

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů – Neurobiologie (NFYZZIV)



Bc. Erika Petránová

VPLYV SPÁNKU NA KONSOLIDÁCIU PAMÄTI EPIZODICKÉHO TYPU U
POTKANOV

THE EFFECT OF SLEEP ON CONSOLIDATION OF EPISODIC-LIKE MEMORY IN RATS

Diplomová práce
Školitel: RNDr. Eduard Kelemen, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení autora práce

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 6.8.2020

Bc. Erika Petránová

PodĎakovanie

Chcela by som sa poĎakovať môjmu školiteľovi Dr. Edovi Kelemenovi za jeho trpezlivosť, ochotu a cenné praktické i teoretické rady v priebehu vypracovávaní tejto diplomovej práce. Ďalej by som sa chcela poĎakovať všetkým členom nášho tímu, menovite Dr. Ewe Szczurowskej a Mgr. Tereze Rydzkovej za ich obrovskú podporu a mnohé praktické rady počas môjho štúdia a práce v laboratóriu, následne Mgr. Alene Brukhnovej za uvedenie ma do problematiky spracovávaní animálneho EEG signálu a samozrejme všetkým ďalším kolegom z Národného ústavu duševného zdravia v Klecanech, ktorí sa starajú o správny chod a fungovanie tejto výnimočnej inštitúcie. V neposlednom rade jedno veľké Ďakujem patrí mojej rodine, priateľovi a kamarátom, ktorých si nesmierne vážim a vždy mi boli veľkou oporou.

Abstrakt

Pozitívny efekt spánku si všímame na mnohých úrovniach fungovania nášho organizmu. Prepojenie spánku a pamäti pozorujeme dlhé roky a dnes už vieme, že rôzne fázy spánku korelujú so zlepšovaním rôznych typov pamäti. Jednou z hypotéz, ktoré vysvetľujú pozitívny vplyv spánku na posilňovanie pamäťových reprezentácií je jeho nezastupiteľná aktívna úloha v procese pamäťovej konsolidácie. Konsolidácia pamäti epizodického typu u zvierat, ktorá spracováva spomienky na udalosti s časovým a priestorovým kontextom, by podľa tejto hypotézy mohla prebiehať vďaka dvojfázovému spánkovému procesu, v ktorom má každá spánková fáza svoju konkrétnu úlohu.

Teoretická časť tejto práce uvedie čitateľa do problematiky organizovania priestoru a času v našom mozgu, zoznámi ho so základmi elektroencefalografie (EEG) a podrobne predstaví diskutovanú hypotézu aktívnej spánkovej konsolidácie. Praktická časť sa následne venuje overovaniu platnosti vyššie uvedenej hypotézy kombináciou porovnávania výsledkov z behaviorálnej úlohy 2 skupín zvierat s rozdielnou manipuláciou spánku a analýzou EEG signálu nahrávaného v priebehu experimentu pred a po tréningu. Behaviorálna úloha bola navrhnutá v našom laboratóriu a je vhodná pre skúmanie kontextovej pamäti sústreďujúc sa na časopriestorové aspekty udalosti.

Kľúčové slová:

spánok, pamäť epizodického typu, konsolidácia, hipokampus

Abstract

We can notice the positive effects of sleep on many functions of our organism. For a long time we have observed the interconnection between sleep and memory and today we already know, that different sleep phases correlate with an improvement of different memory types. One of the hypotheses, that explain the positive effect of sleep on strengthening of the memory representations, is its irreplaceable active role in the process of memory consolidation. The memory consolidation of episodic type in animals, which processes memories into events with time and space context, could according to this theory occur due to two phase sleep process, in which each phase has a specific role.

The theoretical part of this thesis will familiarize the reader with the problematic of organization of time and space in our brain, and introduce him to the foundations of electroencephalography (EEG) and offer a detailed introduction into the discussed hypothesis of active sleep consolidation. The practical part is then focused on the confirmation of the already mentioned hypothesis through the combination of comparison of results from the behavioral task of 2 groups of animals with different sleep manipulation and of the analysis of EEG signal recorded during the experiment before and after the training. The behavioral task was designed in our laboratory and is suited to the research of context memory, focusing on spatiotemporal aspects of the event.

Keywords:

sleep, episodic-like memory, consolidation, hippocampus

Zoznam skratiek

| | |
|------------------|--|
| CA | <i>cornu Ammonis</i> |
| Ca ²⁺ | vápenaté katióny |
| CNS | centrálne nervová sústava |
| EEG | elektroencefalografia |
| EMG | elektromyografia |
| EPSP | excitačný postsynaptický potenciál |
| GABA | kyselina gama-aminomaslová |
| iEEG | intrakraniálna elektroencefalografia |
| IPSP | inhibičný postsynaptický potenciál |
| LFP | potenciál blízkeho poľa |
| LTP | dlhodobá potenciácia |
| MRI | magnetická rezonancia |
| MTL | mediálny temporálny lalok |
| NREM | fázy spánku bez rýchlych očných pohybov |
| PET | pozitrónová emisná tomografia |
| PGO | ponto-genikulookcipitálne oscilácie |
| REM | fáza spánku charakteristická rýchlymi očnými pohybmi |
| S-WR | oscilácie s ostrými hrotmi |
| SO | pomalé oscilácie |
| SWS | spánok pomalých vln |

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 0. Úvod..... | 8 |
| 1. LITERÁRNY PREHĽAD | 10 |
| 1.1 <i>ASOCIOVANIE MIESTA & ČASU</i> | <i>10</i> |
| 1.1.1 NEURONÁLNY ZÁKLAD KONTEXTOVÝCH SPOMIENOK | 11 |
| 1.1.2 ORGANIZOVANIE MIESTA & ČASU V HIPOKAMPE..... | 13 |
| 1.2 <i>ELEKTROENCEFALOGRAFIA</i> | <i>16</i> |
| 1.2.1 NEURONÁLNA AKTIVITA & GENEROVANIE EEG SIGNÁLU..... | 17 |
| 1.2.2 MOZGOVÉ VLNY & EEG RYTMY | 18 |
| 1.2.3 SPÁNKOVÁ EEG | 21 |
| 1.3 <i>SPÁNOK & KONSOLIDÁCIA SPOMIENOK S KONTEXTOM.....</i> | <i>23</i> |
| 1.3.1 HYPOTÉZA AKTÍVNEJ SPÁNKOVEJ KONSOLIDÁCIE..... | 25 |
| 2. CIELE PRÁCE..... | 29 |
| 3. METODIKA..... | 30 |
| 3.1 <i>APARATÚRA.....</i> | <i>30</i> |
| 3.2 <i>PRIEBEH EXPERIMENTU</i> | <i>32</i> |
| 3.2.1 ČASOPRIESTOROVÁ ÚLOHA | 32 |
| 3.3 <i>EXPERIMENTÁLNE ZVIERATÁ.....</i> | <i>36</i> |
| 3.3.1 MANIPULÁCIA SO ZVIERATAMI | 36 |
| 3.4 <i>NAHRÁVANIE ANIMÁLNEHO EEG & EMG SIGNÁLU</i> | <i>39</i> |
| 3.4.1 VÝROBA IMPLANTÁTOV..... | 39 |
| 3.4.2 NAHRÁVANIE & VYHODNOCOVANIE SIGNÁLU | 40 |
| 4. VÝSLEDKY | 42 |
| 4.1 <i>BEHAVIORÁLNA ČASŤ EXPERIMENTU</i> | <i>42</i> |
| 4.1.1 VÝSLEDKY Z PRVEJ FÁZY BEHAVIORÁLNEJ ČASTI | 43 |
| 4.1.2 VÝSLEDKY Z DRUHEJ FÁZY BEHAVIORÁLNEJ ČASTI | 45 |
| 4.2 <i>Analýza EEG.....</i> | <i>47</i> |
| 5. DISKUSIA | 53 |
| 6. ZÁVER..... | 56 |
| 7. REFERENCIE | 57 |

