rezovi su dalje inkubirani u odgovarajućim serumima u cilju redukcije nespecifičnog bojenja tokom 1h (za Ki-67 ili GFAP – u kozjem (Goat IgG #PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA); za PV -u konjskom (Mouse IgG #PK-6102, Vector

Laboratories, Burlingame, Ca, USA) ili za DCX- u zečjem (Rabbit IgG #PK-6105, Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA) serumu), a zatim i u odgovarajućim primarnim antitelima preko noći: anti-Ki-67 (rabbit polyclonal IgG # ab15580, Abcam, Kembridž, Velika Britanija, razblaženje 1:3500); anti-DCX (goat polyclonal IgG #sc-8066, Santa Cruz Biotechnology, Dalas, Teksas, SAD, razblaženje 1:100); anti-PV (mouse monoclonal, IgG #P3088, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD, razblaženje 1:1000) i anti-GFAP (rabbit polyclonal IgG #z0334, DAKO, Santa Klara, Kalifornija, SAD, razblaženje 1:500).

Za vizualizaciju imunoreaktivnih mesta korišćena je avidin-biotin kompleks (ABC) metoda koja podrazumeva inkubaciju najpre u odgovarajućem biotinizovanom sekundarnom serumu, a nakon ispiranja i u avidin-biotin-peroksidaza kompleksu (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit - Peroxidase, mišji IgG, PK-6102; zečji IgG, PK-6105; kozji IgG, PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA). Kao hromogen korišćen je 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA). Rezovi su kontrastirani Majerovim hematoksilinom, dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola (96%, 100%) (Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Serbia), prosvetljeni u ksilenu (Xylene, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Serbia) i pokriveni medijumom za pokrivanje DPX-om (44581, Sigma, St. Louis, MO, USA). Za ove analize korišćeno je po šest životinja iz svake grupe.

3.7.2. Kvantifikovanje imunoreaktivnih ćelija

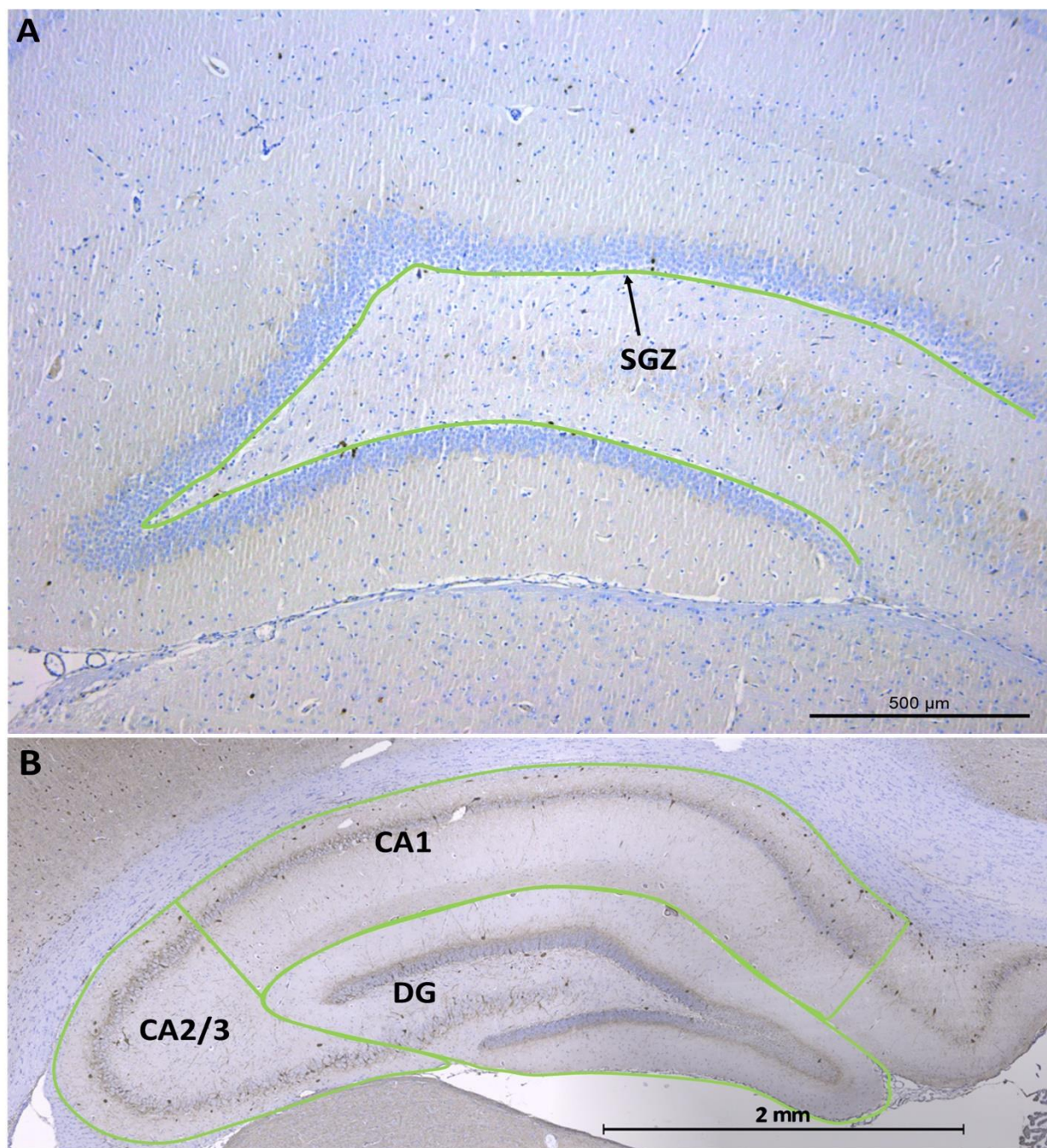
Gotovi preparati su analizirani na mikroskopu Leica DM4000 B LED sa digitalnom kamerom uz korišćenje softvera Leica Application Suite (verzija 4.4.0).

Kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija Ki-67 i DCX je rađena duž subgranularne zone (SGZ) hipokampusa. Ova zona je precizno definisana u literaturi kao granica između hilusa i granularnog sloja hipokampusa. Radi standardizacije rezultata, broj imunoreaktivnih ćelija Ki-67 i DCX je preračunat na 1 mm dužine SGZ hipokampusa (slika 3.7.1.1.).

Kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija koje eksprimiraju PV (parvalbumin) je sprovedena u različitim hipokampalnim regijama (CA1, CA2/3, DG) koristeći isti Leica Application Suite softver. Broj ovih ćelija u svakoj od navedenih regija je izražen kao broj ćelija na 1 mm² ispitivane površine (slika 3.13.).

Za kvantifikaciju ekspresije GFAP-a korišćen je dodatak "Color Picker Threshold Plugin" unutar softvera "Icy". Samo fotografije preseka su rađene na mikroskopu Leica DM4000 B LED sa digitalnom kamerom. Postupak je uključivao obeležavanje pozitivnih boja koje predstavljaju GFAP-imunoreaktivne ćelije obojene DAB-om (nekoliko nijansi braon boje), kao i negativnih boja koje predstavljaju kontrastirana jedra svih ćelija, obezbojeno tkivo i pozadinu.

Na osnovu tačno odabranih pozitivnih i negativnih boja, softver je bio u mogućnosti da izmeri površinu prekrivenu pozitivnim bojama, što predstavlja površinu prekrivenu GFAP imunoreaktivnim ćelijama. Zastupljenost ovih ćelija je izražena kao relativni odnos između površine koju zauzimaju GFAP imunoreaktivne ćelije i ukupne površine regiona od interesa (dentatni girus hipokampusa).



Slika 3.13. A. Distribucija Ki-67 imunoreaktivnih ćelija duž subgranularne zone hipokampusa; B. Distribucija PV imunoreaktivnih ćelija unutar regiona CA1, CA2/3 i dentatnog girusa (DG) hipokampusa.

Reprezentativna fotomikrografija preseka hipokampusa obojenog na A: Ki-67 protein i B: PV protein, na kome je zelenom linijom označena: A-SGZ duž koje je vršena kvantifikacija Ki-67 i DCX imunoreaktivnih ćelija i B: granice regiona CA1, CA2/3 i DG.

3.8 Statistička analiza

Odluka o izboru testa za procenu statističke značajnosti razlike u vrednostima određene varijable između grupa i unutar grupa zavisila je od distribucije podataka testirane pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Varijable sa normalnom raspodelom su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna greška (SE), dok su varijable koje nisu pokazale normalnu raspodelu prikazane medijanom sa 25. i 75. percentilom i opsegom minimum-maksimum.

Materijal i metode

Za utvrđivanje statističke značajnosti razlike između grupa koje nemaju normalnu raspodelu korišćen je Mann-Whitney U test ili Kruskal-Wallis ANOVA test sa Mann-Whitney U post hoc testom. Za utvrđivanje statističke značajnosti razlike između grupa koje imaju normalnu raspodelu korišćen je Studentov t-test ili jednosmerna ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom, u zavisnosti od broja grupa u poređenju,.

Za procenu statističke značajnosti razlike u incidenci i distribuciji napada između grupa korišćen je Fischerov test tačne verovatnoće.

Za utvrđivanje veze između nivoa MDA u moždanim strukturama, serumske koncentracije kortikosterona i osnovnih ishodnih varijabli u etološkim testovima za procenu ponašanja povezanog sa anksioznošću korišćen je Pirsonov test korelacije.

Vrednosti sa $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim, dok su vrednosti sa $p < 0,01$ ili $< 0,001$ smatrane visoko statistički značajnim.

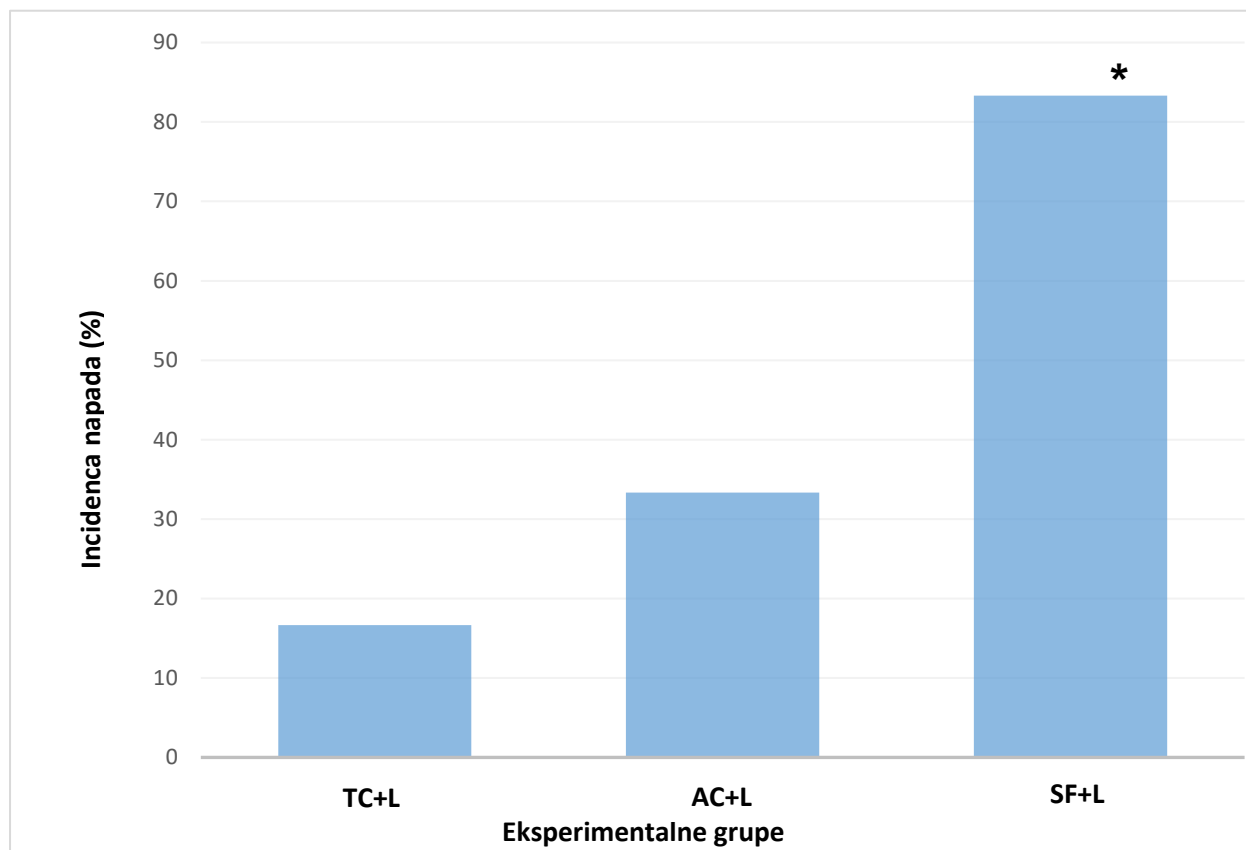
Za grafičku obradu i dizajn određenih slika korišćeni su online alati (BioRender.com).

4. REZULTATI

4.1. Uticaj akutne fragmentacije spavanja na ekscitabilnost

4.1.1. Analiza konvulzivnog ponašanja

Konvulzivni napadi su zabeleženi u svim grupama koje su tretirane lindanom. Učestalost konvulzija u sedentarnoj grupi TC + L bila je 16,67%, dok je u kontrolnoj grupi za aktivnost AC + L bila 33,33%. Najveći broj životinja sa konvulzijama registrovan je u grupi koja je podvrgnuta akutnoj fragmentaciji spavanja, gde je učestalost napada bila 83,33%. Učestalost napada bila je statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi SF + L u poređenju sa sedentarnom kontrolom TC + L ($p < 0,05$). Iako je učestalost konvulzija bila veća u SF+L grupi, u poređenju sa AC + L grupom, nije zabeležena statistički značajna razlika (83,33% prema 33,33%, $p > 0,05$). Nije bilo razlike u incidenci napada između TC + L i AC + L grupa ($p > 0,05$; Slika 4.1.).



Slika 4.1. Efekti akutne fragmentacije spavanja na incidencu konvulzivnih napada izazvanih lindanom kod pacova

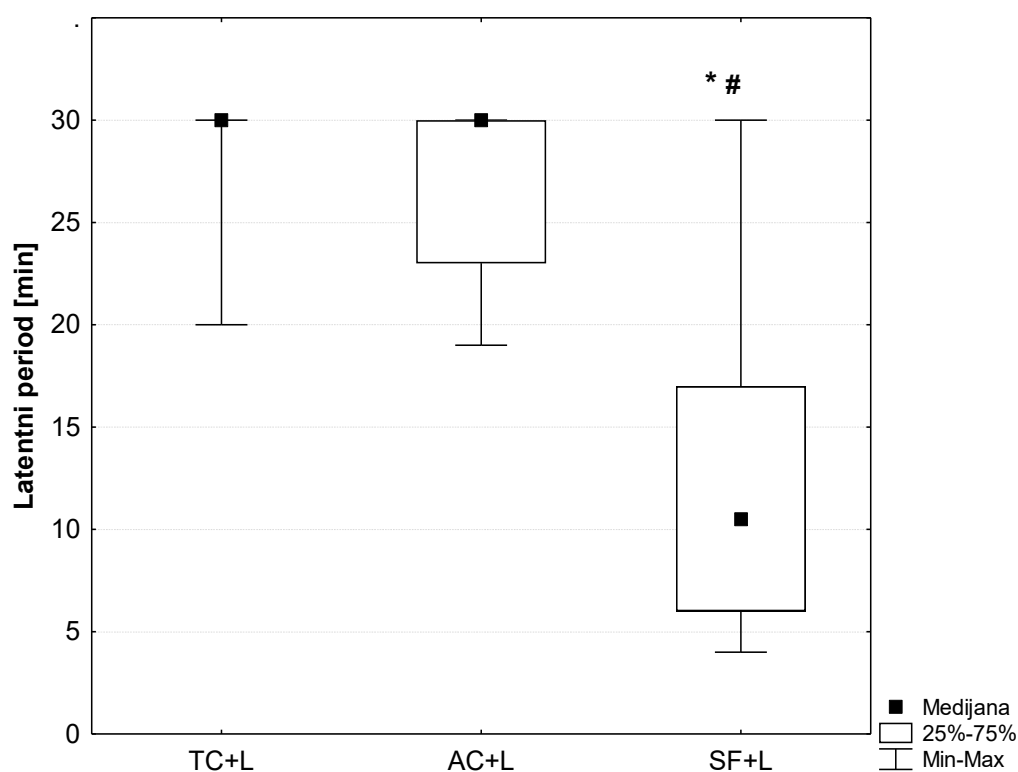
Eksperimentalne životinje su prethodno adaptirane na eksperimentalne uslove (ON i OFF aktivnost tredmila sa brzinom pokretne trake podešene na 0.02 m/s i 0.00 m/s) i raspoređene u sledeće grupe: 1) sedentarna-tredmil kontrola (TC, samo OFF režim), 2) kontrola za aktivnost (AC, 10 min ON i 30 min OFF režim), 3) grupa kojoj je fragmentisano spavanje (SF, 30s ON i 90s OFF mod). Šest sati kasnije, životinje su intraperitonealno tretirane subkonvulzivnom dozom lindana (L, 4 mg/kg, TC+L, AC+L i SF+L), ili dimetisulfoksidom (DMSO, TCc, ACc i SFc- nisu pokazivali znake konvulzivnog bihejviora). Incidencija napada je predstavljena procentima (%) životinja koje imaju konvulzije unutar grupe. Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena Fišerovim testom tačne verovatnoće (* $p < 0.05$ vs. TC+L).

Rezultati

Kada se analizira period latencije do prvog znaka konvulzija (Slika 4.2.), najkraći latentni period imale su životinje iz eksperimentalne grupe SF+L. Razdoblje latencije bilo je statistički značajno kraće u SF + L grupi u poređenju sa AC + L i TC + L grupama ($p < 0,05$). Nije bilo statistički značajne razlike u latenciji između životinja iz AC + L i TC + L grupa ($p > 0,05$).

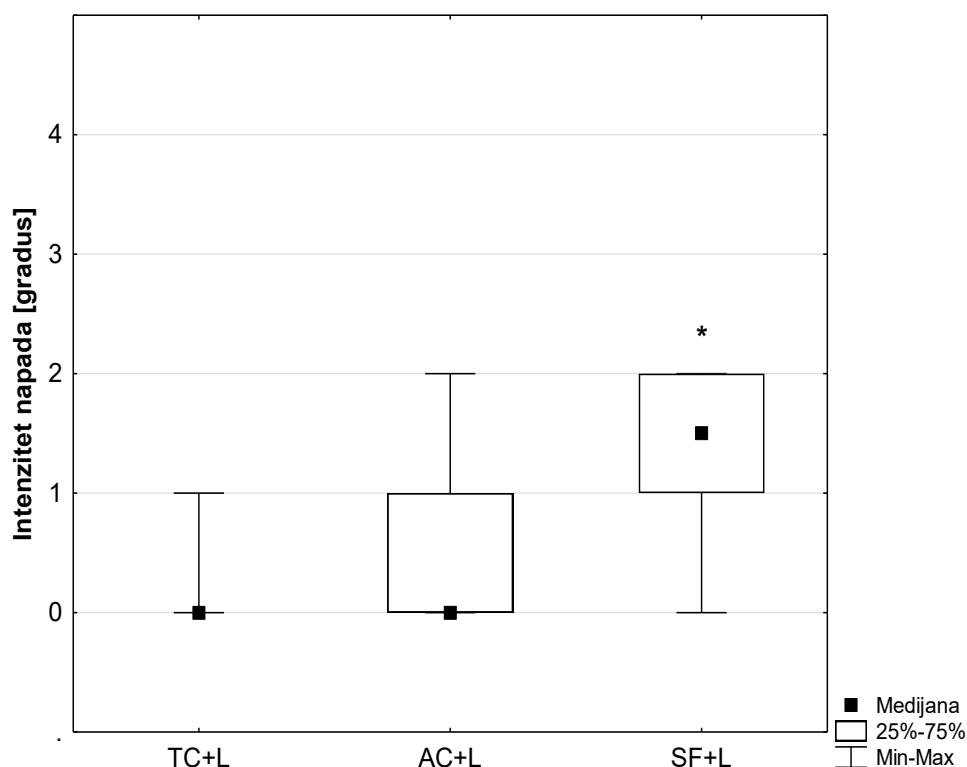
Intezitet konvulzivnih napada (Slika 4.3.) bio je značajno veći u SF + L grupi, u poređenju sa TC + L grupom ($p < 0,05$). Nije bilo statistički značajne razlike u intezitetu konvulzija između AC + L i TC + L grupa ($p > 0,05$).

Životinje koje su podvrgnute istom eksperimentalnom protokolu kao one iz SF + L, AC + L i TC + L grupe, ali su primili DMSO umesto lindana (skupine SFc, ACc i TCc), nisu pokazivale znakove konvulzivnog biheviora.



Slika 4.2. Efekti akutne fragmentacije spavanja na latentni period lindanom indikovanih konvulzija kod pacova

Latentni period = vreme od administracije lindana u subkonvulzivnoj dozi do pojave prvih znakova konvulzivnog ponašanja. Statistička značajnost razlike među grupama je procenjena uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA i Mann-Whitney U testa (* $p < 0.05$ vs. TC+L, # $p < 0.05$ vs. AC+L).



Slika 4.3. Efekti akutne fragmentacije spavanja na intezitet napada izazvanih lindanom kod pacova

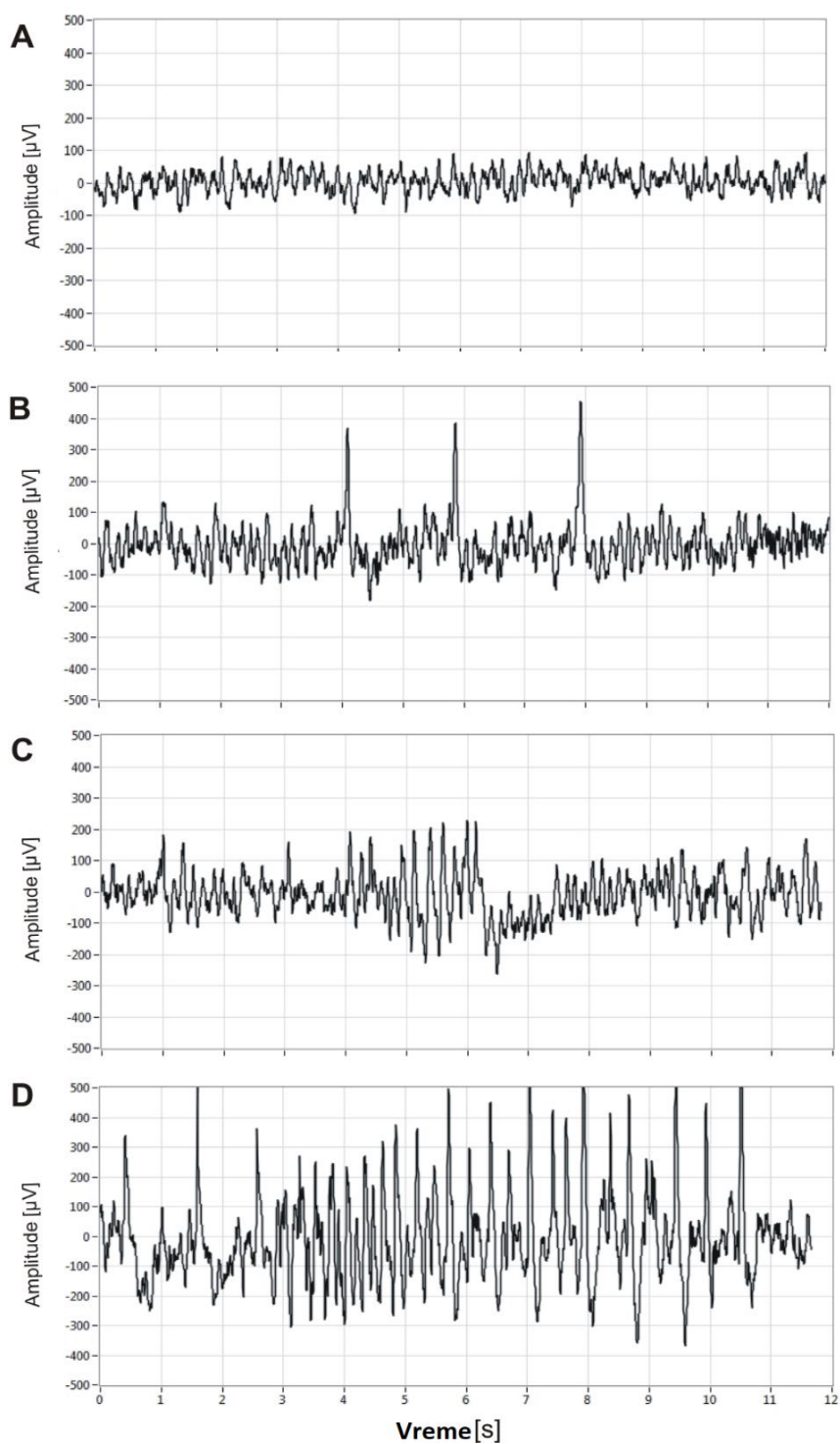
Intezitet napada je procenjena deskriptivnom skalom sa sledećim gradusima: gradus 0- nema napad; gradus 1- trzaj glave i donje vilice; gradus 2- mioklonus celog tela (reakcija vrele ploče) i bilateralni klonus prednjih ekstremiteta sa potpunim uspravljanjem (Kengur položaj); gradus 3-progresija i generalizovane kloničke konvulzije sa toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; gradus 4- prolongirane toničko-kloničke konvulzije koje traju duže od 20s (status epilepticus) ili česte ponavljane epizode kloničkih konvulzija produženi vremenski period (preko 5 min). Statistička značajnost razlike među grupama je procenjena uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA i Mann-Whitney U testa (* $p < 0.05$ vs. TC+L, # $p < 0.05$ vs. AC+L).

4.1.2. Analiza EEG

EEG zapisi životinja iz kontrolnih grupa (TCc, ACc i SFc) nisu imali znakove iktalne aktivnosti nakon primene DMSO (Slika 4.4.-A).

Pacovi iz ovih grupa su imali bazalnu aktivnost na EEG zapisima koja odgovara aktivnosti pri „grooming-u“. Sporadična pojava izolovanih šiljaka bila je karakteristična za EEG zapise u TC + L grupi (Slika 4.4.-B), nakon primene lindana.

Iktalna aktivnost je takođe registrovana i kod životinja iz AC + L grupe u periodu nakon administracije lindana (Slika 4.4.-C).



Slika 4.4. Prikaz reprezentativnih EEG zapisa u grupama nakon akutne fragmentacije spavanja

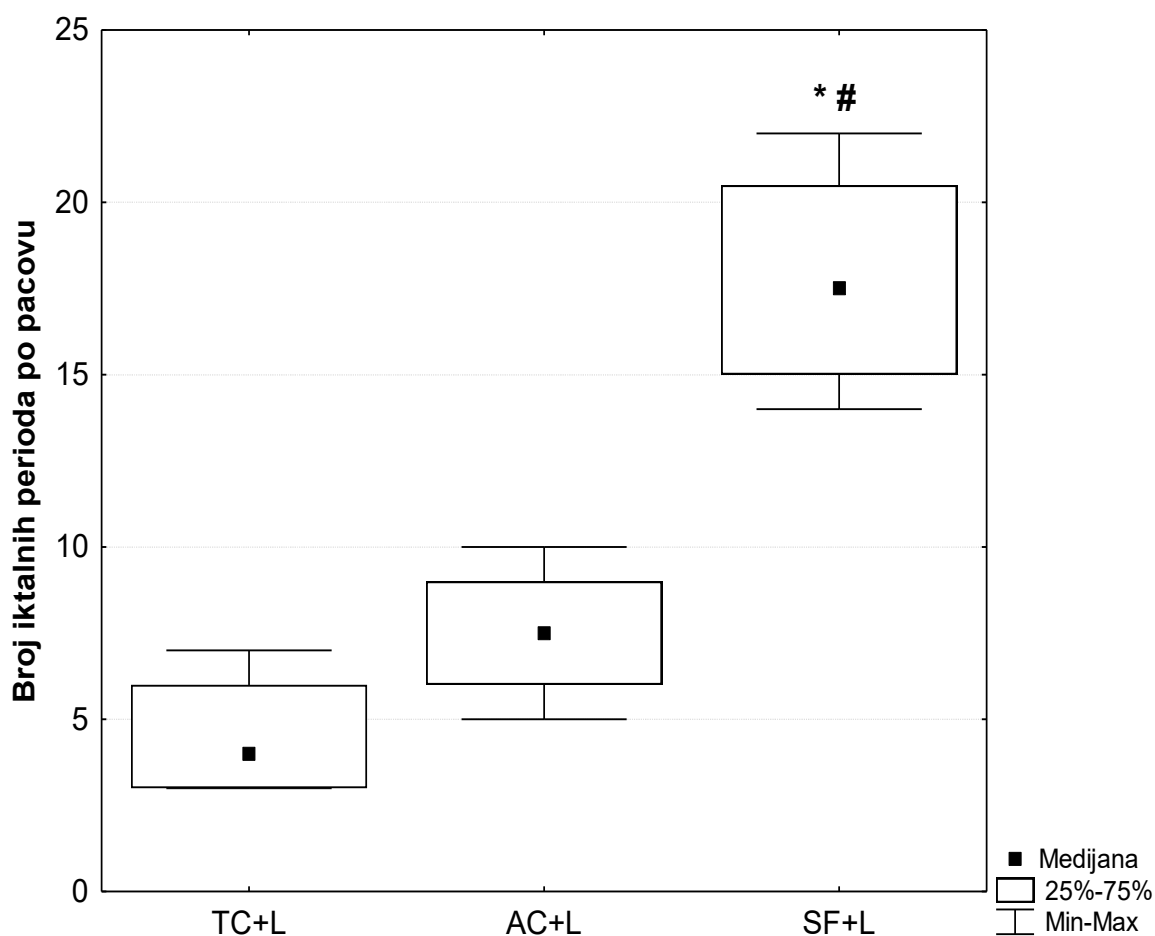
Odgovarajući reprezentativni zapisi EEG aktivnosti u (A) kontrolnim grupama (TCc, ACc i SFc) na kome je prikazana bazalna aktivnost bez znakova epileptiformih promena, i (B) TC+L, (C) AC+L i (D) SF+L grupe nakon administracije subkonvulzivne doze lindana, na kojima je prikazana progresivna pojava iktalnih obrazaca. Na C i D su primjeri iktalnih perioda koji su kvantifikovani prema definiciji. Odvod: levi frontalni-desni parietalni korteks.

Rezultati

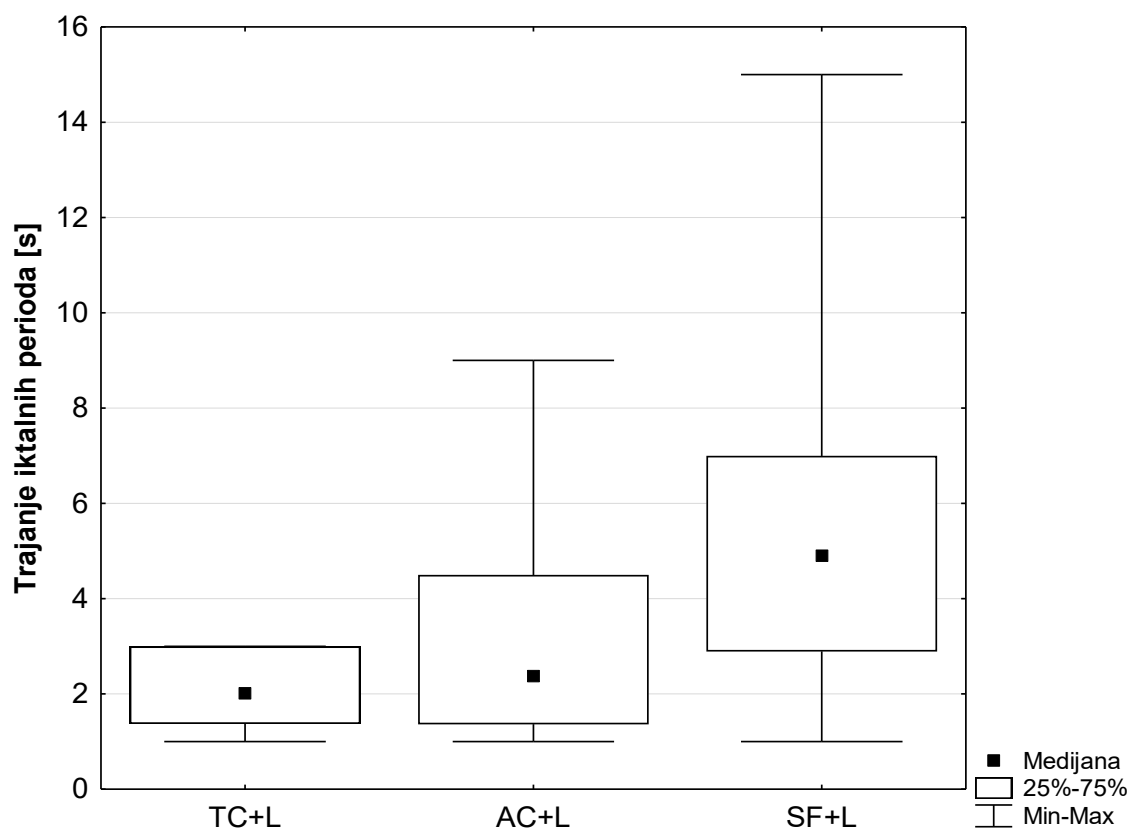
U EEG zapisima životinja iz SF+L grupe bile su prisutne serije visokonaponskih iktalnih pražnjenja (Slika 4.4.-D).

Kvantitativna analiza iktalnih razdoblja, odnosno njihovog broja i trajanja pokazala je značajne razlike među grupama. Broj iktalnih perioda po pacovu (Slika 4.5.) bio je značajno veći u eksperimentalnoj grupi SF + L u poređenju sa sedentarnom kontrolom TC + L, ($p < 0,05$), kao i u poređenju sa kontrolnom grupom za aktivnost na tredmilu AC + L ($p < 0,05$). Nije bilo statistički značajne razlike između AC + L i TC + L grupa u broju iktalnih fenomena po životinji ($p > 0,05$).

Trajanje iktalnih perioda (Slika 4.6.) imalo je tendenciju da bude veće u SF + L grupi u odnosu na TC + L i AC + L, ali te razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). Što se tiče broja iktalnih perioda po životinji, nije bilo statistički značajne razlike između AC + L i TC + L grupa ($p > 0,05$).



Slika 4.5. Broj iktalnih perioda po eksperimentalnoj životinji tokom tridesetominutnog EEG registrovanja na životinjama iz eksperimentalnih grupa nakon administracije lindana. Statistička značajnost između grupa je procenjena uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA i Mann-Whitney U testa (* $p < 0.05$ vs. TC+L, # $p < 0.05$ vs. AC+L).



Slika 4.6. Trajanje iktalnih perioda tokom tridesetominutnog EEG registrovanja na životinjama iz eksperimentalnih grupa nakon administracije lindana.

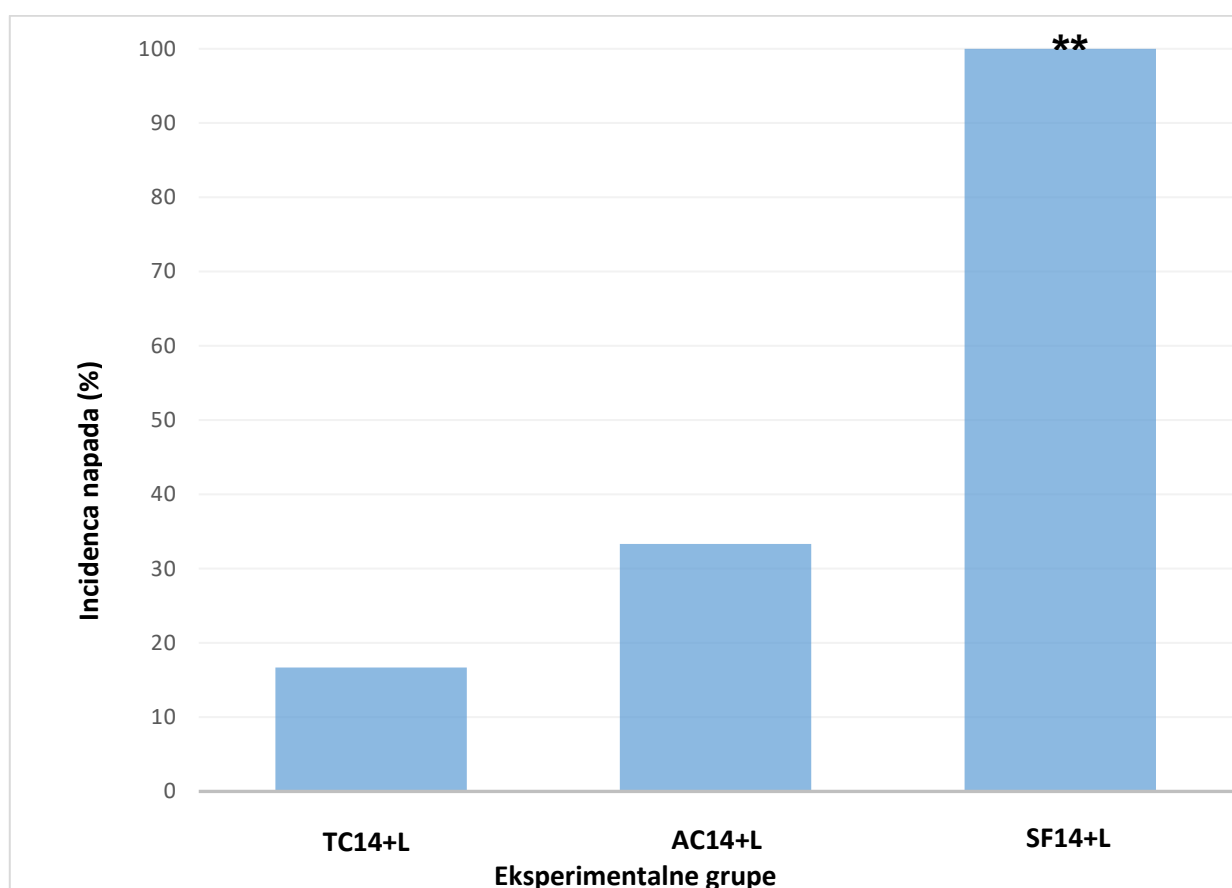
Statistička značajnost između grupa je procenjena uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA i Mann-Whitney U testa (* $p < 0.05$ vs. TC+L, # $p < 0.05$ vs. AC+L).

4.2. Uticaj hronične fragmentacije spavanja na ekscitabilnost

4.2.1. Analiza konvulzivnog ponašanja

U SF14c, AC14c i TC14c nije bilo bihevioralnih znakova konvulzija, dok su konvulzije zabeležene u svim grupama koje su pretretirane lindanom.

Učestalost napada (Slika 4.7.) bila je najveća u eksperimentalnoj grupi SF14+L, gde su bili uniformno prisutni (incidenca=100%). Učestalost u SF14+L grupi bila je statistički značajno viša u poređenju sa AC14+L grupom, sa incidencom od 33,33% (Fisherov test tačne verovatnoće $P=0,0303$), kao i u poređenju sa TC+L grupom, koja je imala incidencu 16,67% (Fisherov test tačne verovatnoće $p=0,0076$). Nije bilo značajne razlike u incidenci između TC14+L i AC14+L grupa (33,33% u odnosu na 16,67%, Fisherov test tačne verovatnoće $p=0,5000$).

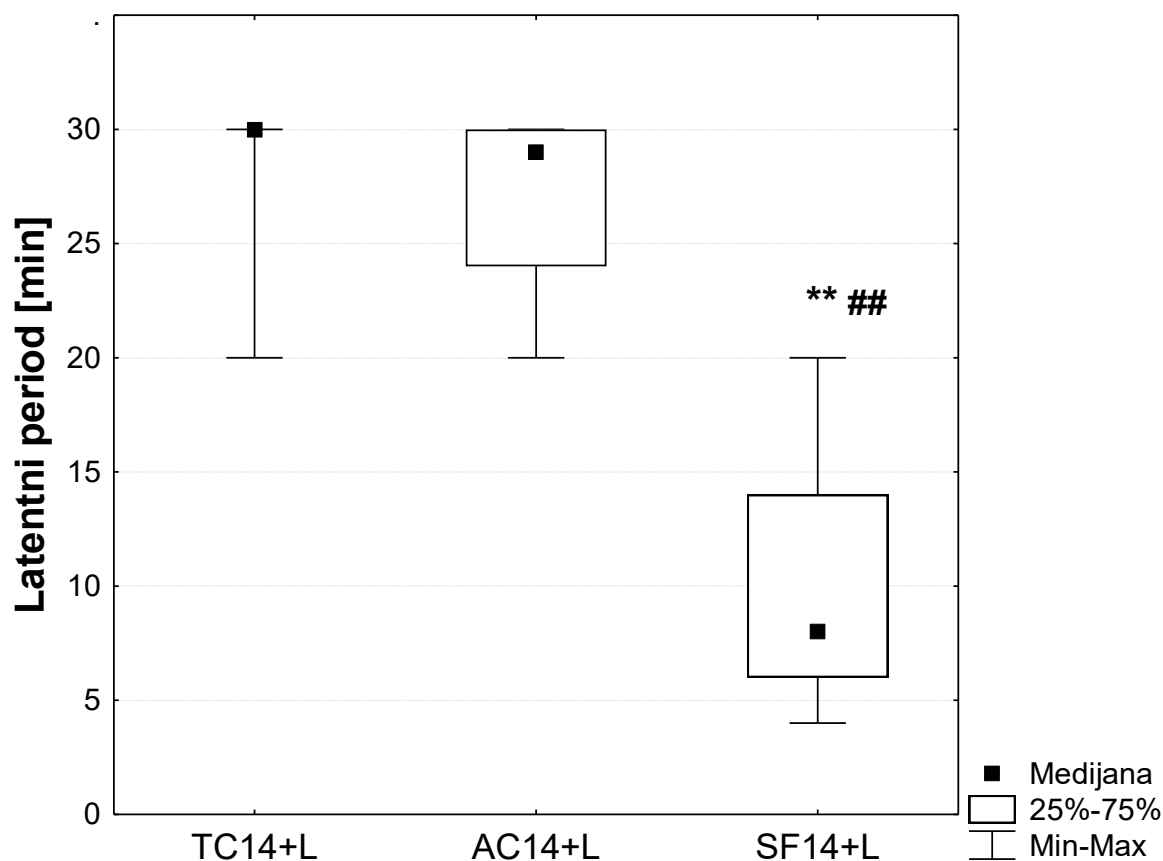


Slika 4.7. Efekti hronične fragmentacije spavanja na incidencu konvulzivnih napada izazvanih lindanom kod pacova

Nakon adaptacije na eksperimentalne uslove, i nakon 14 dana protoka za fragmentaciju spavanja, učinjena je intraperitonealna administracija lindana (L) i tako su formirane odgovarajuće grupe: eksperimentalna grupa (SF+L, sa protokolom trake 30s ON i 90s OFF), kontrola za aktivnost trake (AC+L, 10min ON i 30 min OFF) i sedentarna-tredmil kontrola (TC+L, konstantno OFF režim). Incidenca konvulzivnih napada je prikazana kao procenat životinja koje imaju konvulzije u odnosu na ukupan broj životinja u grupi (%). Za procenu statističke značajnosi korišćen je Fišerov test tačne verovatnoće (** $p < 0.01$).

Sledeći parametar konvulzivnog ponašanja koji smo analizirali bio je period do nastanka prvih bihejvioralnih znakova konvulzija, nakon administracije lindana (Slika 4.8.). Kruskal-Wallis ANOVA testom pokazna je statistički značajna ($H_2=12,15$, $p < 0,05$) razlika u latentnom periodu između grupa TC14+L, AC14+L i SF14+L.

Latentni period bio je značajno kraći u SF14+L grupi u odnosu na TC14+L ($U=0,50$, $z=2,85$, $p < 0,01$) i AC14+L grupe ($U=13,00$, $z=2,75$, $p < 0,01$). Iako je srednja vrednost latentnih perioda životinja iz AC14+L grupe bila manja u poređenju sa onom kod životinja iz TC14+L, razlika nije bila statistički značajna ($U=13,00$, $z=0,85$, $p > 0,05$).

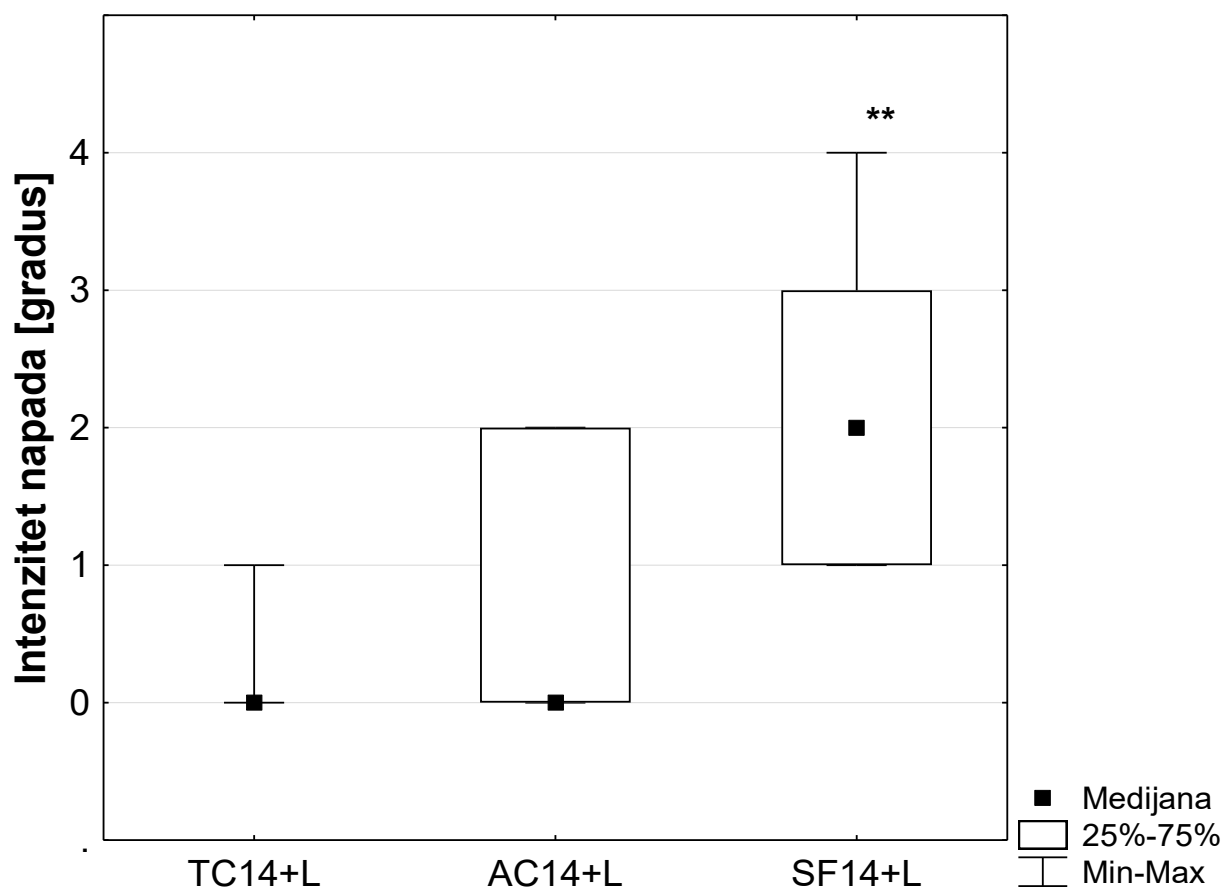


Slika 4.8. Latentni period do nastanka konvulzivnog napada nakon hronične fragmentacije spavanja

Statistička značajnost razlika među grupama procenjena je korišćenjem Kruskal-Wallis ANOVA i Man-Whitney U testa (** $p < 0.01$ vs. TC+L, # $p < 0.01$ vs. AC+L).