0. Úvod

Náš mozog spracováva v priebehu dňa neustály tok informácií z vonkajšieho prostredia. Prijaté informácie sú podľa ich relevantnosti ďalej spracovávané a ukladané v našej centrálnej sústave, vďaka čomu s nimi môžeme v budúcnosti opäť narábať. Tento komplexný proces pozostávajúci z kódovania, ukladania a znovu vybavenia danej informácie nazývame pamäť. Ukladanie pamäťovej stopy po jej zakódovaní sa nazýva pamäťová konsolidácia (Muller & Pilzecker 1900). Pri pamäťovej konsolidácii dochádza k významným zmenám na systémovej i synaptickej úrovni.

Je dôležité uvedomiť si, že každá kódovaná informácia nesie rôzny obsah, podľa ktorého je spracovávaná rôznymi časťami mozgu špecifickými pre danú informáciu. Spomienky pokrývajúce informácie o udalostiach s ich časopriestorovým kontextom podliehajú po celý čas pamäťového spracovania časti mozgu zvanej hipokampus (Seinvorth et al. 2005). Hipokampus je štruktúra, ktorá sa vďaka tomuto pozorovaniu stala hlavným neuronálnym kandidátom pre organizovanie miesta a času. Táto hypotéza sa stala ešte presvedčivejšou po identifikovaní hipokampálnych place a time cells (O'Keefe & Nadel 1978, Pastalkova et al. 2008). V súčasnosti je teda hipokampus mimo iné považovaný za kritickú štruktúru pre správne fungovanie našej epizodickej pamäti.

Epizodická pamäť je termín pre spomienky obsahujúce informácie zodpovedajúce otázky typu „Čo? Kde? Kedy?“ (Tulving 2002). Sú to teda deklaratívne spomienky, ktorými sa dokážeme v našej mysli preniesť do minulosti a spomínať na danú epizódu. Animálne modely skúmania nám od nepamäti prinášajú oveľa väčší náhľad a dokážeme vďaka nim oveľa hlbšie preniknúť do danej problematiky. Pri skúmaní tohto typu pamäti však nastáva očividný problém s nepreukázateľným autoetickým vedomím u zvierat. Pre prekonanie tejto prekážky pri skúmaní epizodickej pamäti pomocou animálnych modelov však bolo navrhnutých mnoho metód, ktoré dokazujú pamäť epizodického typu u zvierat a demonštrujú animálnu pamäť na udalosti s ich časopriestorovým či iným kontextom (Clayton & Dickinson 1998, Binder et al. 2012, Inostroza et al. 2013).

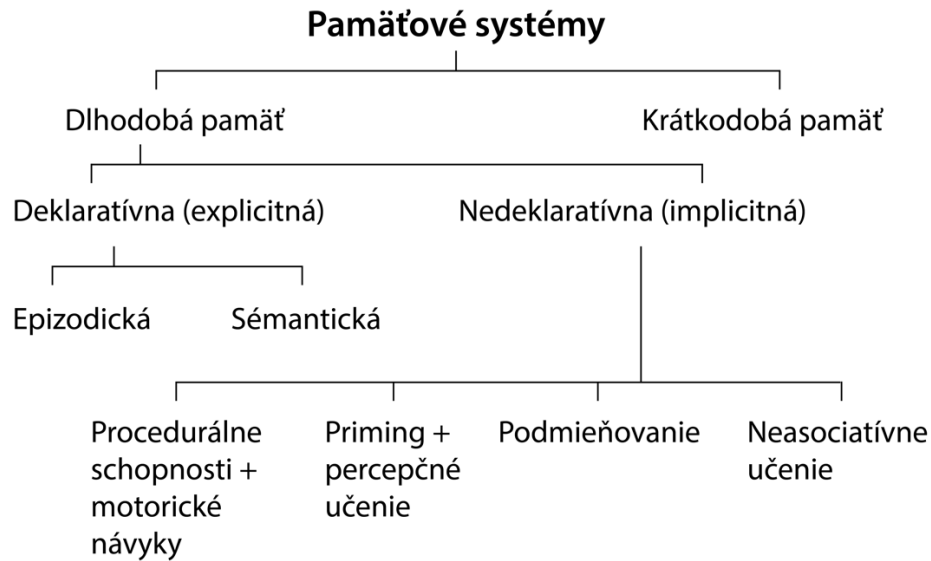
Pozitívny efekt spánku na upevňovanie pamäťových stôp bol pozorovaný pred mnohými rokmi (Ebbinghaus 1885). Dnes už vieme, že rôzne fázy spánku pomáhajú pri upevňovaní rôznych typov pamäte (Plihal & Born 1997). Toto zistenie nás privádza k rozličným hypotézam navrhujúcim úlohu spánku pri pamäťovej konsolidácii. Jednou z nich, ktorá priamo vysvetľuje konsolidáciu epizodických spomienok je hypotéza aktívnej spánkovej konsolidácie (Diekelmann & Born 2010). Táto hypotéza postuluje esenciálnu úlohu spánku v pamäťovej konsolidácii dramatickou zmenou EEG aktivity, ktorá umožňuje špecifickú neuronálnu konektivitu a transformáciu pamäťovej stopy vedúcu k jej následnému upevňovaniu na synaptickej úrovni v štruktúrach dlhodobého uloženia.

1. LITERÁRNY PREHĽAD

1.1 ASOCIOVANIE MIESTA & ČASU

Časopriestor je štvorrozmerný priestor, ktorý zjednocuje trojrozmerný fyzikálny priestor a čas. Pri skúmaní reprezentácií konkrétnych udalostí je veľmi dôležité uvedomiť si, že vnímanie času a priestoru ako dvoch nezávislých pojmov je podmienené pozorovateľom. Pri spomínaní na rôzne udalosti je pre ľudí prirodzené vybaviť si všetky aspekty daného momentu z minulosti spoločne. Táto perspektíva nás teda privádza k názoru, že pamäť spája jednotlivé aspekty epizódy do jednotnej reprezentácie (Copara et al. 2014).

Pamäť možno charakterizovať ako schopnosť organizmu pracovať s prijatými informáciami z prostredia a možno ju klasifikovať do rôznych systémov podľa toho, na ktoré z hľadísk informačného spracovávania sa zameriame. Podľa dĺžky uchovávaní sa informácie pamäť delíme na percepčnú (senzorickú), krátkodobú a dlhodobú. Dlhodobú pamäť ďalej možno deliť podľa typu informácií, ktoré ukladá na deklaratívnu (explicitnú) a nedeklaratívnu (implicitnú). Nedeklaratívna pamäť predstavuje nevedomé, automatické vzorce chovania, ktoré sa v mozgu kódovali a uchovali prostredníctvom neasociatívneho učenia (habituácia, senzitácia), klasickým či operačným podmieňovaním, ďalej tzv. primingom alebo osvojením si rôznych motorických schopností. Deklaratívna pamäť pracuje s vedomými spomienkami na fakty a udalosti, ktoré si vyžadujú aktívne vybavovanie. Fakty a udalosti predstavujú obsahovo dva rozdielne typy informácií a preto deklaratívnu pamäť ďalej delíme na epizodickú (udalosti) a sémantickú (fakty) (Tulving 2002).



Obrázok č. 1: Pamäťové systémy – rozdelenie pamäti do systémov podľa rôznych kritérií informačného spracovania podľa Tulvinga

Epizodická pamäť pracuje so spomienkami na konkrétne udalosti v kontexte „Čo sa stalo?“, „Kde sa to stalo?“ a „Kedy sa to stalo?“. U ľudí zahrňuje práca s takýmto typom informácií mentálne cestovanie časom. Ľudia sa vďaka autoetickému vedomiu vedia mentálne preniesť do minulosti a vybavovať si konkrétne udalosti (Tulving 1972). U zvierat nevieme túto vedomú zložku epizodickej pamäti posúdiť. Existujú však viaceré štúdie, ktoré dokazujú, že i zvieratá sú schopné pracovať so spomienkami s kontextom čo-kde-kedy. Klasickým príkladom je experiment Claytona a Dickinsona z roku 1998, ktorý ako prvý zdokumentoval tento typ pamäti u zvierat a prišli s termínom pamäť epizodického typu (angl. episodic-like memory) (Clayton and Dickinson 1998).

Nuronálny mechanizmus prepojenia objektu, miesta a času je nezodpovedanou otázkou a púta pozornosť mnohých neurovedeckých skupín. Vývoj animálnych modelov pre riešenie tohto problému nám prináša široké možnosti skúmania mechanizmov pamäti na rôznych úrovniach.

1.1.1 NEURONÁLNY ZÁKLAD KONTEXTOVÝCH SPOMIENOK

V roku 1921 nemecký zoológ a evolučný biológ Richard Semon navrhol termín engram. Engram predstavoval o hypotetické miesto v mozgu, v ktorom mali byť uložené

naše spomienky (Josselyn, Köhler, and Frankland 2015). Nasledujúce výskumy pamäti však ukázali, že prijaté informácie sú našou centrálnou nervovou sústavou ďalej spracovávané a podľa relevantnosti a obsahu danej informácie priestorovo distribuované do konkrétnych častí nášho mozgu.

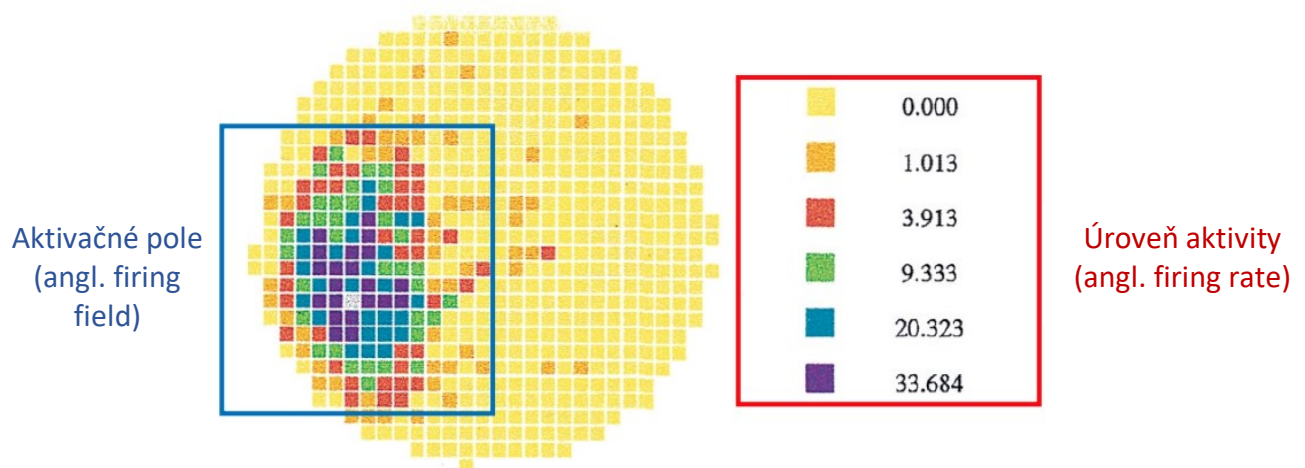
Jedna zo súčasných teórií popisujúca pamäťové spracovávanie informácie na systémovej úrovni po jej zakódovaní je teória štandardnej systémovej konsolidácie (Squire and Alvarez 1995). Táto teória postuluje, že prijaté informácie sú postupne prerozdelené a transportované z miest dočasného úložiska do úložísk dlhodobých. Pri explicitných spomienkach úložisko pre krátkodobé reprezentácie potom predstavuje hipokampus, zatiaľ čo dlhodobé reprezentácie sú ukladané a spracovávané extrahipokampálnymi neokortikálnymi štruktúrami.

Mnohé výskumy potvrdzujú kritickú úlohu hipokampu v správnom fungovaní našej pamäte. Typickým ľudským príkladom dôležitosti hipokampu je záznam z 50. rokov minulého storočia. Pacientovi bol z terapeutických dôvodov chirurgicky bilaterálne odstránený mediálny temporálny lalok. MTL tvorí hipokampálna formácia, parahipokampálny kortex a parahipokampálny gyrus (Amaral 1999). Strata tejto štruktúry viedla k neschopnosti pacienta uchovať si spomienky na nové fakty a udalosti (anterográdna amnézia), zatiaľ čo pamäť s dávno uloženými spomienkami zachovaná zostala (Milner and Scoville 1957). Až hlbšou analýzou tejto anamnézy v roku 2005 sa zistilo, že odstránením MTL nedôjde len k neschopnosti konsolidovať nové spomienky, ale aj k porušeniu dávno uložených epizodických reprezentácií, zatiaľ čo sémantická pamäť ostane prakticky neporušená (Steinvorth, Levine, and Corkin 2005). Rozvoj neurozobrazovacích metód v nasledujúcich rokoch potvrdil hypotézu o zapojení hipokampu do spracovávania epizodických spomienok zaznamenaním aktivácie neurónov v MTL počas epizodického spomínania (Eldridge et al. 2000; Hassabis, Kumaran, and Maguire 2007) a priniesol tiež nové poznatky o aktivácií ďalších štruktúr, ktoré sa zapájajú v tomto procese. Pri epizodickom spomínaní sa aktivujú neuróny nie len v MTL, ale aj neuróny v prefrontálnom a tiež laterálnom parietálnom kortexe (Rugg, Otten, and Henson 2002).

1.1.2 ORGANIZOVANIE MIESTA & ČASU V HIPOKAMPE

Vďaka vyššie spomínaným prácam a mnohým ďalším štúdiám, ktoré dokazujú dôležitosť hipokampu v spracovávaní a uchovávaní informácií o udalostiach v ich časovom a priestorovom kontexte sa domnievame, že hipokampus je štruktúra, ktorá predstavuje potencionálne miesto organizovania času a priestoru v našom mozgu (Eichenbaum 2014). Tento koncept sa stal výzvou pre mnohých bádateľov hľadajúcich mechanizmy pre priestorové a časové reprezentácie v hipokampe.

V 70. rokoch minulého storočia boli v hipokampe identifikované pyramídové neuróny, ktorých aktivita je podmienená lokalizáciou zvieratá v určitej oblasti prostredia (O'Keefe and Nadel 1979). Tieto bunky dostali príznačný anglický názov place cells a predstavujú potenciálny mechanizmus pre priestorové reprezentácie v hipokampe.