Gradiranjem težine konvulzija, uz pomoć prethodno opisane bihejvioralne deskriptivne skale, srednja vrednost gradusa napada, kod životinja iz SF14+L grupe bila je dva, dok su pojedine životinje dostizale i gradus 4 (Slika 4.9.). Intezitet napada u dve kontrolne TC14+L i AC14+L grupe bio je sličan sa srednjom vrednošću gradusa 0, uz napomenu da su ipak nešto više vrednosti imale životinje iz AC14+L grupe.

Kruskal-Wallis ANOVA testom, pokazana je statistički značajna ($H_2 = 9,13$, $p < 0,05$) razlika u intezitetu napada među grupama. Statistički gledano, životinje iz SF14+L grupe imale su veći intezitet napada u poređenju sa TC14+L grupom ($U = 13,00$, $z = -2,77$, $p < 0,01$). Nije bilo statistički značajnih razlika između životinja iz AC14+L naspram SF14+L ($U = 6,00$, $z = -1,91$, $p > 0,05$) i TC14+L u odnosu na AC14+L grupu ($U = 14,00$, $z = -0,74$, $p > 0,05$).

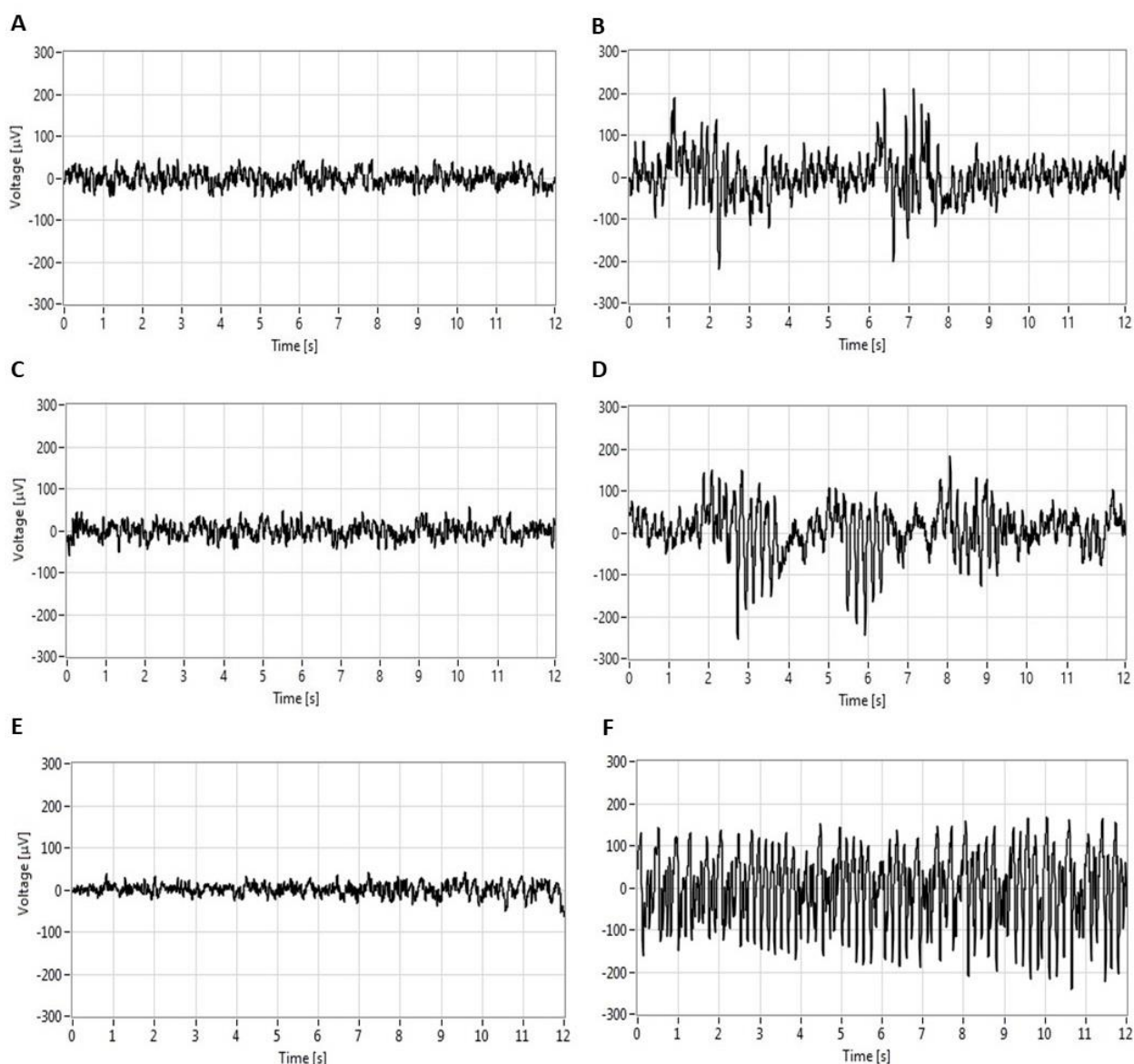


Slika 4.9. Intezitet konvulzivnih napada (gradus) nakon hronične fragmentacije spavanja

Intezitet napada je procenjivan uz pomoć deskriptivne skale koja je prethodno opisana u delu Materijal i Metode (gradus 0- nema napad; gradus 1- trzaj glave i donje vilice; gradus 2- mioklonus celog tela (reakcija vrele ploče) i bilateralni klonus prednjih ekstremiteta sa potpunim uspravljanjem (Kengur položaj); gradus 3-progresija i generalizovane kloničke konvulzije sa toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; gradus 4- prolongirane toničko-kloničke konvulzije koje traju duže od 20s (status epilepticus) ili česte ponavljane epizode kloničkih konvulzija produženi vremenski period (preko 5 min). Statistička značajnost razlika među grupama procenjena je korišćenjem Kruskal-Wallis ANOVA i Man-Whitney U testa (** $p < 0.01$ vs. TC+L, ** $p < 0.01$ vs. AC+L).

4.2.2. Analiza EEG

U EEG zapisima kod životinja iz kontrolnih grupa TCc, Acc, SFc registrovana je bazalna aktivnost (Slika 4.10.-A, C i E), bez znakova iktalnih pražnjenja. Životinje iz grupa pretretiranih lindanom imale su iktalne fenomene na EEG zapisima koji su varirali od sporadičnih šiljaka do grupa i serija visokofrekventnih šiljak-talas kompleksa (Slika 4.10.-B(TC+L), D(AC+L) i F(SF+L)).

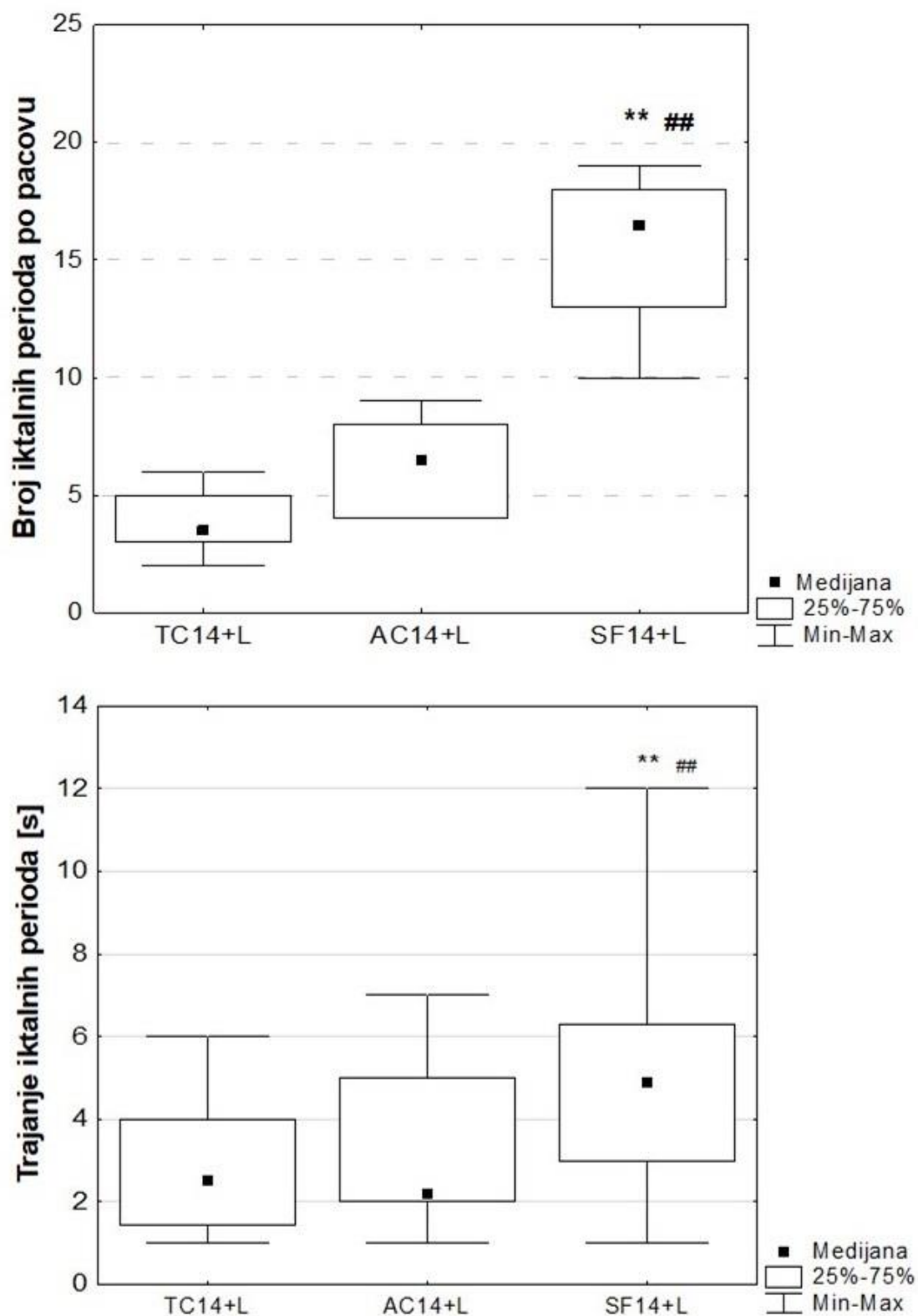


Slika 4.10. Reprezentativni EEG zapisi za grupe TC14c, AC14c i SF14c (A, C i E) i TC14+L, AC14+L i SF14+L (B, D i F).

Reprezentativni EEG zapisi u kontrolnim grupama (TCc, ACc i SFc) za primenu hemokonvulzanta pokazuju bazalnu aktivnost bez znakova epileptiformnih segmenata. Iktalna aktivnost je registrovana nakon administracije subkonvulzivne doze lindana (SF+L, AC+L, TC+L) u vidu pojave šiljaka različite incidence i trajanja. Odvod: Levo frontalni-desni parietalni korteks.

Kruskal-Wallis ANOVA testom, broj iktalnih perioda (Slika 4.11.) bio je značajno različit među grupama koje su pretretirane lindanom ($H^2=13,28$, $p<0,05$) TC14+L, AC14+L i SF14+L. SF14+L grupa imala je značajno veći broj iktalnih perioda po pacovu, u poređenju sa TC14+L ($U=0,00$, $z=-2,81$, $p<0,01$), kao i sa AC14+L grupom ($U=0,00$, $z=-2,80$, $p<0,01$, slika 4G).

U isto vreme, nije bilo statistički značajne razlike između AC14+L i TC14+L grupa ($U=5,50$, $z=-1,94$, $p>0,05$). Isto vredi za trajanje iktalnih perioda (Slika 4.11.) među grupama pretretiranim lindanom (TC14+L, AC14+L i SF14+L, $H^2=15,67$, $p<0,0$).



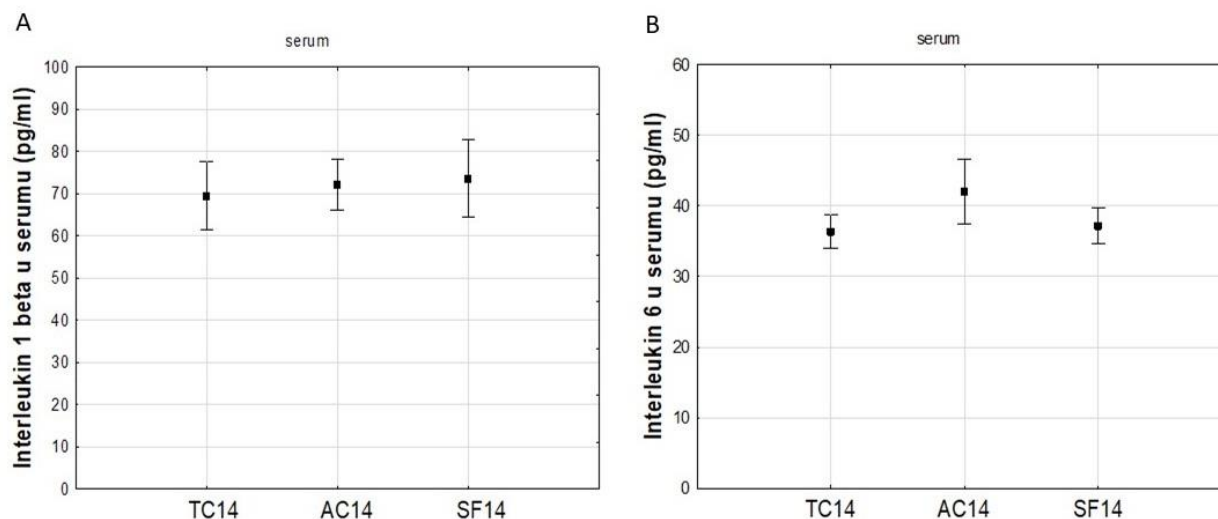
Slika 4.11. Broj i trajanje iktalnih perioda nakon administracije subkonvulzivne doze lindana.

Statistička značajnost razlike među grupama je procenjena uz pomoć KruskalWallis i Mann-Whitney U testa (** $p < 0.01$ vs. TC+L, ## $p < 0.01$ vs. AC+L).

4.3. Mehanizmi interakcije hronične fragmentacije spavanja i ekscitabilnosti

4.3.1. Analiza interleukina

Vrednosti IL-1 β i IL-6 u serumu (Slika 4.12.) nisu pokazale statističku razliku između eksperimentalne (SF14) i kontrolnih grupa (AC14 i TC14) ($F_{2,15}=0,71$, $P>0,05$; i $F_{2,15}=0,88$, $p>0,05$).

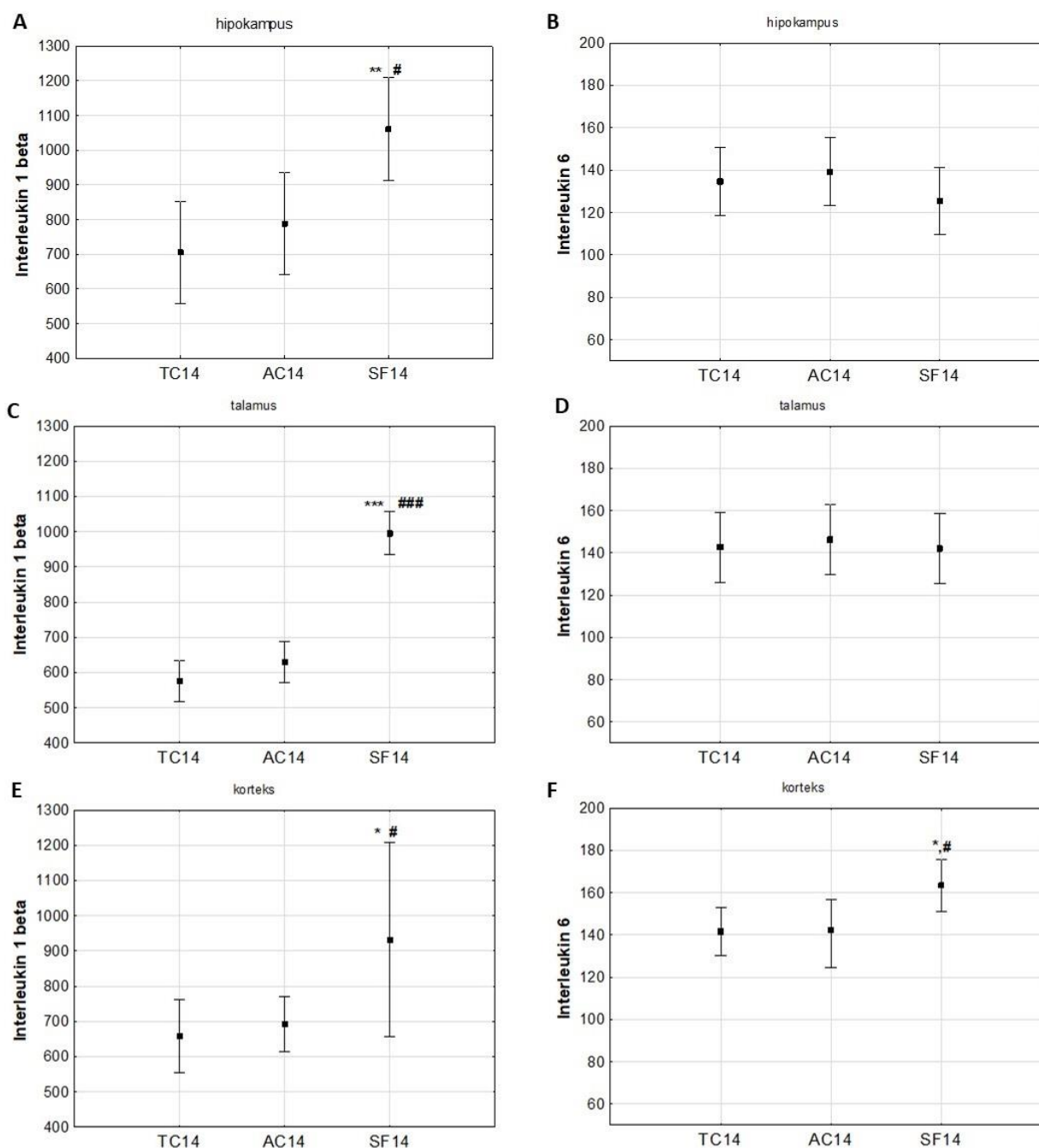


Slika 4.12. Vrednosti interleukina IL-1 β i IL6 u serumu nakon hronične fragmentacije spavanja.

Nivoi IL-1 β i IL6 u serumu životinja su mereni upotrebom komercijalnog ELISA seta. Nisu pronađene statistički značajne razlike među grupama za IL1 β (A) i IL6 (B) u serumu ($p>0,05$ vs. TC14 i AC14).

Prema jednosmernoj ANOVA analizi, postojale su značajne razlike ($p<0,01$) između TC14, AC14 i SF14 grupa u vrednostima IL-1 β u hipokampusu (Slika 4.13.-A). Post hoc analiza pokazala je da su vrednosti IL-1 β u hipokampusu pokazale značajno povećanje u SF14 grupi u poređenju sa životinjama iz TC14 ($p<0,01$) i AC14 grupa ($p<0,05$). Uočeno je da su nivoi IL-1 β viši u AC14 grupi u komparaciji sa TC14, ali razlika nije bila statistički značajna ($p>0,05$). Slična distribucija primećena je u talamusu ($p<0,01$), pri čemu su životinje iz SF14 grupe imale najveće vrednosti IL-1 β u sve tri grupe ($p<0,01$ naspram AC14 i TC14). Ponovo, vrednosti kod životinja iz AC14 grupe bile su više u odnosu na životinje iz TC14, ali nije postignuta statistička značajnost ($p>0,05$) (Slika 4.13.-C). Isto vredi i za IL-1 β u korteksu ($p<0,05$): SF grupa imala je značajno više vrednosti IL-1 β u poređenju sa TC14 ($p<0,05$) i AC14 grupom ($p<0,05$), dok nisu primećene značajne razlike između TC14 i AC14 grupa ($p>0,05$) (Slika 4.13.-E).

Za razliku od hipokampalnog IL-1 β , post hoc analizom hipokampalnih vrednosti IL-6 pokazano je da su životinje iz SF14 grupe imale najniže vrednosti u sve tri grupe (Slika 4.13.-B), nivoi kod životinja iz TC14 grupe bile su više, dok je AC14 grupa imala je najviše vrednosti IL-6; međutim, nije zabeležena statistička značajnost ($p>0,05$). Vrednosti IL-6 u talamusu (Slika 4.13.-D) raspoređene su na sledeći način: SF14<TC14<AC14, ali takođe nije dobijena statistička značajnost ($p>0,05$). Sa druge strane, prema jednosmernoj ANOVA analizi, postojale su značajne razlike ($p<0,05$) između TC14, AC14 i SF14 grupa u nivou IL-6 u korteksu (Slika 4.13.-F), vrednosti IL-6 su bile statistički značajno veće u korteksu životinja iz SF14 grupe u odnosu na životinje iz TC14 i AC14 grupa ($p<0,05$).



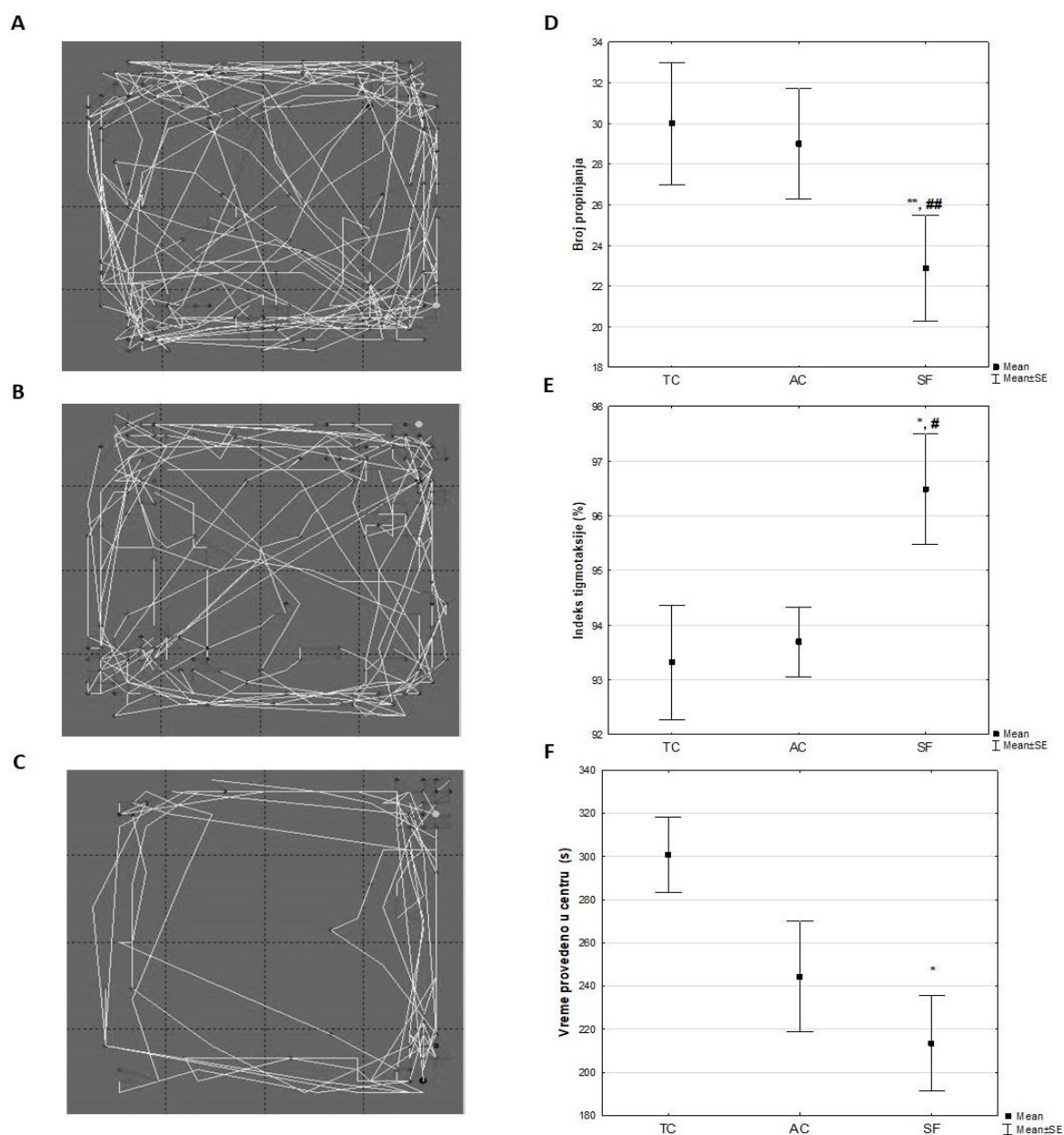
Slika 4.13. Vrednosti interleukina u moždanim srtukturama eksperimentalnih životinja- korteks, talamus i hipokampus, nakon hronične fragmentacije spavanja

Interleukin 1 β : (C) Na grafikonu se mogu videti značajno povišene vrednosti *Il-1 β* u hipokampusu životinja iz SF14 grupe u poređenju sa hipokampusima životinja ostalih grupa (** $p < 0.01$ vs. TC14, # $p < 0.05$ vs. AC14). Rezultati u ostalim strukturama su slični ovima: u talamusu (C), sa najvećim vrednostima u SF14 grupi (** $p = 0.001$ vs. TC14, ### $p = 0.001$ vs. AC14) i korteksu (E) (SF14 vs. TC14, * $p < 0.05$; SF14 vs. AC14, # $p < 0.05$; AC14 vs. TC14, $p > 0.05$). *Interleukin 6*: Vrednosti ovog interleukina su analizirane takođe u hipokampusu (B), talamusu (D) i korteksu (F). Razlike u nivou *IL6* između tri grupe nisu bile statistički značajne u hipokampusu i u talamusu ($p > 0.05$ vs. TC14 i AC14), dok je pronađena statistička značajnost u korteksu (** $p < 0.05$ vs. TC14 i AC14). Statistička značajnost je procenjena upotrebom uz pomoć One-Way ANOVA sa Fišerovim LSD post hoc testiranjem.

4.4. Uticaj akutne fragmentacije spavanja na anksioznost i potencijalni mehanizmi

4.4.1. Rezultati bihevioralnih testiranja nakon fragmentacije spavanja

Analiza lokomotorne aktivnosti životinja u testu otvorenog polja po završetku korespondentnog režima na tredmilu za svaku grupu je pokazala različite obrasce ponašanja u



Slika 4.14. Reprezentativni prikazi lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja u (A) tredmil kontrolnoj grupi, (B) kontrolnoj grupi za aktivnost, (C) grupi u kojoj je sprovedena fragmentacija spavanja. Broj propinjanja na zadnje šape (D), indeks tigmataksije (E) i vreme provedeno u centralnom delu otvorenog polja (F) u testu otvorenog polja nakon protokola za fragmentaciju spavanja.

Broj propinjanja na zadnje šape je predstavljen ukupnim brojem ovog fenomena. Indeks tigmataksije je definisan kao odnos ambulatornog kretanja koje je životinja imala u perifernom delu otvorenog polja i ukupne distance koju je životinja prešla u otvorenom polju. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE. Statistička značajnost između grupa je procenjena uz pomoć One-Way ANOVA sa Fišerovim LSD post hoc testiranjem (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. TC; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. AC).

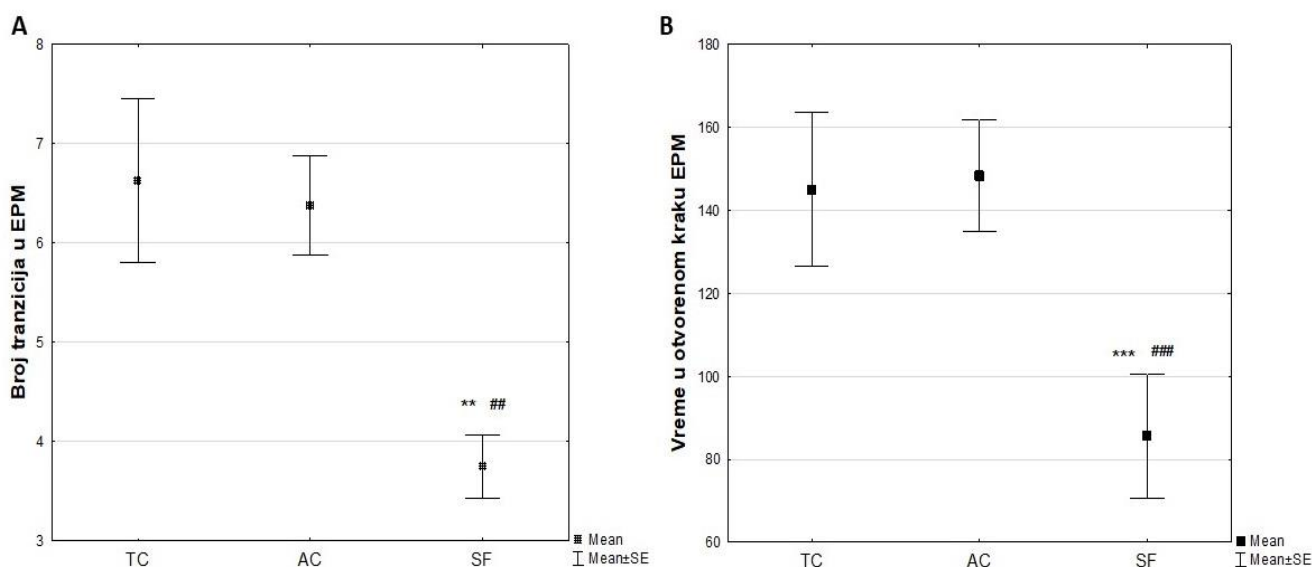
Rezultati

TC, AC i SF grupama, kao što je i prikazano na reprezentativnom šemama lokomotorne aktivnosti u areni (Slika 4.14.).

Dalja kvantitativna analiza ponašanja povezanog s anksioznošću u testu otvorenog polja nije pokazala statistički značajnu razliku između kontrolnih grupa (TC vs. AC grupa) u svim analiziranim parametrima ($p > 0.05$, Slika 4.14.-D, E, F). Sa druge strane, registrovana je statistički značajna razlika između eksperimentalne grupe koja je prošla protokol za fragmentaciju spavanja (SF) i grupa koje su prošle kontrolne protokole (TC i AC grupe). Korišćenjem One-Way ANOVA testa sa LSD post hoc testiranjem, eksperimentalne životinje iz SF grupe su imale statistički značajno manji broj propinjanja na zadnje šape, što je indikator vertikalne aktivnosti, u poređenju sa životinjama iz TC ($p < 0.01$) i AC grupe ($p < 0.01$, Slika 4.14.-D). Indeks tigmotaksije je bio značajno veći u SF grupi u poređenju sa TC ($p < 0.05$) i AC grupom ($p < 0.05$, Slika 4.14.-E).

Kada je u pitanju vreme provedeno u centralnom delu otvorenog polja pokazano je da su životinje iz SF grupe značajno manju količinu vremena provodile u centru u poređenju sa životinjama iz TC grupe ($p < 0.05$, Slika 4.14.-F).

Rezultati testa sa uzdignutim krstastim lavirintom su prikazani na Slici 4.15.



Slika 4.15. Broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova (A) i vreme provedeno u otvorenim kracima (B) u uzdignutom krstastom lavirintu (EPM): sedentarna kontrola (TC), kontrolna grupa za aktivnost (AC) i eksperimentalna grupa sa fragmentacijom spavanja (SF).

Prikazane su srednje vrednosti \pm SE. Statistička značajnost je procenjena uz pomoć One-Way ANOVA testa sa Fišerovim LSD post hoc testom (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. TC, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. AC).

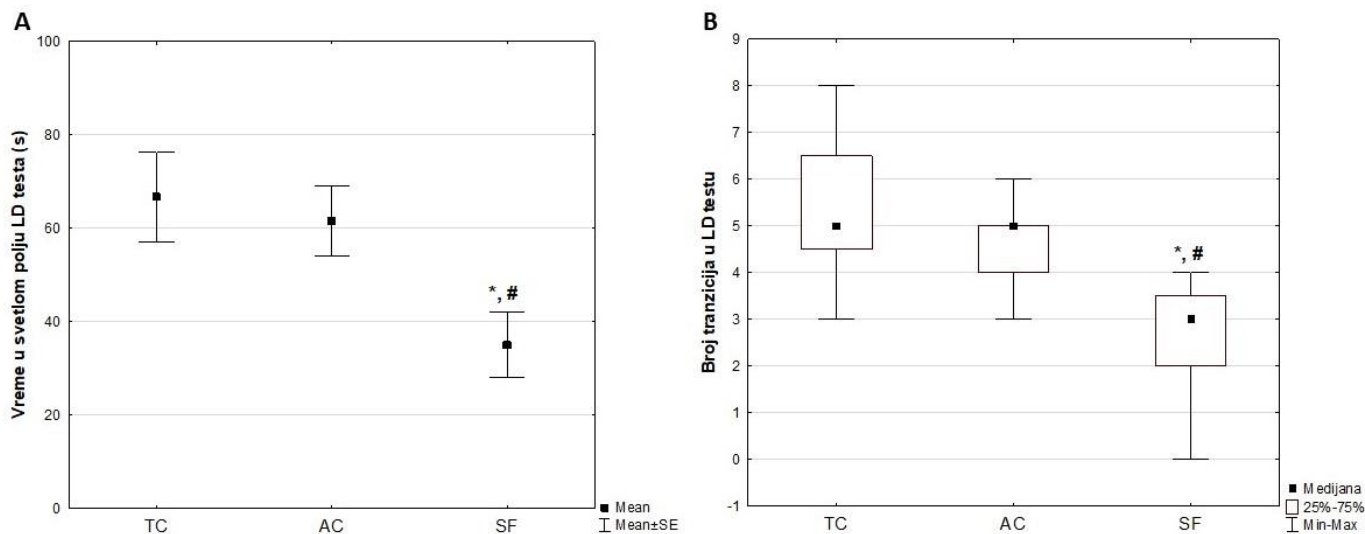
Nije primećena statistički značajna razlika između kontrolnih grupa TC i AC, u svim analiziranim parametrima ($p > 0.05$, Slika 4.15.-A i B). Protokol za fragmentaciju spavanja značajno je smanjio vreme koje su životinje provele u otvorenim kracima tokom testa, u poređenju sa oba kontrolna protokola (SF vs. AC i SF vs. TC, $p < 0.01$, Slika 4.15.-B). Dodatno, broj tranzicija iz zatvorenih u otvorene krake bio je statistički značajno smanjen u fragmentisanoj grupi u poređenju sa obe kontrolne grupe (SF vs. AC i TC, $p < 0.001$, Slika 4.15.-A).

Rezultati

Rezultati testa svetlo/tama su predstavljani na Slici 4.16. Vreme provedeno u svetlom delu komore za ovaj test bilo je značajno kraće u SF grupi, u poređenju sa AC i TC grupom ($p < 0.05$, Slika 4.16.-A).

Isto se odnosi i na broj tranzicija iz svetlog u tamni kompartman (SF vs. AC i SF vs. TC, $p < 0.05$, Slika 4.16.-B). Parametri ovog testa nisu se značajno razlikovali u kontrolnim grupama TC i AC ($p > 0.05$, Slika 4.16.-A i B).

4.4.2. Hormonske analize nakon fragmentacije spavanja

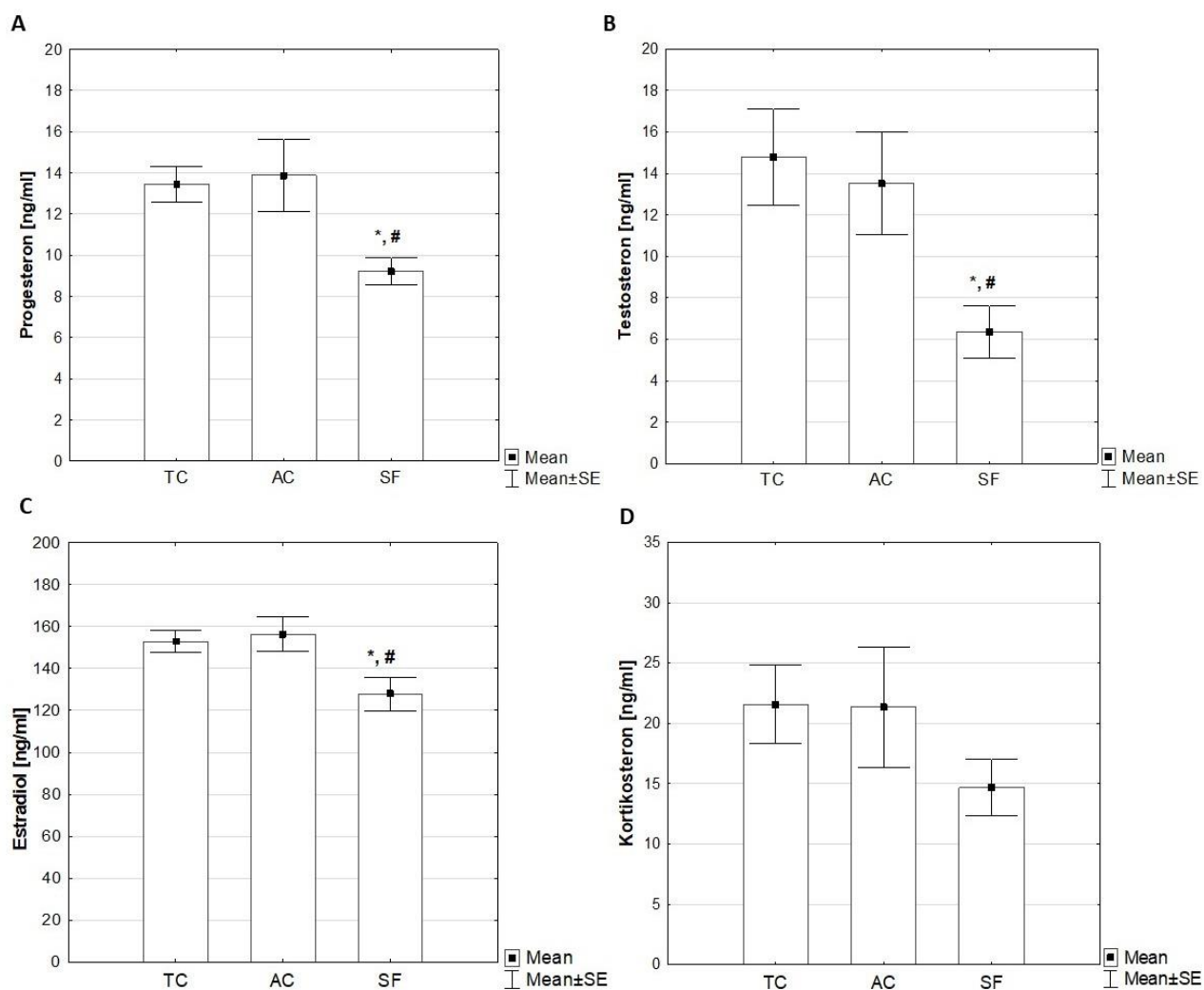


Slika 4.16. Vreme provedeno u otvorenom delu komore za test svetlo/tama (A) i broj tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana (B)

Kada je u pitanju vreme u svetlom kompartmanu, statistička značajnost je procenjena upotrebom One-Way ANOVA testa sa Fišerovim LSD post hoc testiranjem, dok je broj tranzicija procenjen uz pomoć Kruskal Wallis ANOVA i Man Whitney U testa ($*p < 0.05$ vs. TC, $\#p < 0.05$ vs. AC).

Serumski nivoi hormona utvrđeni ELISA testom nisu pokazali značajnu razliku za testosteron, estradiol, progesteron i kortikosteron između kontrolnih grupa TC i AC ($p > 0.05$, Slika 4.17.).

Sa druge strane, životinje kojima je fragmentisano spavanje (SF grupa) imale su statistički značajno niže nivoe testosterona, progesterona i estradiola u poređenju sa obe kontrolne grupe AC i TC ($p > 0.05$, Slika 4.17.-A, B i C). Nasuprot ovome, nije bilo statistički značajne razlike u nivou kortikosterona između eksperimentalne i kontrolnih grupa (SF vs. AC i TC, $p > 0.05$, Slika 4.17.-D).



Slika 4.17. Nivoi hormona u serumu (progesteron (A), testosteron (B), estradiol (C) i kortikosteron (D)) nakon fragmentacije spavanja u grupama sedentarna kontrola (TC), kontrolna grupa za aktivnost (AC) i fragmentacija spavanja (SF), neposredno nakon eksperimenta

Serumski nivoi hormona su određivani u odvojenoj kohorti životinja neposredno nakon protokola za fragmentaciju spavanja ($n=6$ po grupi) uz pomoć ELISA testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SE. Statistička značajnost između grupa je utvrđena korišćenjem One-Way ANOVA testa sa Fišerovim LSD post hoc testom ($*p<0.05$ vs. TC, $\#p<0.05$ vs. AC).

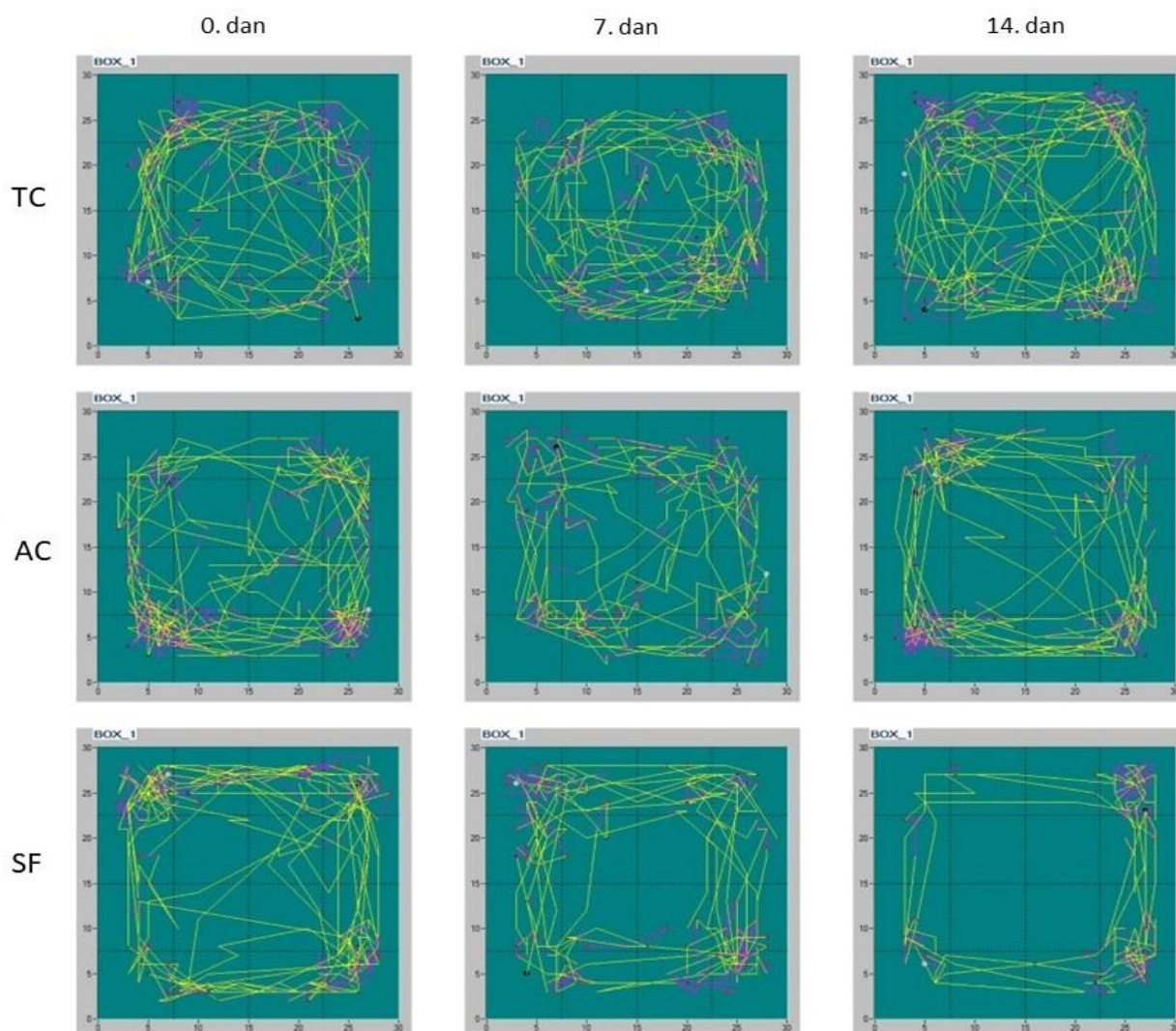
4. 5. Uticaj hronične fragmentacije spavanja na anksioznost i potencijalni mehanizmi

4.5.1. Analiza bihevioralnih parametara

Reprezentativne trajektorije lokomotorne aktivnosti životinja iz TC, AC i SD grupe na početku (dan 0), kao i sedmog i četrnaestog dana nakon fragmentacije spavanja su prikazane na Slici 4.18. Kao što se može primetiti bihevioralni šabloni su vizuelno slični kod životinja iz TC i AC grupe tokom eksperimentalnog perioda, dok su razlike uočljive nakon 7 i 14 dana fragmentacije kod životinja iz SF grupe. Kvantitativna evaluacija parametara povezanih sa anksioznošću u testu otvorenog polja nije pokazala razlike u kod životinja iz TC grupe tokom sve tri posmatrane tačke (0., 7. i 14. dan, $p>0.05$, Slika 4.19.). Iste rezultate pokazala je i analiza

Rezultati

životinja iz AC grupe. Razlike su uočene kod životinja iz SF grupe nakon 7 i 14 dana fragmentacije. Broj propinjanja na zadnje šape, kao indikator vertikalne aktivnosti, bio je značajno snižen kod životinja iz SF grupe u poređenju sa AC grupom ($p < 0.01$), kao i TC grupom ($p < 0.05$). Ovaj parametar se smanjivao postepeno tokom vremena, tj. bio je značajno niži nakon



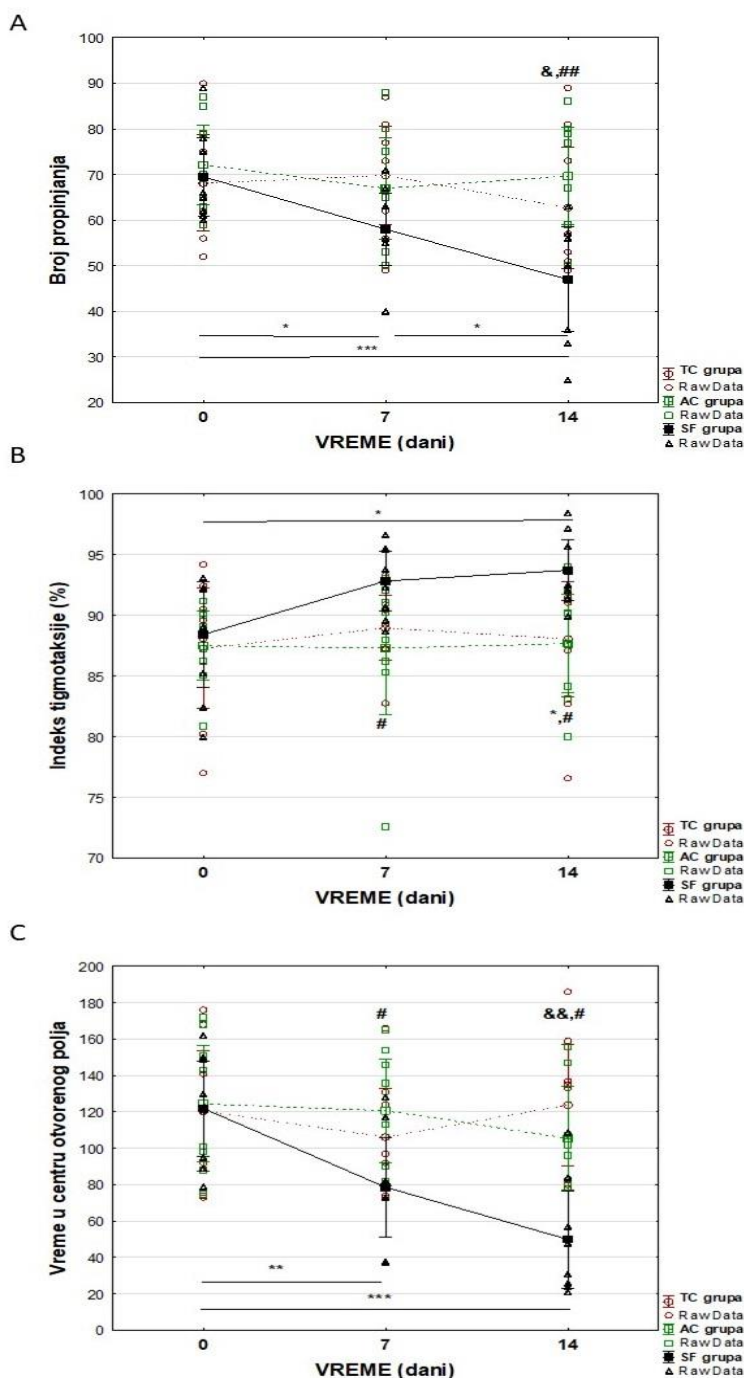
Slika 4.18. Reprerentativni šematski prikazi lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja.

Reprerentativni prikazi kretanja u otvorenom polju životinja iz eksperimentalne (SF) grupe i kontrolnih grupa (AC i TC), na početku eksperimenta (dan 0, bazalna vrednost), kao i sedmog i četrnaestog dana od početka eksperimentalnog protokola.

14 dana fragmentacije, u poređenju sa opserviranim vrednostima nakon 7 dana ($p < 0.05$) (Slika 4.19.-A). Indeks tigmotaksije je bio statistički značajno veći kod životinja iz SF grupe, u poređenju sa životinjama iz TC ($p < 0.05$) i AC grupe ($p < 0.05$), na kraju perioda fragmentacije. Takođe, indeks tigmotaksije je bio kod životinja iz SF grupe statistički značajno niži nakon četrnaest dana ($p < 0.05$) u poređenju sa bazalnim nivoima (Slika 4.19.-B). Pored ovoga, analizirali smo i vreme koje su životinje provele u centralnom delu otvorenog polja (Slika 4.19.-C). Životinje iz SF grupe imale su tendenciju da provode značajno manje vremena u centru u odnosu na one iz TC i AC grupa ($p < 0.01$, Figura 4) nakon četrnaest dana fragmentacije, kao i nakon 7 dana fragmentacija ($p < 0.05$) sa efektom fragmentacije koji je bio direktno proporcionalan periodu za koje je spavanje fragmentisano. Pored ovoga, primećeno je

Rezultati

statistički visoko značajno skraćenje vremena koje su životinje iz SF grupe provodile u centralnom delu otvorenog polja 14. dana, u odnosu na bazalne vrednosti ($p < 0.001$) i vrednosti 7. dana ($p < 0.01$).



Slika 4.19. Kvantitativna evaluacija parametara povezanih sa anksioznošću u testu otvorenog polja

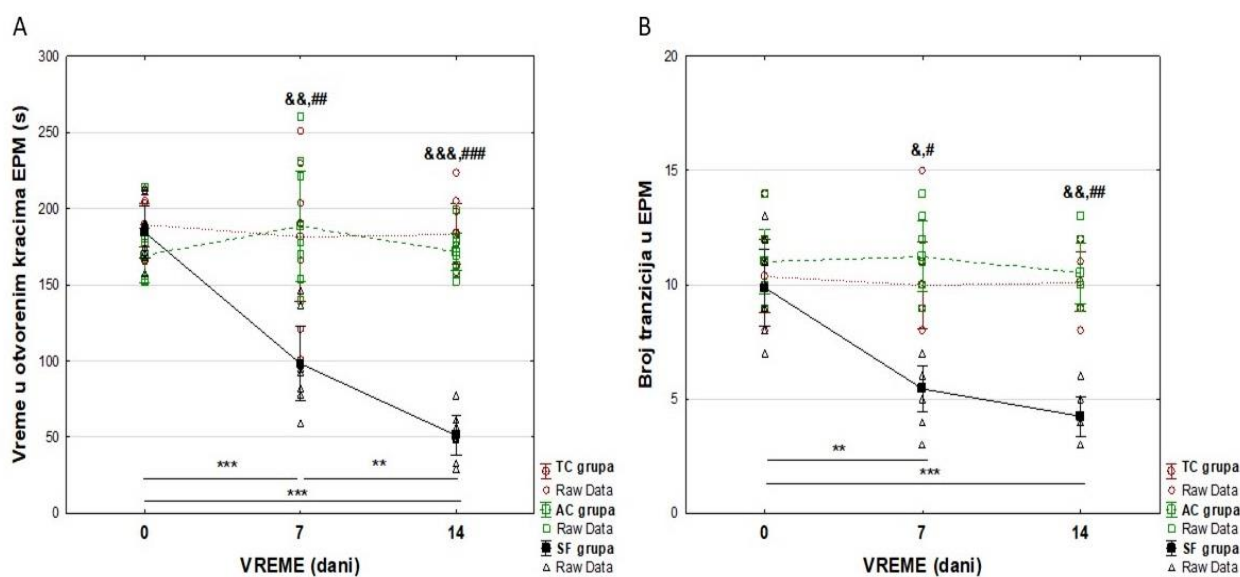
Broj propinjanja na zadnje šape (a), indeks tigmotaksije (b) i vreme provedeno u centralnom delu otvorenog polja (c) registrovani kod životinja iz TC, AC i SF grupe. Indeks tigmotaksije je izračunat kao odnos između distance ambulatornog kretanja u perifernim delovima otvorenog polja i ukupne pređene distance u otvorenom polju. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost + SEM. Razlike unutar grupe su procenjivane uz pomoć ANOVA testa sa Turkey-Kramer LSD post hoc testom $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ i $***p = 0.001$ u SF grupi. Isti test je korišćen za procenu statističke razlike između grupa $\#p < 0.05$ i $\#\#\#p < 0.01$ vs. TC; $\&p < 0.05$ i $\&\&p < 0.01$ vs. EC.

Rezultati

Tokom bazalnog testiranja (0. dan) u testu uzdignutog krstastog lavirinta nisu primećene razlike kod životinja iz TC, AC i SF grupa. Sa druge strane, protokol za fragmentaciju spavanja (SF grupa) značajno je redukovao vreme koje su životinje provodile u otvorenim kracima tokom testa, u poređenju sa TC grupom (SF vs. TC, Slika 4.20.-A nakon sedam ($p<0.01$) i četrnaest dana fragmentacije spavanja ($p<0.001$), kao i u poređenju sa životinjama iz AC grupe (SF vs. AC Slika 4.20.-A, nakon 7 ($p<0.01$) i 14 dana ($p<0.001$)).

Vreme koje su životinje iz SF grupe provodile u otvorenim kracima se postepeno smanjivalo tokom perioda fragmentacije i bilo je značajno niže nakon 14 dana, u poređenju sa opserviranim vrednostima nakon 7 dana ($p<0.001$).

Takođe, ovo vreme, bilo je značajno kraće sedmog dana u odnosu na bazalne vrednosti ($p<0.001$). Sličan rezultat je registrovan i kada je u pitanju broj tranzicija iz zatvorenih u otvorene krake nakon 7 i 14 dana (Slika 4.20.-B).

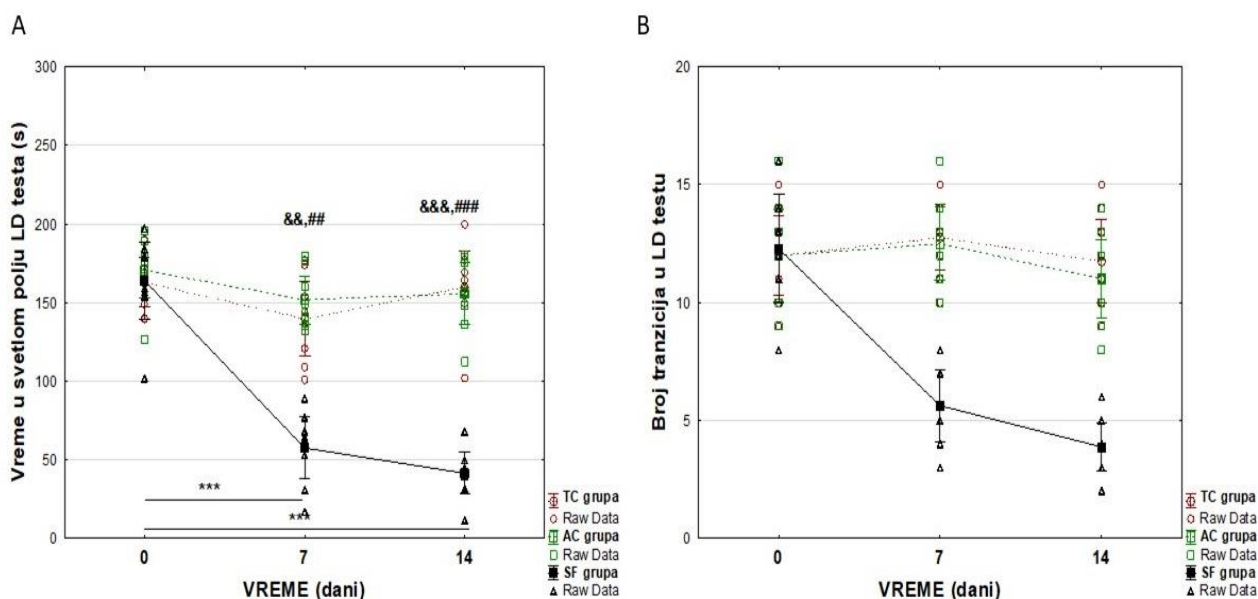


Slika 4.20. Bihevioralni obrasci u testu uzdignutog krstastog lavirinta: vreme provedeno u otvorenim kracima (a) i broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova (b)

Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SEM. Razlike unutar grupe su procenjivane One-Way ANOVA testom sa Turkey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($**p<0,01$, $***p<0,001$ u SF grupi). Isti testovi su upotrebljeni za procenu statističke razlike između grupa ($\#p<0,05$, $\##p<0,01$ vs. TC; $\&p<0,05$, $\&\&p<0,01$ i $\&\&\&p<0.001$ vs. EC).

Rezultati registrovani testom svetlo/tama su prikazani na Slici 4.21. Nije primećena statistički značajna razlika u posmatranim parametrima među grupama (SF, AC i TC) tokom bazalnog merenja ($p>0.05$).

Vreme koje su životinje iz SF grupe provodile u svetlom kompartmanu bilo je značajno kraće u odnosu na životinje iz TC i AC grupe 7. ($p<0.01$.) i 14. dana ($p<0.001$, Slika 4.21.-A). Isto se odnosi i na broj tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana (Slika 4.21.-B).



Slika 4.21. Bihevioralni obrasci registrovani u testu svetlo/tama: vreme provedeno u svetlom kompartmanu (A) i broj tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana (B).

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. Razlike unutar grupe su procenjene uz pomoć One-Way ANOVA testa sa Turkey-Kramer LS post hoc testiranjem ($***p < 0.001$ u SF grupi). Istim testovima procenjena je i statistička razlika između grupa ($##p < 0.001$ i $###p = 0.001$ vs. TC; $&&p < 0.01$ i $&&&p = 0.001$ vs. EC).

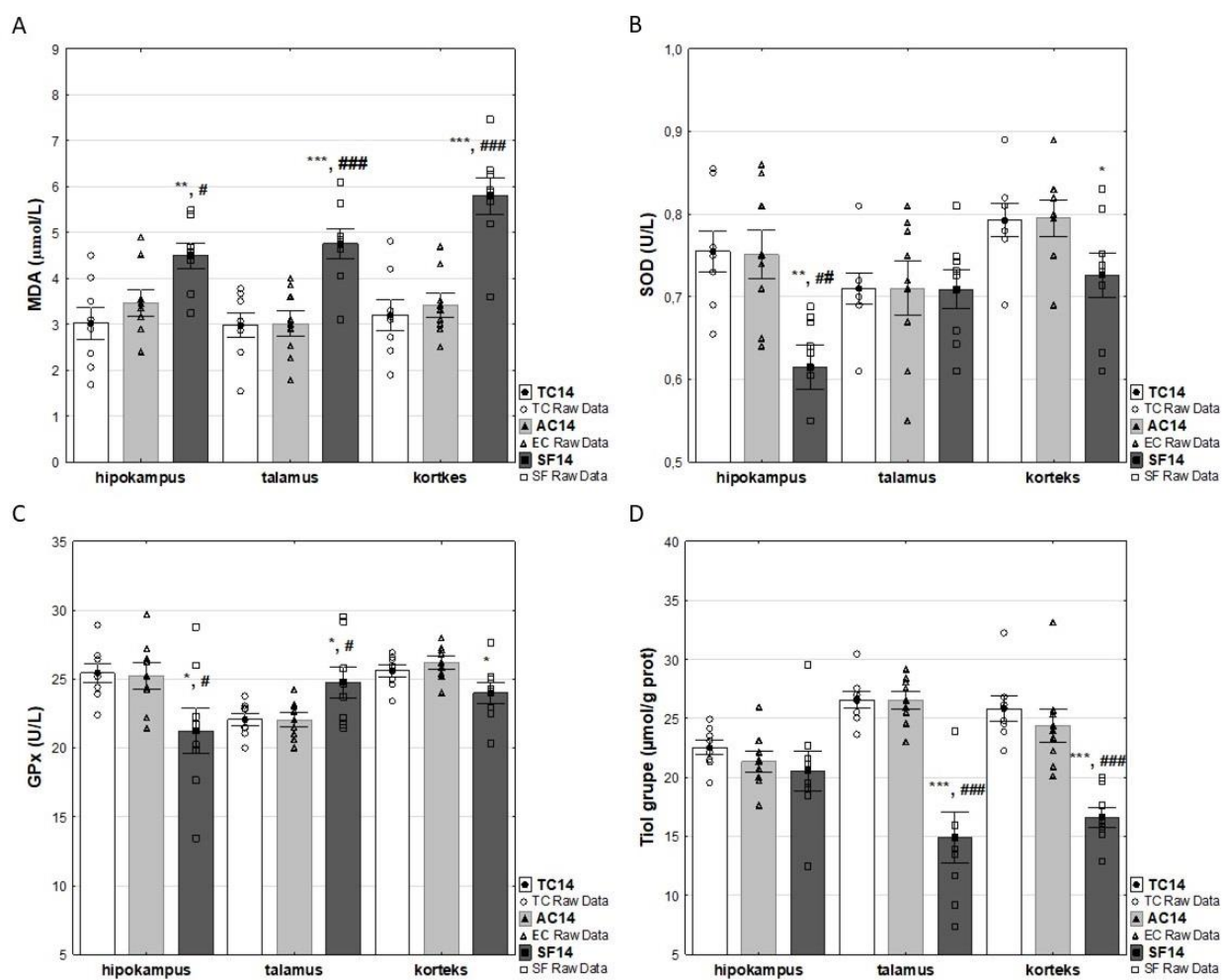
4.5.2. Oksidativni stres u moždanim strukturama

Hronična Fragmentacija spavanja značajno je uticala na pojavu oksidativnog stresa u centralnom nervnom sistemu pacova. Koncentracija MDA je bila značajno veća u sve tri izolovane strukture (talamus, hipokampus i korteks) kod eksperimentalnih životinja (SF) u poređenju sa životinjama iz kontrolnih grupa (TC i AC) (Slika 4.22.-A).

Fragmentacija spavanja takođe je indukovala alteraciju aktivnosti antioksidativnih enzima. Aktivnost Gpx enzima je bila statistički značajno niža u hipokampusu, talamusu i korteksu pacova iz SF grupe u odnosu na životinje iz TC grupe ($p < 0.05$, Slika 4.22.-C), kao i u talamusu i hipokampusu životinja iz AC grupe ($p < 0.05$). Nisu primećene razlike u aktivnosti enzima između AC i TC grupa.

Aktivnost SOD kod životinja kojim je spavanje bilo fragmentisano je bila snižena u hipokampusu i korteksu. Iako je aktivnost SOD merena u hipokampalnim strukturama bila značajno snižena u SF grupi u poređenju sa obe kontrolne grupe, aktivnost SOD u korteksu je bila različita samo u odnosu na TC grupu. Fragmentacija spavanja nije uticala na aktivnost SOD u talamusu (Slika 4.22.-B). Nije primećena razlika u SOD aktivnosti u sve tri strukture između životinja iz kontrolnih grupa (TC i AC).

Dok fragmentacija spavanja nije značajno uticala na koncentraciju tiol grupa u hipokampusu ($p < 0.05$, Slika 4.22.-D), značajan gubitak je opserviran u talamusu i korteksu –životinja kojima je fragmentisano spavanje, u poređenju sa životinjama iz obe kontrolne grupe (TC i AC). Nije bilo statistički značajne razike u koncentraciji tiol grupa među životinjama iz kontrolnih grupa.

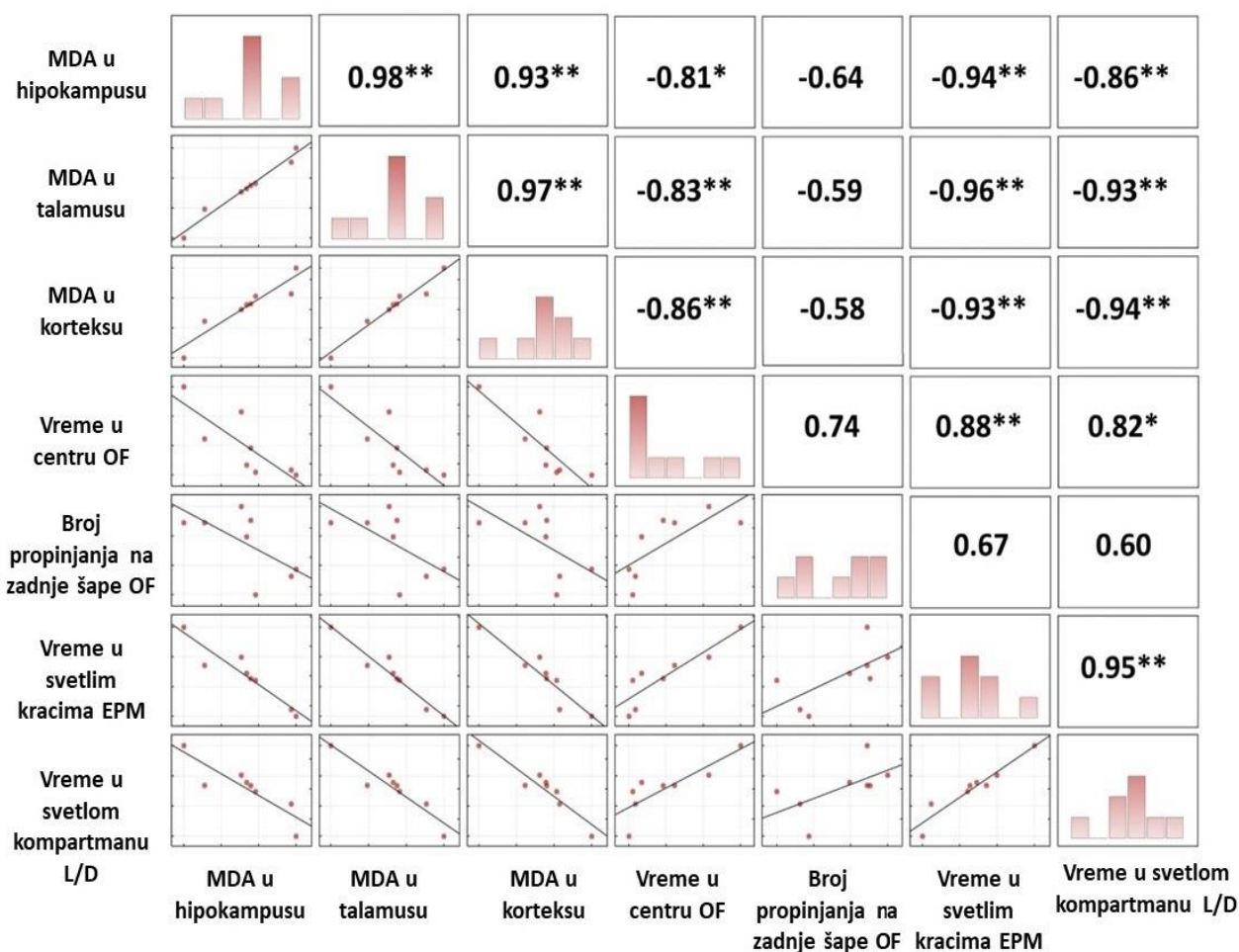


Slika 4.22. Oksidativni stres u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu po završetku fragmentacije spavanja. Nivoi malondialdehida (MDA, A), aktivnost glutation peroksidaze (GPx, B), aktivnost superoksid dismutaze (SOD, C) i nivoi tiol grupa (D) određivani u moždanim strukturama životinja iz TC, AC i SF grupa.

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrijednost \pm SEM. Za utvrđivanje statističke razlike između grupa korišten je ANOVA test sa Turkey-Kramer LSD post hoc testom ($*p < 0.05$, $**p < 0.001$ i $***p = 0.001$ vs. TC; $\#p < 0.05$, $\##p < 0.001$ i $\###p = 0.001$ vs. AC).

4.5.3. Korelaciona analiza bihevioralnih i bihemijskih testova

Kako bi se utvrdila povezanost MDA aktivnosti u talamusu, hipokampusu i korteksu sa ponašanjem karakterističnim za anksioznost, koristili smo Pearsonov test, a rezultati korelacionog matriksa su prikazani na Slika 4.23. Pokazana je značajna negativna korelacija između MDA aktivnosti u hipokampusu, talamusu i korteksu sa vremenom koje su životinje provodile u centru otvorenog polja ($r = -0.81$, $p < 0.05$; $r = -0.83$, $p < 0.01$ i $r = -0.86$, $p < 0.01$). Nije bilo statistički značajne korelacije između propinjanja na zadnje šape i aktivnosti MDA u bilo kojoj od tri izolovane strukture. Registrovana je značajna negativna korelacija između aktivnosti MDA u hipokampusu, talamusu i korteksu životinja kojima je spavanje bilo fragmentisano i vremena koje su životinje provodile u otvorenim kracima EPM testa ($r = -0.94$, $p < 0.01$; $r = -0.96$, $p < 0.01$ i $r = -0.93$, $p < 0.01$) kao i sa vremenom provedenim u svetlom kompartmanu svetlo/tama testa ($r = -0.86$, $p < 0.01$; $r = -0.93$, $p < 0.01$ i $r = -0.94$, $p < 0.01$).



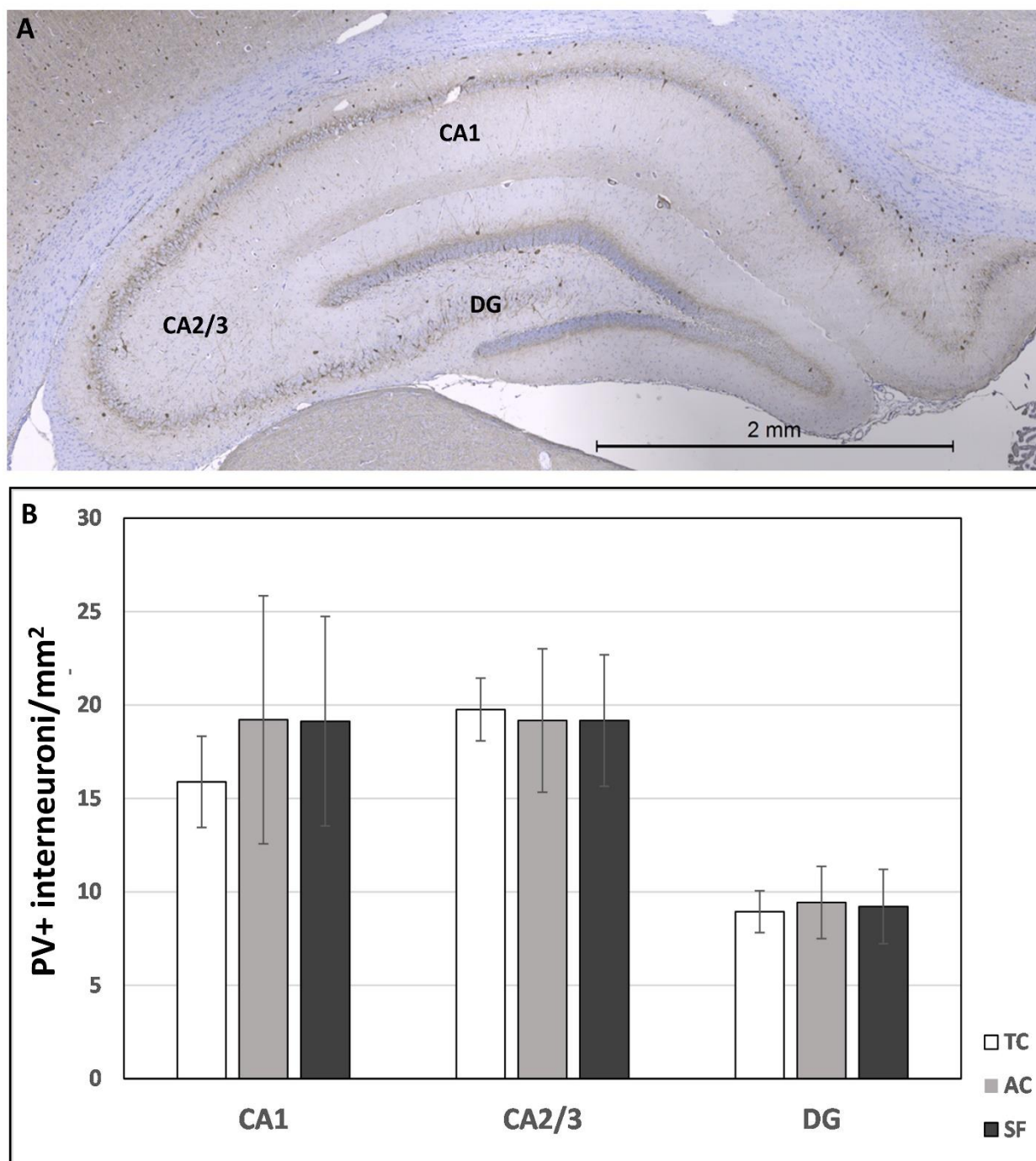
Slika 4.23. Korelaciona analiza između nivoa MDA u hipokampusu, talamusu i korteksu i parametara ponašanja povezanog sa anksioznošću.

Korelacioni matriks pokazuje korelaciju između nivoa MDA u ove tri strukture mozga i izlaznih varijabli bihejvioralnih testova: test otvorenog polja (vreme provedeno u centru), test EPM (vreme provedeno u otvorenim kracima) i testa L/D (vreme provedeno u svetlom kompartmanu). Distribucija svake varijable je prikazana dijagonalno. Gornji trouglasti matriks obuhvata Pearsonovu r vrednost. Donji trouglasti matriks uz pomoć dijagrama distribucije prikazuje odnose između varijabli. * $p < 0.05$ i ** $p < 0.001$.

4.5.4. Analiza hipokampalnih PV-pozitivnih interneurona

Imunohistohemijom analizom pokazana je ekspresija PV-pozitivnih interneurona, uglavnom u predelu sloja piramidalnih neurona CA1 i CA2/3 regiona, kao i u granularnom sloju dentatnog girusa (Slika 4.24.).

Kvantifikacijom broja PV-pozitivnih interneurona u ova tri regiona nije primećena statistički značajna razlika između TC, AC i SF grupa ($p > 0.05$).



Slika 4.24. Kvantitativna analiza PV-pozitivnih interneurona u hipokampusu

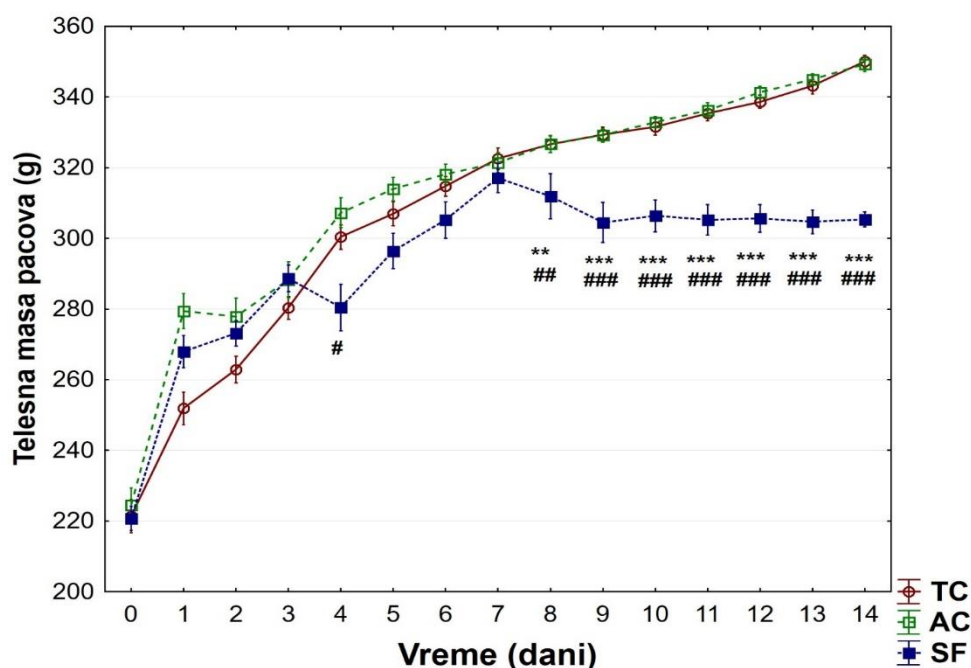
Reprezentativna fotomikrografija hipokampusa sa CA1, CA2/3 i DG regionima (A). Grafički prikaz broja PV+ interneurona u regionima hipokampusa (B). Vrednosti si izražene kao medijana±SEM. Za procenu razlika među grupama korišćen je ANOVA test sa Turkey-Kramer LSD post hoc testiranjem.

4.6. Uticaj frgmentacije spavanja na ponašanje karakteristično za depresivni poremećaj i mehanizmi interakcije

4.6.1. Fragmentacija spavanja i telesna masa eksperimentalnih životinja

Telesna masa (g) svih životinja iz eksperimentalne grupe (SF) i kontrolnih grupa (AC i TC) je svakodnevno merena pre započinjanja eksperimentalnog protokola za taj dan (Slika 4.25.). Analizom telesnih masa eksperimentalnih životinja možemo videti da je do 4. dana prisutan linearni porast telesne mase kod sve četiri grupe sa manjim fluktuacijama između pojedinačnih životinja, ali bez statistički značajne razlike među grupama (SF vs. AC i TC, $p>0,05$; AC vs. TC, $p>0,05$). Četvrtog dana prirast telesne mase životinja kojima je fragmentisano spavanje počinje da usporava značajno u odnosu na obe kontrolne grupe i dolazi do pojave statistički značajne razlike u odnosu na životinje iz sedentarne kontrolne grupe (SF vs. TC, $p<0,05$; SF vs. AC, $p>0,05$).

Od 9. dana od početka eksperimenta telesna masa životinja iz SF grupe praktično stagnira sa tendencijom gubitka na telesnoj masi i prisutna je visoko statistički značajna razlika u odnosu na obe kontrolne grupe (SF vs. TC, $p<0,001$; SF vs. AC, $p<0,001$). Tokom svih dana praćenja nije bilo statistički značajne razlike u telesnim masama između kontrolnih grupa (AC vs. TC, $p>0,05$).

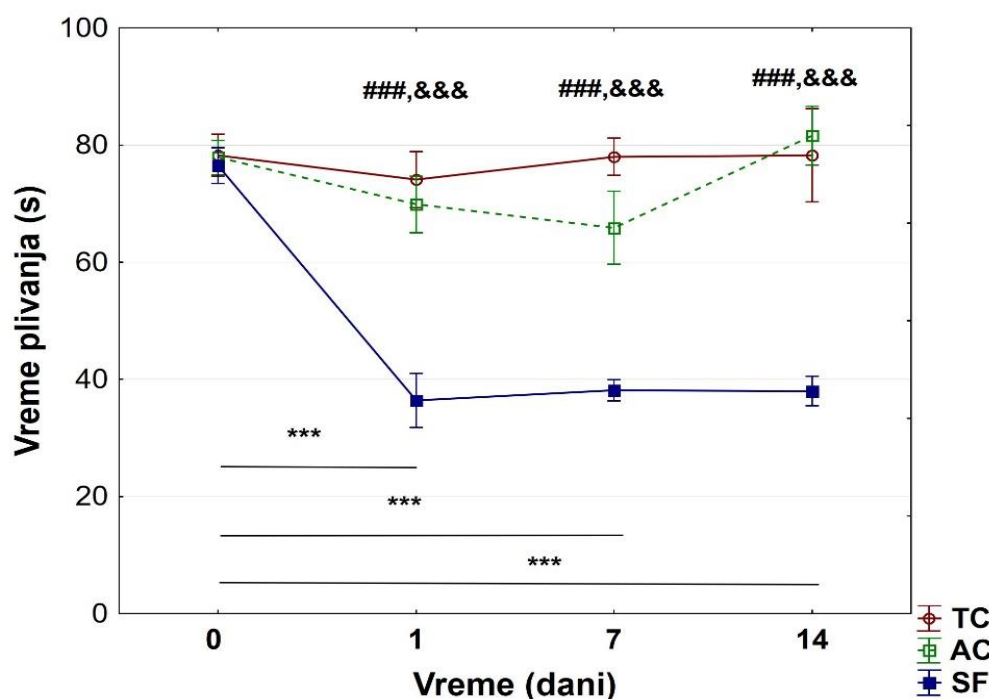


Slika 4.25. Telesna masa kod životinja iz eksperimentalne i kontrolnih grupa merena tokom svih dana trajanja eksperimenta

Vrednosti su izražene kao apsolutna telesna težina (mg).. Statistička značajnost razlika u telesnoj masi između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa (# $p<0,05$, **## $p<0,01$, ***### $p<0,001$, vs. #TC i *AC). U zavisnosti od tretmana životinje su podeljene u tri grupe: SF grupa kojoj je fragmentisano spavanje, AC kontrolna grupa za aktivnost i TC-sedentarna kontrolna grupa.

4.6.2. Fragmentacija spavanja i ponašanje povezano sa depresijom

U cilju utvrđivanja ponašanja povezanog sa depresijom, koristili smo test forsiranog plivanja u trajanju od 14 uzastopnih dana, tokom 6 sati svetle faze (8a.m-14p.m.) kako bi procenili efekte akutne, subakutne i hronične fragmentacije na bihevioralne parametre životinja i iste mogli međusobno da poredimo. Pre početka registrovanja uzeta je bazalna vrednost koja je predstavljala prosečno vreme koje životinje provedu u određenom tipu ponašanja u testu forsiranog plivanja za životinje iz svih grupa (SF, AC, TC), što je na grafikonima obeleženo sa 0. Životinje kojima je akutno fragmentisano spavanje (1. dan) su statistički visoko značajno kraće plivale u odnosu na životinje iz obe kontrolne grupe (### $p<0,001$ vs. TC; &&& $p<0,001$ vs. AC) (Slika 4.26.). Kada je u pitanju razlika između efekata akutne, subakutne i hronične fragmentacije kod životinja iz SF grupe je primećena visoko statistički značajna razlika nakon sedam (***) i četrnaest (***) dana fragmentacije u odnosu na bazalnu vrednost. U isto vreme nije bilo statistički značajne razlike u vremenu provedenom u plivanju kod životinja iz kontrolnih grupa (AC vs. TC, $p>0.05$, Slika 4.26.).



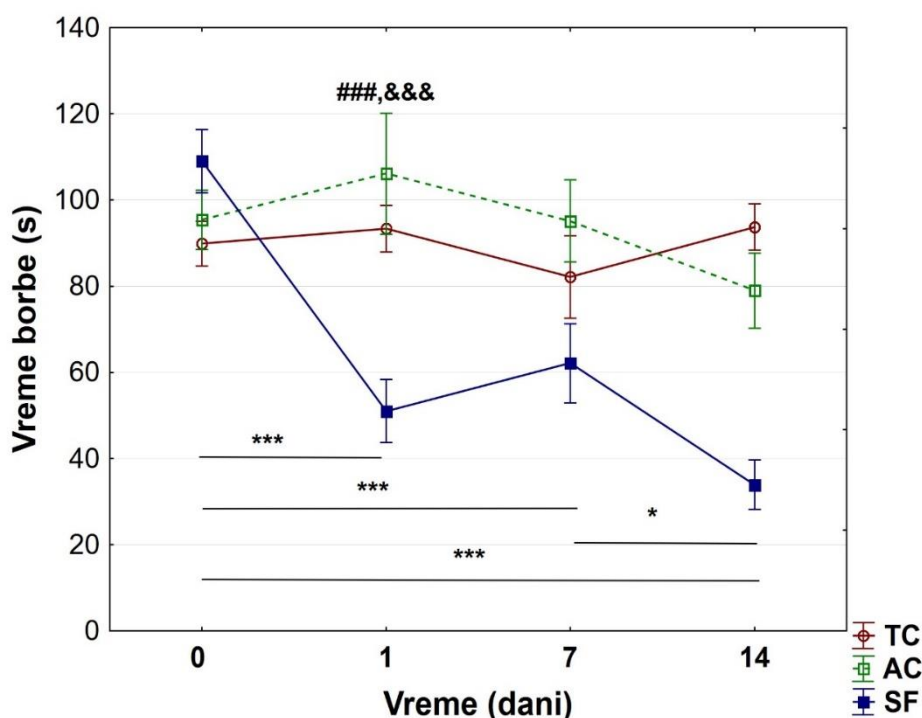
Slika 4.26. Distribucija i trajanje plivanja kod životinja iz eksperimentalne (SF) i kontrolnih grupa (TC i AC) u testu forsiranog plivanja (FST)

Na grafikonu je prikazano trajanje plivanja kod životinja iz sve tri grupe nakon akutne (1. dan), subakutne (7. dan) i hronične (14. dan) fragmentacije spavanja. Kao 0 je obeleženo prosečno trajanje plivanja u ovom testu i vrednost je bila ista za životinje iz svih grupa. Značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ((### $p<0,001$ vs. TC; &&& $p<0,001$ vs. AC), dok je unutargrupna razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom (***) $p<0.001$).

Pacovi sa fragmentisanim spavanjem su proveli statistički značajno manje vremena u borbi ($p<0,001$) nakon akutne (1. dan), subakutne (7. dan) i hronične fragmentacije spavanja u odnosu na obe kontrolne grupe (### $p<0,001$ vs. TC; &&& $p<0,001$ vs. AC, Slika 4.27.). Neophodno je napomenuti da je kod životinja iz eksperimentalne grupe došlo do značajnog

Rezultati

pada u vremenu provedenom u 7. i četrnaestog dana u odnosu na bazalnu vrednost ($***p<0.001$), dok je razlika između 14. i 7. dana nešto manja ali i dalje statistički značajna ($*p<0.05$). Nije bilo statistički značajne razlike kod životinja iz kontrolnih grupa (AC vs. TC, $p>0.05$, Slika 4.27.).



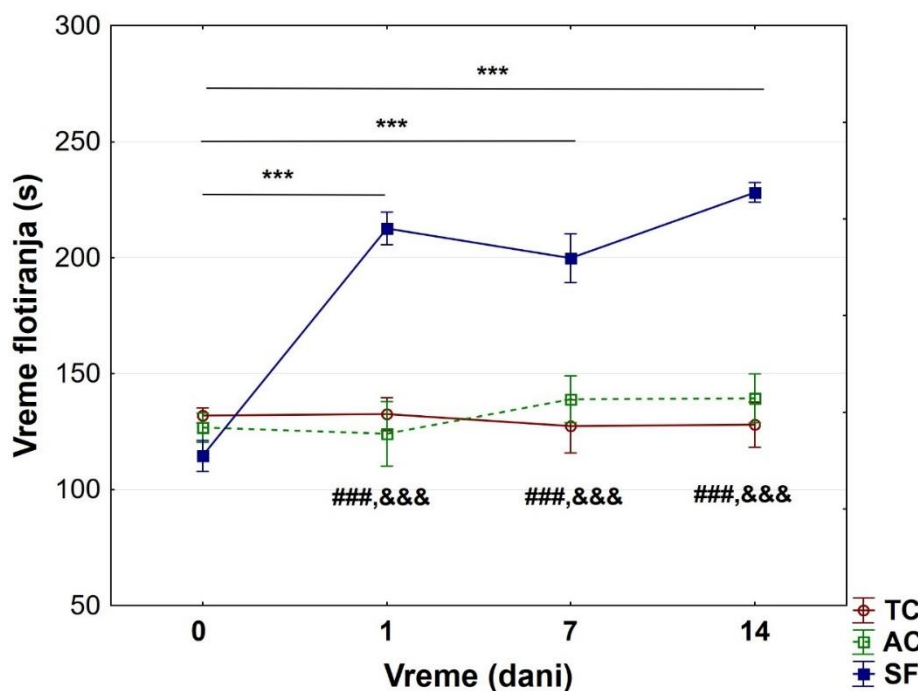
Slika 4.27. Distribucija i trajanje borbe kod životinja iz eksperimentalne (SF) i kontrolnih grupa (TC i AC) u testu forsiranog plivanja (FST)

Na grafikonu je prikazano trajanje plivanja kod životinja iz sve tri grupe nakon akutne (1. dan), subakutne (7. dan) i hronične (14. dan) fragmentacije spavanja. Kao 0 je obeleženo prosečno trajanje plivanja u ovom testu i vrednost je bila ista za životinje iz svih grupa. Značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa ($###p<0,001$ vs. TC; $***p<0,001$ vs. AC), dok je unutargrupna razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($*p<0.05$, $***p<0.001$).

Životinje iz eksperimentalne grupe su tokom celog trajanja eksperimenta statistički značajno duže flotirale u odnosu na životinje iz obe kontrolne grupe ($###p<0,001$ vs. TC; $***p<0,001$ vs. AC, Slika 4.28.).

Subakutna i hronična fragmentacija spavanja uzrokovala je visoko statistički značajno produženje vremena flotiranja kod životinja iz eksperimentalne grupe ($***p<0.001$) u odnosu na bazalnu vrednost. Nije bilo statistički značajne razlike kod životinja iz kontrolnih grupa (AC vs. TC, $p>0.05$, Slika 4.28.).

Rezultati



Slika 4.28. Distribucija i trajanje flotiranja kod životinja iz eksperimentalne (SF) i kontrolnih grupa (TC i AC) u testu forsiranog plivanja (FST)

Na grafikonu je prikazano trajanje plivanja kod životinja iz sve tri grupe nakon akutne (1. dan), subakutne (7. dan) i hronične (14. dan) fragmentacije spavanja. Kao 0 je obeleženo prosečno trajanje plivanja u ovom testu i vrednost je bila ista za životinje iz svih grupa. Značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa ($###p < 0,001$ vs. TC; $p < 0,001$ vs. AC), dok je unutargrupna razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($***p < 0.001$).

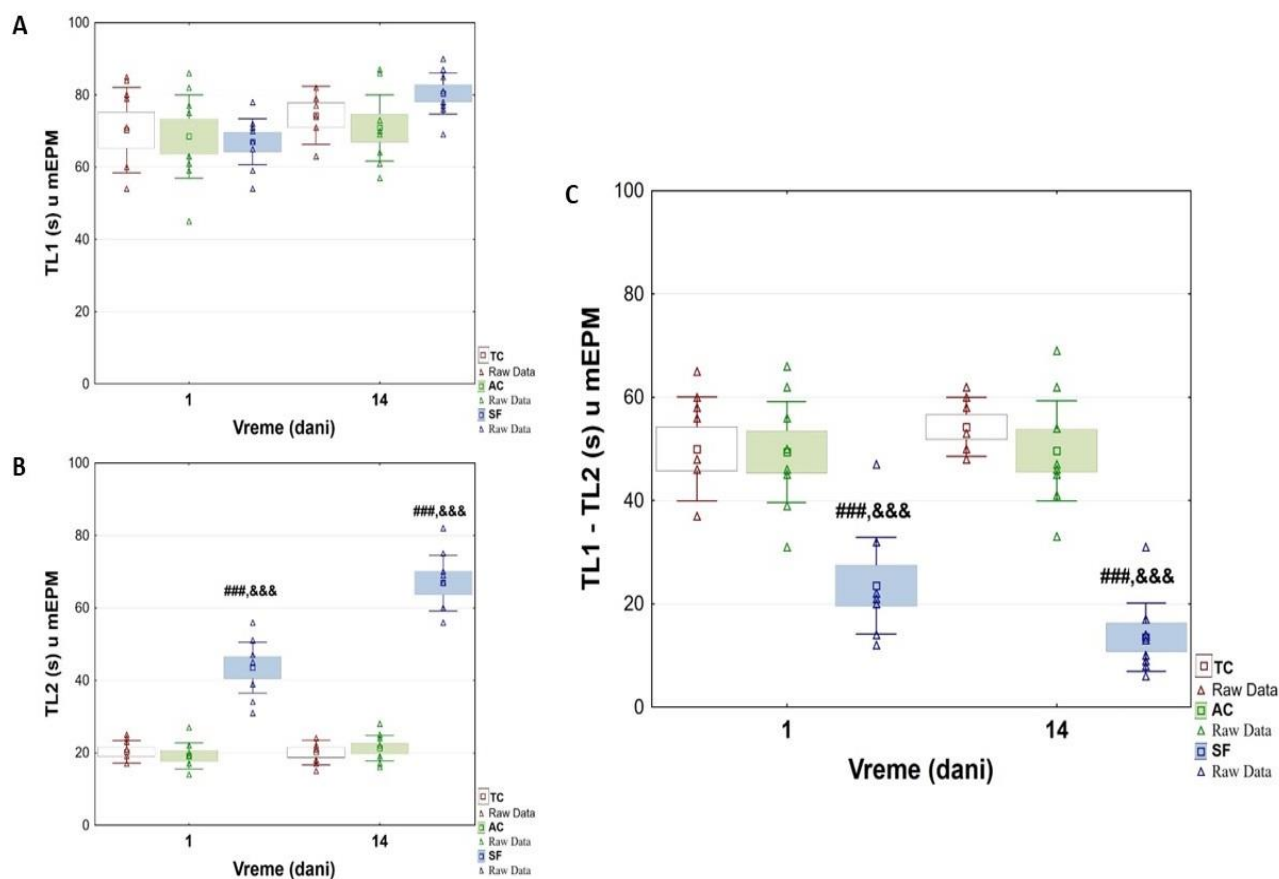
4.6.3. Fragmentacija spavanja i kognitivne funkcije (učenje i pamćenje)

U cilju procene kognitivnog ponašanja i kognitivnih funkcija, učenja i pamćenja, sve životinje iz eksperimentalne i kontrolnih grupa su 1. i 14 dana podvrgnute modifikovanom testu uzdignutog krstastog lavirinta kako bi procenili akutne i hronične efekte fragmentacije spavanja (Slika 4.29.).
vreme.

Tokom predtesta nije utvrđena statistički značajna razlika u trajanju TL1 latentnog vremena između eksperimentalne i kontrolnih grupa nakon akutne (1) i hronične fragmentacije spavanja (14) (SF vs. AC i TC, $p > 0,05$, Slika 4.29.-A).

Test retencije je pokazao da su životinje iz eksperimentalne grupe imale statistički visoko značajno kraće TL2 latentno vreme kako 1. tako i 14. dana ($###p < 0,001$ SF vs. TC; $p < 0,001$ SF vs. AC) u poređenju sa kontrolnim životinjama (Slika 4.29.-B).

Takođe ista razlika je primećena i kada se napravi apsolutna razlika između TL1 i TL2 ($###p < 0,001$ SF vs. TC; $p < 0,001$ SF vs. AC, Slika 4.29.-C).



Slika 4.29. Latentno vreme transfera tokom predtesta (A), retencije (B) i razlika (C, TL1-TL2) u modifikovanom testu uzdignutog krstastog lavirinta kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Latentno vreme transfera iz otvorenog u zatvoreni krak tokom predtesta (T1 latentno vreme) i retencije (T2 latentno vreme) kao i razlika (TL1-TL2) je izraženo kao prosečna vrednost \pm standardna greška. Statistička značajnost razlika između grupa je utvrđena one - way ANOVA testom (### $p < 0,001$ SF vs. TC; &&& $p < 0,001$ SF vs. AC).