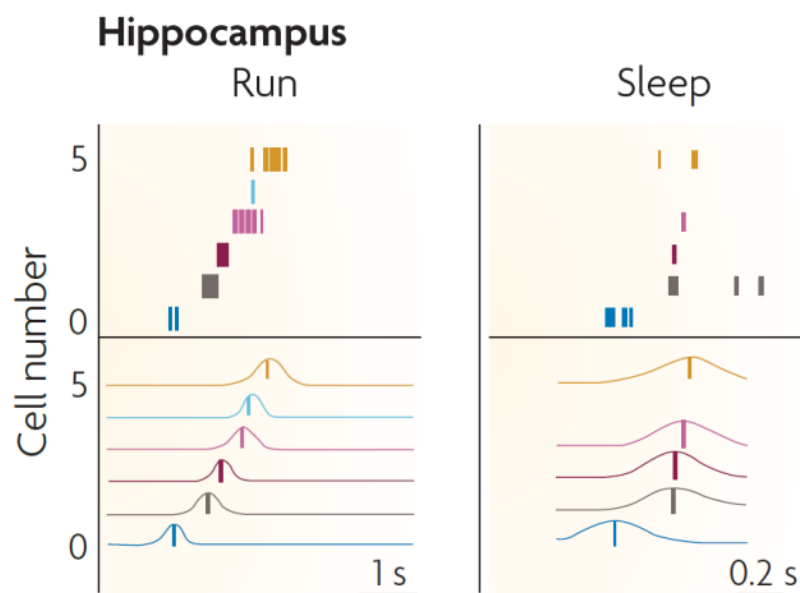


Obrázok č. 2: Place cell – obrázok zobrazuje kruhovú arénu rozdelenú na pixely a úroveň aktivity jednotkového nahrávania konkrétnej bunky. Rôzne veľká úroveň aktivity konkrétnej bunky naprieč arénou je znázornená prislúchajúcou farbou konkrétneho pixelu na aréne. Prevzaté a upravené od (Muller 1996)

Významným objavom popisujúcim pravdepodobný mechanizmus pre časové reprezentácie v tejto oblasti bolo pozorovanie pyramídových buniek s aktivitou v špecifickom momente časovo štruktúrovanej udalosti (Pastalkova et al. 2008). Tieto bunky boli preto nazvané anglicky time cells. Je nutné poznamenať, že time cells spracúvajú časovú udalosť v momente, keď zviera nemení priestorovú pozíciu a teda nemôžu byť vysvetlené zmenami v umiestnení alebo pohybov v priestore (MacDonald et al. 2011).

Tieto zistenia nás vedú k otázke ohľadom integrácie neurónov miesta a času: Ako hipokampus kombinuje priestorové a časové reprezentácie? Dôležitá hypotéza vedúca k objasneniu tejto otázky tvrdí, že neurón času a miesta je pravdepodobne jedna a tá istá bunka. Túto domnienku podporuje experiment, v ktorom zvieratá striedali svoju lokáciu v priestore bludiska a medzi priestorovými zmenami zvieratá bežali na bežeckom páse. Časovo špecifická aktivita neurónov bola súhlasne s vyššie uvedenými prácami zaznamenaná počas behu zvierat na bežeckom páse a priestorovo špecifická aktivita bola identifikovaná pri zmene polohy zvieratá v bludisku. Neuróny času a miesta boli pozorované spoločne v rovnakej populácii nahrávaných buniek. Vskutku, niektoré neuróny vykazujúce časovo špecifickú aktivitu na bežeckom páse boli aktívne aj pri prejdení potkana do konkrétneho miesta na bludisku (Kraus et al. 2013). V takomto prípade je teda vhodné považovať pyramídové bunky v hipokampe pri určitých podmienkach za multidimenzionálne v zmysle kódovania relevantnej dimenzie udalosti (Eichenbaum 2014).

Interakcie medzi kódovaním času a priestoru sú dobre pozorovateľné pri jednotkovom nahrávaní neuronálnej aktivity z hipokampu počas pohybovania sa potkana po bludisku v presnom sekvenčnom poradí. Ansámby nahraných place cells, ktoré boli aktívne spoločne počas prebiehania potkana po určitom mieste na bludisku sú „prehrávané“, tzn. aktivované v rovnakom poradí počas „off-line“ periód, v ktorých sa zvieratá nepohybujú. Neuronálne kódovanie priestoru pozorované pri aktívnom pohybe zvieratá po bludisku je teda neskôr rekapitulované v presnom časovom poradí priestorovej aktivity zvieratá (Carr, Jadhav, and Frank 2011). Toto prehrávanie (angl. replay) bolo identifikované počas spánku a bolo zistené, že jeho narušenie vedie k zhoršeniu pamäťovej reprezentácie konkrétnej prehrávanej udalosti (Jadhav et al. 2012).



Obrázok č. 3: Reaktivácia hipokampálnych neurónov – obrázok zobrazuje aktiváciu hipokampálnych neurónov počas bdenia pri behu po kruhovej aréne. V nasledujúcom spánku pomalých vln sa nielenže prehráva aktivita rovnakých buniek aktivovaných pri behu počas bdenia, no bunky pália v približne rovnakom poradí v akom pálili počas nahrávania. Prevzaté a upravené od (Diekelmann and Born 2010).

Z prezentovaných dôkazov môžeme konštatovať, že hoci udalosti vnímame v ich časovom a priestorovom kontexte a tieto dimenzie sú teda pri reprezentácii danej udalosti vzájomne prepojené, kódovanie času a priestoru je v hipokampálnej formácii za určitých behaviorálnych podmienok pozorované pomocou jednotkového nahrávania separátne podľa relevantnosti v danej situácii. Zdá sa, že za kombinovanie a vytváranie časopriestorového kontextu sú potom zodpovedné individuálne bunky, ktoré vedú kódovať obe dimenzie pri celkovom vytváraní reprezentácie, pričom takáto schopnosť kombinovania je podstatná pre vytváranie a konsolidáciu pamäte.

1.2 ELEKTROENCEFALOGRAFIA

Pojmom elektroencefalografia označujeme elektrofyziologickú metódu pre zaznamenávanie elektrickej aktivity mozgu. Touto metódou vieme zaznamenať sumárne zmeny elektrického potenciálu, ktoré vznikajú v dôsledku synchronizovanej synaptickej aktivity veľkého množstva neurónov.

Za začiatok elektrofyziológie považujeme objav Carla Matteucciho (1811 – 1868) a Emila Du Bois-Reaymonda (1811 – 1868), ktorí ako prví zaznamenali elektrické signály pochádzajúce zo svalových nervov. Ľudskú mozgovú aktivitu formou elektrických signálov použitím galvanometru a umiestnením dvoch elektród na pokožku hlavy ako prvý zaznamenal Richard Canton (1842 – 1926). V tomto krátkom úvode do histórie elektroencefalografie nemožno vynechať ani Hansa Bergera (1873 – 1941), ktorý sa bezpochyby stal jedným z najznámejších priekopníkov v štúdiu EEG a ako prvý zaznamenal a popísal alfa vlny. Taktiež zdokumentoval významné pozorovanie korelácie medzi mentálnou aktivitou a zmenami v EEG zázname (Haas 2003).

V súčasnej dobe už máme viac typov EEG nahrávania. V prvom rade je to nahrávanie povrchové, ktoré patrí medzi neinvazívne metódy nahrávania EEG. Toto nahrávanie sa bežne používa ako v humánných neurovedeckých štúdiách, tak i v terapeutickej praxi. Ďalej vieme nahrávať EEG i intrakraniálne. Táto metóda je invazívna a vyžaduje chirurgický zákrok. Výhodou iEEG je však vysoká citlivosť, ktorá dokáže zaznamenať i slabšiu mozgovú aktivitu neidentifikovateľnú na pokožke hlavy (Hawsawi, Carmichael, and Lemieux 2017). iEEG sa typicky využíva pri neurovedeckých výskumoch na animálnych modeloch. V súvislosti s animálnym iEEG mi nedá nespomenúť i LFP, ktoré nám prinieslo mnoho hodnotných informácií o fungovaní CNS. Umiestnením nahrávacej elektródy do konkrétneho nervového tkaniva vieme zaznamenať extracelulárne signály pochádzajúce z konkrétnej skupiny skúmaných buniek. Toto nahrávanie je teda lokálne a anglicky ho nazývame local field potencial (LFP). LFP je invazívna metóda, ktorá sa primárne využíva v animálnych štúdiách a len vo veľmi vzácných prípadoch v terapeutickej praxi.

Tak ako každá metóda i EEG má svoje výhody a nevýhody. Jednou z najväčších výhod je vynikajúce časové rozlíšenie, čo robí EEG vhodnou technikou pre hodnotenie dynamického mozgového fungovania (Herrmann et al. 2016). Pre zlepšenie

priestorového rozlíšenia býva EEG často kombinovaná s inými neurozobrazovacími metódami, napr. MRI alebo PET. Jednou zo stávajúcich nevýhod EEG je fakt, že mozog nie je jediným zdrojom elektrickej aktivity v prostredí a nie je ani jediným tkanivom s elektrickou aktivitou v tele. Z toho dôvodu môže byť elektrická aktivita vychádzajúca z mozgu zatienená inou elektrickou aktivitou.

1.2.1 NEURONÁLNA AKTIVITA & GENEROVANIE EEG SIGNÁLU

Základnou funkčnou jednotkou CNS je neurón, ktorý je anatomicky i funkčne prispôsobený na tvorenie a prenos signálu. Každá bunka v našom tele má membránový potenciál (Hober 1905). V prípade neurónov ho nazývame kľudový membránový potenciál. Tento potenciál vzniká z niekoľkých príčin:

a) Koncentračným rozdielom iónov medzi extracelulárnym a intracelulárnym prostredím ; b) Odlišnou priepustnosťou (permeabilitou) plazmatickej membrány pre jednotlivé ióny (Cole and Curtis 1939); c) V malej, ale významnej miere i prítomnosťou elektrogénnych aktívnych prenášačov, púmp na membráne (Skou and Esmann 1992). Komunikácia medzi neurónmi prebieha prostredníctvom zmeny membránového potenciálu pomocou lokálnych zmien napätia. Tieto zmeny môžu spôsobovať buď posun membránového potenciálu smerom ku kladným hodnotám, ktorý potom nazývame excitačný postsynaptický potenciál (EPSP) alebo posun k negatívnejším hodnotám – inhibičný membránový potenciál (IPSP).

Časovou a priestorovou sumáciou rôznych EPSP a IPSP sa vytvorí celkový signál v postsynaptickom neuróne a ak sa zloží dostatočné množstvo lokálnych potenciálov nutných k depolarizácii membrány na prahovú hodnotu, nastane akčný potenciál (Carter and Shieh 2010). Neuronálna aktivita zaznamenávaná pomocou EEG je súčtom EPSP a IPSP veľkých skupín neurónov, ktoré spúšťajú výboje synchronne. Záznam EEG signálu teda nie je záznam akčných potenciálov. EEG signál pochádza z obrovskej skupiny neurónov nachádzajúcej sa v blízkosti každej snímajúcej elektróny. Avšak rytmy, ktoré sledujeme na EEG zázname sú generované často v iných častiach mozgu. Do kôry odkiaľ ich pomocou EEG snímame sú z týchto častí premietané.

1.2.2 MOZGOVÉ VLNY & EEG RYTMY

Neuronálne oscilácie sú v CNS pozorovateľné na všetkých úrovniach nahrávania neuronálnej aktivity. Pozorujeme ich pri sledovaní jednotkovej aktivity prostredníctvom zaznamenávania tzv. spikov, pri zaznamenávaní potenciálov blízkeho poľa (LFP) alebo pri nahrávaní aktivity veľkých skupín neurónov prostredníctvom EEG. Vo všeobecnosti sú oscilácie charakteristické ich frekvenciou, amplitúdou a fázou. Tieto vlastnosti signálu môžeme študovať pomocou časovo-frekvenčných analýz.

Pri študovaní EEG záznamu pozorujeme opakujúce sa vzorce signálu s rôznou frekvenciou a amplitúdou v čase. Zmena týchto oscilačných vzorcov koreluje so zmenou správania či myslenia sledovaného jedinca. Tieto pravidelne sa opakujúce vzorce signálu nazývame mozgové, príp. EEG rytmy. Mozgové rytmy sú typicky rozdelené podľa svojho frekvenčného pásma. Je nutné poznamenať, že presné frekvenčné ohraničenia sa naprieč literatúrou často líšia.

Ako prvý bol objavený alfa rytmus. Alfa vlnenie je charakteristické frekvenčným rozsahom 10 až 12 Hz (Foster et al. 2017) a u ľudí je spoľahlivo detekovateľné z okcipitálneho laloku počas bdenia pri relaxácií so zavretými očami (Berger 1929).