4.6.4. Hronična fragmentacija spavanja i serumski nivoi testosterona i kortikosterona

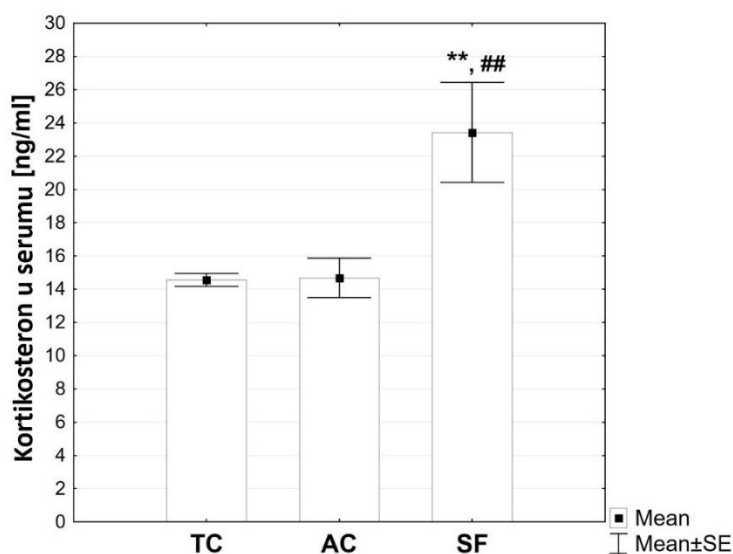
Uzimanje uzorka i priprema seruma za analizu koncentracije kortikosterona i testosterona izvršena je odmah po završetku četrnaesto-dnevne, hronične, fragmentacije spavanja.

Prilikom uzorkovanja krvi za analizu iz repne vene, uzorci za kortikosteron su, u cilju izbegavanja cirkadijalne fluktuacije koncentracije ovog hormona, dobijeni konzistentnim uzorkovanjem krvi između 14.00 i 15.00 h.

Biohemijska analiza uzoraka pokazala je da su životinje nakon hronične fragmentacije spavanja imale statistički visoko značajno veću serumsku koncentraciju kortikosterona u serumu u odnosu na životinje iz obe kontrolne grupe (## $p < 0,001$ SF vs. TC; ** $p < 0,001$ SF vs. AC, Slika 4.30.).

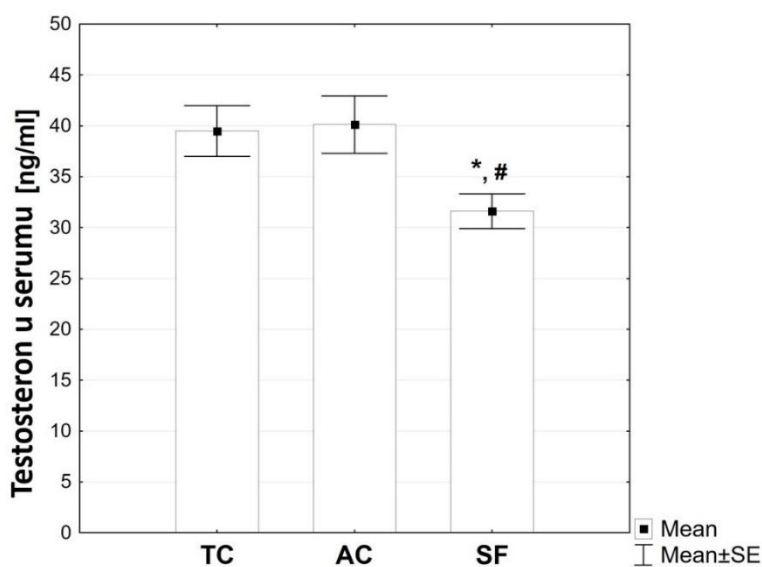
Rezultati

Sa druge strane, koncentracija serumskog testosterona je kod fragmentisanih životinja bila statistički značajno niža, u poređenju sa životinjama iz kontrolnih grupa AC i TC ($\#p<0,05$ SF vs. TC; $*p<0,05$ SF vs. AC, Slika 4.31.).



Slika 4.30. Koncentracija kortikosterona u serumu nakon hronične fragmentacije spavanja

Koncentracije kortikosterona u serumu su određene ELISA metodom. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna greška. Statistička značajnost razlika između grupa je utvrđena one - way ANOVA testom ($\#p<0,001$ SF vs. TC; $**p<0,001$ SF vs. AC).



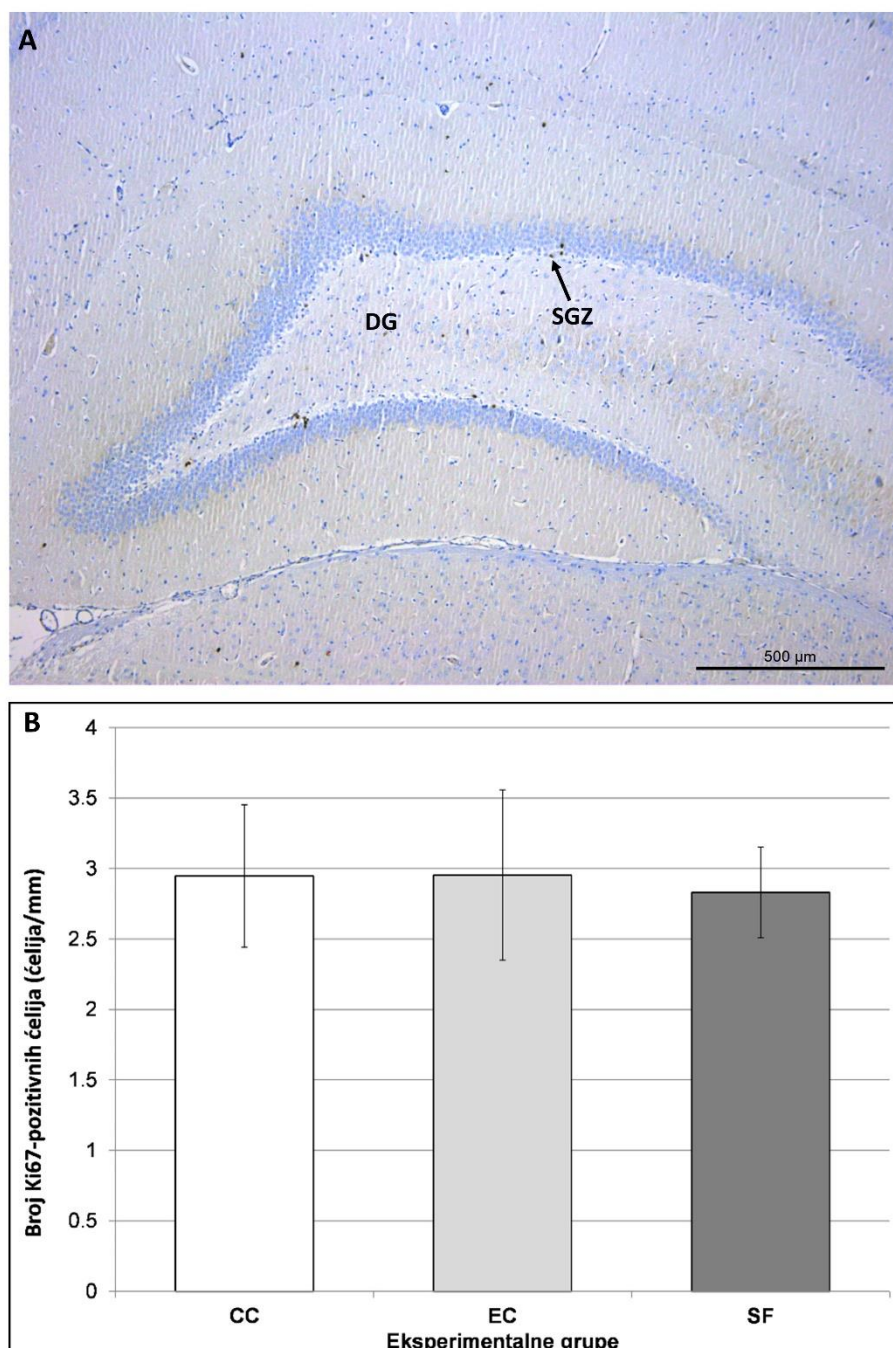
Slika 4.31. Koncentracija testosterona u serumu nakon hronične fragmentacije spavanja

Koncentracije testosterona u serumu su određene ELISA metodom. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna greška. Statistička značajnost razlika između grupa je utvrđena one - way ANOVA testom ($\#p<0,05$ SF vs. TC; $*p<0,05$ SF vs. AC).

4.6.5. Hronična fragmentacija spavanja i imunohistohemijska ekspresija markera neurogeneze i gliogeneze u hipokampusu

4.6.5.1. Hronična fragmentacija spavanja i ekspresija Ki-67 pozitivnih ćelija u SGZ hipokampusa

Kvantitativna analiza broja Ki-67-pozitivnih ćelija je pokazala da nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa (SF vs. AC i TC, $p > 0,05$, Slika 4.32.).

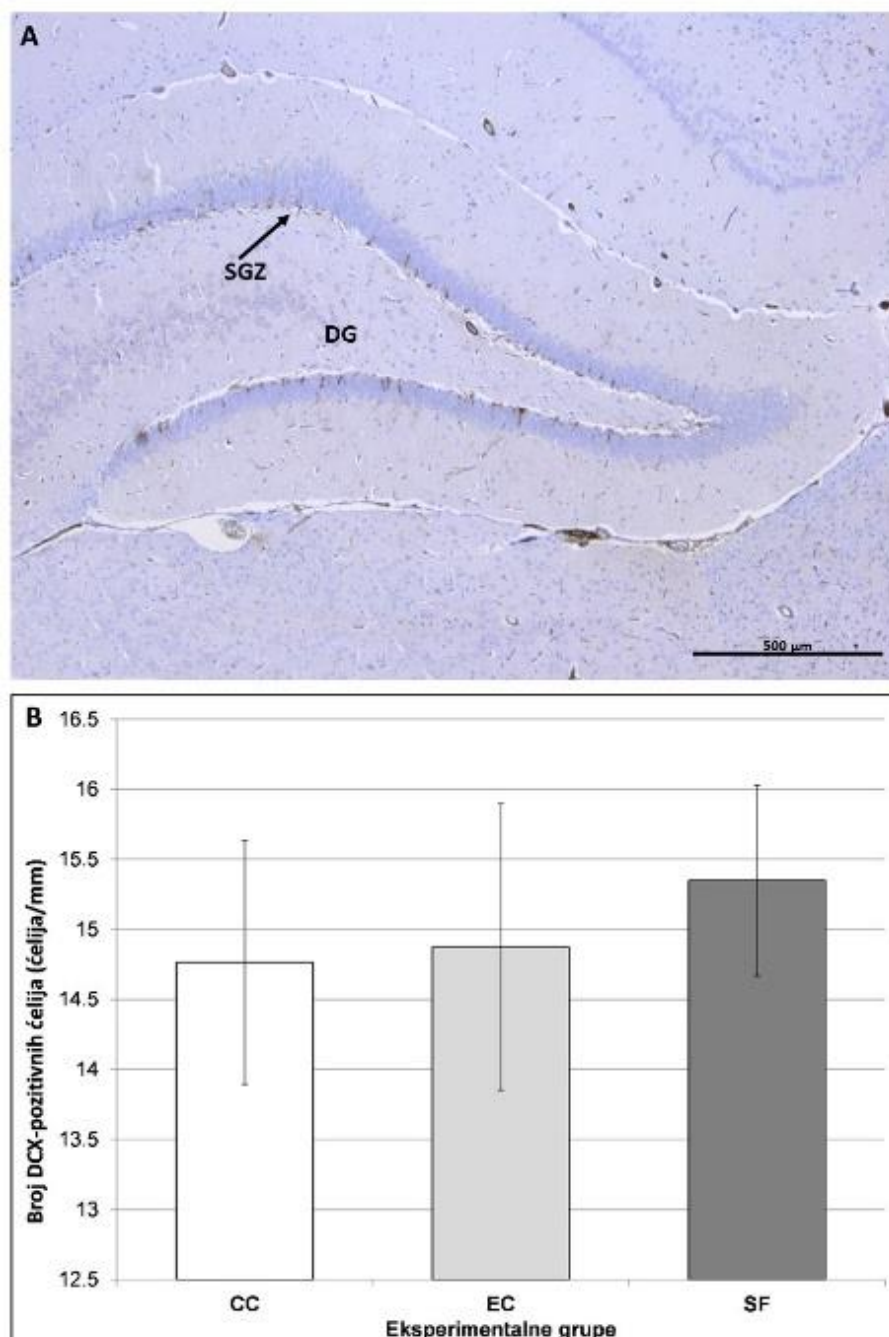


Slika 4.32. Reprezentativna fotomikrografija Ki-67 pozitivnih ćelija u SGZ hipokampusa životinje iz TC grupe (A) i grafički prikaz broja Ki-67-pozitivnih ćelija u ispitivanim grupama (B).

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna grška. Statistička značajnost razlika između grupa je ispitivana upotrebom one-way ANOVA testa (SF vs. AC i TC, $p > 0,05$).

4.6.5.2. Hronična fragmentacija spavanja i ekspresija DCX-pozitivnih ćelija u SGZ hipokampusa

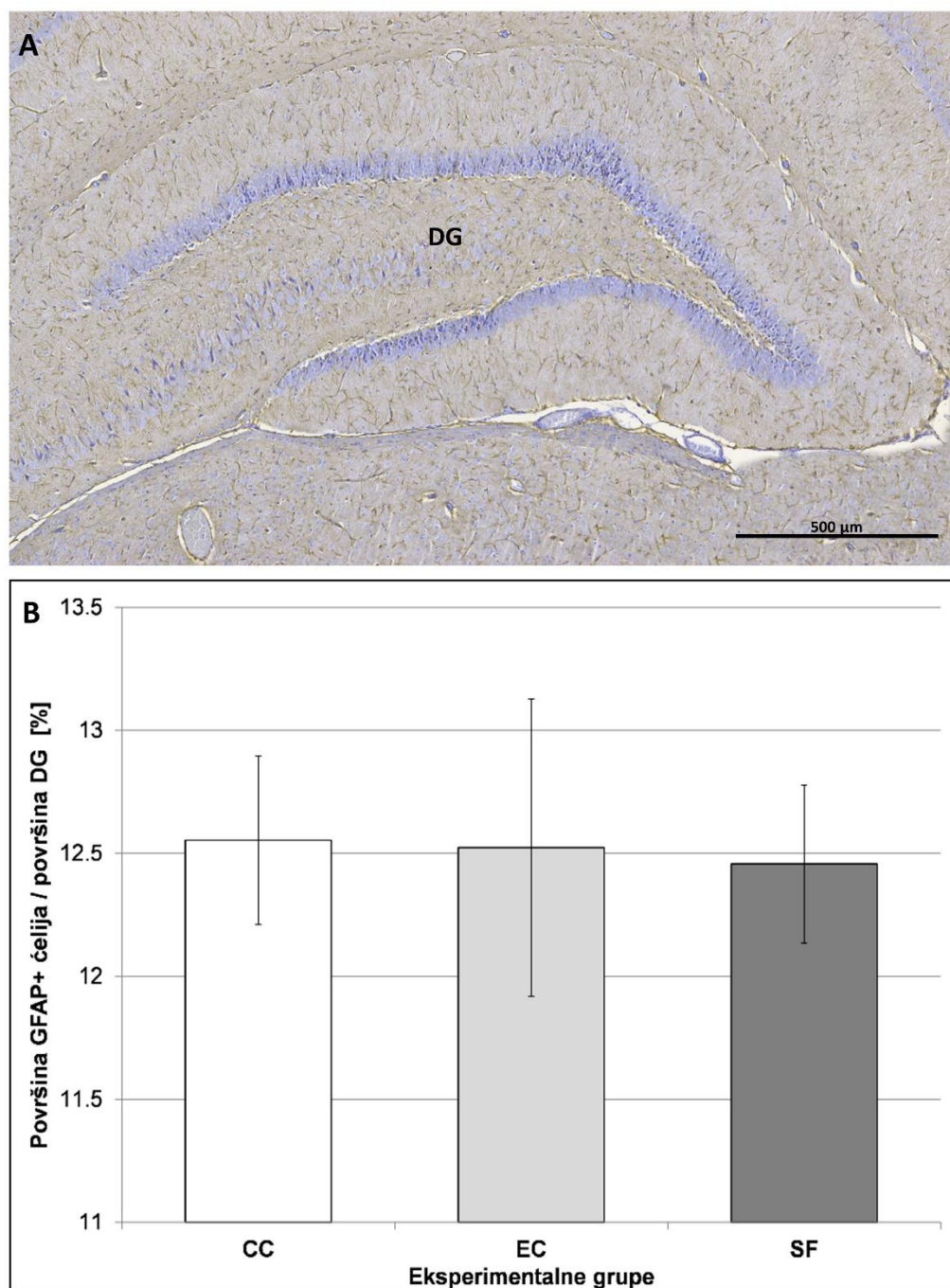
DCX imunoreaktivni neuroni u hipokampusima životinja iz eksperimentalne i kontrolnih grupa su bili predominantno lokalizovani duž SGZ u DG hipokampusa. Analizom broja DCX-pozitivnih ćelija nije uočena statistički značajna razlika u broju ovih ćelija između ispitivanih grupa (SF vs. AC i TC, $p > 0,05$, Slika 4.33.).



Slika 4.33. Reprezentativna fotomikrografija DCX-pozitivnih ćelija u SGZ hipokampusa životinje iz kontrolne grupe (A) i grafički prikaz broja DCX-pozitivnih ćelija u ispitivanim grupama (B)

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna greška. Statistička značajnost razlika između dve grupe je ispitivana upotrebom one-way ANOVA testa (SF vs. AC i TC, $p > 0,05$).

4.6.5.3. Hronična fragmentacija spavanja i ekspresija GFAP+ astrocita u hipokampusu



Slika 4.34. Reprezentativna fotomikrografija GFAP-pozitivnih astrocita u hipokampusu sedentatne kontrole (A) i grafički prikaz procentualne zastupljenosti ekspresije GFAP imunoreaktivnosti u ispitivanim grupama (B)

Procentualna zastupljenost ekspresije GFAP prikazana je kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Značajnost razlike između grupa je ispitivana upotrebom one- way ANOVA testa (SF vs. AC i TC, $p > 0,05$).

Astroцити, који уобичајено садрже GFAP су локализовани шиrom дентатног гируса. На фотомикрографији се јасно могу уочити ћелијска тела и пројужци GFAP-имунореактивних астрoцитa. Резултати квантитативне анализе експресије GFAP маркера астрoцитa нису показали статистички значајну разлику између испитиваних група ($p < 0,01$, Слика 4.34.).

5. DISKUSIJA

Rezultati istraživanja koje smo sproveli pokazali su da visokofrekventna fragmentacija spavanja po uzoru na onu koja se javlja kod opstruktivne apneje u spavanju dovodi do povećanja moždane ekscitabilnosti neurona, kako akutno, tako i kada je prolongirana. Ovi rezultati su potvrđeni bihevioralnom i elektroencefalografskom analizom. Analiza konvulzivnog biheviora je pokazala veću incidencu napada kod životinja iz eksperimentalne grupe koja je praćena kraćim latentnim periodom i većim intezitetom u oba dela eksperimenta (akutna i hronična fragmentacija spavanja). Kada je u pitanju elektroencefalografska analiza, akutna i hronična fragmentacija spavanja dovele su do pojave serija visokonaponske iktalne aktivnosti, dok je kvantitativna analiza iktalnih razdoblja takođe pokazala značajne razlike među grupama. U kontrolnoj grupi za aktivnost primećena je sporadična pojava iktalnih fenomena, dok su životinje iz sedentarne kontrolne grupe imale uredan EEG zapis. Nakon hronične fragmentacije spavanja vrednosti IL-1 β bile su značajno povećane u hipokampusu, talamusu i korteksu životinja iz eksperimentalne grupe. Nivoi IL-6 su bili najniži u hipokampusu i talamusu eksperimentalnih životinja ali bez statističke razlike u odnosu na životinje iz kontrolnih grupa, ali nije pronađena statistički značajna razlika. Kada je u pitanju korteks, vrednosti IL-6 kod eksperimentalnih životinja bile su značajno veće u odnosu na životinje iz kontrolnih grupa.

Već je pokazano da promene obrazaca spavanja imaju duboke efekte na podložnost za pojavu konvulzija, a uticaj totalne i parcijalne deprivacije spavanja na pacijente sa epilepsijom je prethodno objašnjen (Scalise i sar., 2006; Lucey i sar., 2015). Ipak, odnos između fragmentacije spavanja i epilepsije još uvek nije dovoljno rasvetljen. Nekoliko studija proučavalo je efekte deprivacije spavanja na podložnost konvulzivnim napadima, pri čemu se pokazalo da deprivacija spavanja može povećati incidencu napada kod pacijenata sa epilepsijom i eksperimentalnih životinja (Hrnčić i sar., 2013). U preglednom radu Díaz-Negrillo (2013) je pokazano da deprivacija spavanja povećava učestalost konvulzivnih epizoda kod pacijenata sa noćnim fokalnim konvulzivnim epizodama u frontalnom režnju, dok su Aboul Ezz i sar. (2021) pokazali da selektivna deprivacija povećava učestalost i trajanje napada kod pacova.

Pored deprivacije spavanja, uloga ciklusa spavanja i budnosti u predispoziciji za pojavu konvulzivnih napada, takođe je detaljno proučavana. Narušena arhitektura, naročito fragmentacija i deprivacija spavanja, mogu značajno uticati na moždanu ekscitabilnost. Ovi efekti su zapaženi i u animalnim i u studijama na humanoj populaciji. Jedna studija je utvrdila da fragmentacija spavanja kod pacova dovodi do povećanja ekscitabilnosti u frontalnom korteksu, regionu mozga koji je uključen u kognitivne procese (Sportiche i sar., 2010). Slično ovome, fragmentacija spavanja kod miševa dovodi do povećanja ekscitabilnosti u hipokampusu, koji je uključen u učenje i memoriju (Abel i sar., 2013). Deprivacija spavanja kod ljudi povećava ekscitabilnost motornog korteksa što može uticati na smanjenje fizičkih performansi (Civardi i sar., 2001), ali dovodi i do smanjenja inhibitorne funkcije prednjeg korteksa, što bi moglo doprineti kognitivnim oštećenjima (Yoo i sar., 2007). Mehanizmi koji stoje iza ovih efekata nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se veruje da poremećaj spavanja dovodi do promena u ravnoteži između ekscitatornih i inhibitornih neurotransmitera u mozgu i smanjenja inhibitornog neurotransmitera GABA u mozgu, što bi moglo doprineti povećanoj ekscitabilnosti (Brown i sar., 2012). Ukupno, ove studije sugerišu da narušena arhitektura spavanja može značajno uticati na moždanu ekscitabilnost, i tako dovesti do pada u kognitivnim i motoričkim performansama.

Istraživanja su pokazala da fragmentacija spavanja može značajno uticati na REM fazu. Jedno istraživanje je utvrdilo da česta buđenja tokom noći dovode do smanjenja količine REM spavanja i povećanja broja REM perioda tokom noći (Ohayon i sar., 2004). U saglasnosti sa ovim Mullington i sar. su pokazali da fragmentacija spavanja dovodi do značajnog smanjenja vremena provedenog u REM fazi, kao i smanjenja procenta ukupnog vremena provedenog u REM fazi spavanja (Mullington i sar., 2000). Pored uticaja na REM fazu, fragmentacija spavanja takođe može uticati na sporotalasno spavanje. U studiji VanCautera i sar. pokazano je da česta buđenja tokom noći dovode do smanjenja trajanja NREM faza spavanja (Werth i sar., 1997). Druga istraživanja potvrdila su ovaj rezultat i pokazala da fragmentacija spavanja ne samo da dovodi do smanjenja ukupnog vremena provedenog u ne-REM fazama, već utiče i na promene u distribuciji različitih faza ne-REM spavanja (Bianchi i sar., 2011).

Nekoliko studija se bavilo odnosom između REM faze spavanja i pojave konvulzija. Jedna studija je utvrdila da su konvulzije učestalije tokom REM faze spavanja u poređenju sa drugim fazama spavanja. Studija proučavala 13 pacijenata sa farmako-rezistentnom epilepsijom koji su prošli polisomnografsko praćenje kako bi se merili EEG i RSA (eng. *respiratory sinus arrhythmia*) tokom spavanja. Istraživači su otkrili da je pojava konvulzivnih napada povezana sa smanjenjem RSA tokom NREM spavanja, ali ne i tokom REM spavanja. Takođe su otkrili da je hiperekscitabilnost bila povezana sa smanjenjem trajanja dubokih faza sporotalasnog spavanja (SWS) i povećanjem NREM1 faze. Ukupno, studija sugeriše da promene u aktivnosti autonomnog nervnog sistema tokom NREM spavanja, merene preko RSA, mogu biti povezane sa pojavom napada epilepsije kod pacijenata sa farmakorezistentnom epilepsijom (Ng i Pavlova, 2013). Druga studija je utvrdila da deprivacija REM spavanja, može smanjiti prag za pojavu konvulzija. Cilj studije bio je proučavanje efekata faza spavanja i deprivacije spavanja na konvulzivne napade. Uključeno je 15 pacijenata sa epilepsijom koji su prošli kontinuirano video-EEG praćenje tokom fiziološkog perioda spavanja i tokom deprivacije spavanja. Istraživači su analizirali vrstu i učestalost konvulzija u različitim fazama i različitim uslovima spavanja. Rezultati su pokazali da se većina napada dogodila tokom spavanja (84% tokom spavanja naspram 16% tokom budnosti). Takođe, pojava napada se razlikovala tokom različitih faza spavanja, pri čemu je najveća učestalost napada zabeležena tokom NREM 2 faze. Utvrđeno je da deprivacija povećava učestalost konvulzija kod nekih pacijenata, posebno onih sa idiopatskom generalizovanom epilepsijom (Mallow i sar., 2002).

Ovi rezultati sugerišu da REM faza spavanja može imati ključnu ulogu u regulaciji moždane hiperekscitabilnosti i pojave napada. Nadalje, sugerišu da intervencije usmerene na modulaciju REM faze spavanja mogu imati terapijski potencijal za lečenje epilepsije. Određeni antidepressivi, poput selektivnih inhibitora ponovnog preuzimanja serotonina (SSRI), produžavaju vreme provedeno u REM fazi (Wilson i Argyropoulos, 2005). Ovaj efekat može biti koristan za neke pacijente sa epilepsijom, jer bi potencijalno mogao smanjiti učestalost ili težinu napada. Sa druge strane, određeni antiepileptici, poput karbamazepina i fenitoina, pokazali su se kao supresori REM spavanja (Bazil, 2003). Ovaj efekat može biti neželjen za neke pacijente sa epilepsijom, jer bi potencijalno mogao povećati rizik od napada. Stoga, prilikom odluke o farmakoterapiji kod pacijenata sa epilepsijom, neophodno je uzeti u obzir njihov efekat na REM fazu. Kada su u pitanju ne-farmakološke intervencije za moduliranje REM faze, transkranijalna magnetna stimulacija (TMS), koja može selektivno ciljati regije mozga uključene u regulaciju REM faze spavanja, pokazala je sposobnost da modulira ekscitabilnost kod pacijenata sa epilepsijom. U jednoj studiji, TMS primenjen tokom REM faze spavanja

smanjio je ekscitabilnost kortikalnih područja i povećao prag za pojavu napada kod pacijenata s epilepsijom (Fregni i sar., 2006).

Tačni mehanizmi kojima REM faza utiče na ekscitabilnost kod epilepsije nisu u potpunosti razjašnjeni, ali postoji nekoliko aktuelnih teorija. Jedna teorija sugerira da REM faza može poboljšati GABA-ergičku inhibiciju, što bi moglo smanjiti verovatnoću pojave napada (Ferini-Strambi i Zucconi, 2000). Druga teorija sugerira da REM faza može olakšati konsolidaciju memorije i neuroplastičnost, što bi moglo poboljšati kontrolu napada (Nir i Tononi, 2010). Osim toga, pokazano je da REM faza povećava aktivnost određenih neurotransmitera, poput acetilholina, koji mogu imati antikonvulzivne efekte (Gottesmann, 2002). Međutim, važno je napomenuti da efekti REM faze na ekscitabilnost mogu varirati u zavisnosti od specifičnog tipa i težine epilepsije, kao i individualnih faktora pacijenta.

Moore i sar. (2021) su istraživali vezu između faza spavanja i konvulzivnih napada kod pacijenata sa epilepsijom i utvrdili da su napadi bili učestaliji tokom prelaska iz sporotalasnog spavanja (NREM) u REM fazu. Clemens i sar. (2007) su na eksperimentalnom modelu dobili slične rezultate, gde su otkrili da su napadi bili verovatniji tokom REM faze spavanja kod pacova. Ova otkrića sugeriraju da tranzicija iz NREM faze u REM fazu spavanja, kao i sama REM faza, mogu igrati značajnu ulogu u razvoju hiperekscitabilnosti. Jedan od potencijalnih mehanizama zaslužnih za ovaj efekat je promena u neurotransmitterskim sistemima koji se javljaju tokom različitih faza ciklusa spavanja i budnosti. Na primer, nivoi GABA opadaju tokom REM faze, što može dovesti do povećane pobuđenosti u mozgu i povećane incidence konvulzija (Dell'Aquila i Soti, 2022). Takođe, promene u nivoima drugih neurotransmitera, kao što su glutamat i serotonin, takođe mogu doprineti vezi između spavanja i hiperekscitabilnosti (Fisher i sar., 2014). Fragmentacija spavanja je česta pojava kod pacijenata sa apnejom u spavanju (Day i sar., 1999) koja se sastoji od abnormalnog disanja kao glavnog simptoma i ciklične pojave prekida u spavanju sa frekvencom od 30 ili više prekida na sat u teškim formama (Devinsky i sar., 1994).

Studiju o uticaju fragmentisanog spavanja na epileptogenezu podelili smo na akutnu i hroničnu kako bi stekli bolje razumevanje efekta ovog fenomena na moždanu ekscitabilnost i istražili potencijalne mehanizme koji su odgovorni za ovu povezanost. Fragmentacija spavanja i intermitentna hipoksija su glavna obeležja OSA kod koje je primećeno snižavanje praga za nastanak konvulzivnih napada (Malow i sar., 2003). Neodgovoreno pitanje u trenutno dostupnoj literaturi je i do kog nivoa fragmentacija spavanja doprinosi sniženju praga ekscitabilnosti kod apnoičnih pacijenata. Da bi se odgovorilo na ovo pitanje, Baud i sar. (2015) su sprovedli studiju o efektima hronične fragmentacije spavanja na podložnost za konvulzije na animalnom modelu. Istraživači su otkrili da hronična fragmentacija spavanja u trajanju od 24 sata dnevno dovodi do povećane podložnosti za konvulzije kod pacova. Međutim, studija nije obuhvatila efekte različitih nivoa fragmentacije spavanja na podložnost za konvulzije.

U preglednom radu koji je objavio Stepanski (2002), definisani su različiti nivoi fragmentacije spavanja (akutni, subakutni i hronični) kao i minimalna učestalost prekida kako bi se spavanje smatralo fragmentisanim. Akutna fragmentacija uključuje prekid spavanja na 30 sekundi svakih pet minuta tokom jednog sata, subakutna prekid spavanja na 30 sekundi svakih pet minuta tokom šest sati dnevno sedam uzastopnih dana, a hronična fragmentacija prekid spavanja na 30 sekundi svakih pet minuta tokom šest sati dnevno četrnaest uzastopnih dana.

Ovi različiti nivoi fragmentacije spavanja omogućili su istraživačima da ispituju efekte kratkoročne i dugoročne fragmentacije spavanja na podložnost za konvulzivne napade kod

pacova. Otkrili su da i akutna i hronična fragmentacija spavanja povećavaju podložnost za pojavu epileptičnih napada, pri čemu hronična fragmentacija ima veći uticaj. Ipak, ni ova studija nije dala odgovor za uticaj visokofrekventne fragmentacije spavanja, po uzoru na onu kod pacijenata sa OSA, na ekscitabilnost.

Naša studija je dala odgovor na ovo pitanje izolovanim ispitivanjem uticaja hronične visokofrekventne fragmentacije spavanja na pojavu konvulzija u eksperimentalnim uslovima. Efekat dugotrajne fragmentacije spavanja u trajanju od 14 dana, korišćen je u saglasnosti sa Baud i sar. (2015), kako bi se procenili hronični efekti, sa razlikom u trajanju fragmentisanog perioda, s obzirom da su Baud i sar. koristili 24h fragmentaciju, dok smo mi primenili fragmentaciju 6/24h, koja je po našem mišljenju bolja za razumevanje njenih efekata s obzirom da je to prosečno trajanje spavanja.

U prvom delu istraživanja ispitivan je uticaj akutne fragmentacije spavanja, u trajanju od 6 sati svetle faze, na pojavu konvulzija kod eksperimentalnih životinja. Modulacija spavanja postignuta je uz pomoć tredmila za male eksperimentalne životinje koji je kontrolisan softverskim paketom uz konstantan nadzor istraživača, prema već prethodno opisanom protokolu (30 prekida u toku jednog sata po šemi prekida koja se javlja kod pacijenata sa teškom opstruktivnom apnejom u spavanju). Naši rezultati pokazali su da ovakav poremećaj arhitekture spavanja potencira i bihejvioralne i EEG karakteristike epileptične aktivnosti kod pacova. U našem istraživanju akutna fragmentacija spavanja dovela je do značajnog povećanja incidence i inteziteta konvulzija, dok je skratila latentni period od davanja subkonvulzivne doze lindana do pojave napada. Štaviše, akutna fragmentacija spavanja u trajanju od 6 sati značajno je povećala broj iktalnih perioda kod eksperimentalnih životinja.

Neophodno je istaći da se efekti akutne i hronične fragmentacije spavanja značajno razlikuju, pre svega u smislu reakcije na stres, somatskog bola, smanjenog kvaliteta života, poremećaja raspoloženja i kognitivne disfunkcije (Medic i sar., 2017). U oba istraživanja, ispitivanje uticaja akutne i hronične fragmentacije spavanja na ekscitabilnost, korišćen je isti protokol za fragmentaciju spavanja u istim eksperimentalnim uslovima, koji imitira poremećaj spavanja u opstruktivnoj apneji u spavanju. Korišćenjem ovog specifičnog protokola fragmentacije, pomeranje (eng. *Shift*) u cirkardijalnom ritmu ili REM rebound efekat je moguć i postoji velika mogućnost njegove pojave.

"*Sleep shift*" se odnosi na promenu u vremenu i raspodeli faza spavanja, smanjenje trajanja dubokih faza sporotalasnog spavanja (eng. *slow-wave sleep*) i povećanje trajanja površnih faza (NREM faza 1) i REM spavanja. Ova promena se smatra kompenzatornim odgovorom na ponavljana buđenja i fragmentaciju spavanja koja se javlja tokom OSA (Almeneessier, 2020). Sa druge strane, "*REM rebound*" efekat je kompenzatorno povećanje REM spavanja nakon perioda smanjenog ili odsutnog REM spavanja. Kod osoba sa OSA, REM spavanje često je poremećeno zbog učestalih buđenja i fragmentacije spavanja. Međutim, tokom perioda dobre kontrole apneje, kao što je nakon početka terapije kontinuiranim pozitivnim pritiskom (CPAP terapije), dolazi do povećanja frekvencije i dužine REM spavanja, što se smatra *rebound* efektom (Cheng i sar., 2021).

I "*sleep shift*" i "*REM rebound effect*" su primećeni kod osoba sa OSA i mogu imati važne implikacije za kvalitet spavanja i ukupno zdravlje. Razumevanje ovih pojava može pomoći u formiranju strategija lečenja za osobe sa OSA. Ipak oba ova fenomena su irelevantna u našem slučaju s obzirom da se ovaj efekat svakodnevno javlja kod pacijenata sa OSA.

U drugom delu studije pokazali smo da dugotrajna visokofrekventna fragmentacija značajno facilitira konvulzivne napade. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa činjenicom da je indukcioni prag za nastanak konvulzivnog napada izuzetno osetljiv na promene obrazaca spavanja. Efekti dugotrajne fragmentacije spavanja bili su značajno teži u odnosu na akutnu fragmentaciju, i doveli su do povećanja ne samo incidence napada, već i bihevioralne i EEG epileptične aktivnosti nakon administracije subkonvulzivne doze lindana.

Postoji nekoliko pretpostavki vezano za uzroke uočene razlike u efektima akutne i hronične fragmentacije spavanja, polazeći od alteracije HPA osovine (Bonnet i Arand 2003) do REM rebound efekta kod hroničnog gubitka spavanja (Shrivastava i sar., 2014) i modifikovanja arhitekture spavanja (Bonet i Arand, 2003). Ipak, definitivni odgovor na ovo pitanje još uvek nije pronađen. U velikom broju studija proučavan je uticaj totalne deprivacije spavanja kao i REM deprivacije na psihološke poremećaje i ponašanje (Bonnet, 1986), kao i njihov odnos sa epilepsijom (Hrnčić i sar., 2013). Ipak, značajno manji broj studija bavio se fragmentacijom spavanja i njenim uticajem na organizam. U fokusu sprovedenih studija do sada (Bonnet, 1986; Levine i sar., 1987; Downey i Bonnet, 1987) bilo je razgraničenje fragmentacije spavanja kao entiteta od deprivacije spavanja, kao i utvrđivanje minimalnog perioda za koji spavanje ne sme biti prekinuto kako ne bi izgubilo svoje pozitivne efekte. Na osnovu ovih kliničkih istraživanja može se zaključiti da se fragmentacija spavanja odnosi na prekide spavanja sa frekvencijom od 6 do 60 na sat, a sve sa većom ili manjom incidencom prekida ne potpada pod ovaj entitet. U našim eksperimentima koristili smo fragmentaciju spavanja sa incidencom 30 prekida/sat u eksperimentalnim grupama (SF), dok je kod kontrolnih grupa za aktivnost tredmila korišćen protokol od 1.5 prekida/sat (AC). U dizajniranju protokola uzeli smo u obzir da je kod pacova ciklus spavanja (i REM i NREM) kraći nekoliko minuta u poređenju sa ljudima (90-110 min) kao i da postoje razlike u obrascima spavanja (monofazno vs. polifazno) (Campbell i Tobler, 1984; Trachsel i sar., 1991; Diniz Behn i Booth, 2011). Ipak, neuromehanizmi koji kontrolišu periode budnosti i spavanja, kako homeostatski tako i cirkadijalni, su visoko očuvani kroz evoluciju i među vrstama (Brown i sar., 2012). Za eksperimentalni model epilepsije korišćen je lindan, koji je već opisan u literaturi (Vučević i sar., 2008). Sama fragmentacija spavanja nije dovela do pojave znakova iktalne aktivnosti kod eksperimentalnih životinja (SFc). Takođe, neophodno je napomenuti da nisu primećene ni bihevioralne ni EEG promene kod kontrolnih grupa životinja (ACc i TCc). Sa druge strane, akutna fragmentacija spavanja je dovela do značajnih bihevioralnih i EEG promena kod eksperimentalnih grupa životinja.

Već je prethodno pokazano da postoji povećan broj pacijenata sa opstruktivnom apnejom u spavanju koji kao pridruženu bolest imaju i epilepsiju (Sonka i sar., 2000). Štaviše, udruženost epilepsije i opstruktivne apneje u spavanju je veoma česta. Njihova zajednička pojava može biti slučajna, ali kada se jave zajedno, interreaguju i značajno se facilitiraju međusobno (Manni i sar., 2005). Takođe opisano je da terapija apneje u spavanju sa kontinuiranim pozitivnim respiratornim pritiskom (CPAP) ima značajne pozitivne efekte na refraktarnu epilepsiju kod ovih pacijenata (Pornsriyom i sar., 2014), kao i na dnevnu somnolenciju i nedostatak pažnje (Hoyt, 2005; Soldatos i Paparrigopoulos, 2005). Intermitentna hipoksija sa konsekutivnom hipoksemijom kod apneje u spavanju je već uspostavljena hipoteza povećanja ekscitabilnosti CNS-a (Seyal i sar., 2010). Naime, hipoksija ima prokonvulzivni efekat (Jensen i sar., 1991; Jensen i sar., 1992) preko različitih mehanizama koji uzrokuju glutaminergičku neurotransmisiju posredstvom mikroglije (Rubaj i sar., 2003; Yang i sar., 2013). Intermitentna hipoksija i fragmentacija spavanja kod ovog poremećaja najverovatnije imaju aditivni ili čak sinergistički efekat, s obzirom da se zajedno javljaju kod opstruktivne apneje u spavanju, ali,

imajući u vidu prirodu oba fenomena, jako ih je teško odvojeno proučavati u kliničkim uslovima. U našim istraživanjima koristili smo eksperimentalni dizajn uspostavljen od strane McKenna i sar. (2007) koji nam je omogućio da pokažemo da fragmentacija spavanja odvojeno kao entitet (bez konkomitentne hipoksije) uzrokuje facilitaciju konvulzivnih napada. Ipak, značaj eksperimentalne fragmentacije spavanja kao posebnog entiteta sa isključenjem intermitentne hipoksije, je još uvek upitan i neophodno je da bude dalje istražen. Na primer, fenomen fragmentacije je neophodno da bude prolongiran kako bi potencijalno izazvao značajnije efekte na više kognitivne funkcije (Ward i sar., 2009). Ovako značajan efekat koji fragmentacija spavanja uzrokuje na incidencu i intezitet konvulzija može biti posledica ili poremećaja arhitekture spavanja i fragmentacije ili gubitka dužine trajanja spavanja (Jain i sar., 2013). McKenna i sar. (2007) su pokazali da visokofrekventna fragmentacija spavanja u trajanju od 6 sati uzrokuje značajno produženje perioda budnosti sa smanjenjem latentnog perioda do započinjanja spavanja i povećanje delta aktivnosti u NREM fazi kao i značajno produženje NREM faze tokom perioda oporavka. Takođe, skraćenje pojedinih faza spavanja može nam pomoći da bolje razumemo mehanizme modulatornog efekta fragmentacije spavanja koja se javlja kod opstruktivne apneje u spavanja na pojavu napada. Naime, pokazano je da je REM spavanje krucijalno za pojavu epilepsije, a dovoljno trajanje REM faze smanjuje ekscitabilnost (Hrnčić i sar., 2011). Neophodno je istaći da ova manipulacija spavanjem imitira fragmentaciju spavanja viđenu kod apneje u spavanju.

Dobar kvalitet spavanja je važan za optimalno funkcionisanje organizma, ali je od esencijalnog značaja kod pacijenata sa epilepsijom jer nedostatak istog dovodi do pogoršanja napada, povećanja učestalosti i refraktarne epilepsije (Bazil, 2017). Takođe, ova naša studija mogla bi dati odgovor na pitanje zašto terapija sa kontinuiranim pozitivnim respiratornim pritiskom (CPAP) nije dovoljna za tretman OSA u smislu kontrole epilepsije (Malow i sar., 2003; Bazil, 2017). Pozitivni efekti CPAP terapijskog protokola su pokazani kod oko 40% tretiranih pacijenata sa OSA (Vaugh i sar. 1996; Beran i sar., 1999; Sonka i sar., 2000), sa prosečnim smanjenjem incidence od oko 50% kod tretiranih pacijenata (Pornsriyom i sar., 2014). Zaista, već je dokazano da je hipoksija značajan prokonvulzivni faktor (Jensen i sar., 1991, 1992), facilitacijom glutaminičke neurotransmisije (Rubaj i sar., 2003, Yang i sar., 2013). Ipak ukoliko CPAP nije adekvatno primenjen, može rezultovati pojavom novih napada (Miano i sar., 2008). Imajući u vidu naše rezultate možemo pretpostaviti da fragmentacija spavanja može biti mehanizam zaslužan za snižavanje praga za nastanak konvulzivnog napada u apnoičnim uslovima.

Epileptogeneza je kompleksan proces koji se karakteriše trajnom predispozicijom za nastanak konvulzija, i povezana je, između ostalog, i sa promenama u imunskom sistemu (Vezzani i sar., 2002; Lehtimaki i sar., 2007; Rosa i sar., 2016). Već je pokazano da poremećaji spavanja imaju veoma značajan uticaj na neuroinflamaciju, koja predstavlja proces u kome imuni sistem odgovara na povrede ili oboljenja centralnog nervnog sistema. Hronična deprivacija spavanja, apneja u spavanju i druge forme poremećaja spavanja su povezane sa povećanim nivoima proinflamatornih citokina u mozgu, što može dovesti do neuroinflamacije i neuroloških poremećaja. U jednoj studiji pokazano je da hronična deprivacija spavanja dovodi do povećanog nivoa interleukina 6 (IL-6) i TNF- α u mozgu, dva proinflamatorna citokina za koje je poznato da su uključeni u proces neuroinflamacije (Zielinski i sar., 2014). U drugoj studiji pokazano je da apneja u spavanju povezana sa povećanim nivoom C reaktivnog proteina (CRP), još jednim od markera inflamacije (Unnikrishnan i sar., 2015).

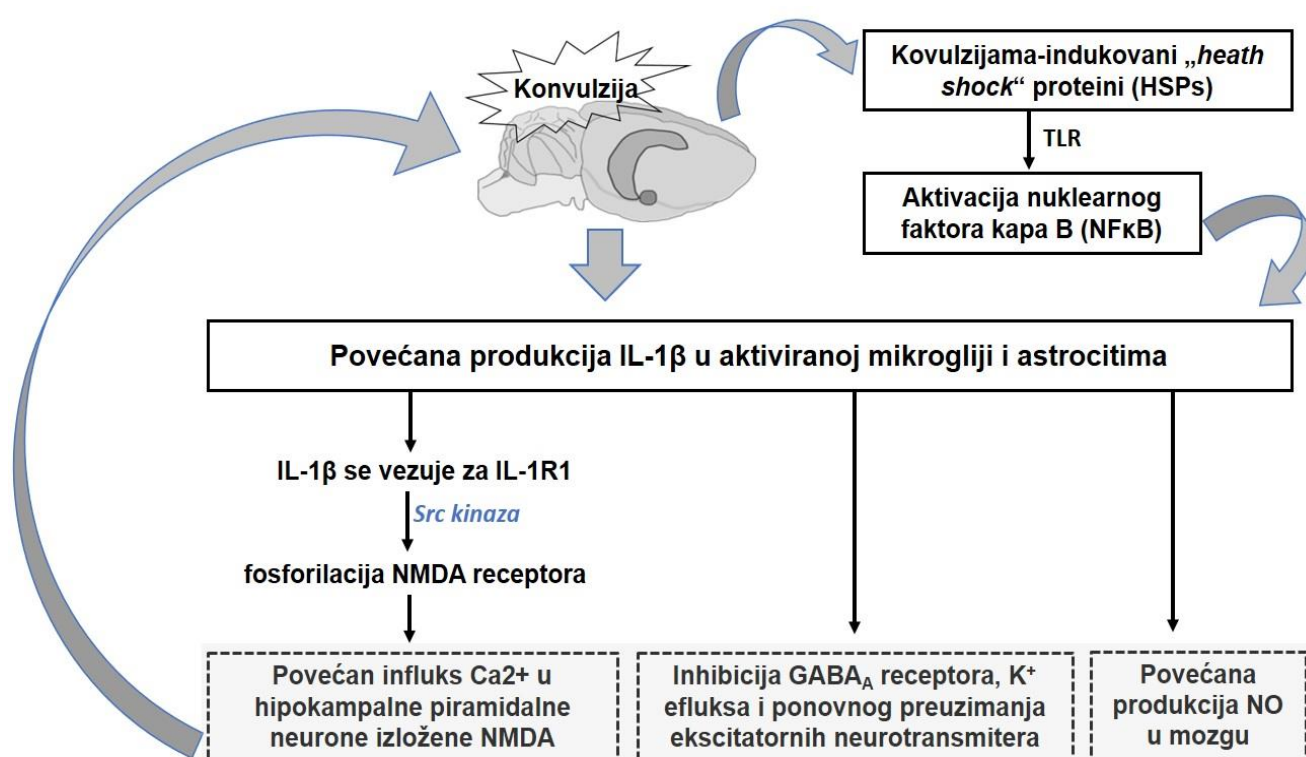
Ova istraživanja sugerišu da disrupcija spavanja može da ima značajnu ulogu u razvoju neuroinflamacije, što može doprineti u patogenezi velikog broja neuroloških poremećaja kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest i druga neurodegenerativna oboljenja (Irwin i sar., 2016; Leng i sar., 2019).

U našoj studiji nivoi IL-1 β su bili povišeni u talamusu, korteksu i hipokampusu životinja iz SF grupe, u odnosu na AC i TC grupu. Nije bilo statistički značajne razlike između AC i TC grupe, ali nivoi IL-1 β su bili veći u kontrolnoj grupi za aktivnost na tredmilu u odnosu na sedentarnu kontrolnu grupu, tako da ne može se u potpunosti isključiti fizička aktivnost kao pridruženi faktor za ovo povećanje. Kada su u pitanju vrednosti IL-6, statistički značajno povećanje postojalo je samo u korteksu fragmentisanih životinja, dok u hipokampusu i talamusu nije bilo statistički značajne razlike.

Odnos između epilepsije i vrednosti IL-1 β još uvek nije razjašnjen u kliničkim studijama: u nekima je dokazana povezanost, u drugim nije (Tilgen i sar., 2002; Virta i sar., 2002; Kanemoto i sar., 2003; Ozakara i sar., 2006). Sa druge strane, bazične eksperimentalne studije daju nam veću mogućnost da se uspostavi povezanost između povišenih vrednosti IL-1 β i povećane konvulzivne aktivnosti. Vezzani i sar. (1999) su prvi objavili da IL-1 β pojačava fokalnu elektroencefalografsku aktivnost konvulzija indukovanih kainatom posredstvom glutaminičke neurotransmisije. Inflamatorne alteracije kod pacova tokom konvulzivnih epizoda se karakterišu brzim porastom nivoa IL-1 β u aktiviranim mikroglijama i astrocitima (Fabene i sar. 2008). Štaviše, ovi povišeni nivoi IL-1 β održavaju se i nakon prestanka napada, što dodatno doprinosi hipotezi o uticaju IL-1 β u mehanizmu nastanka spontanih konvulzivnih napada (Allan i sar., 2005; Fabene i sar., 2008). Aktivacija IL-1 β signalnog puta odvija se preko netranskriptivno zavisnih enzimskih puteva, koji uključuju IL-1R1 posredovanu aktivaciju neutralne sfingomijelinaze (Sanchez-Alvarez i sar., 2006) i posledičnu produkciju ceramida koji aktivira Src-tirozin kinazni protein (Sanchez-Alvarez, 2006). Nakon toga, IL-1 β pospešuje influks kalcijuma u hipokampalne piramidalne ćelije koje su izložene N-metil-D-aspartatu (NMDA) fosforilacijom (preko Src kinaze) NR2B subjedinice NMDA receptorskog kompleksa, koji je zaslužan za regulisanje permeabilnosti za jon Ca (Viviani i sar., 2003). Kada je oslobođen IL-1 β se sa visokim afinitetom veže za tip 1 IL-1 receptora (IL-1R1) koji je eksprimiran na hipokampalnim neuronima (Ravizza i Vezzani. 2006). Nasuprot tome, kada konvulzija izazove rapidnu produkciju IL-1 β , ushodna regulacija IL-1RA je usporena i odložena obično na nekoliko sati (De Simoni i sar., 2000; Raviza i Vezzani. 2006). Ova činjenica sugeriše da je centralni nervni sistem značajno manje efektivan od perifernog u obuzdavanju efekata povišene aktivnosti endogenog IL-1 β .

Konvulzije su obično praćene i ekstenzivnim oštećenjem neurona, što može dati odgovor na razlog povećane produkcije IL-1 od strane mikroglija (Snchez-Alvarez i sar., 2006). Na ćelijskom nivou Toll-like receptori (TLR), aktivirani konvulzijom indikovanim *heath shock* proteinima (HSP) indukuju aktivaciju nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B), koji dovodi do produkcije IL-1 β (Hanke i Kielian. 2011). TLR3 doprinose hipokampalnoj ekscitabilnosti ushodnom regulacijom receptora za proinflamatorne citokine kao što je INF- β (Costelo i Lynch. 2013). FOX3P je takođe eksprimiran od strane mikroglija u cilju nishodne regulacije inflamatornog procesa, modulacijom NF κ b, ključnog inflamatornog transkripcionog faktora (Chung i sar., 2010). Uključenost ovih mehanizama u povećane vrednosti IL1 β koje su viđene u našoj studiji, ostaje otvoreno pitanje na koje je neophodno odgovoriti u nekoj od narednih studija. Ovaj mehanizam je podržan i antikonvulzivnim efektom IL-1 β u bikukulinom izazvanim napadima kod eksperimentalnih životinja (Vezzani i sar., 2002). U našoj studiji povećani nivoi

IL-1 β u cerebralnom korteksu, hipokampusu i talamusu u SF grupi su u saglasnosti sa hipotezama o prokonvulzivnoj ulozi i neurotoksičnim efektima IL-1 β . Prokonvulzivna uloga može biti postignuta posredstvom nekoliko mehanizama: IL1 β se ponaša kao direktni prokonvulzivni agens kroz inhibiciju GABA_A receptora i K⁺ efluks (Wang i sar., 2000); inhibira preuzimanje ekscitatornih neurotransmitera od strane glije (Hu i sar., 2000) i uzrokuje intracelularni influks jona kalcijuma, rezultujući tako modifikacijom voltažno zavisnih jonskih kanala i redukcijom praga za nastanak konvulzija (Viviani i sar., 2003; Xu i sar., 2013). Drugi mehanizmi takođe mogu biti uključeni, na primer, poznato je da IL-1 β povećava produkciju azot-dioksida (NO) u mozgu (Meini i sar., 2000), kao i da stimuliše glutaminergičku neurotransmisiju i uzrokuje neuronalnu hiperekscitabilnost (Zhu i sar., 2006). Nasuprot našim rezultatima Sayyah i sar. (2005) su prijavili antikonvulzivni efekat intraventrikularno apliciranog IL-1 β kod „*amigdala-kindling*“ miševa, što se potencijalno može objasniti sa sposobnošću IL-1 β da modulira intracelularnu koncentraciju jona Ca²⁺ na dozno-zavisan način, balansirajući tako ekscitatornu i inhibitornu neurotransmisiju (Zhu i sar., 2006; Li i sar., 2011). Shematski prikaz predloženih mehanizama prikazan je na Slici 5.1.



Slika 5.1. Shematska reprezentacija aktivacije IL-1 β i posledične pojave hiperekscitabilnosti

Za detalje pogledati poglavlje Diskusija 5.2.

Pored IL-1 β , epileptogeneza je takođe povezana i sa alteracijama u IL-6, ali je njegov efekat još uvek nedovoljno razjašnjen, a dostupne studije su kontradiktorne (D*Arcangelo i sar., 2000). Nakon napada, IL-6 iRNA je rapidno stimulisana u hipokampusu, korteksu, dentatnom girusu i amigdala, dok je ushodna regulacija IL-6 receptora iRNK ograničena samo na hipokampus (Lehtimaki i sar., 2003). Nekoliko kliničkih studija je pokazalo rapidno i prolazno postiktalno povećanje IL-6 koje dostiže maksimum nakon 12h i zadržava se 24 sata nakon konvulzije. Ipak, neki pacijenti sa hroničnom epilepsijom imali su povećane nivoe IL-6 i u bazalnim uslovima (Virta i sar., 2002; Lehtimaki i sar., 2004; Lehtimaki i sar., 2007; Alapirrti i sar., 2009). Različiti tipovi epilepsije pokazali su različite obrasce u povećanju IL-6. Uzimajući

u obzir niže postiktalne nivoe IL-6 kod ozbiljnih formi epilepsije, možemo zaključiti da se IL-6 potencijalno ponaša kao protektivni agens (Bauer i sar., 2009). Nasuprot ovom mišljenju, postoje podaci da je egzogeno apliciran IL-6 doveo do atenuacije konvulzija kod pacova (Fukuda i sar., 2007). Studije sa transgenetskim pacovima reflektuju dvostruku prirodu IL-6, te su životinje deficitarne u IL-6 podložnije na konvulzije, a one sa prekomernom ekspresijom IL-6 imaju manji prag za nastanak spontanih napada i NMDA indukovanih napada, najverovatnije usled redukovane GABA posredovane inhibicije (De Sarro i sar., 2004).

U našoj studiji povišeni nivoi IL-1 β i IL-6 su pronađeni u korteksu koji je uvek uključen u patogenezu konvulzivnog napada (Alapirrti i sar., 2018).

IL- β je prepoznat kao prokonvulzivni i proinflamatorni citokin. Sa druge strane, IL-6 je plejotropni citokin koji ima obe uloge i pro- i anti-inflamatornu sa predominantno antikonvulzivnom prirodom (Erta i sar., 2012). U našem istraživanju pronađeni su povišeni nivoi IL-1 β u korteksu, hipokampusu i talamusu, sa IL-6 povećanim jedino u korteksu, nakon hronične fragmentacije spavanja. Možemo pretpostaviti da IL-1 β može doprineti epileptogenezi u našoj studiji, modulacijom ili blokiranjem IL-6 posredovanog prenosa signala u hipokampusu i talamusu, imajući u vidu da je takva interakcija već potvrđena u drugim organskim sistemima (Deon i sar., 2001). Naime, antagonizam se može dogoditi na nivou prenosa signala; npr. pokazano je da IL-1 β suprimira Janus-STAT kinazni signalni put pomoću IL-6, i antagonizuje IL-6 posredovanu indukciju tkivnog inhibitora ekspresije metaloproteinaze 1 (Deon i sar., 2001). Neuroinflamacija je zavisna od citokina, glijalne i neuronalne transdukcije signala, kako u ekstracelularnom matriksu tako i u svim komponentama koje su međusobno povezane. Povećani nivoi IL-6 u korteksu mogu da budu kompenzatorni odgovor u cilju balansiranja poremećenog odnosa proinflamatornih i antiinflamatornih citokina. Ovo potvrđuje i činjenica da je primećena ushodna regulacija IL-6 u uslovima povećane ekscitabilnosti (Uludag i sar., 2013), što je verovatno i slučaj u našem istraživanju.

Naša studija je pokazala da fragmentacija spavanja dovodi do pojave ponašanja koje je karakteristično za anksiozni poremećaj, a efekti fragmentacije su direktno proporcionalni vremenu za koje je spavanje narušeno. Kvantitativna analiza svih bihevioralnih testova koji su sprovedeni na eksperimentalnim životinjama pokazala je ponašanje indikativno za anksioznost, što je podrazumevalo manji broj propinjanja na zadnje šape, kraće vreme provedeno u centru i veći indeks tigmotaksije u testu otvorenog polja, kod životinja kojima je fragmentisano spavanje; kao i kraće vreme provedeno u otvorenom kraku i svetlom kompartmanu, kao i smanjen broj tranzicija iz svetla u tamu, u testovima uzdignutog krstastog lavirinta i svetlo/tama. Kod grupe životinja kojima je akutno fragmentisano spavanje ELISA testom utvrđeni su statistički značajno niži nivoi testosterona, progesterona i estradiola u odnosu na životinje iz kontrolnih grupa. Hronična fragmentacija spavanja značajno je uticala na pojavu oksidativnog stresa u centralnom nervnom sistemu pacova, sa koncentracijom MDA značajno većom u sve tri izolovane strukture (talamus, hipokampus i korteks) kod životinja iz eksperimentalne grupe, sniženom aktivnošću SOD, gubitkom *thiol* grupa u talamusu i korteksu fragmentisanih životinja i značajno manjom aktivnošću Gpx enzima u sve tri izolovane strukture.

Ova veza između poremećaja spavanja i anksioznosti bila je fokus i drugih studija koje su ispitivale druge oblike moduliranog spavanja. Jedno od glavnih saznanja sprovedenih studija u ovoj oblasti jeste da poremećaji spavanja mogu povećati rizik od razvoja anksioznosti, što je u saglasnosti sa rezultatima naše studije. Na primer, meta-analiza Taylora i sar. (2005) pokazala

je da poremećaji spavanja povećavaju rizik od razvoja anksioznosti, a anksioznost povećava rizik od razvoja poremećaja spavanja. Dodatno, poremećaji spavanja mogu narušiti emocionalnu regulaciju i kognitivne procese neophodne za efikasno suočavanje sa stresom i anksioznošću. Konkretno, mogu umanjiti sposobnost regulacije emocija, što dovodi do povećanja negativnih emocija kao što su anksioznost, briga i strah. Osim toga, poremećaji spavanja mogu ometati pažnju i kogniciju, što otežava obradu i pamćenje informacija povezanih sa suočavanjem sa stresom i anksioznošću. Baglioni i sar. (2011) analizirali su podatke iz nekoliko epidemioloških studija i utvrdili da osobe sa nesanicom imaju veći rizik od razvoja anksioznih poremećaja u odnosu na one bez nesаницe. Autori su takođe primetili da je nesanica prediktor kasnije depresije, što može ukazivati na zajednički osnovni mehanizam kod poremećaja spavanja i poremećaja raspoloženja. Slično tome, Franzen i sar. (2008) su sproveli studiju na mladim odraslim osobama i utvrdili da poremećaji spavanja značajno predviđaju simptome anksioznosti. Autori su sugerisali da poremećaji spavanja mogu biti rani marker anksioznosti, budući da su prethodili razvoju simptoma anksioznosti.

Potencijalni mehanizmi povezivanja poremećaja spavanja i anksioznosti uključuju:

1. Neurobiološke faktore: Spavanje i anksioznost dele nekoliko neurobioloških puteva, uključujući hipotalamo-hipofizo-adrenalnu (HPA) osu, amigdalnu i prefrontalni korteks. Poremećaji u ovim putevima mogu dovesti do poremećaja spavanja i anksioznosti.
2. Kognitivne faktore: Poremećaji spavanja mogu dovesti do kognitivnih oštećenja, poput pažnje usmerene na negativne podražaje i ruminacija, što je takođe povezano sa anksioznošću.
3. Bihevioralne faktore: Osobe sa poremećajima spavanja mogu izbegavati određene aktivnosti, poput socijalnih interakcija ili vežbanja, što može doprineti razvoju anksioznosti.

Pokazano je da deprivacija spavanja ima značajan uticaj na anksioznost. U meta analizi Kalmbacha i sar. (2018) dokazano je da deprivacija spavanja dovodi do egzacerbacije simptoma anksioznosti. Smatra se da je odnos obostran i da anksioznost takođe dovodi do pogoršanja poremećaja spavanja (Kalmbach i sar., 2018). Jedan od potencijalnih mehanizama kojim se može objasniti ova povezanost je uticaj deprivacije spavanja na regulaciju emocija. Adekvatno spavanje je neophodno za valjano procesuiranje emocija, dok deprivacija spavanja dovodi do pojave negativnih emocija i posledično anksioznosti (Kalmbach i sar., 2018). Pored toga, deprivacija spavanja može oštetiti kognitivne procese koji su neophodni za suočavanje sa anksioznošću, poput pažnje i memorije (Thompson i sar., 2022). Ona takođe dovodi do povećane aktivacije amigdale, regiona mozga koji je uključen u procesuiranje emocija, uključujući anksioznost (Tempesta i sar., 2021). Osim toga, deprivacija spavanja može pogoršati postojeće simptome anksioznosti. Osobe sa anksioznim poremećajima mogu imati problema sa uspavlivanjem ili održavanjem sna, što dovodi do povećanog nedostatka spavanja i pogoršanja simptoma anksioznosti (Thompson i sar., 2022). Nadalje, nedostatak spavanja može oštetiti sposobnost donošenja odluka i rešavanja problema, što dovodi do smanjene sposobnosti za upravljanje situacijama koje izazivaju anksioznost (Tempesta i sar., 2021).

Fragmentacija spavanja u ovoj studiji je modelovana tako da izazove prekide spavanja slične onima koji se javljaju kod pacijenata sa OSA. Prethodni rezultati o uticaju narušene arhitekture spavanja na ponašanje povezano sa anksioznošću kod pacova su kontradiktorni, a o tačnim uzrocima uočenih razlika se još uvek raspravlja (Bonnet i Arand, 2003; Pires i sar., 2016).

Naime fragmentacija spavanja je povećala „grooming“, ali nije imala nikakvog efekta na stereotipno ponašanje, lokomotiju ili rezultat na testu uzdignutog krstastog lavirinta prema rezultatima Tufika i sar. (2009). Sa druge strane, pokazano je da fragmentacija spavanja značajno snižava incidencu propinjanja na zadnje šape, indikator vertikalne aktivnosti koji je povezan sa eksplorativnim ponašanjem. Dodatno, Suchecki i sar. (2002) su pokazali da su pacovi imali smanjenu lokomotornu aktivnost i naglašene bihevioralne parametre karakteristične za anksioznost nakon fragmentacije spavanja postignute uz pomoć metodologije sa platformom. Prijavljeni su i letalni ishodi nakon hronične fragmentacije spavanja u eksperimentalnim uslovima (Tufik i sar. 2009). Potencijalno objašnjenje različitih rezultata može biti i posledica različite interpretacije rezultata kao i različite metodologije koja je upotrebljena za postizanje disrupcije spavanja.

S obzirom na različite rezultate iz dostupne literature, naročito kada je u pitanju anksiogeni potencijal akutne i hronične disrupcije spavanja, studiju o ispitivanju anksiogenog potencijala fragmentacije spavanja smo podelili na dva dela: akutnu-u kojoj je ispitivan uticaj fragmentacije spavanja u trajanju od 6 sati na parametre anksioznosti eksperimentalnih životinja; subakutnu i hroničnu-u kojoj je ispitivan uticaj prolongirane fragmentacije (u trajanju od 6h od 24h, tokom sedam dana i 6h/24h tokom 14 dana) i posmatrana vremenska zavisnost opserviranih promena.

Manipulacija spavanjem u našoj studiji je dizajnirana prema već uspostavljenoj i široko primenjivanoj metodologiji za fragmentaciju spavanja, koja uključuje dve kontrolne grupe (sedentarnu-TC i kontrolnu grupu za lokomotornu aktivnost-AC) i eksperimentalnu grupu kojoj je fragmentisano spavanje-SF (Guzman-Marin i sar., 2007). Izabrali smo model visokofrekventne fragmentacije spavanja sa segmentima od 2 minuta u kojima je spavanje fragmentisano u trajanju od 30 sekundi, a segmenti se nasumično ponavljaju. Eksperiment je sproveden tokom svetle faze u trajanju od 6 sati, s obzirom da se u tom periodu odvija najveća količina spavanja u fiziološkim uslovima. Ovaj protokol je izabran da najbolje oponaša promene kod pacijenata sa teškom apnejom u spavanju, kod kojih periodi hipopneje ili apneje često traju 10-60 sekundi u intervalima od 1-2 minuta.

Prema prethodnim studijama u kojima je primenjivano polisomnografsko registrovanje (McKenna i sar., 2007), životinje koje su bile izložene fragmentaciji spavanja u trajanju od 6 sati, imale su značajno duže trajanje perioda budnosti (sa 29.2% na 65.0%). Štaviše, procenat i NREM i REM faze spavanja je bio smanjen, a isto se odnosi na prosečno trajanje NREM faze spavanja. Sve gore spomenute činjenice ukazuju da je ovim životinjama spavanje bilo fragmentisano. Uzimajući u obzir ove rezultate, zajedno sa našim prethodnim iskustvom sa ovom metodologijom, mi, u cilju izbegavanja izlaganja životinja dodatnom stresu, nismo standardno radili polisomnografiju na životinjama. Ako pogledamo sam eksperimentalni dizajn za TC, AC i SF grupe (0, 1.5 i 30 prekida spavanja po satu) možemo videti da AC grupa ima zanemarljiv broj prekida spavanja. Protokol za AC grupu je dizajniran kako bi se anulirali pridruženi efekti koje kretanje na traci tredmila potencijalno može izazvati, slično kao u drugim studijama (McGuire i sar., 2008). Dužina pređenog puta za životinje iz AC grupe je potpuno jednaka onoj kod životinja iz SF grupe, s tim da je spavanje životinja u ovoj grupi neprekinuto duži vremenski period u odnosu na SF grupu (1.5 prekida po satu naspram 30 prekida/h u SF grupi)(Park i sar., 2014). Ovim se mogu objasniti i pojedine razlike u rezultatima između TC i AC grupe (0 naspram 1.5 prekida/h).

Kada je u pitanju subakutna i hronična manipulacija spavanjem, trebalo bi imati u vidu da je REM rebound efekat moguć. Međutim, dokazano je da nestaje nakon prvog dana bez fragmentacije (Kastin i sar., 2015). U studiji koju su sproveli Trammell i sar. (2014), miševi izloženi 6-satnoj fragmentaciji potpuno su nadoknadili izgubljenu REM fazu spavanja tokom narednog perioda od 18 sati u kojem je bilo dozvoljeno nesmetano spavanje, ali nisu vratili izgubljeno sporotalasno spavanje (SWS), a pritom su zadržali značajan SWS dug na kraju posmatranog perioda. To nije bio slučaj sa fragmentacijom od 12 h/24 h ili 24 h/24 h, jer je SWS dug takođe održavan nakon perioda oporavka, i bio je ekvivalentan dužini trajanja fragmentacije, sa tom razlikom da ovde nije došlo do nadoknade REM faze spavanja. Ovo je takođe bio jedan od razloga zašto smo koristili fragmente spavanja od 6 sati- umesto 12 ili 24 sata. Prema našim saznanjima, ovo je jedina studija koja je uključila obe, subakutne i hronične efekte poremećenog kvaliteta spavanja na anksioznost u istoj grupi životinja.

Rezultati sva tri bihevioralna testa za ispitivanje anksioznosti (test otvorenog polja, test uzdignutog krstastog lavirinta i *light/dark* test) primenjena u ovoj studiji su konzistentni i pokazuju povećan nivo anksioznosti nakon fragmentacije spavanja prema ustaljenim smernicama za interpretaciju (Prut i Belzung, 2003; Bourin i Hascoet 2003; Costall i sar., 1989). Naime, ovi testovi za ponašanje povezano sa anksioznošću snažno sugerišu redukciju eksplorativnog biheviora nakon akutne fragmentacije spavanja. Smanjeno vreme provedeno u centralnom delu, kao i smanjen broj propinjanja na zadnje šape, značajno povećanje indeksa tigmatoksije, kao i prolongirano vreme provedeno u tamnom polju pokazuju da su životinje nezainteresovane za istraživanje nepoznatog regiona. Ovaj bihevioralni obrazac odgovara slici koja se vidi kod anksioznog poremećaja (Prut i Belzung, 2003). Štaviše, povećan indeks tigmatoksije, kao najsenzitivniji znak, pokazuje da životinje imaju tendenciju da se kreću po uglovima, blizu zidova otvorene arene. Sa druge strane, nalaz smanjenog propinjanja na zadnje ekstremitete dodatno potvrđuje smanjenje eksplorativne aktivnosti, samo u ovom slučaju vertikalne komponente. Obrazac ponašanja koji karakteriše očigledan pad u vremenu provedenom u centralnom području otvorenog polja, rast indeksa tigmatoksije, zajedno sa padom broja propinjanja na zadnje ekstremitete, 14. dan u odnosu na 7. dan u SF grupi, jasno pokazuje uticaj koji ima trajanje fragmentisanog spavanja. Rezultati oba testa svetlo/tamno i uzdignutog krstastog lavirinta su u saglasnosti sa rezultatima testa otvorenog polja, budući da su opservirani efekti ozbiljniji kod hroničnih (14 dana) u poređenju sa subakutnim (7 dana) uslovima. Kada je u pitanju prolongirana fragmentacija, pokazano je da anksiozni potencijal narušenog kvaliteta spavanja direktno zavisi od vremena za koje je spavanje fragmentisano ili od dužine fragmentacije.

Iako se veruje da pacijenti sa opstruktivnom apnejom u spavanju (OSA) imaju slabije mentalno zdravlje, brojne studije nisu uspele da pokažu značajnu korelaciju između ova dva fenomena (Bajpai i sar., 2014). Ipak, pretpostavka je da uzrok ove povezanosti može biti u fragmentaciji spavanja ili njegovom lošem kvalitetu. U našim eksperimentima visokofrekventni hronični prekid spavanja doveo je do povećanja anksioznih obrazaca ponašanja kod mužjaka glodara, što je u skladu sa rezultatima Sateie, koji su pokazali da poremećaj kvaliteta i kontinuiteta spavanja predisponiraju razvoj ili pogoršanje mentalnih bolesti (Sateia, 2009). Naši rezultati pobijaju teoriju da psihopatologija kod OSA predstavlja i etiološki uzrok i komplikaciju (Haba-Rubio, 2005) s obzirom da smo jasno pokazali da poremećaj spavanja, sličan onom kod apneje u spavanju, izaziva anksioznost u eksperimentalnim uslovima. Jednom razvijena, anksioznost može dodatno pogoršati kvalitet spavanja stvarajući začarani krug, jer poremećaj spavanja i mentalno zdravlje potiču iz istih

neurobioloških procesa (Haba-Rubio, 2005), što je ovde verovatno slučaj. Prema objavljenim podacima, postoji značajno povećanje u samostalno konstatovanoj anksioznosti, frustraciji, gubitku interesa i motivacije kod pacijenata sa opstruktivnom apnejom u spavanju (Pires i sar., 2016; Suchecki i sar., 2012; Perry i sar., 2008). Štaviše, povećan broj saobraćajnih nezgoda je primećen kod ovih pacijenata, usled nedostatka koncentracije i problema sa kognicijom (Nair i sar., 2011). Kada se analiziraju efekti disrupcije spavanja na fluktuacije raspoloženja i anksioznost, neophodno je da imamo na umu bidirekcionu odnos između ovih entiteta kao i da je diferencijacija uzroka i posledice jako kompleksna. Pored fragmentacije spavanja, pojedine studije sugerišu da se deprivacija spavanja može koristiti kao eksperimentalni model manije kod pacova usled lokomotorne „hiperreaktivnosti“ (Tartar i sar., 2009; Suchecki i sar., 2012).

Kada su u pitanju mehanizmi za nastanak opserviranih promena nakon fragmentacije spavanja, na osnovu prethodnih studija pošli smo od pretpostavke da akutni efekti fragmentacije najpre mogu biti posledica poremećaja u hormonalnoj regulaciji, dok je patofiziološka osnova subakutnih i hroničnih promena značajno komplikovanija, s obzirom na aktivaciju regulacionih mehanizama, pre svega pozitivne povratne sprege na HPA osovini.

Pretpostavlja se da se prvi bihevioralni znaci fragmentacije spavanja manifestuju na nivou emocionalne nestabilnosti (Horne i sar., 1999; Greenwood i sar., 2014). Deprivacija spavanja, kada je dugotrajna, u krajnjoj instanci menja fundamentalne karakteristike funkcionisanja neuroendokrinih stres sistema i tako utiče na nivo anksioznosti (Meerlo i sar., 2008). Nakon akutne fragmentacije spavanja nivoi testosterona, estradiola i progesterona bili su značajno niži kod životinja kojima je bilo fragmentisano spavanje, u poređenju sa obe kontrolne grupe ($p < 0.05$, SF vs. AC i SF vs. TC), što ukazuje na evidentan poremećaj HPA osovine. U isto vreme nije bilo razlike u nivoima kortikosterona nakon fragmentacije spavanja.

Još uvek postoji nedovoljan broj podataka o uticaju fragmentacije spavanja na hormonalni status. Povećana aktivnost HPA osovine usled akutne fragmentacije spavanja, prema Hanu i sar. (2012), najverovatnije je posledica metalnog i/ili fizičkog stresa, pre nego nedostatka spavanja *per se*. Najmanje jedan deo akutnih efekata je rezultat mehanizma povezanog sa kortikotropin oslobađajućim hormonom (CRH). CRH neuroni, formiraju *feed-forward* sistem sa noradrenergičkim sistemom mozga (*locus coeruleus*) promovišući NA aktivnost, što za uzvrat uzrokuje aktivaciju CRH aktivnosti frontalnog režnja i izaziva konvulzivne promene na EEG zapisu (Datta i sar., 2007; Lőrincz i sar., 2017; Hirotsu i sar., 2015). Jedna sedmica parcijalne disrupcije spavanja dovela je do značajnih alteracija u funkcionisanju HPA osovine: smanjenu senzitivnost CRH i 5HT-1A receptora sa povećanjem senzitivnosti nadbubrega na ACTH (Han i sar., 2012; Datta i sar., 2007; Lőrincz i sar., 2017; Hirotsu i sar., 2015; Reul i sar., 2002). Ove alteracije su slične onima koje se mogu videti kod depresije (Han i sar., 2012).

Test otvorenog polja u studiji sprovedenoj od strane Tartar i sar. (2009) pokazao je povećanu eksplorativnu aktivnost nakon 24-časovne deprivacije i fragmentacije spavanja u poređenju sa kontrolnim grupama. Nasuprot našim rezultatima, njihova studija sugerisala je da su primećene razlike u ponašanju životinja posledica aktivacije HPA osovine usled odgovora na stres. Naime životinje iz kontrolne grupe za aktivnost, koja je imala istu količinu kretanja na tredmilu, kao i eksperimentalna grupa, u otvorenom polju su se ponašale slično onima iz sedentarne kontrolne grupe. U isto vreme, ova grupa je pokazala porast vrednosti kortikosterona u odnosu na sedentarnu kontrolnu grupu, sličan porastu kod grupe koja je podvrgnuta deprivaciji i fragmentaciji spavanja. Ovi rezultati mogu biti posledica

prolongiranog boravka na tredmilu (24h) što može uzrokovati aktivaciju stres sistema (Hirotzu i sar., 2015). Štaviše, prema McKenni i sar. (2007), 24-časovna fragmentacija spavanja je povezana sa značajnim alteracijama u REM fazi spavanja, što može biti dodatni pridruženi efekat. Uzimajući u obzir gore spomenute rezultate, odlučili smo da fragmentiramo životinje u trajanju od 6 sati, što je približno jednako njihovom normalnom trajanju spavanja i minimizuje uticaj stresa kao *confounding* faktora.

Veća prevalenca anksioznosti kod žena i hipogonadnih muškaraca u poređenju sa zdravim muškarcima je primećena u brojnim studijama (Gater i sar., 1998; Yonkers, 1997). Povećana simptomatologija u smislu panike u premenstrualnom periodu je bila praćena naglim smanjenjem nivoa progesterona, dok ovi simptomi nisu uočeni tokom trudnoće (Cohen i sar., 1994), što pokazuje da gonadni hormoni utiču na ponašanje. Progesteron ima fundamentalni značaj za održavanje homeostaze steroidnih hormona, s obzirom da se može metabolisati u nekoliko drugih steroidnih hormona. Testosteron se, uz pomoć 5α -reduktaze može metabolisati u dihidrotestosteron (DHT) ili se može aromatizovati u estradiol (Miller i sar., 2011; Oette i Mukhopadhyay, 2004). Dodatno, progesteron i testosteron su prekursori u sintezi neurosteroida (dihidroprogesteron (DHP) i alopregnenolon ili DHT i 3α -diol) (Melcangi i sar., 2008).

Pokazano je da je neurosteroidna homeostaza izmenjena kod depresivnih i anksioznih poremećaja. Antidepresivi delimično imaju dejstvo ponovnim uspostavljenjem neurosteroidnog balansa (Longone, 2011), s obzirom da se ponašaju kao potentan modulator nekoliko neurotransmitera kao što su GABA_A, NMDA, AMPA, $\alpha 1$ i glicin (Rupprecht i Holsboer, 2001).

Pokazano je da progesteron potencira anksiolitički i sedativni efekat kod životinja, kako kod ženki tako i tako i kod mužjaka (Reddy i sar., 2005; Soderpalm i sar., 2004). U ovoj studiji, pokazano je da je nivo progesterona smanjen u grupi koja je prošla protokol fragmentacije spavanja (SF grupa, $p < 0.005$). Naši rezultati su konzistentni sa prethodno sprovedenim studijama (Frye i sar., 1994; Carboni i sar., 1996; Majewska i sar., 1986) što sugerise da progesteron modulira ponašanje povezano sa anksioznošću. Administracija progesterona ili njegovih metabolita smanjila je ponašanje povezano sa anksioznošću na mužjacima i ženkama pacova (Carboni i sar., 1996; Majewska i sar., 1986). Progesteron je mnogo više od „ženskog“ hormona s obzirom da poboljšava ili čak imitira efekte testosterona na tipično ponašanje muškaraca kod više vrsta počev od guštera do ljudi (Wagner, 2006), a efekti progesterona na anksioznost nisu specifični za pol (Gulinello i sar., 2002). Efekti progesterona na nivo anksioznosti su najverovatni posredovani modulacijom GABA_A receptora, bilo direktno ili posredstvom njegovog metabolita alopregnenolona (Le Melle'do i Baker, 2004). Ovo je pokazano u studiji sprovedenoj od strane Reddy i sar. (2005) koja je, na genetski modifikovanim miševima za PR gen (nemaju receptor za progesteron), pokazala anksiozni odgovor značajno veći u poređenju sa „wild“ tipom životinja. Većina ovih efekata je uzrokovana alosternom modulacijom GABA_A receptora alopregnenolonom (Reddy i sar., 2005). Da zaključimo, fragmentacija spavanja može izazvati ponašanje slično anksioznosti, smanjenjem nivoa progesterona, što dokazuju i rezultati dobijeni u našoj studiji.

U ovoj studiji nivoi testosterona su bili sniženi nakon fragmentacije spavanja. Shodno tome, naši rezultati podržavaju hipotezu da fragmentacija spavanja može doprineti sniženom nivou testosterona kod pacijenata sa OSA. Dugo su hipoksemija (Fisher i sar., 2012; Barrett-Conno i sar., 2008; Gambineri i sar., 2003) i gojaznost (Kirbas i sar., 2007) smatrani glavnim razlozima

za snižene vrednosti testosterona kod pacijenata sa OSA, dok fragmentacija spavanja do sada nije razmatrana kao faktor koji utiče na ovaj efekat. Intermitentna hipoksija i fragmentacija spavanja se dešavaju udruženo kod pacijenta sa OSA, a odvojeni efekti ova dva fenomena mogu biti proučavani samo na eksperimentalnim modelima. Nedavno su uspostavljeni kompleksniji eksperimentalni modeli za proučavanje OSA (Liu i sar., 2019), ali hormonalni status još uvek nije istražen.

Frye i Seliga (Frye i Seliga, 2001;) su pokazali da je suplementacija testosteronom kod pacova izazvala anksiolitički efekat utvrđen povećanjem eksplorativnog biheviora i vremena provedenog u otvorenom kraku uzdignutog krstastog lavirinta. Naši rezultati su pokazali niže nivoe testosterona kod pacova koji su pokazivali karakteristike anksioznosti, što dodatnu ukazuje na ulogu androgena u smanjenju anksioznosti. Ovakav nalaz je konzistentan sa drugim istraživanjima u kojima je suplementacija testosteronom povećala eksploraciju u eksperimentalnim grupama (Bitran i sar., 1993). Brojne studije su pokazale da je kastracija odraslih mužjaka povezana sa anksioznošću, što se može poništiti suplementacijom (Frye i Seliga, 2001; Fernandez-Guasti i Martinez-Mota, 2003; Fernandez-Guasti i Martinez-Mota, 2005; Morsink i sar., 2007; McHenry i sar., 2014). Prolongiran tretman testosteronom izazvao je značajno smanjenje straha u seriji testova koji su uključivali nepoznate stimuluse (Boissy i Bouissou, 1994, Vandenheede et Bouissou, 1993). Testosteron se metaboliše da bi se formirao DHT, koji se dalje može konvertovati u 3α -diol i 3β -diol, neuroaktivne steroide sa neuromodulatornom aktivnošću (McHenry i sar., 2014). Aikey i sar. (2002) su sugerisali da je anksiolitički efekat testosterona posredovan 5α -redukovanim metabolitima, koji su potentni GABA_A agonisti. Metaboliti testosterona, androsteron i 3α androstediol su slabi androgeni ali potentni modulatori GABA_A/benzodiazepinskog receptorskog kompleksa (GBR), dok testosteron i DHT imaju nizak afinitet za GBR (Frye i Seliga, 2001; Aikey i sar., 2002) ali jače deluju na androgene receptore. Niži nivoi testosterona kod životinja sa fragmentisanim spavanjem takođe se mogu objasniti predominacijom REM faze spavanja u odnosu na NREM (Luboshitzky i sar., 2001). Dodatno, rezultati eksperimentalnih studija su pokazali da su deprivirani mužjaci pacova imali sniženu koncentraciju testosterona (Andersen i sar., 2005). Ovi rezultati takođe podržavaju hipotezu da je ponašanje slično anksioznosti u našoj studiji jednim delom posredovano i nižim koncentracijama testosterona.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su snižen nivo estradiola kod životinja sa fragmentacijom spavanja. Proestrusne ženke pacova, sa višim nivoima slobodnog estradiola i androgena, pokazale su značajno niže nivoe anksioznosti u poređenju sa diestrusnim ženkama (niski nivoi estradiola) (Frye i sar., 2000). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Filova i sar (2015) koji su pokazali da je administracija estradiola gonadektomisanim muškim životinjama uzrokovala brz anksiolitički efekat u otvorenom krstastom lavirintu, ali ne i na drugim testovima. U studiji na gonadektomisanim muškim pacovima, Carrier i sar. (2015) su pokazali da se ponašanje koje je karakteristično za anksioznost može neutralisati administracijom bilo testosterona ili estradiola. Estradiol nezavisno takođe ima značajnu anksiolitičku ulogu (Farr i sar., 2000).

Oksidativni stres, kao potencijalna biološka osnova anksioznosti razvijena na terenu disrupcije spavanja/fragmentacije, nije do sada detaljno istraživan u ovom kontekstu. Prethodne studije su pokazale da oksidativni stres uzrokovan poremećenim obrascima spavanja nije ravnomerno raspoređen u svim strukturama mozga, pri čemu su efekti na hipotalamus veći u odnosu na ostale strukture (Ikeda i sar., 2005). Podaci pokazuju da poremećaj u REM fazi spavanja izaziva oksidativni stres dominantno u hipokampusu (Singh i

sar., 2008) kao posledicu smanjene antioksidativne odbrane (Ramanathan i sar., 2002; Süer i sar., 2011). Rezultati naše studije jasno su pokazali veću koncentraciju malonildialdehida (MDA) u sve tri strukture mozga fragmentisanih životinja, dok je aktivnost antioksidativnih enzima GPx (glutation peroksidaza) i SOD (superoksid-dismutaza) bila značajno smanjena. Ranije je pokazano da nedostatak spavanja izaziva ponašanje povezano sa anksioznošću i kod ljudi i kod životinja. Sa druge strane, postoji povezanost između anksioznosti i oksidativnog stresa u mozgu (Hovatta i sar., 2010; Famitafreshi i Karimian, 2020; Hrnčić i sar., 2016; Serdari i sar., 2000). Rezultati ove studije ukazuju da postoji korelacija između nusprodukta oksidativnog stresa sa anksioznim ponašanjem pacova nakon fragmentacije spavanja. Veruje se da je anksioznost posebno povezana sa povećanjem oksidativnih promena u hipokampusu, dok su i druge strukture u mozgu takođe zahvaćene. Ovom studijom smo demonstrirali da oksidativno oštećenje lipida, prisutno kod sve tri strukture mozga, ukazuje na značajan oksidativni stres kao rezultat fragmentacije. Ovome u prilog ide i smanjena aktivnost SOD u našem OSA modelu, znajući da povišena aktivnost SOD-a može zaštititi ćelijske strukture od oksidativnog oštećenja (Ramanathan i sar., 2002; Shan i sar., 2007),

Kada su ljudi izloženi deprivaciji spavanja, oni pokazuju značajno povećanje biomarkera oksidativnog stresa, najverovatnije zbog gubitka antioksidanata u plazmi (Jówko i sar., 2018; Trivedi i sar., 2017). Shodno tome, OSA ih stavlja u veći rizik od razvoja različitih neuroloških bolesti (Liew i Aung, 2021) i neurokognitivnog oštećenja (Xu i sar., 2004). Imajući u vidu skromnu antioksidativnu odbranu mozga, zbog visokog sadržaja lipida, nije neočekivano da lako dolazi do oksidativnog oštećenja lipida, proteina i DNK molekula (Halliwell, 2006; Ng i sar., 2008). Štaviše, oksidativni stres bi mogao biti uključen i u štetan efekat neadekvatnog spavanja na druge organske sisteme (Atrooz i Salim, 2020). Suprotno rezultatima Harkness i sar. koji su objavili da poremećaj spavanja podiže oksidativni stres u PV+ ćelijama moždane kore pacova (Harkness i sar., 2019), nismo primetili značajne promene hipokampalnih PV+ interneurona. Na osnovu naših rezultata, može se primetiti nepromenjen broj PV+ interneurona u CA1, CA2/3 i DG regionima hipokampusu u SF grupi pacova (u odnosu na TC i AC grupe). Ove razlike se mogu pripisati razlikama u eksperimentalnoj modulaciji spavanja koja se koristi, i njenom trajanju. Stoga, naša hipoteza o smanjenju PV+ interneurona kod SF može biti odbačena. Naša hipoteza se zasnivala na činjenici da se hipokampus, zajedno sa drugim krugovima limbičkog sistema, amigdalom, prefrontalnim korteksom i drugima, nalazi na raskrsnici puteva straha, pamćenja i anksioznosti i da PV+ interneuronski inhibitorni mehanizmi kontrolišu anksioznost (Çalışkan i sar., 2016; Duval i sar., 2015). Gubitak hipokampalnih neurona zajedno sa ponašanjem povezanim sa anksioznošću je pokazan u drugim studijama (Lorigooini i sar., 2020; Šutulović i sar., 2021). Međutim, ipak treba naglasiti da su hipokampalni PV+ interneuroni (Czeh i sar., 2005) uključeni u obrasce ponašanja, uključujući strah i anksioznost (Rankov Petrovic i sar., 2019), iako ne utiču na mehanizam ponašanja sličnog anksioznosti izazvanog fragmentacijom spavanja. Naši rezultati su pokazali da je trajanje fragmentacije spavanja značajan faktor u razvoju ponašanja povezanog sa anksioznošću, kao i da su ovi efekti posredovani oksidativnim distresom u mozgu.

Rezultati naše studije pokazali su da fragmentacija spavanja po uzoru na onu koja se javlja kod opstruktivne apneje u spavanju dovodi do ponašanja karakterističnog za depresiju, a efekti ovakve fragmentacije su linearno proporcionalni dužini fragmentisanog perioda. Ovo je potvrđeno bihevioralnom analizom rezultata testa forsiranog plivanja, koji je pokazao produženje perioda imobiliteta u odnosu na aktivno plivanje i borbu kod životinja kojima je

fragmentisano spavanje u odnosu na kontrolne grupe. Ovaj efekat bio je više izražen nakon subakutnog i hroničnog tretmana u odnosu na akutni. Modifikovani test uzdignutog krstastog lavirinta pokazao je kognitivni pad kod životinja nakon hronične fragmentacije spavanja koji se manifestovao produženim periodom tranzicije iz svetlih i tamne krake u TL2 sekvenci. Ovo takođe može da se tumači kao pojava karakteristična za depresivni poremećaj ili kao posledica depresivnog poremećaja s obzirom da imunohistohemijski nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji Ki 67, DCX i GFAP u dentatnom girusu hipokampusa. Izostanak razlike u faktorima neurogeneze upućuje da su opservirane promene izazvane fragmentacijom spavanja najverovatnije uzrokovane depresivnim poremećajem i kao takve su privremene. Ovde moramo napomenuti da, iako je metodološki ustanovljeno da se hronični efekti disrupcije spavanja mogu verodostojno posmatrati na modelima disrupcije u trajanju od 14 dana, to i dalje predstavlja relativno kratak period za nastanak trajnih promena u neurogenezi, te se ne može sa sigurnošću tvrditi da li u kliničkim okolnostima dugotrajna fragmentacija spavanja, npr. kod pacijenata sa OSA, ostavi trajne posledice po kognitivni status. Dugotrajna fragmentacija spavanja u našoj studiji dovela je do smanjenja telesne težine (iako je bilo fluktuacija u opserviranom periodu od 14 dana), povećanja serumskog nivoa kortikosterona i smanjenja nivoa testosterona kod životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrole.

Poremećaji spavanja predstavljaju čest fenomen koji se javlja kod osoba sa dijagnostikovanom depresijom, a nova istraživanja sugerišu da upravo poremećaji spavanja mogu imati značajnu ulogu upravo u razvoju i održavanju simptoma depresije. Ispitivanje efekata poremećaja spavanja na ponašanje karakteristično za depresiju je izuzetno otežano u kliničkim uslovima usled etičkih ograničenja, stoga ova istraživanja na eksperimentalnim životinjama mogu pružiti neprocenjiv uvid u kompleksan odnos između spavanja i depresije. Eksperimentalni modeli omogućavaju kontrolisane uslove i precizno praćenje promena u ponašanju životinja. Takođe, istraživanja na životinjama mogu ponuditi podatke koji su teško dostupni kod ljudi, kao što su direktno manipulisanje sa faktorima spavanja i praćenje dugoročnih efekata na ponašanje. Ovo pomaže u boljem razumevanju uzročno-posledičnih veza između poremećaja spavanja i depresije. Konačno, saznanja iz ovakvih istraživanja mogu poslužiti kao osnova za razvoj novih terapijskih pristupa i tretmana za depresiju koji uključuju poboljšanje kvaliteta spavanja. Iako istraživanje na životinjama ne može potpuno preneti sve aspekte depresije kod ljudi, može pružiti važne smernice za dalja istraživanja i razumevanje ove kompleksne interakcije.

Odmah na početku važno je napomenuti da nemaju svi poremećaji spavanja isti uticaj na depresiju. Sa jedne strane, imamo deprivaciju spavanja (parcijalnu ili totalnu) za koju je dokazano da ima blagotvoran efekat na depresivne pacijente tokom akutnog tretmana, dok sa druge strane pacijenti sa OSA pokazuju da se simptomi depresije pogoršavaju kako bolest napreduje. Već je pokazano da su deprivacija spavanja, skraćeno normalnog vremena spavanja, kao i fragmentacija spavanja bidirekciono povezani sa depresijom. Poremećaji spavanja, uopšteno, predstavljaju rizik za nastanak depresivnih poremećaja, dok depresija sama po sebi izaziva poremećaje spavanja (Roberts i sar., 2014). Pokazano je da loš kvalitet spavanja ima 50-90% pacijenata sa depresijom, a glavni poremećaji spavanja kod ovih pacijenata su poteškoće sa započinjanjem i održavanjem spavanja i rano jutarnje buđenje (Jagannath i sar., 2013; Cox i sar., 2016). Kod ovih pacijenata arhitektura spavanja je modifikovana povećanjem sklonosti ka spavanju u REM fazi, što dovodi do smanjene latencije do započinjanja REM faze, smanjenja trajanja sporotalasnog spavanja (NREM) i što je najvažnije fragmentacije spavanja (Le Dantec i sar., 2014).

Pacovi kojima je deprivirano spavanje, bez obzira na to da su podvrgnuti totalnoj ili REM deprivaciji, pokazali su produženo trajanje flotiranja u testu forsiranog plivanja u poređenju sa kontrolnim životinjama. Ovo produženo stanje imobilnosti smatra se indikativnom bihevioralnom karakteristikom depresije (Steru i sar., 1985). Pored ovoga, disrupcija spavanja dovodi i do smanjene otpornosti na stres usled disfunkcije ventromedijalnog prefrontalnog korteksa (vmPFC-a) što je takođe karakteristično za depresiju. Upotrebom funkcionalne magnetne rezonance otkriveno je da dolazi do smanjenja funkcionalne povezanosti između vmPFC i amigdaloidnog kompleksa, što je povezano sa smanjenim raspoloženjem (Bush i sar., 2022).