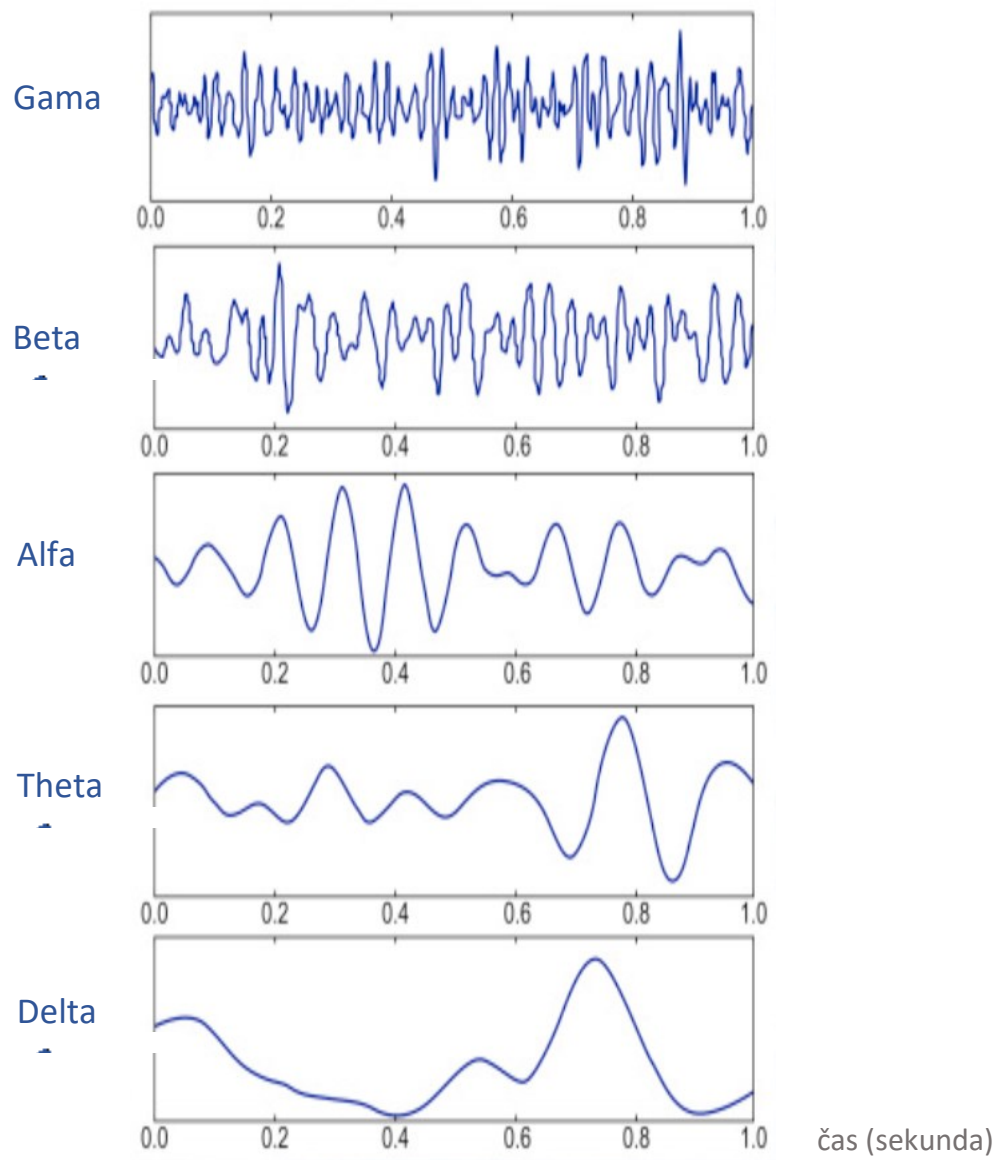
Beta vlnenie leží vo frekvenčnom pásme od 13 do 30 Hz a je asociované s normálnym bdelym vedomím. Beta vlnenie s nízkou amplitúdou je pozorovateľné najmä pri aktívnom myslení, napríklad pri riešení nejakého problému alebo pri situáciách vyvolávajúcich stres (Baumeister et al. 2008). Beta vlnenie tiež indukuje inhibičný kortikálny prenos sprostredkovaný kyselinou gama-aminomaslovou (GABA) (Feshchenko, Veselis, and Reinsel 1997; Van Lier et al. 2004).

Gama vlnenie sa pohybuje vo frekvenčnom pásme nad 30 Hz. Gama rytmus koreluje s kognitívnymi procesmi akými je pracovná pamäť či pozornosť a môže byť posilňovaný pomocou meditácie (Lutz et al. 2004) alebo neurostimuláciou (McDermott et al. 2018). Koreláciu gama aktivity s vyššie spomínanými kognitívnymi funkciami potvrdzuje i zmenená gama aktivita pozorovaná pri rôznych kognitívnych ochoreniach, napr. pri Alzheimerovej chorobe (Van Deursen et al. 2008), či epilepsií (Hughes 2008).

Delta rytmus predstavuje vlnenie s vysokou amplitúdou a frekvenciou medzi 0,5 až 4 Hz. Delta rytmus sa u zdravých jedincov vyskytuje len počas hlbokého spánku. Generovanie delta rytmu môže pochádzať z thalamu a kortexu. Predpokladá sa, že

generovanie delta rytmu thalamom vzniká v koordinácií s retikulárnou formáciou (Maquet et al. 1997). Zatiaľ čo jeho generovanie v kôre je regulované suprachiasmatickým jadrom hypotalamu. Tiež sa ukázalo, že delta vlnenie je sprostredkované sčasti vďaka T-typu kalciových kanálov (Lee, Kim, and Shin 2004) a že počas spánku pri výskyte delta vlnenia je zvýšená inhibičná aktivita GABAergných interneurónov (Pace-Schott and Hobson 2002).

Theta rytmus spadá do frekvenčného pásma od 4 do 9 Hz. Sú popísané dva typy theta rytmu: hipokampálny theta rytmus a kortikálny theta rytmus. Pomocou techniky LFP bol hipokampálny rytmus zaznamenaný a široko študovaný v hipokampe, ale aj v ďalších mozgových štruktúrach u rôznych druhov cicavcov (Whishaw and Vanderwolf 1973). V hipokampe potkanov bol pozorovaný pri lokomócií a počas REM spánku, pričom sa zistilo, že frekvencia theta oscilácií rastie priamo úmerne s rýchlosťou behu potkana a pohybuje sa medzi 6,5 až 9 Hz (Vanderwolf 1969). Dnes je hipokampálny theta rytmus všeobecne spájaný so schopnosťou priestorovej orientácie a učenia (Buzsáki 2005; Buzsáki and Moser 2013). Zároveň sa domnievame, že theta rytmus svojou schopnosťou organizovať aktivitu hipokampálnych neurónov bude hrať vitálnu úlohu pri konsolidácií spomienok, konkrétne pri vytváraní LTP (Brankačk, Stewart, and E. Fox 1993; Hyman et al. 2003). U ľudí sa samozrejme z etického hľadiska zvyčajne nepraktikuje nahrávanie hipokampálneho LFP a primárne disponujeme s dôkazmi o kortikálnom zázname theta rytmu. Invazívne metódy nahrávania humánneho EEG signálu sú uskutočňované len vo výnimočných terapeutických prípadoch. Väčšina dostupných informácií ohľadom ľudského hipokampálneho theta rytmu teda pochádza z malej skupiny epileptických pacientov. Hipokampálne oscilácie u ľudí boli prítomné zhodne s animálnymi štúdiami počas REM spánku a ich frekvencia sa pohybovala v pásme od 4 do 7 Hz (Cantero et al. 2003).

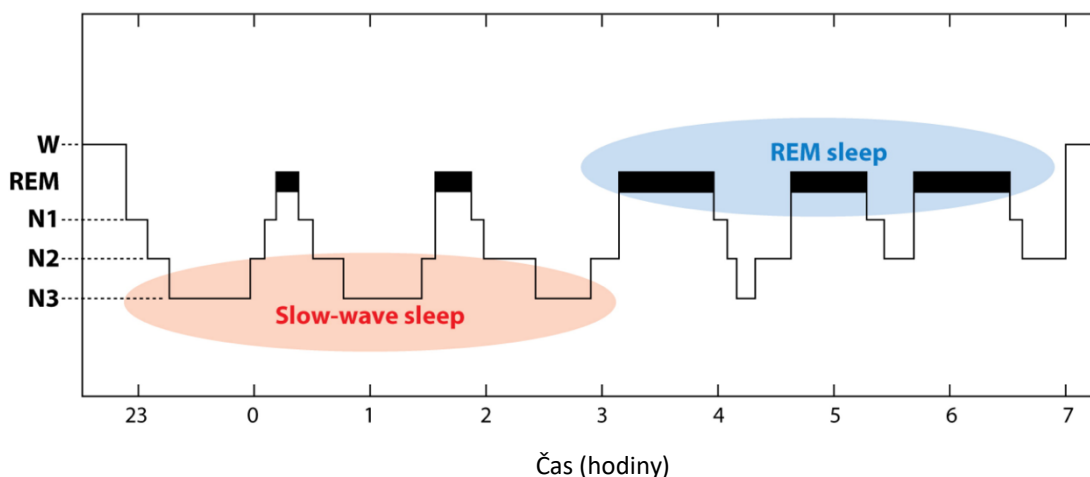


Obrázok č. 4: EEG rytmy – Prevzaté a upravené od (Buzsáki 2009).