Deprivacija i fragmentacija spavanja su se pokazali kao značajni faktori rizika za depresiju i smanjenje kognitivnih sposobnosti. Studija koju su sprovedeli Saha i sar. (2016) sugeriše da gubitak apetita i gubitak telesne težine, bilo nezavisno ili u kombinaciji, mogu doprineti neurokognitivnom padu kod pacijenata sa depresijom. U našem istraživanju, fragmentacija spavanja je izazvala ponašanje slično depresiji, kao i poremećaj kognicije. Test forsiranog plivanja je otkrio povećano vreme flotiranja u fragmentisanoj grupi životinja u odnosu na životinje u kontrolnim grupama, dok je vreme provedeno u plivanju ili borbi bilo smanjeno, što ukazuje na depresivno ponašanje. Povećanje razlike između eksperimentalne i kontrolnih grupa bilo je direktno proporcionalno broju dana sa fragmentisanim spavanjem. Broj studija koje su se bavile uticajem akutne i hronične fragmentacije spavanja na bihevioralne karakteristike u testu forsiranog plivanja je izrazito ograničen. Kada je u pitanju akutna fragmentacija spavanja, naši rezultati su u saglasnosti sa onima koje su dobili Steru i sar. (1985). Pacovi koji su podvrgnuti protokolima fragmentacije često pokazuju produženo trajanje nepokretnosti, što ukazuje na povećanu podložnost ponašanju sličnom depresiji. Kada je u pitanju hronična fragmentacija spavanja u istraživanju Dulawa i sar. (2004) pokazano je da tretman fluoksetinom (antidepresiv) nakon hronične fragmentacije spavanja dovodi do smanjenja imobilnosti životinja i povećanog trajanja aktivnog plivanja u testu forsiranog plivanja, što je takođe u saglasnosti sa našim rezultatima. Ovo je prva studija koja je linearno na istim životinjama pratila efekte akutne i hronične fragmentacije spavanja na bihevioralne karakteristike u testu forsiranog plivanja.

Istraživanja su pokazala značajne veze između simptoma depresije i objektivnih mera fragmentacije spavanja, kao što su povećano vreme budnosti nakon početka spavanja i broj drugih epizoda budnosti (Maglione i sar., 2014). Takođe, studije su pokazale da osobe sa više simptoma depresije mogu doživeti dnevnu neaktivnost i povećanu pospanost, što dodatno može poremetiti arhitekturu spavanja (Maglione i sar., 2014). Prema istraživanju Dean i sar. (2010), kod pacijenata sa opstruktivnom apnejom dolazi do produženja trajanja stadijuma 1 sporotalasnog spavanja, uz istovremeno skraćanje trajanja i učestalosti ostalih stadijuma (stadijumi 2, 3 i 4). Takođe, dolazi do skraćanja REM faze spavanja. Stadijum 1 je prelazno stanje između budnosti i spavanja, a njegova učestalost i trajanje se povećavaju zbog fragmentacije spavanja kod pacijenata sa opstruktivnom apnejom, što dovodi do skraćanja trajanja ostalih faza spavanja. Kada je reč o pacijentima sa depresivnim poremećajima, njihova arhitektura spavanja je takođe poremećena. Prema studiji Carotenuto i sar. (2012), kod ovih pacijenata dolazi do povećanja intenziteta i brzine pokreta očiju tokom REM faze spavanja, uz raniju pojavu prve epizode REM spavanja. To dovodi do povećanja ukupnog vremena provedenog u REM fazi. Pacijenti koji imaju dijagnostikovanu opstruktivnu apneju i depresivni poremećaj imaju smanjenu učestalost spavanja i veći deo vremena provedenog u REM fazi tokom spavanja. Osim toga, istraživanje Sattaratpajit i sar. (2022) ukazuje na postojanje REM-povezane

opstruktivne apneje, koja se karakteriše respiratornim događajima kao što su apneja i hipopneja, pretežno tokom REM faze spavanja. Prevalenca REM-povezane opstruktivne apneje je procenjena između 10% i 36% kod pacijenata sa opstruktivnom apnejom. Kriterijumi za identifikaciju REM-povezane opstruktivne apneje uključuju ukupan indeks apneje-hipopneje (AHI) od ≥ 5 i odnos AHI tokom REM faze spavanja prema AHI tokom NREM faze spavanja od ≥ 2 . Uz to, istraživanje Means i sar. (2003) ukazuje na povezanost između opstruktivne apneje i depresije. Depresija je čest psihološki poremećaj koji se javlja kod pacijenata sa opstruktivnom apnejom. Međutim, priroda ove veze nije potpuno razjašnjena.

Veza između fragmentacije spavanja, depresije i telesne težine je kompleksna i višefaktorska. Jedan predloženi mehanizam je uticaj fragmentacije spavanja na metaboličke faktore i regulaciju apetita. Konceptualni model Taherija sugeruje da smanjena aktivnost zbog umora, povećan unos hrane i metabolički hormoni koji utiču na glad i apetit su važni faktori koji povezuju spavanje sa gojaznošću (Taheri i sar., 2004). Studije su pokazale da je fragmentacija spavanja povezana sa povećanim unosom hrane i telesnom težinom kako kod ljudi, tako i kod životinja (Mavanji i sar., 2010). Fragmentacija spavanja može poremetiti regulaciju hormona koji su uključeni u kontrolu apetita, poput leptina i grelina, što dovodi do povećanog unosa hrane i povećanja telesne težine (Taheri i sar., 2004). Osim toga, veza između fragmentisanog spavanja, depresije i telesne težine može se razlikovati u zavisnosti od pola i uzrasta. Istraživanja su pokazala razlike u vezi između trajanja spavanja i telesne težine u odnosu na pol i uzrast, pri čemu je izraženija povezanost primećena kod mlađih adolescenata (Lytle i sar., 2011). Kod devojčica srednjoškolskog uzrasta, kasnije buđenje vikendom u poređenju sa radnim danima povezano je sa nižim procentom telesne masti i boljim statusom telesne težine (Lytle i sar., 2011). Ovi nalazi ukazuju na to da veza između spavanja, depresije i telesne težine može varirati u različitim populacijama i razvojnim fazama. Postoji dvosmerna veza između promena u obrascima spavanja i gubitka/dobijanja telesne težine. Tokom deprivacije spavanja, neuroendokrini sistem kontrole apetita je disfunkcionalan, što menja metaboličku ravnotežu i negativno utiče na održavanje telesne težine (Papatriantafyllou i sar., 2022). Osobe koje pate od depresije mogu prolaziti kroz periode od dobijanja težine ka gubljenju težine zbog gubitka apetita i smanjene motivacije za unos hrane. Naši rezultati su pokazali sličan obrazac, gde su u prvoj nedelji eksperimenta životinje dobijale na težini u poređenju s početnim vrednostima, dok je počevši od osmog dana telesna masa bila značajno niža u poređenju sa životinjama iz kontrolnih grupa, te su u saglasnosti sa rezultatima objavljenih studija i dodatno potvrđuju depresivni poremećaj koga odlikuje fluktuacija telesne težine.

Disrupcija spavanja povezana je sa negativnim efektima i na kognitivne funkcije, uključujući pamćenje. To je čest problem u današnjem društvu i ima visoku komorbidnost sa neurodegenerativnim i neuropsihijatrijskim poremećajima. Razumevanje molekularne osnove efekata poremećenog spavanja ključno je za rešavanje ovih zdravstvenih problema. Lee i sar. (2016) su proučavali povezanost između OSA i oštećenja autobiografske memorije, što predstavlja marker depresije. Studija je pokazala da se pacijenti sa OSA, koji su imali simptome depresije, znatno slabije sećaju specifičnih događaja u poređenju sa zdravim kontrolama (Lee i sar., 2016). Ovo sugeruje da OSA može doprineti oštećenju autobiografske memorije, bez obzira na ozbiljnost simptoma depresije (Lee i sar., 2016). Prekomerna generalizacija autobiografske memorije, koja se karakteriše teškoćom u sećanju na specifične događaje, povezana je sa depresijom i pokazano je da predviđa tok depresije kod pacijenata sa OSA (Lee i sar., 2016). Osim oštećenja pamćenja, OSA je povezana sa drugim neuro-psihološkim poremećajima,

uključujući poremećaje pažnje, izvršavanje zadataka i verbalno pamćenje (Lee i sar., 2016). Oštećenja verbalnog pamćenja, kako neposrednog tako i odloženog, često se primećuju kod nelečenih pacijenata sa OSA (Lee i sar., 2016). Ova kognitivna oštećenja mogu doprineti razvoju ili pogoršanju simptoma depresije kod osoba sa OSA. Fragmentacija spavanja kod OSA koja dovodi do produžene dnevne pospanosti i hipoksije usled desaturacije krvi kiseonikom može delovati na promenu raspoloženja, uznemirenost, pad koncentracije, otežano pamćenje, razvoj osećaja nezadovoljstva (Yosunkaya i sar., 2016). Patofiziološka pozadina ovog poremećaja obuhvata mnogo faktora (neuroinflamacija, oksidativni stres i promena u neurotransmiterskim sistemima) od kojih je najznačajniji otežana dilatacija glatke muskulature gornjih disajnih puteva usled redukovane serotonergičke aktivnosti (Veasey, 2003), što je sve povezano sa patogeneom depresije (Lee i sar., 2016). Dodatno, prisustvo komorbiditeta kao što su gojaznost i hipertenzija kod pacijenata sa OSA može dodatno doprineti razvoju simptoma depresije.

Poremećaji spavanja su poznati uzročnici poremećaja raspoloženja i kognitivnog propadanja, kako pojedinačno, tako i kao deo depresivnog poremećaja. Modifikovani test uzdignutog krstastog lavirinta u našoj studiji je pokazao kognitivni pad kod pacova koji su podvrgnuti fragmentaciji spavanja. To se manifestovalo u vidu produženog vremena koje je pacovima bilo potrebno za tranziciju iz otvorenih u zatvorene krake lavirinta u T2 sekvenci, što ukazuje na smanjene sposobnosti učenja i pamćenja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem koje su sproveli Vecsey i sar. (2012) u kome je proučavan genomski uticaj disrupcije spavanja u hipokampusu miševa, regiji mozga koja je ključna za formiranje pamćenja. Istraživanja su pokazala da deprivacija spavanja dovodi do promenjene ekspresije gena, pri čemu su promene zabeležene na 533 gena. Važno je napomenuti da je bioinformatička analiza otkrila da deprivacija spavanja smanjuje translaciju, potencijalno posredovano komponentama insulinskog signalnog puta, poput mTOR-a, ključnog regulatora sinteze proteina. Drugo istraživanje koje su sproveli Abel i sar. (2013) istaklo je vezu između spavanja i konsolidacije pamćenja. Autori su diskutovali o tome kako određene oscilacije u sporotalasnom spavanju (NREM) pre kodiranja mogu poboljšati kapacitet učenja hipokampusu kod ljudi. Sa druge strane, deprivacija spavanja ometa naknadnu aktivnost i kodiranje u hipokampusu. Ovi nalazi sugerišu da neurobiologija spavanja ima ključnu ulogu u molekularnim, ćelijskim i mrežnim mehanizmima plastičnosti koji su uključeni u učenje i konsolidaciju pamćenja. Vecsey i sar. (2012) su takođe pokazali da deprivacija spavanja smanjuje nivoe ukupnog i fosforilisanog mTOR-a, koji su ključni za sintezu proteina. Međutim, nakon perioda oporavka, nivoi su se vratili na početne vrednosti, što sugeriše da negativni efekti poremećenog spavanja na pamćenje i kogniciju mogu biti posredovani smanjenjem sinteze proteina putem smanjenja mTOR-a. Jedan od potencijalnih mehanizama je nedostatak esencijalnih vitamina, minerala i omega-3 masnih kiselina koji su neophodni za funkciju mozga. Drugi predloženi mehanizam je povezan s promenama u oslobađanju hormona u mozgu koji su važni za neurotransmisiju, učenje, pamćenje i održavanje raspoloženja (Saha i sar., 2016). Istraživana je i otpornost na poremećaje spavanja. Jedno istraživanje je utvrdilo da je otpornost na akutnu deprivaciju spavanja povezana sa umanjenošću oštećenja sposobnosti učenja posredovanog hipokampusom (Lee i sar., 2020). U istraživanju je korišćen model akutne deprivacije spavanja na miševima i zadatak prostorne navigacije kako bi se procenila sposobnost učenja (Lee i sar., 2020). Rezultati ukazuju da neki pojedinci mogu imati urođenu otpornost na kognitivna oštećenja izazvana poremećajima spavanja (Lee i sar., 2020).

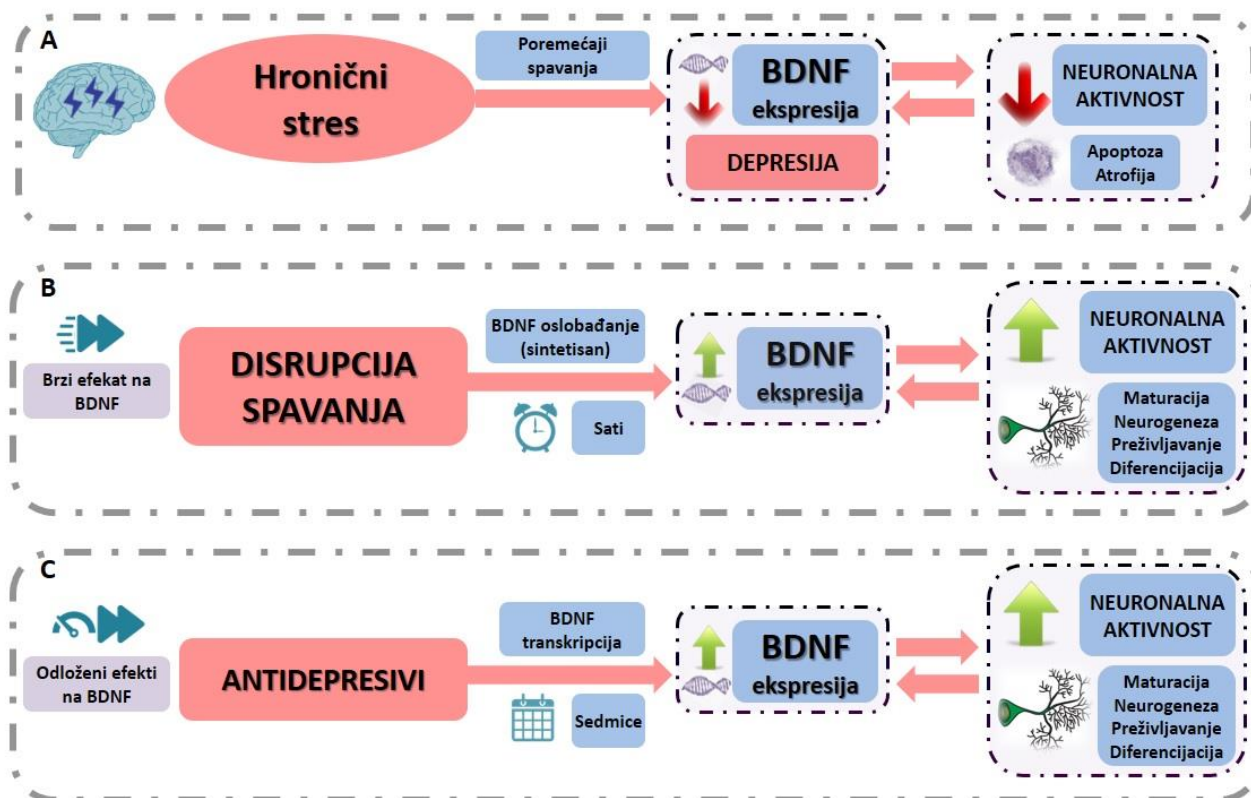
Imunski sistem ima važnu ulogu u regulaciji procesa učenja, pamćenja i neuralne plastičnosti, pozitivnoj regulaciji neurogeneze i maturaciji sinapsi na nivou hipokampusa. Svoje dejstvo ostvaruje putem konsolidovane aktivacije ćelija nervnog tkiva sa imunološkim dejstvom (mikroglije i astrociti), ćelija imunskog sistema (T-ćelija i makrofaga) i neurona. Interakcija se zasniva na odgovoru ćelija koje ne pripadaju nervnom tkivu na signalno dejstvo klasičnih neurotransmitera (glutamat i monoamini) i hormona (glukokortikoidi), što je praćeno reagovanjem nervnih ćelija na promene nivoa proinflammatoryh citokina (interleukin-1, interleukin-6, faktor nekroze tumora alfa) i drugih medijatora kao što su prostaglandini (Yirmiya i sar., 2011).

Patološka stanja poput depresivnih poremećaja, ali i poremećaji spavanja kao što je insomnija i drugi oblici hronične restrikcije spavanja mogu da dovedu do poremećaja funkcije imunskog sistema u smeru pojačane imunološke aktivnosti i povećane sinteze faktora inflamacije (Zielinski, 2014). Deprivacija spavanja dovodi do poremećaja energetskog metabolizma i pokreće zapaljenje niskog intenziteta (Monje i sar., 2011).

Brojna istraživanja pokazala su prisustvo zapaljenskih markera, kao što je C-reaktivni protein (CRP) u krvi i likvoru kod pacijenata sa depresijom (Howren i sar., 2009, Lindqvist i sar., 2016). Dalje, istraživanja su potvrdila da je zapaljenje osnovni uzročni faktor kod nekih tipova depresije i kognitivnih oštećenja (Raison i sar., 2009). Promene u aktivnosti inflamatornih faktora koje nastaju kao posledica deprivacije utiču na CNS i doprinose nastanku depresivnih poremećaja. Povećana produkcija interleukina-1 beta, interleukina-6, faktora nekroze tumora alfa i drugih medijatora zapaljenja izazvana hroničnom restrikcijom spavanja dovodi do hiperekscitabilnosti neurona i pojačanja adrenokortikalne stimulacije, uz posledični nastanak nepravilnosti u odvijanju kognitivnih procesa i regulaciji spavanja (Yirmiya i sar., 2011). IL-1, koga proizvode mikroglije i astrociti, u prekomernim količinama može dovesti do psihomotorne retardacije (Krysta i sar., 2017). Na osnovu dosadašnjih istraživanja pretpostavlja se da povećan nivo IL-6 utiče na metabolizam serotonina u CNS tako što smanjuje raspoloživu količinu aminokiseline triptofana u krvi (Krysta i sar., 2017). Povećanu sintezu proinflammatoryh citokina prati nepravilno i smanjeno stvaranje neurotropina i faktora rasta poput neurotrofnog moždanog faktora. Posledični poremećaji spavanja manifestuju se nedostatkom ne-REM sporo-talasnog spavanja, uz smanjenje delta talasa u EEG zapisu (Zielinski i sar., 2014).

Sinaptičko remodelovanje i sinaptogeneza u velikoj meri zavise od neurotrofnih faktora, pre svega neuralnog faktora rasta (NGF), neurotrofina 3 i 4 (NT-3, NT-4), glijalno-ćelijskog neurotrofnog faktora (GDNF) i faktora rasta nervnih ćelija (BDNF) (Schaaf i sar., 2000). BDNF je neurotrofin koji je neophodan za neuronski razvoj i preživljavanje, sinaptičku plasticitet i kognitivne funkcije (Binder i Scharfman, 2004).

Prethodna istraživanja su pokazala smanjenje nivoa BDNF-a u serumu nelečenih pacijenata sa depresijom u poređenju sa onima koji su primali odgovarajuću terapiju, što je dovelo BDNF u fokus istraživanja mehanizama depresije (Metrisciano i sar., 2009). Takođe, pronađena je pozitivna korelacija između nivoa BDNF-a i težine kliničke slike kod pacijenata sa depresijom (Gonul i sar., 2005).



Slika 5.2. Efekti hroničnog stresa, nedostatka sna i antidepresivnog tretmana na depresivni poremećaj.

A. Hronični stres (nedostatak sna ili fragmentacija sna, nesanica, itd.) smanjuje nivo izražavanja BDNF-a čime uzrokuje depresivne epizode smanjenjem neuronske aktivnosti. B. Nedostatak spavanja akutno može imati korisnu ulogu u depresivnom poremećaju, međutim, dugotrajno bez antidepresivnog tretmana nema efekta, čak može pogoršati kliničku sliku depresije ako se ne tretira. C. U kombinaciji s antidepresivima, hronični nedostatak sna dovodi do povećane neuronske aktivnosti što potencira zrenje sinapsi, neurogenezu i diferencijaciju matičnih ćelija. Za detalje pogledati poglavlje Diskusija.

Postmortem uzorci hipokampusa depresivnih pacijenata potvrdili su značajno niže koncentracije BDNF-a kod nelečenih pacijenata u poređenju sa lečenima, zajedno sa manjim volumenom hipokampalnog tkiva kod svih depresivnih pacijenata (Karege i sar., 2005).

Međutim, rezultati o uticaju BDNF-a na depresiju nisu dovoljno konzistentni, i ova tema je još uvek nedovoljno istražena (Slika 5.2.). U animalnim modelima depresije, hronični stres i maternalna deprivacija dovode do smanjenja nivoa BDNF mRNA u hipokampusu (Tsai, 2007). Takođe, infuzija tirozin-kinaza inhibitora blokira antidepresivni efekat BDNF-a, što naglašava važnu ulogu kaskade tirozin-kinaze B receptora (TrkB) u antidepresivnom mehanizmu BDNF-a (Tsai, 2007). S obzirom na sve navedeno, verovatno je da nedostatak BDNF-a ima važnu ulogu u patogenezi velikog depresivnog poremećaja, a aktivacija BDNF-TrkB kaskade je neophodna za terapijski efekat antidepresiva. Postupak deprivacije spavanja dokazao je svoju efikasnost u ublažavanju depresije (Tufik i sar., 2009) sa višestrukim neurobiološkim mehanizmima koji su uključeni u terapijske efekte akutno, i patofiziološke procese hronično (Schmitt i sar., 2016). Transkripcija gena BDNF, koja indukuje dugotrajnu potencijaciju (LTP), čini se da igra ulogu u neuroprotekciji i neurogenezi, a TrkB (aktiviran od strane BDNF-a) ima ulogu u modulaciji i medijaciji cirkadijalnih ritmova, koji se čini da su poremećeni kod poremećaja raspoloženja (Schmitt i sar., 2016; Medina i sar., 2014). Smatra se da BDNF povećava intracelularni kalcijum, aktiviranjem tirozin-kinaze B receptora/fosfolipaze $C\gamma$ (TrkB/PLC γ) puta, čime se promoviše

fosforilacija CaMKII (Zagaar i sar., 2013). CaMKII je ključni posrednik koji može lako ući u sinapse i delovati kao molekularni prekidač za posredovanje dugotrajnog skladištenja informacija. Ova faza LTP dovodi do dugotrajnih poboljšanja u efikasnosti sinapsi, poboljšanog presinaptičkog oslobađanja neurotransmitera i fosforilacije i transporta AMPA receptora (Zagaar i sar., 2013). Negativan efekat deprivacije spavanja na LTP i plastičnost sinapsi smatra se posledicom osnovnih promena u intracelularnim signalnim molekulima kao što su CaMKII, kalcineurin i BDNF. Smanjenje bazalnih nivoa BDNF-a može direktno uticati na smanjenje bazalnih nivoa P-CaMKII (Zagaar i sar., 2013).

S druge strane, dok se čini da kratkotrajna potpuna deprivacija spavanja povećava ekspresiju BDNF-a u različitim regionima mozga, selektivno deprivacija REM spavanja od pacova nije pokazala promene u ekspresiji BDNF-a (Clinton i sar., 2011). Akutni, terapijski efekti deprivacije spavanja ili parcijalne REM deprivacije mogu poticati od brzog oslobađanja BDNF-a, čime se normalizuju nivoi BDNF-a, za razliku od produžene latencije klasičnih antidepresiva. Posebno je pokazano da REM-SD kod velikog depresivnog poremećaja (MDD) dovodi do postepenog poboljšanja, što ukazuje da antidepresivni efekti selektivnog REM-SD i totalnog SD-a počinju na suzbijanju aktivnosti sporih talasa. Takođe je poznato da serotonin stimuliše proizvodnju BDNF-a i obrnuto, BDNF povećava serotonergičku neurotransmisiju. Postoji sugestija da prolongirani stres u obliku nedovoljnog spavanja može izazvati poremećaj hipotalamo-hipofizo-adrenalnog (HPA) sistema. Dugoročno, to dovodi do pogoršanja poremećaja spavanja, smanjenja nivoa BDNF-a, što može ugroziti sposobnost pojedinca na adaptaciju u kriznim situacijama, kao i depresiju (Schmitt i sar., 2016). Akutna deprivacija spavanja dovodi do povećanja nivoa pCREB (aktivne forme transkriptivnog faktora) i povećanja nivoa BDNF receptora TrkB (Cirelli i sar., 2009). Kao rezultat toga, takođe dolazi do povećanja ekspresije faktora koji su uključeni u plastičnost mozga, čija ekspresija je takođe povećana tokom hroničnog antidepresivnog tretmana. Međutim, efekat deprivacije spavanja je akutan i ne može se održavati tokom dužeg perioda bez odgovarajućeg antidepresivnog tretmana. U svojoj meta-analizi, Brunoni i saradnici se slažu sa neurotrofinskom teorijom depresije, sugerišući da je poboljšanje kod velikog depresivnog poremećaja povezano sa neuroplastičnošću i da različite vrste antidepresivnih tretmana dovode do povećanja nivoa BDNF-a (Brunoni i sar., 2008). Efekte fragmentacije spavanja na nivoa BDNF-a kod depresivnog poremećaja tek treba utvrditi.

Naši rezultati pokazuju povećanu koncentraciju kortikosterona nakon postupka fragmentacije spavanja, što se može smatrati markerom hiperaktivacije hipotalamo-hipofizo-adrenalne (HPA) osovine koja doprinosi razvoju depresije i kognitivnog oštećenja (Zhang i sar., 2021).

Eksperimentalni model sedmodnevne parcijalne restrikcije spavanja uzrokovano je značajne alteracije u odgovoru HPA osovine koje su se karakterisale smanjenom senzitivnošću CRH i 5HT-1A receptora, dok je senzitivnost nadbubrežnog receptora ACTH bila povećana. Ovakve promene, barem delimično, su slične onima koje mogu da se vide kod depresije (Meerlo i sar., 2008).

Neophodno je spomenuti i da postoji zanimljiv translacioni neuroendokrini model anksioznosti/depresije koji se temelji na hroničnoj primeni kortikosterona, optimizovan je za upotrebu u modeliranju perzistentnog stanja sličnog anksioznosti/depresiji kod glodara, a do sada je korišćen za procenu specifičnih efekata hronične primene kortikosterona na spavanje. To je etiološki relevantan model depresije, u kojem hronična primena kortikosterona izaziva

visoku emocionalnost, povezanu sa smanjenjem neurogeneze i promenjenom osetljivošću na bol, koji se poništavaju klasičnim i inovativnim antidepresivima (Zhao i sar., 2008).

Vraćajući se na proučavanje eksperimentalnog neuroendokrinog modela depresije/anksioznosti, koji navodi da su glavni mehanizmi koji leže u pozadini alteracije ponašanja i spavanja verovatno posledica hroničnog tretmana kortikosteronom koje pokreće negativnu povratnu spregu na HPA osovину, možemo analizirati potencijalne mehanizme uključene u disregulaciju spavanja.

Činjenica je da njihovi rezultati korelišu s nalazima u subpopulaciji pacijenata s depresijom, koje karakteriše smanjenje aktivnosti HPA osovine, lučenje kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) i hipoaktivnost sistema za buđenje, te zauzvrat povećanje glukokortikoida. Ovako promenjena osovina mogla bi uticati na NREM spavanje, povećavajući ga aktivacijom mehanizma zavisnog o mineralokortikoidnog receptora, i na REM, mehanizmom posredovanim glukokortikoidnim receptorima, smanjujući tako ovu fazu. S obzirom da elementi odgovorni na glukokortikoidne receptore koji se nalaze u CNS-u kontrolišu ekspresiju gena čiji su produkti uključeni u cirkadijalnu regulaciju, ovo je način na koji se na njih može uticati. Ipak, budući da neuroni SCN-a ne eksprimiraju ni mineralo- ni gluko-kortikoidne receptore, kortikosteron bi na ovaj centar mogao uticati indirektno, kroz projekcije iz drugih područja koja ih eksprimiraju i dopiru do SCN-a. (Le Dantec i sar., 2014).

Kod osoba koje boluju od depresije dokazan je povišen nivo kortizola u krvi, ali i u drugim uzorcima poput urina i salive gde je kortizol slobodan, nezvan za proteinske nosače (Stetler i sar., 2011; Rodenbeck i Hajak, 2001), ali pojačana funkcija HPA osovine ne mora nužno nastati kao posledica depresivnih promena u ponašanju. Hiperaktivnost može nastati i pre nastupanja depresivnih poremećaja zbog neurobioloških abnormalnosti koje su prethodile razvoju depresivnog oboljenja (Pariante, 2008). Hiperaktivnost ovog sistema može biti posledica poremećaja glavnog regulatornog mehanizma HPA ose, negativne povratne sprege. Povratna sprega se zasniva na vezivanju kortizola iz krvi za glukokortikoidne receptore lokalizovane u hipokampusu, hipotalamusu i hipofizi. Negativna povratna sprega može biti oštećena zbog mutacija koje nastaju kao posledica delovanja proinflamatornih citokina i epigenetskih promena na nivou gena koji nose informaciju za sintezu ovih receptora i nemogućnost kortizola da prevaziđe krvno-moždanu barijeru i dospe do odgovarajućih receptora. Glukokortikoidna rezistencija i nemogućnost glukokortikoidnih hormona da ostvare dejstvo na ciljno tkivo dovodi do kompenzatorne hiperaktivnosti HPA osovine (Pariante, 2008). Produkcija kortizola je usklađena sa cirkadijalnim ritmom. Tokom večeri i noći nivo kortizola u krvi opada u odnosu na dnevne vrednosti. Sredinom perioda spavanja koncentracija kortizola počinje postepeno da raste, sekretuje se pulsatorno u vremenskim intervalima koji se poklapaju sa nastupanjem REM faze kako bi u ranim jutarnjim časovima dostigao najvišu vrednost (Payne i Nadel, 2004). Kod osoba sa primarnom insomnijom uočen je povišen nivo kortizola u krvi u večernjim satima i tokom noći koji, u zavisnosti od stepena povećanja, dovodi do češćih buđenja i prekida u noćnom spavanju. Kada je insomnija udružena sa depresivnim poremećajima, hiperaktivnost HPA osovine je još veća, a fragmentacija spavanja kao patofiziološka manifestacija postaje još intenzivnija.

Dodatni faktor koji doprinosi razvoju ponašanja sličnog depresiji je nizak nivo testosterona, što je primećeno kod pacova izloženih fragmentaciji spavanja u našoj studiji. Pojedina klinička istraživanja daju dokaze koji ukazuju da testosteron ima anksiolitičku i antidepresivnu ulogu, i potencijalno se može koristiti za poboljšanje raspoloženja i mentalnog zdravlja (Morsink i sar.

2007; Giltay i sar., 2021). Testosteron može uticati na mnoge monoamine i dovesti do povećanog oslobađanja dopamina, što može suprimirati pojavu ponašanja povezanog sa depresijom. Takođe, tretman testosteronom kod pacova je povećao oslobađanje dopamina i serotonina u nukleus akumbensu i striatumu (De Souza i sar., 2009). Mogućnost da testosteron utiče na dopaminergičku i serotoninergičku neurotransmisiju ukazuje na njegovu ulogu u razvoju depresije i potencijalnom lečenju antidepresivima (McHenry i sar., 2013). Testosteron je takođe povezan s kognitivnim tegobama. Studije kod starijih muškaraca pokazale su potencijalne povoljne efekte na kogniciju (Cherrier i sar., 2009). Ozbiljan pad memorije kod pacova je bio primetan nakon kastracije, dok se memorija mogla poboljšati egzogenom primenom testosterona (Pintana i sar., 2015). Nedavna istraživanja takođe su potvrdila da suplementacija testosteronom poboljšava kognitivno oštećenje (Lau i sar., 2014; Cai i sar., 2020). Predloženi mehanizmi kognitivnog oštećenja kod nedostatka testosterona uključuju povećano nakupljanje amiloida β u mozgu, promene u sinaptičkoj plastici i podsticanje neurodegeneracije u hipokampusu.

Pored svih opisanih mehanizama koji mogu imati značajnu ulogu u depresiji izazvanoj disrupcijom spavanja, treba napomenuti da reaktivni kiseonični radikali (ROS) takođe mogu imati, barem manji uticaj na psihološki stres, s obzirom na to da su smanjeni nivoi glutationa (GSH) pronađeni u nekim delovima mozga pacova, posebno hipotalamusu i talamusu, iako nalazi ukazuju da oksidativni stres u mozgu pacova nakon parcijalne deprivacije spavanja (REM deprivacija) ne rezultira gubitkom ćelija (Le Dantec i sar., 2014). Postoje dokazi koji ukazuju na moguću ulogu povećanog nivoa NADPH oksidaze u mozgu u oksidativnom stresu izazvanim fragmentacijom spavanja. Ovaj enzim se pojavljuje kao glavni izvor generacije ROS u većini ćelija sisara, uključujući neurone i sinapse, bilo kao nusprodukt normalne katalitičke aktivnosti ili kao rezultat poremećene funkcije kod različitih oboljenja. U eksperimentu koji je uključivao miševе sa mutacijom NADPH oksidaze i odgovarajuće kontrolne grupe, nakon 15 dana fragmentacije spavanja, eksperimentalna grupa je pokazala normalno učenje i bila zaštićena od deficita spacijalnog učenja koja su primećena kod kontrolne grupe izložene fragmentaciji spavanja, uz značajno povećanje ekspresije gena i aktivnosti NADPH oksidaze. Najvažnije je da trajanje spavanja, raspodela faza spavanja niti latencija do nastupanja spavanja nisu bile pogođene ni kod eksperimentalne ni kod kontrolne grupe (Nair i sar., 2011). Rezultati variraju među studijama, pri čemu neke ukazuju na povećanu osetljivost hipokampusa i hipotalamusa, dok druge izveštavaju o smanjenoj osetljivosti na ROS u korteksu i moždanom stablu kao odgovor na poremećaje spavanja.

U poslednjih nekoliko godina, različita istraživanja su ispitivala kako proizvodnja novih ćelija i njihov razvoj u neurone bivaju pogođeni kvalitetom spavanja i gubitkom istog. Iako prekidi spavanja u periodu kraćem od jednog dana izgleda da imaju malo uticaja na osnovnu stopu proliferacije ćelija, produžena restrikcija ili prekidi spavanja mogu imati kumulativne efekte koji dovode do značajnog smanjenja proliferacije ćelija, preživljavanja ćelija i neurogeneze u hipokampusu. Posebno je važno napomenuti da iako kratkotrajna deprivacija spavanja možda ne utiče na osnovnu stopu proliferacije ćelija, jedno istraživanje na pacovima pokazuje da čak i blaga restrikcija spavanja može ometati povećanje neurogeneze koje se normalno dešava tokom učenja zavisnog od hipokampusa (Meerlo i sar., 2009).

U depresiji izazvanoj injekcijama kortikosterona, bojenje hipokampusa je pokazalo smanjenje ekprimiranja DCX, što ukazuje na smanjenu neuroproliferaciju i neurogenezu (Sanchez i sar., 2019). Smanjenje proliferacije ćelija i smanjenje postotka ćelija koje se diferenciraju u neurone su dva faktora koji mogu doprineti smanjenoj neurogenezi u modelu

deprivacije spavanja kod pacova (Guzman-Marin i sar., 2005). Kod pacijenata sa hroničnom insomnijom, povećani su markeri oštećenja astrocita (Zhang i sar., 2020). Kod pacova kojima je deprivirano spavanje u trajanju od 5 dana, astrociti su hipertrofisali sa pojačanom imunoreaktivnošću GFAP (Hsu i sar., 2003). Međutim, naši rezultati nisu pokazali nikakve razlike u ekspresiji DCX i Ki67 u hipokampusu, što sugerije da u našem modelu fragmentacije spavanja nisu primećene promene u neurogenezi i proliferaciji neurona. Slično tome, nije pronađena značajna razlika u izražavanju GFAP u hipokampusu kod grupe pacova izloženih fragmentaciji spavanja. Odsustvo promena u DCX, Ki67 i GFAP u našem istraživanju može se objasniti razlikama između fragmentacije spavanja i deprivacije spavanja. Dok fragmentacija predstavlja kratka prekidanja spavanja unutar redovnog rasporeda i količine spavanja, deprivacija predstavlja stanje neadekvatnog kvaliteta i količine spavanja, uključujući dobrovoljnu i nevoljnu pospanost, kao i poremećaje cirkadijalnog ritma.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Akutna i četrnaestodnevna visokofrekventna fragmentacija spavanja, po modelu opstruktivne apneje u spavanju dovela je do povećane moždane ekscitabilnosti i povećanja osetljivosti za razvoj konvulzivnih napada na šta ukazuju rezultati bihevioralnih i elektroencefalografskih analiza u smislu povećanog broja i težine napada izazvanih lindanom u subpragovnoj dozi, odnosno značajnih promene u dužini i trajanju epileptiformnih EEG pražnjenja kod životinja sa fragmentisanim spavanjem u odnosu na korespondentne kontrole.

2. Životinje kojima je spavanje bilo fragmentisano ispoljavale su bihevioralne obrasce u etološkim testovima karakteristične za povećan stepen anksioznosti na šta su ukazali rezultati sva tri testa iz baterije etoloških testova za procenu anksioznosti koji su korišćeni u ovoj studiji. Sem toga, životinje kojima je spavanje bilo fragmentisano ispoljile su i povećan stepen ponašanja koje se povezuje sa depresijom čiji stepen je zavisio od dužine perioda fragmentacije spavanja, a smanjenje kognitivne sposobnosti u odgovarajućim bihevioralnim testovima.

3. Fragmentacija spavanja dovela je do poremećaja redoks homeostaze u sve tri ispitivane moždane strukture što se manifestovalo porastom lipidne peroksidacije u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu uz izmenjen profil antioksidativne zaštite u ovim strukturama. Opisane promene u bihevioralnim etološkim testovima korelirale su sa stepenom narušene redoks homeostaze.

4. Citokinski profil je bio izmenjen kod životinja kojima je spavanje bilo fragmentisano i to tako da je nivo IL-1 β bio značajno povišen u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu, dok je nivo IL-6 bio značajno povišen samo u cerebralnom korteksu. Nije bilo promene u nivou ovih citokina u serumu.

5. Fragmentacija spavanja dovela je do promena u hormonskom profilu. Kod životinja sa akutnom fragmentacijom spavanja nivoi hormona testosterona, estradiola i progesterona bili su značajno sniženi, dok nije bilo značajne promene u nivou kortikosterona. Hronična fragmentacija je takođe dovela do značajnog sniženja nivoa testosterona.

6. U ovoj studiji primenjena fragmentacija spavanja nije dovela do promena u adultnoj neurogenezi i gliogenezi u hipokampusu, s obzirom da imunohistohemijski nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji Ki 67, DCX i GFAP u dentatnom girusu hipokampusa životinja čije spavanje je bilo fragmentisano. Takođe, nije bilo ni promena u broju inhibitornih interneurona u hipokampusu, na šta je ukazao imunohistohemijski nalaz nepromenjenog broja PV+ ćelija.

7.LITERATURA

A

- Abad, V. C., & Guilleminault, C. (2003). Diagnosis and treatment of sleep disorders: A brief review for clinicians. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 5(4), 371-388.
- Abdelmalek, S., Chtourou, H., Aloui, A., Souissi, N., & Tabka, Z. (2013). The effect of partial sleep deprivation on anaerobic performance and muscle damage. *International Journal of Sports Medicine*, 34(3), 248-253.
- Abel, T., Havekes, R., Saletin, J. M., & Walker, M. C. (2013). Sleep, plasticity and memory from molecules to whole-brain networks. *Current Biology*, 23(17), R774-R788.
- Aboul Ezz, H. S., Noor, A. E., Mourad, I. M., Fahmy, H., & Khadrawy, Y. A. (2021). Neurochemical effects of sleep deprivation in the hippocampus of the pilocarpine-induced rat model of epilepsy. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(1), 85-91.
- Achermann, P. (2004). The two-process model of sleep regulation revisited. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 75(3 Suppl), A37-43.
- Adamantidis, A., de Lecea, L., & Kocsis, B. (2007). The role of hypothalamic orexin (hypocretin) neurons in sleep regulation. *Zeitschrift für Psychologie*, 215(1), 25-33.
- Agnew, H. W., Webb, W. B., & Williams, R. L. (1967). Comparison of stage four and 1-REM sleep deprivation. *Perceptual and Motor Skills*, 24(2), 851-858.
- Aikey, J. L., Nyby, J. G., Anmuth, D. M., & James, P. J. (2002). Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). *Hormones and Behavior*, 42, 448-460.
- Åkerstedt, T., Maislin, G., Mullington, J., & Dinges, D. F. (2003). The cumulative cost of additional wakefulness: Dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep*, 26(2), 117-126.
- Alapirtti, T., Lehtimäki, K. A., Nieminen, R., Mäkinen, R., Raitanen, J., Moilanen, E., ... & Peltola, J. (2018). The production of IL-6 in acute epileptic seizure: A video-EEG study. *Journal of Neuroimmunology*, 316, 50-55.
- Alapirtti, T., Rinta, S., Hulkkonen, J., Mäkinen, R., Keränen, T., & Peltola, J. (2009). Interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production in patients with focal epilepsy: A video-EEG study. *Journal of the Neurological Sciences*, 280(1-2), 94-97.
- Alhola, P., & Polo-Kantola, P. (2007). Sleep deprivation: Impact on cognitive performance. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3(5), 553-567.
- Allan, S. M., Tyrrell, P. J., & Rothwell, N. J. (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 629-640.
- Almeneessier, A. S., Alshahrani, M., Aleissi, S., Hammad, O. S., Olaish, A. H., & BaHammam, A. S. (2020). Comparison between blood pressure during obstructive respiratory events in REM and NREM sleep using pulse transit time. *Scientific Reports*, 10(1), 3342.
- American Academy of Sleep Medicine Task Force. (1999). *International classification of sleep disorders: Diagnostic and coding manual*. American Academy of Sleep Medicine.
- American Academy of Sleep Medicine. (2005). *International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic and Coding Manual* (2nd ed.). Westchester: American Academy of Sleep Medicine.
- American Academy of Sleep Medicine. (2014). *International classification of sleep disorders-third edition (ICSD-3)*. American Academy of Sleep Medicine.
- Andersen, M. L., Perry, J. C., & Tufik, S. (2005). Acute cocaine effects in paradoxical sleep deprived male rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29, 245-251.
- Antony, M. (2008). *The handbook of anxiety and anxiety disorders*. UK: OPU.
- Arendt, J., Skene, D. J., & Middleton, B. (2008). Human non-visual responses to the modulation of daily light intensity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(2), 355-364.
- Atrooz, F., & Salim, S. (2020). Sleep deprivation, oxidative stress and inflammation. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Elsevier.

B

- Babkoff, H., Caspy, T., & Mikulincer, M. (1991). Subjective sleepiness ratings: The effects of sleep deprivation, circadian rhythmicity and cognitive performance. *Sleep*, 14, 534-539.
- Babson, K. A., Trainor, C. D., Feldner, M. T., & Blumenthal, H. (2010). A test of the effects of acute sleep deprivation on general and specific self-reported anxiety and depressive symptoms: an experimental extension. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 41(3), 297-303.
- Baglioni, C., Battagliese, G., Feige, B., Spiegelhalder, K., Nissen, C., Voderholzer, U., Lombardo, C., & Riemann, D. (2011). Insomnia as a predictor of depression: A meta-analytic evaluation of longitudinal epidemiological studies. *Journal of Affective Disorders*, 135(1-3), 10-19.
- BaHammam, A. S. (2016). Comorbid depression in obstructive sleep apnea: an under-recognized association. *Sleep & Breath*, 20(2), 447-456.
- Baird, A. L., Coogan, A. N., Siddiqui, A., Donev, R. M., & Thome, J. (2011). Adult attention-deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural, endocrine and molecular levels. *Molecular psychiatry*, 16(12), 1231-1237.
- Bajpai, S., Im, K. B., Dyken, M. E., Sodhi, S. K., & Fiedorowicz, J. G. (2014). Obstructive sleep apnea and risk for late-life depression. *Annals of Clinical Psychiatry*, 26(3), 163-170.
- Baker, F. C., Wolfson, A. R., Lee, K. A., & Larson, E. B. (2012). Association of sociodemographic, lifestyle, and health factors with sleep quality and daytime sleepiness in women: findings from the 2007 National Sleep Foundation "Sleep in America Poll". *Journal of Women's Health*, 21(1), 19-28.
- Baldwin, C. M., Griffith, K. A., Nieto, F. J., O'Connor, G. T., Walsleben, J. A., & Redline, S. (2001). The association of sleep-disordered breathing and sleep symptoms with quality of life in the Sleep Heart Health Study. *Sleep*, 24(1), 96-105.
- Banno, M., Harada, Y., Taniguchi, M., Tobita, R., Tsujimoto, H., & Yanai, M. (2018). Fragmented sleep is associated with daytime sleepiness and cognitive dysfunction in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep and Breathing*, 22(1), 107-114.
- Baracchi, F., & Opp, M. R. (2008). Sleep-wake behavior and responses to sleep deprivation of mice lacking both interleukin 1 β receptor 1 and tumor necrosis factor α receptor 1. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22, 982-993.
- Barrett-Connor, E., Dam, T-T., Stone, K., Harrison, S. L., Redline, S., & Orwoll, E. (2008). The Association of Testosterone Levels with Overall Sleep Quality, Sleep Architecture, and Sleep-Disordered Breathing. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93, 2602-2609.
- Barry, J., Campbell, S., Yeung, A. C., Raby, K. E., & Selwyn, A. P. (1991). Waking and rising at night as a trigger of myocardial ischemia. *The American Journal of Cardiology*, 67(12), 1067-1072.
- Baud, M. O., Magistretti, P. J., & Petit, J. M. (2015). Sustained sleep fragmentation induces sleep homeostasis in mice. *Sleep*, 38(4), 567-579.
- Bauer, S., Cepok, S., Todorova-Rudolph, A., Nowak, M., Köller, M., Lorenz, R., ... & Hamer, HM. (2009). Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. *Epilepsy Research*, 86(1), 82-88.
- Baum, K. T., Desai, A., Field, J., Miller, L. E., Rausch, J., & Beebe, D. W. (2014). Sleep restriction worsens mood and emotion regulation in adolescents. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 55(2), 180-190.
- Bazil, C. W. (2003). Effects of antiepileptic drugs on sleep structure: Are all drugs equal? *CNS Drugs*, 17(10), 719-728.
- Bazil, C. W. (2017). Sleep and epilepsy. *Seminars in neurology*, 37(4), 407-412.
- Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R. Reactive Oxygen Species: Physiological i Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *J Exp Neurosci*. 2016;10(Suppl 1):23-48.

- Belenky, G., Wesensten, N. J., Thorne, D. R., Thomas, M. L., Sing, H. C., Redmond, D. P., Russo, M. B., & Balkin, T. J. (2003). Patterns of performance degradation and restoration during sleep restriction and subsequent recovery: a sleep dose-response study. *Journal of Sleep Research*, 12(1), 1-12.
- Bellesi, M., de Vivo, L., Chini, M., Gilli, F., Tononi, G., & Cirelli, C. (2017). Sleep Loss Promotes Astrocytic Phagocytosis and Microglial Activation in Mouse Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, 37(21), 5263-5273.
- Beran, R. G., Plunkett, M. J., & Holland, G. J. (1999). Interface of epilepsy and sleep disorders. *Seizure*, 8(2), 97-102.
- Bergmann, B. M., Kushida, C. A., Everson, C. A., Gilliland, M. A., Obermeyer, W., & Rechtschaffen, A. (1989). Sleep deprivation in the rat: Methodology. *Sleep*, 12(1), 5-12.
- Bianchi, M. T., Cash, S. S., Mietus, J., Peng, C. K., & Thomas, R. J. (2011). Probabilistic sleep architecture models in patients with and without sleep apnea. *Journal of Sleep Research*, 21(3), 330-341.
- Billard, M., Bassetti, C., Dauvilliers, Y., Dolenc-Groselj, L., Lammers, G. J., Mayer, G., Pollmacher, T., Reading, P., & Sonka, K. (2006). EFNS guidelines on management of narcolepsy. *European Journal of Neurology*, 13, 1035-1048.
- Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*, 22(3), 123-131.
- Bitran, D., Kellogg, C. K., & Hilvers, R. J. (1993). Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABAA receptors in the rat. *Hormones and Behavior*, 27, 568-583.
- Bixler, E. O., Vgontzas, A. N., Lin, H. M., Calhoun, S. L., Vela-Bueno, A., & Kales, A. (2000). Excessive daytime sleepiness in a general population sample: the role of sleep apnea, age, obesity, diabetes, and depression. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(5), 1738-1743.
- Bodosi, B., Gardi, J., Hajdu, I., Szentirmai, E., Obal Jr, F., & Krueger, J. M. (2004). Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(5), R1071-R1079.
- Boissy, A., & Bouissou, M. F. (1994). Effects of androgen treatment on behavioral and physiological responses of heifers to fear-eliciting situations. *Hormones and Behavior*, 28, 66-83.
- Bonnet, M. H. (1986). Performance and sleepiness as a function of frequency and placement of sleep disruption. *Psychophysiology*, 23(3), 263-271.
- Bonnet, M. H., & Arand, D. L. (1995). We are chronically sleep deprived. *Sleep*, 18, 908-911.
- Bonnet, M. H., & Arand, D. L. (2003). Clinical effects of sleep fragmentation versus sleep deprivation. *Sleep Medicine Reviews*, 7(4), 297-310.
- Bonnet, M., & Arand, D. (2010). Hyperarousal and insomnia: State of the science. *Sleep Medicine Reviews*, 14(1), 9-15.
- Borbély, A. A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Human neurobiology*, 1(3), 195-204.
- Borbely, A. A., & Neuhaus, H. U. (1979). Sleep-deprivation: effects of sleep and EEG in the rat. *Journal of Comparative Physiology*, 133(1), 71-87.
- Borsini, F; Podhorna, J; Marazziti, D (2002). "Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?". *Psychopharmacology*. 163 (2): 121-141.
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463, 55-65.
- Bourin, M; Hascoët, M (2003). "The mouse light/dark box test". *European Journal of Pharmacology*. 463 (1-3): 55-65.

- Boursaud, P. M., Remond, A., van Someren, E. J., & Mühlethaler, M. (2003). Suppression of pontine-geniculo-occipital wave activity during rapid eye movement sleep in the cat. *Neuroscience*, 119(3), 803-812.
- Breslau, N., Roth, T., Rosenthal, L., & Andreski, P. (1996). Sleep disturbance and psychiatric disorders: A longitudinal epidemiological study of young adults. *Biological Psychiatry*, 39(6), 411-418.
- Brosschot, J. F., Gerin, W., & Thayer, J. F. (2018). The perseverative cognition hypothesis: A review of worry, prolonged stress-related physiological activation, and health. *Journal of psychosomatic research*, 117, 3-11.
- Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews*, 92(3), 1087-1187.
- Brunoni, A. R., Lopes, M., & Fregni, F. (2008). A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: Implications for the role of neuroplasticity in depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 11(8), 1169-1180.
- Buijs, R. M., Scheer, F. A., Kreier, F., & Yi, C. X. (2019). The 24-hour sleep-wake rhythm: a new sleep homeostasis model to explain sleep duration. *Obesity Reviews*, 20(Suppl 1), 6-13.
- Buijs, R. M., van Eden, C. G., Goncharuk, V. D., & Kalsbeek, A. (2006). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *Journal of Endocrinology*, 18(5), 161-171.
- Bush, B., Donnay, C., Andrews, E. A., Lewis-Sanders, D., Gray, C. L., Qiao, Z., ... & Ehlen, J. C. (2022). Non-rapid Eye Movement Sleep Determines Resilience to Social Stress. Preprint.

C

- Cai, Z., & Li, H. (2020). An Updated Review: Androgens and Cognitive Impairment in Older Men. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 586909.
- Cain, N., & Gradisar, M. (2010). Electronic media use and sleep in school-aged children and adolescents: A review. *Sleep Medicine*, 11(8), 735-742.
- Cajochen, C., Münch, M., Kobińska, S., Kräuchi, K., Steiner, R., Oelhafen, P., ... & Wirz-Justice, A. (2003). High sensitivity of human melatonin, alertness, thermoregulation, and heart rate to short wavelength light. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(3), 4502-4509.
- Çalışkan, G., Müller, I., Semtner, M., et al. (2016). Identification of parvalbumin interneurons as cellular substrate of fear memory persistence. *Cerebral Cortex*, 26(5), 2325-2340.
- Campbell, S. S., & Tobler, I. (1984). Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 8(3), 269-300.
- Carboni, E., Gee, K. W., Wieland, S., & Lan, N. C. (1996). Anxiolytic properties of endogenously occurring pregnanediols in two rodent models of anxiety. *Psychopharmacology*, 126, 173-178.
- Carley, D. W., & Farabi, S. S. (2016). Physiology of Sleep. *Diabetes Spectrum*, 29(1), 5-9.
- Carotenuto, M., Esposito, M., Parisi, L., Gallai, B., Marotta, R., Pascotto, A., ... & Roccella, M. (2012). Depressive symptoms and childhood sleep apnea syndrome. *NDT*, 369.
- Carrier, N., Saland, S. K., Duclot, F., He, H., Mercer, R., & Kabbaj, M. (2015). The anxiolytic and antidepressant-like effects of testosterone and estrogen in gonadectomized male rats. *Biological Psychiatry*, 78, 259-269.
- Carskadon, M. A. (2004). Sleep in adolescents: the perfect storm. *Pediatric Clinics*, 51(2), 299-317.
- Carskadon, M. A., Harvey, K., & Dement, W. C. (1981). Sleep loss in young adolescents. *Sleep*, 4, 299-312.

- Caruso, C. C. (2012). Running on empty: Fatigue and healthcare professionals: The consequences of inadequate sleep. NIOSH: Workplace Safety and Health.
- Cedernaes, J., Osler, M., Voisin, S., Broman, J. E., Vogel, H., Dickson, S. L., Zierath, J. R., Schiöth, H. B., & Benedict, C. (2015). Acute sleep loss induces tissue-specific epigenetic and transcriptional alterations to circadian clock genes in men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(3), E1255-E1261.
- Charrier, A., Ozturk, N., & Reddy, A. B. (2017). Light-modulated regulators of the circadian clock. *Journal of Biological Chemistry*, 292(21), 8553-8560.
- Chen, M. C., Chang, C., Glover, G. H., et al. (2014). Increased insula coactivation with salience networks in insomnia. *Biological Psychology*, 97, 1-8.
- Chen, Y. L., Keller, J. J., Kang, J. H., & Hsieh, H. J. (2013). Obstructive sleep apnea and the subsequent risk of depressive disorder: A population-based follow-up study. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 9(5), 417-423.
- Cheng, J. X., Ren, J., Qiu, J., Jiang, Y., Zhao, X., Sun, S., & Su, C. (2021). Rapid eye movement sleep and slow wave sleep rebounded and related factors during positive airway pressure therapy. *Scientific Reports*, 11(1), 7599.
- Cherrier, M. (2009). Testosterone effects on cognition in health and disease. *Frontiers in Hormone Research*, 37, 150-162.
- Chihorek AM, Abou-Khalil B, & Malow BA. (2007). Obstructive sleep apnea is associated with seizure occurrence in older adults with epilepsy. *Neurology*, 69(19), 1823-1827.
- Chokroverty, S. (2014). *Sleep Disorders Medicine: Basic Science, Technical Considerations, and Clinical Aspects* (3rd ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Chung, H. S., Lee, J. H., Kim, H., Lee, H. J., Kim, S. H., Kwon, H. K., Im, S. H., & Bae, H. (2010). Foxp3 is a novel repressor of microglia activation. *Glia*, 58(10), 1247-1256.
- Cikrikcioglu, M., Hursitoglu, M., Erkal, H., et al. (2011). Oxidative stress and autonomic nervous system functions in restless leg syndrome. *European Journal of Clinical Investigation*.
- Cirelli, C., & Tononi, G. (2009). Sleep and sleep states: Gene expression. *Encyclopedia of Neuroscience*, 903-909.
- Civardi, C., Boccagni, C., Vicentini, R., Bolamperti, L., Tarletti, R., Varrasi, C., Monaco, F., & Cantello, R. (2001). Cortical excitability and sleep deprivation: A transcranial magnetic stimulation study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 71(6), 809-812.
- Clark, C. P., & Golshan, S. (2007). Polysomnography and criteria for the antidepressant response to sleep deprivation. *Journal of Affective Disorders*, 101(1-3), 195-200.
- Clemens, Z., Fabó, D., & Halász, P. (2005). Overnight verbal memory retention correlates with the number of sleep spindles. *Neuroscience*, 132(2), 529-535.
- Coenen, A.M., & van Luijtelaaar, E.L. (1985). Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiology & Behavior*, 35(4), 501-504.
- Cohen, L. S., Sichel, D. A., Dimmock, J. A., & Rosenbaum, J. F. (1994). Impact of pregnancy on panic disorder: A case series. *Journal of Clinical Psychiatry*, 55, 284-288.
- Connor, J., Norton, R., Ameratunga, S., Robinson, E., Civil, I., Dunn, R., Bailey, J., & Jackson, R. (2002). Driver sleepiness and risk of serious injury to car occupants: Population-based case control study. *British Medical Journal*, 324(7346), 1125.
- Cortese, S., Konofal, E., Yateman, N., Mouren, M. C., & Lecendreux, M. (2013). Sleep and alertness in children with ADHD. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 54(7), 745-753.
- Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., & Tomkins, D. M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 32, 777-785.
- Costello, D. A., & Lynch, M. A. (2013). Toll-like receptor 3 activation modulates hippocampal network excitability, via glial production of interferon- β . *Hippocampus*, 23(8), 696-707.
- Cox, R.C., & Olatunji, B.O. (2016). A systematic review of sleep disturbance in anxiety and related disorders. *Journal of anxiety disorders*, 37, 104-29.

- Czeh, B., Simon, M., van der Hart, M. G., Schmelting, B., Hesselink, M. B., & Fuchs, E. (2005). Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 67-79.
- Czeh, B., Welt, T., Fischer, A. K., Erhardt, A., Schmitt, W., Muller, M. B., ... & Fuchs, E. (2007). Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*, 62(5), 484-489.

D

- D'Arcangelo, G., Tancredi, V., Onofri, F., D'Antuono, M., Giovedì, S., & Benfenati, F. (2000). Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience*, 12(4), 1241-1252.
- Datta, S., & MacLean, R. R. (2007). Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: Reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31, 775-824.
- Day, N., & Midgley, A. (1999). Assessing sleep quality and daytime sleepiness in children with psychiatric disorders. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 40(5), 803-812.
- Day, R., Gerhardstein, R., Lumley, A., et al. (1999). The behavioral morbidity of obstructive sleep apnea. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 41, 341-354.
- Day, R., Gerhardstein, R., Lumley, A., Roth, T., & Rosenthal, L. (1999). The behavioral morbidity of obstructive sleep apnea. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 41(5), 341-354. doi: 10.1053/pcad.1999.0410341.
- De Sarro, G., Russo, E., Ferreri, G., Giuseppe, B., Flocco, M. A., Di Paola, E. D., & De Sarro, A. (2004). Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 77(4), 761-766.
- De Souza Silva, M. A., Mattern, C., Topic, B., Buddenberg, T. E., & Huston, J. P. (2009). Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone. *European Neuropsychopharmacology*, 19, 53-63.
- Dean, B. A., Aguilar, D., Shapiro, C. M., Orr, W. C., Isserman, J. A., Calimlim, B., ... & Rippon, G. A. (2010). Impaired health status, daily functioning, and work productivity in adults with excessive sleepiness. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 52(2), 144-149.
- Deboer, T., Detari, L., & Meijer, J. H. (2007). Long term effects of sleep deprivation on the mammalian circadian pacemaker. *Sleep*, 30(2), 257-262.
- Degen, R., Degen, H. E., & Reker, M. (1987). Sleep EEG with or without sleep deprivation? Does sleep deprivation activate more epileptic activity in patients suffering from different types of epilepsy? *European Neurology*, 26, 51-59.
- DeLacea, J. A., & Eban-Rothschild, A. (2017). A good rest: Uncovering the sleeping brain. *Science*, 355(6322), 1294-1295.
- Dell'Aquila, J. T., & Soti, V. (2022). Sleep deprivation: a risk for epileptic seizures. *Sleep Science*, 15(2), 245-249.
- Deon, D., Ahmed, S., Tai, K., Scaletta, N., Herrero, C., Lee, I. H., Krause, A., & Ivashkiv, L. B. (2001). Cross-talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Journal of Immunology*, 167(9), 5395-5403.
- Devinsky, O., Ehrenberg, B., Barthlen, G. M., Abramson, H. S., & Luciano, D. (1994). Epilepsy and sleep apnea syndrome. *Neurology*, 44(11), 2060-2064.
- Díaz-Negrillo, A. (2013). Influence of sleep and sleep deprivation on ictal and interictal epileptiform activity. *Epilepsy Research and Treatment*, 2013, 492524.

- Diekelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(2), 114-126.
- Dinges, D. F., Graeber, R. C., Carskadon, M. A., Czeisler, C. A., & Dement, W. C. (1989). Attending to inattention. *Science*, 245(4916), 342-343.
- Diniz Behn, C. G., & Booth, V. (2011). Modeling the temporal architecture of rat sleep-wake behavior. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 4713-4716.
- Dousset, J. C., Trouilh, M., & Foglietti, M. J. (1983). Plasma malonaldehyde levels during myocardial infarction. *Clin Chim Acta*, 129(3), 319-322.
- Downey, R., & Bonnet, M. H. (1987). Performance during frequent sleep disruption. *Sleep*, 10(4), 354-363.
- Driller, M. W., Dunican, I. C., Omond, S. E. T., Boukhris, O., Stevenson, S., Lambing, K., & Bender, A. M. (2023). Pyjamas, Polysomnography and Professional Athletes: The Role of Sleep Tracking Technology in Sport. *Sports (Basel)*, 11(1), 14.
- Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B., & Hen, R. (2004). Effects of Chronic Fluoxetine in Animal Models of Anxiety and Depression. *Neuropsychopharmacology*, 29(7), 1321-1330.
- Duval, E. R., Javanbakht, A., & Liberzon, I. (2015). Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11, 115-126.
- Dworak, M., McCarley, R. W., Kim, T., Kalinchuk, A. V., & Basheer, R. (2010). Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *Journal of Neuroscience*, 30(26), 9007-9016.

E

- Erland, L. A. E., & Saxena, P. K. (2017). Melatonin natural health products and supplements: Presence of serotonin and significant variability of melatonin content. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 13(2), 275-281.
- Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1254-1266.

F

- Fabene, P. F., Navarro Mora, G., Martinello, M., Rossi, B., Merigo, F., Ottoboni, L., Bach, S., Angiari, S., Benati, D., Chakir, A., Zanetti, L., Schio, F., Osculati, A., Marzola, P., Nicolato, E., Homeister, J. W., Xia, L., Lowe, J. B., McEver, R. P., Osculati, F., Sbarbati, A., Butcher, E. C., & Constantin, G. (2008). A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nature Medicine*, 14(12), 1377-1383.
- Famitafreshi, H., & Karimian, M. (2020). Reduction of anxiety level is associated with an oxidative-stress imbalance in the hippocampus in morphine administration period in male rats. *Journal of Addictive Diseases*, 38(1), 64-70.
- Farr, S. A., Banks, W. A., & Morley, J. E. (2000). Estradiol potentiates acetylcholine and glutamate-mediated post-trial memory processing in the hippocampus. *Brain Research*, 864, 263-269.
- Feng, V., Tumati, S., Wang, R., Bawa, K. K., Gallagher, D., Herrmann, N., Marzolini, S., Oh, P., Andreatza, A., & Lanctôt, K. L. (2022). The Relationship between Oxidative Stress and Subjective Sleep Quality in People with Coronary Artery Disease. *Brain Sciences*, 12(8), 1070.
- Ferini-Strambi, L., & Zucconi, M. (2000). REM sleep behavior disorder. *Clinical Neurophysiology*, 111(Suppl. 2), S136-S140.
- Fernandez-Guasti, A., & Martínez-Mota, L. (2003). Orchidectomy sensitizes male rats to the action of diazepam on burying behavior latency: Role of testosterone. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 75, 473-479.
- Ferrara, M., De Gennaro, L., & Bertini, M. (1999). Selective slow-wave sleep (SWS) deprivation and SWS rebound: Do we need a fixed SWS amount per night? *Sleep Research Online*, 2(4), 15-19.

Literatura

- Ferre, S., Diamond, I., & Goldberg, S. R. (1989). Idazoxan counteracts caffeine-induced stimulation of locomotor activity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 163(1), 85-90.
- Filova, B., Malinova, M., Babickova, J., Tothova, L., Ostatnikova, D., Celec, P., et al. (2015). Effects of testosterone and estradiol on anxiety and depressive-like behavior via a non-genomic pathway. *Neuroscience Bulletin*, 31, 288-296.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 7-15.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 452-82.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E.,...Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.
- Fisher, S. P., Godinho, S. I. H., Potheary, C. A., Hankins, M. W., Foster, R. G., & Peirson, S. N. (2012). Rapid Assessment of Sleep-Wake Behavior in Mice. *Journal of Biological Rhythms*, 27, 48-58.
- Foldvary-Schaefer N, Andrews ND, Pornsriniyom D, et al. (2012). Sleep apnea and epilepsy: Who's at risk? *Epilepsy & Behavior*, 25(3), 363-367.
- Frank, M.G., Morrissette, R., & Heller, H.C. (1998). Effects of sleep deprivation in neonatal rats. *Brain Research Developmental Brain Research*, 108(1-2), 269-276.
- Franken, P., Chollet, D., & Tafti, M. (2001). The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control. *Journal of Neuroscience*, 21(8), 2610-2621.
- Franken, P., Dijk, D. J., Tobler, I., & Borbély, A. A. (1991). Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 261(1), R198-R208.
- Franken, P., Gip, P., Hagiwara, G., Ruby, N., Heller, H. C., & O'Hara, B. (2007). Nighttime sleep EEG changes following sleep deprivation in mice. *Sleep*, 30(5), 623-632.
- Franken, P., Malafosse, A., & Tafti, M. (2001). Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(3), R1172-R1180.
- Franken, P., Thomason, R., Heller, H. C., & O'Hara, B. F. (2007). A non-circadian role for clock-genes in sleep homeostasis: A strain comparison. *BMC Neuroscience*, 8, 87.
- Franzen, P. L., & Buysse, D. J. (2008). Sleep disturbances and depression: Risk relationships for subsequent depression and therapeutic implications. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 10(4), 473-481.
- Fregni, F., Otachi, P. T., Do Valle, A., Boggio, P. S., Thut, G., Rigonatti, S. P., ... Valente, K. D. (2006). A randomized clinical trial of repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with refractory epilepsy. *Annals of Neurology*, 60(4), 447-455.
- Frucht, M. M., Quigg, M., Schwaner, C., & Fountain, N. B. (2000). Distribution of seizure precipitants among epilepsy syndromes. *Epilepsia*, 41, 1534-1539.
- Frye, C. A., & Duncan, J. E. (1994). Progesterone metabolites, effective at the GABAA receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats. *Brain Research*, 643, 194-203.
- Frye, C. A., & Lacey, E. H. (2001). Posttraining androgens' enhancement of cognitive performance is temporally distinct from androgens' increases in affective behavior. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 1, 172-182.
- Frye, C. A., & Seliga, A. M. (2001). Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 1, 371-381.
- Frye, C. A., Petralia, S. M., & Rhodes, M. E. (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 67, 587-596.

- Fukuda, M., Morimoto, T., Suzuki, Y., Shinonaga, C., & Ishida, Y. (2007). Interleukin-6 attenuates hyperthermia-induced seizures in developing rats. *Brain & Development*, 29(10), 644-648.
- Fuller, P. M., Gooley, J. J., & Saper, C. B. (2011). Neurobiology of the sleep-wake cycle: Sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. *Journal of Biological Rhythms*, 26(2), 123-135.

G

- Gallopini, T., Luppi, P. H., Rambert, F. A., Frydman, A., Fort, P., & Jouvet, M. (2004). Effect of the Wake-Promoting Agent Modafinil on Sleep-Promoting Neurons from the Ventrolateral Preoptic Nucleus: An In Vitro Pharmacologic Study. *Sleep*, 27(1), 19-25.
- Gambineri, A., Pelusi, C., & Pasquali, R. (2003). Testosterone levels in obese male patients with obstructive sleep apnea syndrome: Relation to oxygen desaturation, body weight, fat distribution and the metabolic parameters. *Journal of Endocrinological Investigation*, 26, 493-498.
- Gangwisch, J., Malaspina, D., Posner, K., Babiss, L. A., & Heymsfield, S. B. (2010). Insomnia and sleep duration as mediators of the relationship between depression and hypertension incidence. *American Journal of Hypertension*, 23(1), 62-69.
- Garattini, S., & Vezzani, A. (2000). Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *European Journal of Neuroscience*, 12(7), 2623-2633.
- Gater, R., Tansella, M., Korten, A., Tiemens, B. G., Mavreas, V. G., & Olatawura, M. O. (1998). Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: Report from the World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care. *Archives of General Psychiatry*, 55, 405-413.
- Gaudreau, H., Morettini, J., Lavoie, H. B., & Carrier, J. (2001). Effects of a 25-h sleep deprivation on daytime sleep in the middle-aged. *Neurobiology of aging*, 22(3), 461-468.
- Gaweł S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. *Wiad Lek.* 2004;57(9-10):453-5.
- Geoffroy, P., Hoertel, N., Etain, B., et al. (2018). Insomnia and hypersomnia in major depressive episode: Prevalence, sociodemographic characteristics and psychiatric comorbidity in a population-based study. *Journal of Affective Disorders*, 226, 132-141.
- Gerstner, J. R., Smith, G. G., Lenz, O., Perron, I. J., Buono, R. J., & Ferraro, T. N. (2014). BMAL1 controls the diurnal rhythm and set point for electrical seizure threshold in mice. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8, 121.
- Gibbs E, & Gibbs FA. (1947). Diagnostic and localizing value of electroencephalographic studies in sleep. *Association for Research in Nervous and Mental Disease*, 26, 366-377.
- Giedke, H., Geilenkirchen, R., & Hausen, M. (1992). The timing of partial sleep deprivation in depression. *Journal of Affective Disorders*, 25, 117-128.
- Giedke, H., Klingberg, S., Schwärzler, F., & Schweinsberg, M. (2003). Direct comparison of total sleep deprivation and late partial sleep deprivation in the treatment of major depression. *Journal of Affective Disorders*, 76(1-3), 85-93.
- Gillberg, M., Kecklund, G., & Åkerstedt, T. (1994). Relations between performance and subjective ratings of sleepiness during a night awake. *Sleep*, 17, 236-241.
- Giltay, E. J., Enter, D., Zitman, F. G., Penninx, B., Van Pelt, J., Spinhoven, P., & Roelofs, K. (2012). Salivary testosterone: Associations with depression, anxiety disorders, and antidepressant use in a large cohort study. *Journal of Psychosomatic Research*, 72(3), 205-213.
- Glos, M., Bucher, T., Wiest, R., Schindler, C., Konstantinopoulou, E., & Züst, R. (2019). Sleep fragmentation is associated with metabolic disturbances, including obesity and diabetes mellitus type 2: a population-based study. *Sleep Medicine*, 54, 184-191.

- Goel, N., Rao, H., Durmer, J. S., & Dinges, D. F. (2009). Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Seminars in neurology*, 29(4), 320-339.
- Gomes, A. A., Tavares, J., & de Azevedo, M. H. (2011). Sleep and academic performance in undergraduates: A multi-measure, multi-predictor approach. *Chronobiology international*, 28(9), 786-801.
- Gong, H., McGinty, D., Guzman-Marin, R., Chew, K. T., Stewart, D., & Szymusiak, R. (2004). Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *Journal of Physiology*, 556(3), 935-946.
- Gottesmann, C. (2002). The neurochemistry of waking and sleeping mental activity: The disinhibition-dopamine hypothesis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 56(4), 345-354.
- Grassi-Zucconi, G., Cipriani, S., Balgkouranidou, I., & Scattoni, R. (2006). "One night" sleep deprivation stimulates hippocampal neurogenesis. *Brain Research Bulletin*, 69(4), 375-381.
- Graves, L. A., Heller, E. A., Pack, A. I., & Abel, T. (2003). Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learning & Memory*, 10(3), 168-176.
- Greenwood, B. N., Thompson, R. S., Opp, M. R., & Fleshner, M. (2014). Repeated exposure to conditioned fear stress increases anxiety and delays sleep recovery following exposure to an acute traumatic stressor. *Frontiers in Psychiatry*, 5, 146.
- Gulinello, M., Gong, Q. H., & Smith, S. S. (2002). Progesterone withdrawal increases the $\alpha 4$ subunit of the GABAA receptor in male rats in association with anxiety and altered pharmacology—a comparison with female rats. *Neuropharmacology*, 43, 701-714.
- Günzler, W. A., Kremers, H., & Flohé, L. (1974). An Improved Coupled Test Procedure for Glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.9) in Blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 12(10).
- Gupta, R., Lahan, V., & Goel, D. (2013). A study examining depression in restless leg syndrome. *Asian Journal of Psychiatry*, 6, 308-312.
- Guzman-Marin, R., Bashir, T., Suntsova, N., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2007). Hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in the adult rat. *Neuroscience*, 148, 325-333.
- Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Methippara, M., Greiffenstein, R., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2005). Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(9), 2111-2116.
- Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Methippara, M., Greiffenstein, R., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2005). Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(8), 2111-2116.

H

- Haack, M., Kraus, T., Schuld, A., Dalal, M., Koethe, D., & Pollmächer, T. (2007). Diurnal variations of interleukin-6 plasma levels are confounded by blood drawing procedures. *Psychoneuroendocrinology*, 32(5), 638-642.
- Haba-Rubio, J. (2005). Psychiatric aspects of organic sleep disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 7(4), 335-346.
- Halassa, M. M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J. R., Lee, S. Y., Abel, T., ... Frank, M. G. (2009). Astrocytic Modulation of Sleep Homeostasis and Cognitive Consequences of Sleep Loss. *Neuron*, 61(2), 213-219.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.
- Han, K. S., Kim, L., & Shim, I. (2012). Stress and sleep disorder. *Experimental Neurobiology*, 21, 141.
- Hanke, M. L., & Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: Mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*, 121(9), 367-387.

- Harkness, J. H., Bushana, P. N., Todd, R. P., Clegern, W. C., Sorg, B. A., & Wisor, J. P. (2019). Sleep disruption elevates oxidative stress in parvalbumin-positive cells of the rat cerebral cortex. *Sleep*, 42(1).
- Harrison, Z., & Horne, J. A. (2000). The impact of sleep deprivation on decision making: A review. *Journal of Experimental Psychology: Applied*, 6(3), 236-249.
- Harvey, A. G. (2002). A cognitive model of insomnia. *Behaviour Research and Therapy*, 40(8), 869-893.
- Harvey, A. G., & Payne, S. (2002). The management of unwanted pre-sleep thoughts in insomnia: Distraction with imagery versus general distraction. *Behaviour Research and Therapy*, 40, 267-277.
- Havekes, R., Bruinenberg, V. M., Tudor, J. C., Ferri, S. L., Baumann, A., Meerlo, P., & Abel, T. (2012). Transiently increasing cAMP levels selectively in hippocampal excitatory neurons during sleep deprivation prevents memory deficits induced by sleep loss. *Journal of Neuroscience*, 32(44), 15763-15771.
- He, J., Kastin, A. J., Wang, Y., & Pan, W. (2015). Sleep fragmentation has differential effects on obese and lean mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(3), 644-652.
- Henny, P., & Jones, B. E. (2008). Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs: implications for wakefulness and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 28(30), 7819-7830.
- Hicks, R. A., Okuda, A., & Thomsen, D. (1977). Depriving rats of REM sleep: The identification of a methodological problem. *The American Journal of Psychology*, 90(1), 95-102.
- Hill, V. M., O'Connor, R. M., Sissoko, G. B., Irobunda, I. S., Leong, S., Canman, J. C., Stavropoulos, N., & Shirasu-Hiza, M. (2018). A bidirectional relationship between sleep and oxidative stress in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 16(7), e2005206.
- Hirotsu, C., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2015). Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. *Sleep Science*, 8, 143-152.
- Hodoba, D. (2002). Sleep and disorders of sleep. In H. J. Adelman, K. E. Daly, & P. J. Smith (Eds.), *Encyclopedia of neuroscience* (pp. 1119-1122). Elsevier Science.
- Hodoba, D. (2017). *Poremećaji spavanja*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Hogg S.A. (1996). "Review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety". *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54 (1): 21-30.
- Horne, J. A., & Reyner, L. A. (1995). Sleep-related vehicle accidents. *British Medical Journal*, 310(6979), 565-567.
- Horne, J. A., & Shackell, B. S. (1989). Alpha rhythm and the subjective estimation of sleepiness. *Sleep*, 12(3), 231-237.
- Horne, J., & Reyner, L. (1999). Vehicle accidents related to sleep: A review. *Occupational and Environmental Medicine*, 56, 289-294.
- Hovatta, J. Juhila, & J. Donner (2010). Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neuroscience Research*, 68(4), 261-275.
- Howren, M. B., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, 71, 171-186.
- Lindqvist D. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2017;76:197-205.
- Hoyt, B. D. (2005). Sleep in patients with neurologic and psychiatric disorders. *Primary Care*, 32(3), 535-548.
- Hrnčić, D., Rasić-Marković, A., Bjekić-Macut, J., Susić, V., Djuric, D., & Stanojlović, O. (2013). Paradoxical sleep deprivation potentiates epilepsy induced by homocysteine thiolactone in adult rats. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 238(1), 77-83.
- Hrnčić, D., Rašić-Marković, A., Djuric, D., Šušić, V., & Stanojlović, O. (2011). The role of nitric oxide in convulsions induced by lindane in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 947-954.

- Hsu, J. C., Lee, Y. S., Chang, C. N., Chuang, H. L., Ling, E. A., & Lan, C. T. (2003). Sleep deprivation inhibits expression of NADPH-d and NOS while activating microglia and astroglia in the rat hippocampus. *Cells Tissues Organs*, 173(4), 242-254.
- Hu, S., Sheng, W. S., Ehrlich, L. C., Peterson, P. K., & Chao, C. C. (2000). Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation*, 7(3), 153-159.
- Huber, R., Deboer, T., & Tobler, I. (2000). Effects of sleep deprivation on sleep and sleep EEG in 3 mouse strains: empirical data and simulations. *Brain Research*, 857, 8-19.

I

- Iber, C., Ancoli-Israel, S., Chesson, A., & Quan, S. (2007). *The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: Rules, terminology and technical specifications (2nd ed.)*. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine.
- Ikeda, M., Ikeda-Sagara, M., Okada, T., et al. (2005). Brain oxidation is an initial process in sleep induction. *Neuroscience*, 130(4), 1029-1040.
- Ilanković, N., & Ilanković, V. (1999). *Restaurativna psihijatrija*. Telnid-Medicinski fakultet.
- Inutsuka, A., Yamanaka, A., & The Physiological Society (2013). The physiological aspects of orexin/hypocretin neurons. *Journal of Physiological Sciences*, 63(1), 7-16.
- Irshad, M., & Chaudhuri, P. S. (2002). Oxidant-antioxidant system: Role and significance in the human body. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(11), 1233-1239.
- Irwin, M. R., Olmstead, R., & Carroll, J. E. (2016). Sleep disturbance, sleep duration, and inflammation: A systematic review and meta-analysis of cohort studies and experimental sleep deprivation. *Biological Psychiatry*, 80(1), 40-52.

J

- Jagannath, A., Peirson, S. N., & Foster, R. G. (2013). Sleep and circadian rhythm disruption in neuropsychiatric illness. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(5), 888-894.
- Jain, S. V., Horn, P. S., Simakajornboon, N., & Glauser, T. A. (2013). Obstructive sleep apnea and primary snoring in children with epilepsy. *Journal of Child Neurology*, 28(1), 77-82.
- Jaussent, I., Bouyer, J., Ancellin, M. L., et al. (2011). Insomnia and daytime sleepiness are risk factors for depressive symptoms in the elderly. Vol. 34. *Sleep*.
- Jensen, F. E., Applegate, C. D., Holtzman, D., Belin, T. R., & Burchfiel, J. L. (1991). Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Annals of Neurology*, 29(6), 629-637.
- Jensen, F. E., Holmes, G. L., Lombroso, C. T., Blume, H. K., & Firkusny, I. R. (1992). Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia*, 33(6), 971-980.
- Jhaveri, K. A., Trammell, R. A., & Toth, L. A. (2007). Effect of environmental temperature on sleep, locomotor activity, core body temperature, and immune responses of C57BL/6J mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21, 975-987.
- Jocelyn, P. C. (1987). Spectrophotometric assay of thiols. In S. P. Colowick & N. O. Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 143, pp. 44-67). Academic Press.
- Jones, B. E. (2004). Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Progress in brain research*, 145, 157-169.
- Jordan, A. S., McSharry, D. G., & Malhotra, A. (2014). Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet*, 383(9918), 736-747.
- Jouvet, D., Vimont, P., Delorme, F., & Jouvet, M. (1964). Étude de la privation sélective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales*, 158(4), 756-759.

Jówko, E., Różański, P., & Tomczak, A. (2018). Effects of a 36-h survival training with sleep deprivation on oxidative stress and muscle damage biomarkers in young healthy men. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 2066.

K

Kalmbach, D. A., Anderson, J. R., & Drake, C. L. (2018). The impact of stress on sleep: Pathogenic sleep reactivity as a vulnerability to insomnia and circadian disorders. *Journal of Sleep Research*, 27(6), e12710.

Kanemoto K, Kawasaki J, Yuasa S, Kumaki T, Tomohiro O, Kaji R, & Nishimura M. (2003). Increased frequency of interleukin-1beta-511T allele in patients with temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, and prolonged febrile convulsion. *Epilepsia*, 44(6), 796-9.

Kang, S. G., Kang, J. M., Ko, K. P., Park, S. C., & Lee, I. H. (2013). Insomnia and its association with occupational injury among underground coal miners in Korea. *Sleep Medicine*, 14(9), 871-875.

Kapur, V. K., Redline, S., Nieto, F., Young, T. B., Newman, A. B., & Henderson, J. A. (2002). The relationship between chronically disrupted sleep and healthcare use. *Sleep*, 25(3), 289-296.

Kapur, V., Blough, D. K., Sandblom, R. E., Hert, R., de Maine, J. B., Sullivan, S. D., & Psaty, B. M. (1999). The medical cost of undiagnosed sleep apnea. *Sleep*, 22(6), 749-755.

Katy, D. A., & McHorney, C. A. (2002). The relationship between insomnia and health-related quality of life in patients with chronic illness. *Journal of Family Practice*, 51(3), 229-235.

Katz, D. A., & McHorney, C. A. (1998). Clinical correlates of insomnia in patients with chronic illness. *Archives of Internal Medicine*, 158(10), 1099-1107.

Khan, Z., & Trotti, L. M. (2015). Central disorders of hypersomnolence focus on the narcolepsies and idiopathic hypersomnia. *Chest*, 148(1), 262-273.

Khealani, B. A. (2006). Neurobiology of sleep. *Pakistan Journal of Neurological Sciences*, 1(3), 155-158.

Kim, J. H., Jeong, H. C., Lee, J. M., & Kim, T. H. (2017). Sleep apnea and sex hormones: a new field of research for understanding gender differences in sleep apnea. *Sleep Medicine and Research*, 8(1), 1-7.

Kirbas, G., Abakay, A., Topcu, F., Kaplan, A., Ünlü, M., & Peker, Y. (2007). Obstructive Sleep Apnoea, Cigarette Smoking and Serum Testosterone Levels in a Male Sleep Clinic Cohort. *Journal of International Medical Research*, 35, 38-45.

Kochanek, K. D., Murphy, S. L., Xu, J., & Arias, E. (2014). Mortality in the United States, 2013. NCHS data brief, no 178. National Center for Health Statistics.

Koranyi, E., & Lehmann, H. (1960). Experimental sleep deprivation in schizophrenic patients. *Archives of General Psychiatry*, 2(5), 534-544.

Kotagal P, & Yardi N. (2008). The relationship between sleep and epilepsy. *Seminars in Pediatric Neurology*, 15(2), 42-49.

Kripke, D. F., Garfinkel, L., Wingard, D. L., Klauber, M. R., & Marler, M. R. (2002). Mortality associated with sleep duration and insomnia. *Archives of General Psychiatry*, 59(2), 131-136.

Kronholm, E., Harma, M., Hublin, C., et al. (2006). Self-reported sleep duration in Finnish general population. *Journal of Sleep Research*, 15(3), 276-290.

Krueger, J. M., & Majde, J. A. (1994). Humoral links between sleep and the immune system: research issues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 719, 129-139.

Krueger, J. M., Obál, F., Fang, J., Kubota, T., & Taishi, P. (2010). The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1199, 222-235.

Kryger, M. H., Roos, L., Delaive, K., Walld, R., & Horrocks, J. (1996). Utilization of health care services in patients with severe obstructive sleep apnea. *Sleep*, 19(9 Suppl), S111-S116.

Krysta, K., Krzystanek, M., Bratek, A., et al. (2017). Sleep and inflammatory markers in different psychiatric disorders. *Journal of Neural Transmission*, 124, 179-186.

L

Lallukka, T., Sivertsen, B., Kronholm, E., Bin YS, Overland, S., Glozier, N., ... & Kivimäki, M. (2013). Association of sleep duration and sleep quality with the physical, social, and emotional functioning among Australian adults. *Sleep*, 36(11), 1683-1690.

Lau, C. F., Ho, Y. S., Hung, C. H., Wuwongse, S., Poon, C. H., Chiu, K., ... & Chang, R. C. (2014). Protective effects of testosterone on presynaptic terminals against oligomeric beta-amyloid peptide in primary culture of hippocampal neurons. *BioMed Research International*, 2014, 103906.

Lazarus, M., Shen, H. Y., Cherasse, Y., Qu, W. M., Huang, Z. L., Bass, C. E., Winsky-Sommerer, R., Semba, K., Fredholm, B. B., Boison, D., Hayaishi, O., Urade, Y., & Chen, J. F. (2019). Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 39(46), 9042-9054.

Le Dantec, Y., Hache, G., Guilloux, J. P., Guiard, B. P., David, D. J., Adrien, J., & Escourrou, P. (2014). NREM sleep hypersomnia and reduced sleep/wake continuity in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression based on chronic corticosterone administration. *Neuroscience*, 274, 357-368.

Le Méllédo, J.-M., & Baker, G. (2004). Role of progesterone and other neuroactive steroids in anxiety disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 4, 851-860.

Lee, A. J., Lei, H., Zhu, L., Jiang, Z., & Ladiges, W. C. (2020). Resilience to Acute Sleep Deprivation Is Associated with Attenuation of Hippocampal Mediated Learning Impairment. *Aging and Pharmacology and Therapeutics*, 4(2), 195-202.

Lee, V. V., Trinder, J., & Jackson, M. L. (2016). Autobiographical memory impairment in obstructive sleep apnea patients with and without depressive symptoms. *Journal of Sleep Research*, 25(5), 605-611.

Leenaars, C. H. C., Dematteis, M., Joosten, R. N. J. M. A., Eggels, L., Sandberg, H., Schirris, M., ... & Van Someren, E. J. W. (2011). A new automated method for rat sleep deprivation with minimal confounding effects on corticosterone and locomotor activity. *Journal of Neuroscience Methods*, 196(1), 107-117.

Leger, D. (1994). The cost of sleep-related accidents: A report for the National Commission on Sleep Disorders Research. *Sleep*, 17(1), 84-93.

Léger, D., Guilleminault, C., Bader, G., Levy, E., & Paillard, M. (2002). Medical and socio-professional impact of insomnia. *Sleep*, 25(6), 625-629.

Leger, D., Scheuermaier, K., Philip, P., Paillard, M., & Guilleminault, C. (2001). SF-36: Evaluation of quality of life in severe and mild insomniacs compared with good sleepers. *Psychosomatic Medicine*, 63(1), 49-55.

Lehtimäki, K. A., Keränen, T., Huhtala, H., Hurme, M., Ollikainen, J., Honkaniemi, J., Palmio, J., & Peltola, J. (2004). Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: The effect of seizure type and duration. *Journal of Neuroimmunology*, 152(1-2), 121-125.

Lehtimäki, K. A., Keränen, T., Palmio, J., Mäkinen, R., Hurme, M., Honkaniemi, J., & Peltola, J. (2007). Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 116(4), 226-230.

Lehtimäki, K. A., Peltola, J., Koskikallio, E., Keränen, T., & Honkaniemi, J. (2003). Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. *Brain Research Molecular Brain Research*, 110(2), 253-260.

- Leite Goes Gitai, D., de Andrade, T. G., Dos Santos, Y. D. R., Attaluri, S., & Shetty, A. K. (2019). Chronobiology of limbic seizures: potential mechanisms and prospects of chronotherapy for mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 98, 122-134.
- Leng Y, Musiek ES, Hu K, Cappuccio FP, & Yaffe K. (2019). Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*, 18(3), 307-318. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30461-7.
- Leproult, R., Van Cauter, E., & Spiegel, K. (2011). Impact of sleep and sleep loss on hormonal regulation and metabolism. In *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* (Vol. 24, No. 5, pp. 765-778). Elsevier.
- Levenson, J., Benca, R., & Rumble, M. (2015). Sleep related cognitions in individuals with symptoms of insomnia and depression. *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 11(1), 51-58.
- Levine, B., Roehrs, T., Stepanski, E., Zorick, F., & Roth, T. (1987). Fragmenting sleep diminishes its recuperative value. *Sleep*, 10(6), 590-599.
- Levine, B., Roehrs, T., Stepanski, E., Zorick, F., & Roth, T. (1987). Fragmenting sleep diminishes its recuperative value. *Sleep*, 10(6), 590-599.
- Li, G., Bauer, S., Nowak, M., Norwood, B., Tackenberg, B., Rosenow, F., Knake, S., Oertel, W. H., & Hamer, H. M. (2011). Cytokines and epilepsy. *Seizure*, 20(3), 249-256.
- Li, M., Kechter, A., Olmstead, R., et al. (2018). Sleep and mood in older adults: Coinciding changes in insomnia and depression symptoms. *International Psychogeriatrics*, 30.
- Li, P., Fu, X., Smith, N. A., Ziobro, J., Curiel, J., Tenga, M. J., et al. (2017). Loss of CLOCK results in dysfunction of brain circuits underlying focal epilepsy. *Neuron*, 96, 387-401.e6.
- Liew, S. C., & Aung, T. (2021). Sleep deprivation and its association with diseases - a review. *Sleep Medicine*, 77.
- Liu, X., Ji, A., Shi, C., Li, X., & Li, T. (2015). Impact of sleep disorders on the level of sex hormones in women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41(10), 1503-1508.
- Liu, Y., Gao, L., Lv, W., Lin, L., Wang, Y., He, H., et al. (2019). Histological, Ultrastructural, and Physiological Evaluation of a Rat Model of Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Medical Science Monitor*, 25, 1806-1813.
- Liu, Y., Wheaton, A. G., Chapman, D. P., Cunningham, T. J., Lu, H., & Croft, J. B. (2016). Prevalence of healthy sleep duration among adults—United States. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(6), 137-141.
- Longone, P. (2011). Neurosteroids as neuromodulators in the treatment of anxiety disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 2.
- Longordo, F., Fan, J., Steimer, T., Kopp, C., & Lüthi, A. (2011). Do mice habituate to "gentle handling?" A comparison of resting behavior, corticosterone levels and synaptic function in handled and undisturbed C57BL/6J mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 61.
- Longordo, F., Kopp, C., & Lüthi, A. (2009). Consequences of sleep deprivation on neurotransmitter receptor expression and function. *European Journal of Neuroscience*, 29(9), 1810-1819.
- Lorigooini, Z., Sadeghi Dehsahraei, K., Bijad, E., Habibian Dehkordi, S., & Amini-Khoei, H. (2020). Trigonelline through the attenuation of oxidative stress exerts antidepressant- and anxiolytic-like effects in a mouse model of maternal separation stress. *Pharmacology*, 105(5-6), 289-299.
- Lőrincz, M. L., & Adamantidis, A. R. (2017). Monoaminergic control of brain states and sensory processing: Existing knowledge and recent insights obtained with optogenetics. *Progress in Neurobiology*, 151, 237-253.
- Lovato, N., & Gradisar, M. (2014). A meta-analysis and model of the relationship between sleep and depression in adolescents. Recommendations for future research and clinical practice. *Sleep Medicine Reviews*, 18(6), 521-529.

- Lu, J., Greco, M., Shiromani, P., Saper, C. B., & Jouvet, M. (2000). Effects of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3830-3842.
- Lu, J., Sherman, D., Devor, M., & Saper, C. B. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*, 441(7093), 589-594.
- Luboshitzky, R., Zabari, Z., Shen-Orr, Z., Herer, P., & Lavie, P. (2001). Disruption of the nocturnal testosterone rhythm by sleep fragmentation in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 1134-1139.
- Lucey, B. P., Leahy, A., Rosas, R., & Shaw, P. J. (2015). A new model to study sleep deprivation-induced seizure. *Sleep*, 38(5), 777-785.
- Luppi, P. H., Wu, M. F., & Aston-Jones, G. (2017). Arousal, stress, and motivation: Hypothalamic modulation of sensory processing. *Current Opinion in Neurobiology*, 49, 219-224.
- Lytle, L. A., Pasch, K. E., & Farbakhsh, K. (2011). The relationship between sleep and weight in a sample of adolescents. *Obesity*, 19(2), 324-331.

M

- Macchi, M. M., & Bruce, J. N. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25(3-4), 177-195.
- Magalhães, E. S., Paes, F., Bittencourt, L. R., de Mello, M. T., & Tufik, S. (2010). Sleep deprivation and oxidative stress in animal models: a systematic review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(5), 352-361.
- Maglione, J. E., Ancoli-Israel, S., Peters, K. B., Paudel, M. L., Yaffe, K., Ensrud, K. E., ... & Stone, K. L. (2014). Subjective and objective sleep disturbance and longitudinal risk of depression in a cohort of older women. *Sleep*, 37(7), 1-9.
- Mahowald, M. W., & Schenck, C. H. (2005). The REM sleep behavior disorder odyssey. *Nature*, 437(7063), 1279-1285.
- Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., & Paul, S. M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232, 1004-1007.
- Mallick, B. N., & Singh, A. (2011). REM sleep loss increases brain excitability: Role of noradrenalin and its mechanism of action. *Sleep Medicine Reviews*, 15(3), 165-178.
- Malow, B. A., Levy, K., Maturen, K., Bowes, R., & O'Brien, L. M. (2000). Sleep-wake cycle abnormalities in epilepsy patients. *Sleep Research Online*, 3(3), 131-136.
- Malow, B. A., Lin, X., Kushwaha, R. K., & Aldrich, M. S. (1998). Interictal spiking increases with sleep depth in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 39(12), 1309-1316.
- Malow, B. A., Passaro, E., Milling, C., Minecan, D. N., & Levy, K. (2002). Sleep deprivation does not affect seizure frequency during inpatient video-EEG monitoring. *Neurology*, 59, 1371-1374.
- Malow, B. A., Weatherwax, K. J., Chervin, R. D., Hoban, T. F., Marzec, M. L., Martin, C., ... & Adler, R. D. (2003). Identification and treatment of obstructive sleep apnea in adults and children with epilepsy: a prospective pilot study. *Sleep Medicine*, 4(6), 509-515.
- Mander, B. A., Rao, V., Lu, B., Saletin, J. M., Lindquist, J. R., Ancoli-Israel, S., ... Walker, M. P. (2013). Prefrontal atrophy, disrupted NREM slow waves and impaired hippocampal-dependent memory in aging. *Nature neuroscience*, 16(3), 357-364.
- Manni, R., Zambrelli, E., Bellazzi, R., & Terzaghi, M. (2005). The relationship between focal seizures and sleep: an analysis of the cyclic alternating pattern. *Epilepsy Research*, 67(1-2), 73-80.
- Manns, I., Mainville, L., & Jones, B. E. (2001). Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience*, 107(2), 249-263.
- Marić, J. (2005). *Klinička psihijatrija*. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beograd.