1.2.3 SPÁNKOVÁ EEG

Spánok je prirodzeným opakujúcim sa štádiom odpočinku u ľudí a zvierat. Je pozorovaný dokonca i u bezstavovcov ako napríklad u *Drosophila melanogaster* (Tononi 2000). Spánok je zaujímavým a stále nie celkom dobre preskúmaným fyziologickým fenoménom. Keďže nie sme počas tohto štádia pri vedomí a náš svalový tonus je významne znížený, mohlo by sa zdať, že spánok je akosi pasívnou formou odpočinku. Rôznymi štúdiami však boli preukázané významné fyziologické procesy, ktoré sa dejú primárne práve počas spánku. Bolo pozorované napríklad prepojenie spánku so správnou funkciou imunitného systému (Besedovsky, Lange, and Born 2012), regeneráciou svalových tkanív (Nédélec et al. 2015), reguláciou emócií (Kahn, Sheppes, and Sadeh 2013) a mnoho ďalších. Nemožno mi nespomenúť i prominentnú úlohu spánku v konsolidácii pamäti. Táto rozsiahla téma bude bližšie popísaná v nasledujúcej kapitole.

Počas spánku sa oproti bdelosti dramaticky mení EEG aktivita. Z elektrofyziologického hľadiska môžeme konštatovať, že spánok je dynamický proces, pri ktorom sa u zdravých jedincov počas noci rytmicky striedajú dve hlavné spánkové fázy: NREM a REM (Carskadon and Dement 2010). Každá z fáz je charakteristická rozdielnymi vzorcami EEG aktivity (viď nižšie). U ľudí je NREM fáza rozdelená do 4 štádií a zahrňuje proces zaspávania, upadania do hlbšieho spánku, až po veľmi hlboký spánok, tzv. spánok pomalých vln (SWS). Po posledných štádiách hlbokého spánku nasleduje REM fáza, ktorá dostala pomenovanie podľa špecifických rýchlych očných pohybov prítomných počas jej trvania (Aserinsky and Kleitman 1953). V prvej polovici noci strávime väčšiu časť v štádiu SWS a naopak v druhej polovici noci prevláda REM spánok (Inostroza and Born 2013).



Obrázok č. 5: Hypnograf – postupné striedanie jednotlivých spánkových fáz a bdelosti počas noci u ľudí. V prvej polovici noci počas spánku dominuje fáza SWS, v druhej polovici prevláda REM fáza. Prevzaté a upravené od (Inostroza and Born 2013).

1.2.3.1 ZMENY EEG AKTIVITY POČAS JEDNOTLIVÝCH SPÁNKOVÝCH FÁZ

U ľudí je upadanie do spánku charakteristické prítomnosťou pravidelnej EEG aktivity s frekvenciou asi 10 Hz. V štádiu NREM 1 sa vyskytujú oscilácie s nízkou amplitúdou a občasnými theta vlnami do asi 5 Hz (McCarley, 2007). V nasledujúcom štádiu NREM 2 sa typicky objavujú spánkové vretienka a K-komplexy. Spánkové vretienka (angl. *spindles*) predstavujú pravidelné oscilácie s frekvenciou okolo 10 až 15 Hz a vznikajú v thalame interakciou GABAergných neurónov *nucleus reticularis* a glutamatergnými thalamo-kortikálnymi projekciami, vďaka čomu sa synchronizovane šíria do kortikálnych oblastí (Gennaro and Ferrara 2003). Hlboké štádiá spánku sú charakteristické osciláciami s frekvenciou od 0,5 do 4 Hz a vysokou amplitúdou. Tieto pomalé oscilácie pochádzajú z neokortexu a synchronizujú neuronálnu aktivitu cyklickým striedaním ich „up“ a „down“ stavov (Achermann 1998). U zvierat pozorujeme pri hlbokom spánku podobné oscilačné vzorce. V animálnych nahrávkach vieme spoľahlivo identifikovať spánok pomalých vln, spánkové vretienka a taktiež i hipokampálne sharp-wave ripples (S-WR). S-WR sú vysokofrekvenčné oscilácie (nad 100 Hz) sú generované hipokampálnou oblasťou CA3 (Ylinen et al. 1995). Veľkú úlohu pri ich vzniku hrá pravdepodobne interakcia medzi inhibičnými interneurónmi a excitačnými pyramídovými bunkami v CA1 (Buzsáki and Draguhn 2004).

U zdravých jedincov po hlbokých štádiách spánku typicky nasleduje REM spánok, ktorý je charakteristický theta rytmom a PGO vlnami. PGO vlny sú generované salvou synchronizovanej aktivity, ktorá sa šíri z mozgového kmeňa do laterálneho genikulátneho jadra thalamu a zrakovkej kôry. PGO vlnenie bolo pozorované u mačiek a hlodavcov, no nie je spoľahlivo identifikované u ľudí. Ľudský REM spánok je charakteristický osciláciami s nízkou amplitúdou a rôzne rýchlymi frekvenciami nachádzajúcimi sa vo frekvenčnom pásme theta rytmu. Naopak pri vyhodnocovaní EEG záznamu špeciálne u hlodavcov pozorujeme počas REM spánku veľmi pravidelné a vysoké theta vlnenie (Inostroza and Born 2013).

1.3 SPÁNOK & KONSOLIDÁCIA SPOMIENOK S KONTEXTOM

Vplyv spánku na pamäť je komplexná otázka, ktorá vyžaduje početné a špecifické štúdie. Spánok aj pamäť sú výnimočné procesy, ktoré samé o sebe nie sú ešte stále dokonale preskúmané. Rovnako ako je spánok stav, počas ktorého dokážeme pomocou fyziologických zmien rozlíšiť niekoľko fáz, tak i pamäť je dynamický proces skladajúci sa z niekoľkých krokov od zakódovania novej informácie po stabilizáciu tejto informácie v dlhodobom úložisku. Mimo to pamäť delíme podľa rôznych kritérií do mnohých systémov.

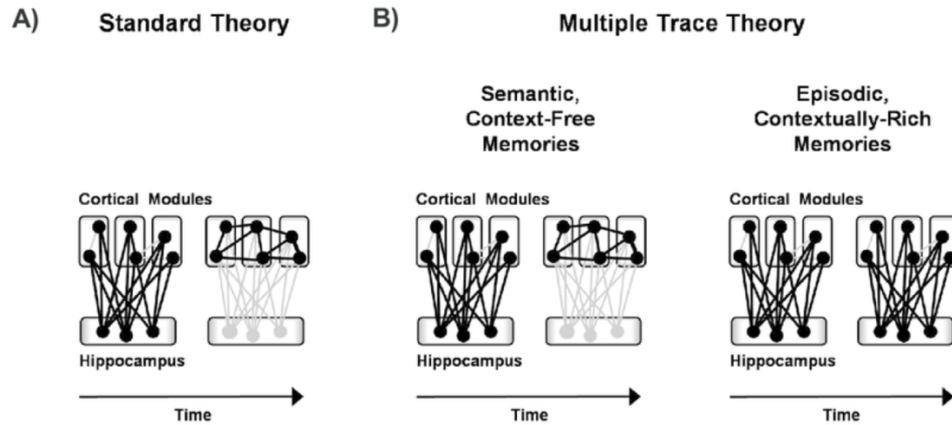
Fakt, že spánok nejakým spôsobom posilňuje informácie zakódované počas bdenia sme si všimli už pred mnohými rokmi (Ebbinghaus, 1885). Otázkou však naďalej zostáva nielen akým spôsobom, ale aj ktorý konkrétny typ pamäti je počas spánku podporovaný. Dnes je známe, že spánok v prvej polovici noci bohatý na SWS preferenčne pomáha v posilňovaní deklaratívnej pamäti, zatiaľ čo spánok v druhej polovici bohatý na REM podporuje posilnenie procedurálnych informácií (Plihal and Born 1997).