- Matos, H. C., Koike, B. D. V., Pereira, W. D. S., de Andrade, T. G., Castro, O. W., Duzzioni, M., et al. (2018). Rhythms of core clock genes and spontaneous locomotor activity in post-status epilepticus model of mesial temporal lobe epilepsy. *Frontiers in Neurology*, 9, 632.
- Mauriz, J. L., Collado, P. S., Veneroso, C., Reiter, R. J., González-Gallego, J., & Tuñón, M. J. (2013). A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: Recent insights and new perspectives. *Journal of Pineal Research*, 54(1), 1-14.
- Mavanji, V., Teske, J. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M. (2010). Elevated sleep quality and orexin receptor mRNA in obesity-resistant rats. *International Journal of Obesity*, 34(11), 1576-1588.
- McCoy, J. G., Tartar, J. L., Bebis, A. C., Ward, C. P., McKenna, J. T., Baxter, M. G., & McCarley, R. W. (2007). Experimental sleep fragmentation impairs attentional set-shifting in rats. *Sleep*, 30, 52-60.
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annual review of neuroscience*, 22(1), 105-122.
- McGuire, M., Tartar, J. L., Cao, Y., McCarley, R. W., White, D. P., Strecker, R. E., et al. (2008). Sleep fragmentation impairs ventilatory long-term facilitation via adenosine A1 receptors: Sleep fragmentation impairs ventilator long-term facilitation. *Journal of Physiology*, 586, 5215-5229.
- McHenry, J., Carrier, N., Hull, E., & Kabbaj, M. (2014). Sex differences in anxiety and depression: Role of testosterone. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35, 42-57.
- McHenry, J., Carrier, N., Hull, E., & Kabbaj, M. (2014). Sex differences in anxiety and depression: Role of testosterone. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(1), 42-57.
- McKenna, J. T., Tartar, J. L., Ward, C. P., Thakkar, M. M., Cordeira, J. W., McCarley, R. W., & Strecker, R. E. (2007). Sleep fragmentation elevates behavioral, electrographic and neurochemical measures of sleepiness. *Neuroscience*, 146, 1462-1473.
- Means, M. K., Lichstein, K. L., Edinger, J. D., Taylor, D. J., Durrence, H. H., Husain, A. M., ... & Radtke, R. A. (2003). Changes in depressive symptoms after continuous positive airway pressure treatment for obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*, 7(1), 31-42.
- Medic, G., Wille, M., & Hemels, M. E. (2017). Short- and long-term health consequences of sleep disruption. *Nat. Sci. Sleep*, 9, 151-161.
- Meerlo, P., Mistlberger, R. E., Jacobs, B. L., Heller, H. C., & McGinty, D. (2009). New neurons in the adult brain: The role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep Medicine Reviews*, 13(3), 187-194.
- Meerlo, P., Sgoifo, A., & Suchecki, D. (2008). Restricted and disrupted sleep: Effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Medicine Reviews*, 12, 197-210.
- Meini, A., Benocci, A., Frosini, M., Sgaragli, G., Pessina, G., Aldinucci, C., Youmbi, G. T., & Palmi, M. (2000). Nitric oxide modulation of interleukin-1[beta]-evoked intracellular Ca²⁺ release in human astrocytoma U-373 MG cells and brain striatal slices. *Journal of Neuroscience*, 20(24), 8980-8986.
- Melcangi, R. C., Garcia-Segura, L. M., & Mensah-Nyagan, A. G. (2008). Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 777-797.
- Mendelson, W. G. (1977). *Human Sleep and Its Disorders*. Plenum Press.
- Mendelson, W.B., Guthrie, R.D., Frederick, G., & Wyatt, R.J. (1974). The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2(4), 553-556.
- Miano, S., Pelliccia, A., Evangelisti, M., Pagani, J., & Villa, M. P. (2008). Role of continuous positive airway pressure therapy on the pathogenesis of sleep-related frontal lobe epilepsy in a child with obstructive sleep apnea syndrome. *J Child Neurol*, 23(1), 124-128.
- Mignot, E. (2012). A practical guide to the therapy of narcolepsy and hypersomnia syndromes. *Neurotherapeutics*, 9(4), 739-752.
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32, 81-151.
- Mirescu, C., Peters, J. D., & Gould, E. (2006). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature neuroscience*, 9(2), 227-231.

- Misra, H., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine i a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–5.
- Modirrousta, M., Mainville, L., & Jones, B. E. (2005). Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *European Journal of Neuroscience*, 21(10), 2807-2816.
- Monje, F. J., Cabatic, M., Divisch, I., Kim, E. J., Herkner, K. R., Binder, B. R., ... & Pollak, D. D. (2011). Constant darkness induces IL-6-dependent depression-like behavior through the NFκB signaling pathway. *The Journal of Neuroscience*, 31, 9075-9083.
- Moore, J. L., Carvalho, D. Z., St Louis, E. K., & Bazil, C. (2021). Sleep and Epilepsy: a Focused Review of Pathophysiology, Clinical Syndromes, Co-morbidities, and Therapy. *Neurotherapeutics*, 18(1), 170-180.
- Morgenthaler, T. I., Kapur, V. K., Brown, T., Swick, T. J., & Alessi, C. (2007). Practice parameters for the treatment of narcolepsy and other hypersomnias of central origin. *Sleep*, 30(12), 1705-1711.
- Morin, C. M., Bootzin, R. R., Buysse, D. J., Edinger, J. D., Espie, C. A., & Lichstein, K. L. (2006). Psychological and behavioral treatment of insomnia: Update of the recent evidence (1998-2004). *Sleep*, 29(11), 1398-1414.
- Morsink, L. F., Vogelzangs, N., Nicklas, B. J., Beekman, A. T., Satterfield, S., Rubin, S. M., ... & Penninx, B. W. (2007). Associations between sex steroid hormone levels and depressive symptoms in elderly men and women: Results from the Health ABC study. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 874-883.
- Moss, T. H., & Sills, D. L. (1981). The Three Mile Island nuclear accident: Lessons and implications. *Science, Technology, & Human Values*, 6(4), 55-61.
- Mullington, J. M., Haack, M., Toth, M., Serrador, J., & Meier-Ewert, H. (2009). Cardiovascular, inflammatory and metabolic consequences of sleep deprivation. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 51(4), 294-302.
- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N.-G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., Schumacker, P. T., Thornalley, P. J., Toyokuni, S., Winterbourn, C. C., Yin, H., & Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651–662.

N

- Nadorff, M. R., Ellis, T. E., Allen, J. G., et al. (2014). Presence and persistence of sleep-related symptoms and suicidal ideation in psychiatric inpatients. *Crisis*, 35, 398-405.
- Nair, D., Zhang, S. X. L., Ramesh, V., Hakim, F., Kaushal, N., Wang, Y., et al. (2011). Sleep fragmentation induces cognitive deficits via nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent pathways in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184, 1305-1312.
- National Heart, Lung, and Blood Institute. (2009). What are sleep deprivation and deficiency? Retrieved from <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/sleep-deprivation-and-deficiency>
- National Sleep Foundation. (2005). 2005 Sleep in America Poll. Retrieved from <https://www.sleepfoundation.org/sleep-polls-data/sleep-in-america-poll/2005-sleep-america-poll>
- Nedić, A., & Živanović, O. (2009). *Psihijatrija*. Novi Sad: Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu.
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., & Bush, A. I. (2008). Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 11(6).

- Ng, M., & Pavlova, M. (2013). Why are seizures rare in rapid eye movement sleep? Review of the frequency of seizures in different sleep stages. *Epilepsy Research and Treatment*, 2013, 932790.
- Nir, Y., & Tononi, G. (2010). Dreaming and the brain: From phenomenology to neurophysiology. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(2), 88-100.
- Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G. J., Mignot, E., & Honda, Y. (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet*, 355(9197), 39-40.
- Nofzinger, E. A., Mintun, M. A., Wiseman, M., Kupfer, D. J., & Moore, R. Y. (1997). Forebrain activation in REM sleep: an FDG PET study. *Brain research*, 770(1-2), 192-201.
- Nuckols, T. K., Bhattacharya, J., Wolman, D. M., Ulmer, C., & Escarce, J. J. (2009). Cost implications of reduced work hours and workloads for resident physicians. *New England Journal of Medicine*, 360(21), 2202-2215.

O

- Oettel, M., & Mukhopadhyay, A. K. (2004). Progesterone: The forgotten hormone in men? *Aging Male*, 7, 236-257.
- Ohayon, M. M., & Roth, T. (2003). Place of chronic insomnia in the course of depressive and anxiety disorders. *Journal of Psychiatric Research*, 37, 9-15.
- Ohayon, M. M., Carskadon, M. A., Guilleminault, C., Vitiello, M. V. (2004). Meta-analysis Of Quantitative Sleep Parameters From Childhood To Old Age In Healthy Individuals: Developing Normative Sleep Values Across the Human Lifespan. *Sleep*, 27(7), 1255-1273.
- Oniani, T. N., Lortkipanidze, N. D., Mgaloblishvili, M. M., Maisuradze, L. M., Oniani, L. T., Babilodze, M. R., & Gvasalia, M. G. (1988). Neurophysiological analysis of paradoxical sleep deprivation. In T. N. Oniani (Ed.), *Neurobiology of Sleep-Wakefulness Cycle* (pp. 19-42). Metsniereba.
- Ozkara, C., Uzan, M., Tanriverdi, T., Baykara, O., Ekinci, B., Yeni, N., Kafadar, A., & Buyru, N. (2006). Lack of association between IL-1beta/alpha gene polymorphisms and temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Seizure*, 15(5), 288-291.

P

- Pack, A. I., Pack, A. M., Rodgman, E., Cucchiara, A., Dinges, D. F., & Schwab, C. W. (1995). Characteristics of crashes attributed to the driver having fallen asleep. *Accident Analysis & Prevention*, 27(6), 769-775.
- Palagini, L., Gemignani, A., Banti, S., Manconi, M., Mauri, M., Riemann, D., & Grassi, L. (2013). Chronic sleep loss during pregnancy as a determinant of stress: Impact on pregnancy outcome. *Sleep Medicine*, 14(6), 526-530.
- Papadimitriou, G. N., & Linkowski, P. (2005). Sleep disturbances in anxiety disorders. *International Review of Psychiatry*, 17(3), 229-236.
- Papatriantafyllou, E., Efthymiou, D., Zoumbaneas, E., Popescu, C. A., & Vassilopoulou, E. (2022). Sleep Deprivation: Effects on Weight Loss and Weight Loss Maintenance. *Nutrients*, 14(8), 1549.
- Pariante, C., & Lightman, S. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, 31, 464-468.
- Pariante, C., & Lightman, S. (2008). The HPA axis in major depression: Classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, 31, 464-468.
- Parish, J. M., & Lyng, P. J. (2003). Quality of life in bed partners of patients with obstructive sleep apnea or hypopnea after treatment with continuous positive airway pressure. *Chest*, 124(3), 942-947.

Literatura

- Park, D. S., Yoon, D. W., Yoo, W. B., Lee, S. K., Yun, C. H., Kim, S. J., et al. (2014). Sleep fragmentation induces reduction of synapsin II in rat hippocampus: Sleep fragmentation reduces synapsin II. *Sleep and Biological Rhythms*, 12, 135-144.
- Parhizkar, S., Gent, G., Chen, Y., Rensing, N., Gratuze, M., Strout, G., ... Holtzman, D. M. (2023). Sleep Deprivation Exacerbates Microglial Reactivity and A β Deposition in a TREM2-Dependent Manner in Mice. *Science Translational Medicine*, 15(693), eade6285.
- Patke, A., Youngstedt, S. D., Peskin, V., Fernandez, M., Grimaldi, D., & Partch, C. L. (2020). Circadian dysrhythmia: A novel perspective on timing disorders. *Sleep Medicine Reviews*, 49, 101227.
- Payne, J. D., & Nadel, L. (2004). Sleep, dreams, and memory consolidation: The role of the stress hormone cortisol. *Learning and Memory*.
- Peker, Y., Hedner, J., & Norum, J. (2015). Obstructive sleep apnea: An update. *Sleep Medicine Reviews*, 19, 25-39.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. and Briley, M. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat". *J. Neurosci. Methods*. 14 (3): 149-67.
- Perry, J. C., D'Almeida, V., Antunes, I. B., & Tufik, S. (2008). Distinct behavioral and neurochemical alterations induced by intermittent hypoxia or paradoxical sleep deprivation in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32, 87-94.
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (2000). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience*, 20(2), 111-119.
- Pilcher, J. J., & Huffcutt, A. I. (1996). Effects of sleep deprivation on performance: A meta-analysis. *Sleep*, 19(4), 318-326.
- Pintana, H., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. (2015). Testosterone deficiency, insulin-resistant obesity and cognitive function. *Metabolic Brain Disease*, 30(4), 853-876.
- Pires, G. N., Bezerra, A. G., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2016). Effects of experimental sleep deprivation on anxiety-like behavior in animal research: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 68, 575-589.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763.
- Polonis, K., Somers, V. K., Becari, C., Covassin, N., Schulte, P. J., Sicotte, H., ... Singh, P. (2017). Moderate-to-severe obstructive sleep apnea is associated with telomere lengthening. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 313(5), H1022-H1030.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (1997). Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience*, 79(1), 225-230.
- Pornsriyom, D., Kim, H. W., Bena, J., Andrews, N. D., Moul, D., & Foldvary-Schaefer, N. (2014). Effect of positive airway pressure therapy on seizure control in patients with epilepsy and obstructive sleep apnea. *Epilepsy & Behavior*, 37, 270-275.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 379-391.
- Portas, C. M., Bjorvatn, B., & Ursin, R. (1997). Adenosine and sleep. *Sleep Medicine Reviews*, 1(1), 5-19.
- Portas, C. M., Bjorvatn, B., Ursin, R., & Ursin, H. (2000). Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Progress in Neurobiology*, 60(1), 13-35.
- Prasad, B., Radulovacki, M., & Olopade, C. (2015). Heritability of sleep quality traits: a twin study. *Sleep*, 38(6), 931-939.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463, 3-33.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2012). Stages of Sleep. In *Neuroscience* (5th ed., pp. 791-803). Sinauer Associates.

R

Raison, C. L., & Miller, A. H. (2011). Is depression an inflammatory disorder? *Current Psychiatry Reports*, 13, 467-475.

Rakotoarisoa, M., Angelov, B., Espinoza, S., Khakurel, K., Bizien, T., & Angelova, A. (2019). Cubic Liquid Crystalline Nanostructures Involving Catalase and Curcumin: BioSAXS Study and Catalase Peroxidatic Function after Cubosomal Nanoparticle Treatment of Differentiated SH-SY5Y Cells. *Molecules*, 24(17), 3058.

Ramanathan, L., Gulyani, S., Nienhuis, R., & Siegel, J. M. (2002). Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *Neuroreport*, 13(11), 1387-1390.

Rankov Petrovic, B., Hrcic, D., Mladenovic, D., et al. (2019). Prenatal androgenization induces anxiety-like behavior in female rats, associated with reduction of inhibitory interneurons and increased BDNF in hippocampus and cortex. *BioMed Research International*, 2019.

Ravizza, T., & Vezzani, A. (2006). Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience*, 137(1), 301-308.

Ravizza, T., & Vezzani, A. (2006). Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience*, 137(1), 301-308.

Reddy, D. S., O'Malley, B. W., & Rogawski, M. A. (2005). Anxiolytic activity of progesterone in progesterone receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, 48, 14-24.

Redline, S., Adams, N., Strauss, M. E., Roebuck, T., Winters, M., & Rosenberg, C. (1998). Improvement of mild sleep-disordered breathing with CPAP compared with conservative therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(3 Pt 1), 858-865.

Redline, S., Sotres-Alvarez, D., Loreda, J., Hall, M., Patel, S. R., Ramos, A., ... & Daviglius, M. (2010). Sleep-disordered breathing in Hispanic/Latino individuals of diverse backgrounds. *The Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(10), 1264-1271.

Reite, M., Ruddy, J., & Nagel, K. (1997). Evaluacija i liječenje poremećaja spavanja [Evaluation and treatment of sleep disorders]. (S. Szabo, Trans.). Naklada Slap.

Reul, J. M. H. M., & Holsboer, F. (2002). On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 4, 31-46.

Riemann, D., & Voderholzer, U. (2003). Primary insomnia: A risk factor to develop depression?. *Journal of affective disorders*, 76(1-3), 255-259.

Riemann, D., Berger, M., & Voderholzer, U. (2001). Sleep and depression - results from psychobiological studies: an overview. *Biological Psychology*, 57(1-3), 67-103.

Roberts, R. E., & Duong, H. T. (2014). The prospective association between sleep deprivation and depression among adolescents. *Sleep*, 37(2), 239-244.

Rodenbeck, A., & Hajak, G. (2001). Neuroendocrine dysregulation in primary insomnia. Vol. 157.

Roman, V., Hagewoud, R., Luiten, P.G., & Meerlo, P. (2006). Differential effects of chronic partial sleep deprivation and stress on serotonin-1A and muscarinic acetylcholine receptor sensitivity. *Journal of Sleep Research*, 15(4), 386-394.

Rosa, D. V., Rezende, V. B., Costa, B. S., Mudado, F., Schütze, M., Torres, K. C., Martins, L. C., Moreira-Filho, C. A., Miranda, D. M., & Romano-Silva, M. A. (2016). Circulating CD4 and CD8 T cells expressing pro-inflammatory cytokines in a cohort of mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res*, 120, 1-6.

Literatura

- Rosenwasser, A. M. (2009). Functional neuroanatomy of sleep and circadian rhythms. In M. Kryger, T. Roth, & W. Dement (Eds.), *Principles and practice of sleep medicine* (pp. 63-74). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Rossi, G., Colicchio, G., & Pola, P. (1984). Interictal epileptic activity during sleep: A stereo-EEG study in patients with partial epilepsy. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 58(2), 97-106.
- Roth, T. (2007). Insomnia: Definition, prevalence, etiology, and consequences. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 3(5 Suppl), S7-S10.
- Roth, T., & Roehrs, T. A. (1996). Etiologies and sequelae of excessive daytime sleepiness. *Clinical Therapeutics*, 18, 562-576.
- Roure, N., Gomez, S., Mediano, O., et al. (2008). Daytime sleepiness and polysomnography in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Medicine*, 9, 727-731.
- Rubaj, A., Zgodziński, W., & Sieklucka-Dziuba, M. (2003). The epileptogenic effect of seizures induced by hypoxia: The role of NMDA and AMPA/KA antagonists. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 74(2), 303-311.
- Rupprecht, R., & Holsboer, F. (2001). Neuroactive steroids in neuropsychopharmacology. *International Review of Neurobiology*, 46, 461-477.
- Ruskin, D.N., Liu, C., Dunn, K.E., Bazan, N.G., & LaHoste, G.J. (2004). Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdala-mediated cued learning in rats. *European Journal of Neuroscience*, 19(11), 3121-3124.
- ## S
- Saha, S., Hatch, D. J., Hayden, K. M., Steffens, D. C., & Potter, G. G. (2016). Appetite and Weight Loss Symptoms in Late-Life Depression Predict Dementia Outcomes. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 24(10), 870-878.
- Sandhu JK, Birnboim HC. Mutagenicity i cytotoxicity of reactive oxygen i nitrogen species in the MN-11 murine tumor cell line. *Mutation Research/Fundamental i Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1997;379(2):241-52.
- Sanchez-Alavez, M., Tabarean, I. V., Behrens, M. M., & Bartfai, T. (2006). Ceramide mediates the rapid phase of the febrile response to IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2904-2908.
- Sánchez-Vidaña, D. I., Po, K. K., Fung, T. K., Chow, J. K., Lau, W. K., So, P. K., ... & Tsang, H. W. (2019). Lavender essential oil ameliorates depression-like behavior and increases neurogenesis and dendritic complexity in rats. *Neuroscience Letters*, 701, 180-192. 17.
- Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J., & Scammell, T. E. (2010). Sleep State Switching. *Neuron*, 68(6), 1023-1042.
- Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2010). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063), 1257-1263.
- Sahay, A., Wilson, D. A., & Hen, R. (2011). Pattern Separation: A Common Function for New Neurons in Hippocampus and Olfactory Bulb. *Neuron*, 70(4), 582-588.
- Sasaki, K., Suzuki, M., Mieda, M., et al. (2011). Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS ONE*, 6(4), e20360.
- Sassani, A., Findley, L. J., Kryger, M., Goldlust, E., George, C., & Davidson, T. M. (2004). Reducing motor-vehicle collisions, costs, and fatalities by treating obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*, 27(3), 453-458.
- Sateia, M. J. (2009). Update on sleep and psychiatric disorders. *Chest*, 135(5), 1370-1379.

- Sateia, M. J. (2014). International classification of sleep disorders-third edition highlights and modifications. *Chest*, 146(5), 1387-1394.
- Sattaratpajit, N., Kulalert, P., & Wongpradit, W. (2022). Characteristics of rapid eye movement-related obstructive sleep apnea in Thai patients. *Scientific Reports*, 12(1).
- Sayyah, M., Beheshti, S., Shokrgozar, M. A., Eslami-far, A., Deljoo, Z., Khabiri, A. R., & Haeri Rohani, A. (2005). Antiepileptogenic and anticonvulsant activity of interleukin-1 beta in amygdala-kindled rats. *Experimental Neurology*, 191(1), 145-153.
- Scalise, A., Desiato, M. T., Gigli, G. L., Romigi, A., Tombini, M., Marciani, M. G., Izzi, F., & Placidi, F. (2006). Increasing cortical excitability: A possible explanation for the proconvulsant role of sleep deprivation. *Sleep*, 29(12), 1595-1598.
- Scammell, T. E., Arrigoni, E., & Lipton, J. O. (2017). Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron*, 94(1), 19-36.
- Schaaf, M. J., De Kloet, E. R., & Vreugdenhil, E. (2000). Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus: Implications for memory formation. *Stress*, 3(3), 201-208.
- Schmitt, K., Holsboer-Trachsler, E., & Eckert, A. (2016). BDNF in sleep, insomnia, and sleep deprivation. *Annals of Medicine*, 48(1-2), 42-51.
- Schroder, C. M., & O'Hara, R. (2005). Depression and obstructive sleep apnea (OSA). *Annals of General Psychiatry*, 4(1), 13.
- Senaratna, C. V., Perret, J. L., Lodge, C. J., Lowe, A. J., Campbell, B. E., Matheson, M. C., Hamilton, G. S., & Dharmage, S. C. (2017). Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: A systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, 34, 70-81.
- Serdari, A., Manolis, A., Tsiptsios, D., et al. (2020). Insight into the relationship between sleep characteristics and anxiety: a cross-sectional study in indigenous and minority populations in northeastern Greece. *Psychiatry Research*, 292, 113361.
- Seyal M, Bateman LM, Albertson TE, et al. (2010). Respiratory changes with seizures in localization-related epilepsy: Analysis of periictal hypercapnia and airflow patterns. *Epilepsy & Behavior*, 57(8), 1359-1364.
- Shan, X., Chi, L., Ke, Y., et al. (2007). Manganese superoxide dismutase protects mouse cortical neurons from chronic intermittent hypoxia-mediated oxidative damage. *Neurobiology of Disease*, 28(2), 206-215.
- Shneerson, J. M. (2000). *Handbook of sleep medicine*. Blackwell Science: Cambridge.
- Shrivastava, D., Jung, S., Saadat, M., Sirohi, R., & Crewson, K. (2014). How to interpret the results of a sleep study. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, 4(5), 24983.
- Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59-64.
- Singh, R., Kiloung, J., Singh, S., & Sharma, D. (2008). Effect of paradoxical sleep deprivation on oxidative stress parameters in brain regions of adult and old rats. *Biogerontology*, 9(3), 153-162.
- Singh, S., & Mallick, B. N. (1996). Mild electrical stimulation of pontine tegmentum around locus coeruleus reduces rapid eye movement sleep in rats. *Neuroscience Research*, 24(3), 227-235.
- Sindhu RK, Kaur P, Kaur P, Singh H, Batiha GE-S, Verma I. Exploring multifunctional antioxidants as potential agents for management of neurological disorders. *Environ Sci Pollut Res*. 2022;29(17):24458-77.
- Smith, G. S., Reynolds, C. F., Houck, P. R., et al. (2009). The cerebral glucose metabolic response to combined total sleep deprivation and antidepressant treatment in geriatric depression: A randomized, placebo-controlled study. *Psychiatry Research*, 171(1), 1-9.
- Soderpalm, A. H. V., Lindsey, S., Purdy, R. H., Hauger, R., & Wit de, H. (2004). Administration of progesterone produces mild sedative-like effects in men and women. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 339-354.

- Soldatos, C. R., & Paparrigopoulos, T. J. (2005). Sleep physiology and pathology: Pertinence to psychiatry. *International Review of Psychiatry*, 17(4), 213-228.
- Sonka, K., Jukličková, M., Pretl, M., Dostálová, S., Horínek, D., & Nevsímalová, S. (2000). Seizures in sleep apnea patients: Occurrence and time distribution. *Sborník Lékařský*, 101(3), 229-232.
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin Neurons and Gamma Rhythms Enhance Cortical Circuit Performance. *Nature*, 459(7247), 698-702.
- Spiegel, K., Leproult, R., & Van Cauter, E. (1999). Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *The Lancet*, 354(9188), 1435-1439.
- Spiegelhalter, K., Regen, W., Baglioni, C., Nissen, C., Riemann, D., & Kyle, S. D. (2010). Neuroimaging-based biomarkers for predicting treatment response in insomnia: conceptual review and emerging evidence. *Sleep Medicine Reviews*, 14(3), 219-227.
- Spiegelhalter, K., Regen, W., Prem, M., Baglioni, C., Nissen, C., Feige, B., ... & Riemann, D. (2010). Reduced anterior internal capsule white matter integrity in primary insomnia. *Human Brain Mapping*, 31(11), 1717-1728.
- Spijker, S., Fossati, G., te Riele, P., Smit, A. B., & Verhage, M. (2011). Investigation of early events in synaptic transmission and synaptic plasticity using gene-manipulated mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1220(1), 80-89.
- Sportiche, N., Suntsova, N., Methippara, M., Bashir, T., Mitrani, B., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2010). Sustained sleep fragmentation results in delayed changes in hippocampal-dependent cognitive function associated with reduced dentate gyrus neurogenesis. *Neuroscience*, 170(1), 247-258.
- Staner, L. (2003). Sleep and anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 5(3), 249-258.
- Stanojlovic, O., Hrnčić, D., Aleksandra, R., Veselinka, S., & Dragana, Z. (2007). Beneficial effects of delta sleep-inducing peptide on metaphit seizures. *Acta Veterinaria*, 57(2-3), 89-101.
- Stanojlović, O., Rašić-Marković, A., Hrnčić, D., Šušić, V., Macut, D., Radosavljević, T., & Djuric, D. (2009). Two Types of Seizures in Homocysteine Thiolactone-Treated Adult Rats, Behavioral and Electroencephalographic Study. *Cell Mol Neurobiol*, 29, 329-339.
- Stepanski, E. J. (2002). The effect of sleep fragmentation on daytime function. *Sleep*, 25(3), 268-276.
- Sterman, M. B. (1974). Sleep. In H. E. Himwich & C. W. Tyler (Eds.), *Limbic and autonomic nervous systems research* (pp. 361-372). Springer.
- Sterman, M. B., Shouse, M. N., & Passouant, P. (1982). *Sleep and epilepsy: Epilepsies and the Sleep Wake Cycle*. New York: Academic Press.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The Tail Suspension Test: A New Method for Screening Antidepressants in Mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- Stetler, C., & Miller, G. (2011). *Depression and HPA activation: A quantitative summary of four decades of research*. American Psychosomatic Society.
- Stich, F. M., Huwiler, S., D'Hulst, G., & Lustenberger, C. (2022). The potential role of sleep in promoting a healthy body composition: Underlying mechanisms determining muscle, fat, and bone mass and their association with sleep. *Neuroendocrinology*, 112(7), 673-701.
- Stickgold, R., Whidbee, D., Schirmer, B., Patel, V., & Hobson, J. A. (2000). Visual discrimination task improvement: A multi-step process occurring during sleep. *Journal of cognitive neuroscience*, 12(2), 244-254.
- Strecker, R. E., Morairty, S., Thakkar, M. M., Porkka-Heiskanen, T., Basheer, R., Dauphin, L. J., Rainnie, D. G., Portas, C. M., Greene, R. W., & McCarley, R. W. (2000). Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behavioral Brain Research*, 115(2), 183-204.
- Strine, T. W., & Chapman, D. P. (2005). Associations of frequent sleep insufficiency with health-related quality of life and health behaviors. *Sleep Medicine*, 6(1), 23-27.

- Stutts, J. C., Wilkins, J. W., Scott, O. J., & Vaughn, B. V. (2003). Driver risk factors for sleep-related crashes. *Accident Analysis and Prevention*, 35(3), 321-331.
- Suchecki, D., Tiba, P. A., & Machado, R. B. (2012). REM sleep rebound as an adaptive response to stressful situations. *Frontiers in Neurology*, 3, 41.
- Suchecki, D., Tiba, P. A., & Tufik, S. (2002). Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *Journal of Neuroendocrinology*, 14, 549-554.
- Süer, C., Dolu, N., Artis, A. S., Sahin, L., Yilmaz, A., & Cetin, A. (2011). The effects of long-term sleep deprivation on the long-term potentiation in the dentate gyrus and brain oxidation status in rats. *Neuroscience Research*, 70(1), 71-77.
- Sutton, E. L. (2014). Psychiatric disorders and sleep issues. *Medical Clinics of North America*, 98, 1123-1143.

Š

- Šutulović N, Grubač, Ž., Šuvakov, S., et al. (2021). Experimental chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome increases anxiety-like behavior: the role of brain oxidative stress, serum corticosterone, and hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.

T

- Taheri, M., & Arabameri, E. (2012). The effect of sleep deprivation on choice reaction time and anaerobic power of college student athletes. *Asian journal of sports medicine*, 3(1), 15-20.
- Taheri, S., Lin, L., Austin, D., Young, T., & Mignot, E. (2004). Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Medicine*, 1(3), e62.
- Talbot, L. S., Maguen, S., Metzler, T. J., Schmitz, M., McCaslin, S. E., Richards, A., ... & Neylan, T. C. (2014). Cognitive behavioral therapy for insomnia in posttraumatic stress disorder: a randomized controlled trial. *Sleep*, 37(2), 327-341.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J. C., Sainz, R. M., ... & Reiter, R. J. (2016). Melatonin: A hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *Journal of Pineal Research*, 61(3), 275-289.
- Tartar, J. L., Ward, C. P., Cordeira, J. W., Legare, S. L., Blanchette, A. J., McCarley, R. W., et al. (2009). Experimental sleep fragmentation and sleep deprivation in rats increase exploration in an open field test of anxiety while increasing plasma corticosterone levels. *Behavioural Brain Research*, 197, 450-453.
- Taub, J. M., & Berger, R. J. (1976). The effects of changing the phase and duration of sleep. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 2(1), 30-41.
- Taylor, D. J., Lichstein, K. L., Durrence, H. H., Reidel, B. W., & Bush, A. J. (2005). Epidemiology of insomnia, depression, and anxiety. *Sleep*, 28(11), 1457-1464.
- Tempesta, D., Socci, V., De Gennaro, L., & Ferrara, M. (2018). Sleep and emotional processing. *Sleep Medicine Reviews*, 40, 183-195.
- Thompson, K. I., Chau, M., Lorenzetti, M. S., Hill, L. D., Fins, A. I., & Tartar, J. L. (2022). Acute sleep deprivation disrupts emotion, cognition, inflammation, and cortisol in young healthy adults. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 945661.
- Thorne, D., Thomas, M., Sing, H., et al. (1998). Driving-simulator accident rates before, during, and after one week of restricted night sleep. *Sleep*, 21(Suppl 3), 23.
- Thurman, D. J., Beghi, E., Begley, C. E., Berg, A. T., Buchhalter, J. R., Ding, D., Hesdorffer, D. C., Hauser, W. A., Kazis, L., Kobau, R., Kroner, B., Labiner, D., Liow, K., Logroscino, G., Medina, M. T., Newton, C. R., Parko, K., Paschal, A., Preux, P. M., Sander, J. W., Selassie, A., Theodore, W.,

- Tomson, T., Wiebe, S., & ILAE Commission on Epidemiology. (2011). Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia*, 52(7), 2–26.
- Tilgen N, Pfeiffer H, Cobilanschi J, Rau B, Horvath S, Elger CE, Propping P, & Heils A. (2002). Association analysis between the human interleukin 1beta (-511) gene polymorphism and susceptibility to febrile convulsions. *Neurosci Lett*, 334(1), 68-70.
- Tobler, I., Borbély, A. A., & Groos, G. (1997). Automatic sleep-wake analysis in the rat using the piezoelectric signal of the mattress. *Journal of Neuroscience Methods*, 75(1), 75-80.
- Tobler, I., Deboer, T., & Fischer, M. (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 17(5), 1869-1879.
- Toth, L. A., & Roehrs, T. (1996). The effects of a nap opportunity during the biological night on performance under chronic sleep restriction. *Sleep*, 19(8), 682-687.
- Touchon, J., Badly-Moulinier, M., Billiard, M., Besset, A., & Cadilhac, J. (1991). Sleep organization and epilepsy. *Epilepsy Research*, 2(Suppl), 73-81.
- Trachsel, L., Tobler, I., Achermann, P., & Borbély, A. A. (1991). Sleep continuity and the REM-nonREM cycle in the rat under baseline conditions and after sleep deprivation. *Physiology & Behavior*, 49(3), 575-580.
- Trammell, R. A., Verhulst, S., & Toth, L. A. (2014). Effects of sleep fragmentation on sleep and markers of inflammation in mice. *Comparative Medicine*, 64(1), 13–24.
- Trivedi, M. S., Holger, D., Bui, A. T., Craddock, T. J. A., & Tartar, J. L. (2017). Short-term sleep deprivation leads to decreased systemic redox metabolites and altered epigenetic status. *PloS One*, 12(7), e0181978.
- Tufik, S., Andersen, M. L., Bittencourt, L. R. A., & Mello, M. T. de. (2009). Paradoxical sleep deprivation: Neurochemical, hormonal, and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81, 521-538. PMID: 19722021

U

- Uludag, I. F., Bilgin, S., Zorlu, Y., Tuna, G., & Kirkali, G. (2013). Interleukin-6, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures. *Seizure*, 22(6), 457-461.
- Underwood, G. (2010). Visual attention and the transition from novice to expert in sport. *International Review of Sport and Exercise Psychology*, 3(1), 157-176.
- Unnikrishnan, D., Jun, J., & Polotsky, V. (2015). Inflammation in sleep apnea: An update. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 16(1), 25-34.
- Upthegrove, R., Marwaha, S., & Birchwood, M. (2016). Depression and schizophrenia: Cause, consequence or trans-diagnostic issue? *Schizophrenia Bulletin*, sbw097.

V

- Van Dongen, H. P., Maislin, G., Mullington, J. M., & Dinges, D. F. (2003). The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep*, 26(2), 117-126.
- Van Hulzen, Z. J. M., & Coenen, A. M. L. (1980). The pendulum technique for paradoxical sleep deprivation in rats. *Physiology & Behavior*, 25, 807-811.
- Van Hulzen, Z. J. M., & Coenen, A. M. L. (1981). Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. *Physiology & Behavior*, 27(5), 943-946.
- Vandenheede, M., & Bouissou, M. F. (1993). Effect of androgen treatment on fear reactions in ewes. *Hormones and Behavior*, 27, 435-448.
- Vaughn, B. V., D'Cruz, O. F., Beach, R., & Messenheimer, J. A. (1996). Improvement of epileptic seizure control with treatment of obstructive sleep apnea. *Seizure*, 5(1), 73-78.

- Veasey, S. C. (2003). Serotonin agonist and antagonist in obstructive sleep apnea: Therapeutic potential. *American Journal of Respiratory Medicine*, 2(1), 21-29.
- Vecsey, C., Peixoto, L., Choi, J. N., Abel, T., Jaganath, D., Hernandez, P. J., ... & Hannenhalli, S. (2012). Genomic analysis of sleep deprivation reveals translational regulation in the hippocampus. *Physiological Genomics*, 44(20), 981-991.
- Vecsey, C. G., Baillie, G. S., Jaganath, D., Havekes, R., Daniels, A., Wimmer, M., ... Abel, T. (2009). Sleep Deprivation Impairs cAMP Signaling in the Hippocampus. *Nature*, 461(7267), 1122-1125.
- Vezzani, A., Conti, M., De Luigi, A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., De Simoni, M. G. (1999). Interleukin-1 beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *Journal of Neuroscience*, 19(12), 5054-5065.
- Vezzani, A., Moneta, D., Richichi, C., Aliprandi, M., Burrows, S. J., Ravizza, T., Perego, C., & De Simoni, M. G. (2002). Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*, 43(Suppl 5), 30-35.
- Vgontzas, A. N., & Bixler, E. O. (2008). Sleep apnea and sleep disruption in obese patients. *Archives of Internal Medicine*, 168(14), 1532-1533.
- Vgontzas, A. N., Fernandez-Mendoza, J., Liao, D., Bixler, E. O., Benson, K. L., & Basta, M. (2013). Insomnia with objective short sleep duration: the most biologically severe phenotype of the disorder. *Sleep Medicine Reviews*, 17(4), 241-254.
- Vgontzas, A. N., Zoumakis, E., Bixler, E. O., Lin, H.-M., Prolo, P., Vela-Bueno, A., ... Chrousos, G. P. (2004). Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(5), 2119-2126.
- Virta, M., Hurme, M., & Helminen, M. (2002). Increased frequency of interleukin-1beta (-511) allele 2 in febrile seizures. *Pediatric Neurology*, 26(3), 192-195.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The Journal of Neuroscience*, 23(25), 8692-8700.
- Vucević, D., Hrncić, D., Radosavljević, T., Mladenović, D., Rasić-Marković, A., Loncar-Stevanović, H., Djurić, D., Macut, D., Susić, V., & Stanojlović, O. (2008). Correlation between electrocorticographic and motor phenomena in lindane-induced experimental epilepsy in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(4), 173-179.

W

- Wadhwa, M., Prabhakar, A., Ray, K., Roy, K., Kumari, P., Jha, P. K., ... & Anand, J. P. (2021). Sleep Deprivation Induced Reduction in Hippocampal Neurogenesis: Implications for Memory Functioning. *Sleep and Vigilance*, 5(1), 11-19.
- Wagner, C. K. (2006). The many faces of progesterone: A role in adult and developing male brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27, 340-359.
- Walling SA, Um W, Corkhill CL, Hyatt NC. Fenton i Fenton-like wet oxidation for degradation et destruction of organic radioactive wastes. *npj Mater Degrad*. Nature Publishing Group; 2021;5(1):1–20.
- Walker, M. P., & Stickgold, R. (2010). Overnight alchemy: Sleep-dependent memory evolution. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3), 218-227.
- Walker, M. P., Brakefield, T., Morgan, A., Hobson, J. A., & Stickgold, R. (2002). Practice with sleep makes perfect: sleep-dependent motor skill learning. *Neuron*, 35(1), 205-211.
- Walsh, J. K., Dement, W. C., & Dinges, D. F. (2011). *Principles and practice of sleep medicine* (5th ed.). W.B. Saunders: Philadelphia. Chapter 62 – Sleep Medicine, Public Policy, and Public Health; pp. 716–724.

- Wang, S., Cheng, Q., Malik, S., & Yang, J. (2000). Interleukin-1beta inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(2), 497-504.
- Wang, X., Wang, R., Zhong, X., & Sun, Q. (2016). Association between sleep quality and breast cancer incidence in postmenopausal women: the Women's Health Initiative. *Sleep*, 39(10), 1743-1751.
- Ward, C. P., McCoy, J. G., McKenna, J. T., Connolly, N. P., McCarley, R. W., & Strecker, R. E. (2009). Spatial learning and memory deficits following exposure to 24 h of sleep fragmentation or intermittent hypoxia in a rat model of obstructive sleep apnea. *Brain Research*, 1294, 128-137.
- Watts ME, Pocock R, Claudianos C. Brain Energy i Oxygen Metabolism: Emerging Role in Normal Function i Disease. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:216.
- Werth, E., Achermann, P., & Borbély, A. A. (1997). Fronto-occipital EEG power gradients in human sleep. *Journal of Sleep Research*, 6(2), 102-112.
- Wilson, J. F. (2008). In the clinic. *Insomnia*. *Annals of Internal Medicine*, 148(1), ITC13-1-ITC13-16.
- Wilson, S., & Argyropoulos, S. (2005). Antidepressants and sleep: A qualitative review of the literature. *Drugs*, 65(7), 927-947.
- Wirz-Justice, A., Tobler, I., Kafka, M. S., Naber, D., Marangos, P. J., Borbély, A. A., et al. (1981). Sleep deprivation: Effects on circadian rhythms of rat brain neurotransmitter receptors. *Psychiatry Research*, 4(1), 57-64.

X

- Xu, D., Miller, S. D., & Koh, S. (2013). Immune mechanisms in epileptogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 195.
- Xu, W., Chi, L., Row, B. W., et al. (2004). Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience*, 126(2), 313-323.

Y

- Yan, C., Wang, X., Huo, J., et al. (2018). Abnormal global brain functional connectivity in primary insomnia patients: A resting-state functional MRI study. *Frontiers in Neurology*, 9, 1-9.
- Yang, Q., Wang, Y., Feng, J., Cao, J., & Chen, B. (2013). Intermittent hypoxia from obstructive sleep apnea may cause neuronal impairment and dysfunction in the central nervous system: the potential roles played by microglia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 9, 1077-1086.
- Yavuzer H, Yavuzer S, Cengiz M, Erman H, Doventas A, Balci H, Erdinçler DS, Uzun H. Biomarkers of lipid peroxidation related to hypertension in aging. *Hypertens Res*. Nature Publishing Group; 2016;39(5):342-8.
- Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity, and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 181-123.
- Yonkers, K. A. (1997). Anxiety symptoms and anxiety disorders: How are they related to premenstrual disorders? *Journal of Clinical Psychiatry*, 58(Suppl 3), 62-67; discussion 68-69.
- Yoo, S. S., Gujar, N., Hu, P., Jolesz, F. A., & Walker, M. P. (2007). The human emotional brain without sleep—a prefrontal amygdala disconnect. *Current biology*, 17(20), R877-R878.
- Yosunkaya, S., Kutlu, R., & Cihan, F. (2016). Evaluation of depression and quality of life in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 19(4), 573.

- Young, T., Blustein, J., Finn, L., & Palta, M. (1997). Sleep-disordered breathing and motor vehicle accidents in a population-based sample of employed adults. *Sleep: Journal of Sleep Research and Sleep Medicine*, 20(8), 608-613.
- Young, T., Evans, L., Finn, L., & Palta, M. (1997). Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep*, 20(9), 705–706.

Z

- Zhang W, Chai X, Li X, Tan X, Yang Z. Legumain knockout improves repeated corticosterone injection-induced depression-like emotional and cognitive deficits. *Behav Brain Res*. 2021 Sep 10;413:113464.
- Zhang, P., Li, Y. X., Zhang, Z. Z., Yang, Y., Rao, J. X., Xia, L., ... & Wang, F. (2020). Astroglial Mechanisms Underlying Chronic Insomnia Disorder: A Clinical Study. *Nature and Science of Sleep*, 12, 693-704.
- Zhang C, Wang X, Du J, Gu Z, Zhao Y. Reactive Oxygen Species-Regulating Strategies Based on Nanomaterials for Disease Treatment. *Adv Sci*. 2021a;8(3):2002797
- Zhao, Y., Ma, R., Shen, J., Su, H., Xing, D., Du, L., ... & Xing, D. (2008). A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *European Journal of Pharmacology*, 581(1-2), 113-120.
- Zhu, G., Okada, M., Yoshida, S., Mori, F., Ueno, S., Wakabayashi, K., & Kaneko, S. (2006). Effects of interleukin-1beta on hippocampal glutamate and GABA releases associated with Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing systems. *Epilepsy Research*, 71(2-3), 107-116.
- Zielinski, M. R., Kim, Y., Karpova, S. A., McCarley, R. W., Strecker, R. E., & Gerashchenko, D. (2014). Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression. *Neurosci Lett*, 580, 27-31.
- Zielinski, M., Kim, Y., Karpova, S., et al. (2014). Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression. *Neuroscience Letters*, 580, 27-31.

PRILOZI

OBJAVLJENI REZULTATI

Radovi *in extenso* u časopisima sa JCR liste:

1. **Grubač, Ž.**, Šutulović, N., Šuvakov, S., Jerotić, D., Puškaš, N., Macut, D., Rašić-Marković, A., Simić, T., Stanojlović, O., & Hrnčić, D. (2021). Anxiogenic potential of experimental sleep fragmentation is duration-dependent and mediated via oxidative stress state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2262913. **(M21, IF 7,310)**
2. **Grubač, Ž.**, Šutulović, N., Jerotić, D., Šuvakov, S., Rašić-Marković, A., Macut, D., Simić, T., Stanojlović, O., & Hrnčić, D. (2021). Experimental chronic sleep fragmentation alters seizure susceptibility and brain levels of interleukins 1 β and 6. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Warsaw)*, 81(1), 96-109. **(M23, IF 1,527)**
3. **Grubač, Ž.**, Šutulović, N., Ademovic, A., Velimirovic, M., Rašić-Marković, A., Macut, D., Petronijevic, N., Stanojlovic, O., & Hrnčić, D. (2019). Short-term sleep fragmentation enhances anxiety-related behavior: The role of hormonal alterations. *PloS One*, 14(7), e0218920. **(M21, IF 2,726)**
4. Hrnčić, D., **Grubač, Ž.**, Rašić-Marković, A., Šutulović, N., Šušić, V., Bjekić-Macut, J., & Stanojlović, O. (2016). Sleep disruption increases seizure susceptibility: Behavioral and EEG evaluation of an experimental model of sleep apnea. *Physiology & Behavior*, 155, 188-194. **(M22, IF 2.635)**

Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:

1. **Grubač, Ž.**, Jovanović, Đ., Puškaš, N., & Hrnčić, D. (2018). Poremećaji spavanja i depresija - povezanost i mehanizmi interakcije. *Medicinski Podmladak*, 69(3), 48-55.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Željko Grubač je specijalizant na Klinici za digestivnu hirurgiju-Prva Hirurška, UKCS. Rođen je u Trebinju u Republici Srpskoj 1990. godine. Gimnaziju „Jovan Dučić“ u Trebinju završio je 2009. godine, a potom upisuje Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu koji završava 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,89. Za uspehe tokom studija bio je četiri puta nagrađen Pohvalnicom Dekana.

Obavezni lekarski staž završava u Univerzitetском Kliničkom Centru Srbije. Usavršavanje je nastavio na doktorskim akademskim studijama na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Fiziološke nauke pod mentorstvom prof. dr D. Hrnčića. Od 2018. godine dr Grubač je na zdravstvenoj specijalizaciji iz Opšte hirurgije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a specijalistički staž obavlja na Klinici za digestivnu hirurgiju, UKCS, gde je i zaposlen.

Svoj naučno-istraživački rad dr Grubač je započeo u Laboratoriji za neurofiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ još kao student, 2011. godine.

ОБАВЕЗНИ ПРИЛОЗИ

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Жељко Грубач

Број индекса: 2016/5077

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Фрагментација спавања изазвана експериментално по моделу апнеје у спавању: бихејвиоралне, електрофизиолошке, биохемијске и структурне промене“

резултат сопственог истраживачког рада;

- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 04.09.2023. год.

ОБАВЕЗНИ ПРИЛОЗИ

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Жељко Грубач**

Број индекса: 2016/5077

Студијски програм: **Докторске студије из медицинских наука – смер Физиолошке науке**

Наслов рада: **„Фрагментација спавања изазвана експериментално по моделу апнеје у спавању: бихејвиоралне, електрофизиолошке, биохемијске и структурне промене“**

Ментори: **Проф. др Драган Хрнчић, Проф. Др Нела Пушкеш**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 04.09.2023. год.

ОБАВЕЗНИ ПРИЛОЗИ

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Фрагментација спавања изазвана експериментално по моделу апнеје у спавању: бихејвиоралне, електрофизиолошке, биохемијске и структурне промене“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 04.09.2023.

1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, 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.** Дозвољава се умножавање, 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 прерада.** Дозвољава се умножавање, 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.** Дозвољава се умножавање, 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 прерада.** Дозвољава се умножавање, 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.** Дозвољава се умножавање, 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.