Nie len v minulosti veľa vedcov považovalo spánok za pasívny stav, ktorého primárnou úlohou je odpočinok a nabratie novej energie pre nasledujúce výzvy. Mám za to, že z tejto myšlienky vznikla i pamäťová teória synaptickej homeostázy. Táto teória postuluje oslabovanie synaptickej sily počas spánku. Neustály tok informácií, ktoré prijímame počas dňa zvyšuje synaptickú silu v našom mozgu a z hľadiska energetickej spotreby by bolo potom prirodzené túto silu znižovať počas stavu, v ktorom ďalšie impulzy z prostredia neprijímame. Postupné znižovanie synaptickej sily vo všetkých

synapsiách by teda odstránilo slabý neuronálny „šum“ a umožnilo upevňovanie dôležitých synapsií a použitie synapsií pre budúce kódovanie (Dash et al. 2009; Vyazovskiy et al. 2008). Model synaptickej homeostázy však ďalej nevysvetľuje preferenčné podporovanie rôznych typov pamäti v rôznych neuronálnych štruktúrach počas rôznych fáz spánku.

V súčasnej dobe však čoraz viac štúdií zaoberajúcich sa vplyvom spánku na pamäť svojimi zisteniami spochybňujú pasívnu úlohu spánku a prinášajú presvedčivé dôkazy o jeho aktívnom zapojení do pamäťového procesu. Mnoho neurovedeckých skupín skúma aktívne zapojenie spánku do procesu pamäťovej konsolidácie. Pamäťová konsolidácia je krok, počas ktorého sa novo zakódovaná informácia stáva relatívne stabilná a uložená v dlhodobom informačnom úložisku (Muller & Pilzecker, 1900). Konsolidáciu môžeme skúmať na synaptickej i systémovej úrovni. Pod pojmom synaptická konsolidácia sa skrývajú dlhodobé plastické zmeny na synapsiách, vďaka ktorým sa posilňuje synaptické spojenie i synaptický prenos. Hlavným mechanizmom synaptickej konsolidácie je dlhodobá potenciácia (Bliss, T., Lomo 1973). Systémová konsolidácia sa snaží objasniť otázku komunikácie, prenosu a ukladania informácií z našich krátkodobých do dlhodobých úložísk.

Na problematiku systémovej konsolidácie existuje niekoľko rôznych pohľadov. Jednými z najdiskutovanejších však po desaťročia zostávajú teória štandardnej systémovej konsolidácie (Russell and Nathan 1946), ktorú som v tejto práci už spomínala a Multiple Trace Theory (Nadel and Moscovitch 1997). Obe teórie sa sústreďujú na konsolidáciu deklaratívnych spomienok a vyzdvihujú rolu hipokampu a neokortexu v tomto procese. Každá z nich však postuluje rozdielny spôsob spracovania pamäti v týchto neuronálnych oblastiach. Jedným zo zásadných rozdielov týchto teórií je pohľad na konsolidáciu epizodických a sémantických spomienok.



Obrázok č. 6: Rozdiel medzi Štandardnou konsolidačnou teóriou a Multiple Trace Theory – A) Štandardná konsolidačná teória predpokladá, že informácie sú kódované hipokampom, ktorý zároveň predstavuje krátkodobé pamäťové úložisko, spomienky sa od neho stanú časom nezávislé. B) Multiple Trace Theory postuluje, že pamäť rôzne spracováva epizodickú a sémantickú pamäť. Epizodická pamäť bude oproti sémantickej vždy závislá na hipokampe. Prevzaté od (Frankland, Teixeira, and Wang 2007).

Neuronálne mechanizmy konsolidácie na bunkovej i systémovej úrovni a taktiež zapojenie spánku do týchto procesov s dôrazom na epizodickú pamäť som detailne prebrala vo svojej bakalárskej práci z roku 2018, ktorá však neobsahovala vlastné výsledky a teda priniesla len prehľad diskutovaných hypotéz a mechanizmov. V literárnom úvode svojej diplomovej práce som sa preto namiesto sebaopakovania rozhodla detailnejšie popísať hypotézu aktívnej konsolidácie, ktorá sa stala predmetom môjho skúmania počas magisterského štúdia. V nasledujúcej časti okrem jej postulátu popisujem aj jej vznik a elektrofyziologické prvky prinášajúce možné objasnenie jej mechanizmu.

1.3.1 HYPOTÉZA AKTÍVNEJ SPÁNKOVEJ KONSOLIDÁCIE

Myšlienka aktívnej spánkovej konsolidácie má pôvod v teórií štandardnej systémovej konsolidácie. Táto teória postuluje dvojfázový pamäťový proces konsolidácie deklaratívnych spomienok, na ktorom sa aktívna spánková konsolidácia vo svojej podstate zakladá. Postulát aktívnej spánkovej konsolidácie vznikol po objavení neuronálneho prehrávania hipokampálnych ansámblov v presnom časovom poradí počas spánku pomalých vln (kapitola 1.1.2).

Hypotéza aktívnej spánkovej konsolidácie navrhuje nasledovný scenár spracovania deklaratívnych spomienok počas spánku: V bdelosti sú epizodické informácie kódované a uskladňované v hipokampálnych a extrahipokampálnych oblastiach (Eldridge et al. 2000; Maguire 2001). V nasledujúcej spánkovej perióde počas SWS sú novo zakódované hipokampálne reprezentácie rapídne reaktivované v rovnakom časovom poradí. Táto reaktivácia prechodne posilňuje hipokampálne aspekty epizódy, no zároveň prostredníctvom CA1 entorinálnej dráhy sa tieto reaktivované informácie dostávajú z hipokampu do neokortexu a striatálnych oblastí. Transformácia hipokampálnych reaktivácií do extrahipokampálnych oblastí iniciuje dlhodobé plastické zmeny na synapsiách, ktoré vedú k stabilizácii nových spomienok v ich dlhodobom pamäťovom úložisku (Inostroza and Born 2013). Pre tieto dlhodobé plastické zmeny na synapsiách a teda synaptickú konsolidáciu by potom mala byť dôležitá nasledujúca REM fáza, ktorá je charakteristická výskytom spomínaných PGO oscilácií u zvierat a theta rytmu. Behom REM fázy vykazuje EEG aktivita minimálnu koherenciu medzi limbickohipokampálnymi a thalamokortikálnymi (Achermann 1998; Axmacher et al. 2008). Vďaka rozpojenému dialógu medzi neuronálnymi štruktúrami hypotéza aktívnej konsolidácie predpokladá zlepšovanie lokálnych synaptických procesov počas REM fázy (Robertson 2009). Mimo iné by to tiež vysvetľovalo, prečo sa počas REM spánku preferenčne neposilňujú deklaratívne spomienky, ktorých konsolidácia je podmienená prepojením jednotlivých častí mozgu.

1.3.1.1 KOMUNIKÁCIA MEDZI NEURONÁLNYMI OBLASŤAMI POČAS SPÁNKOVO DEPENDENTNEJ SYSTÉMOVEJ KONSOLIDÁCIE VO FÁZE SWS

Systémová komunikácia medzi rôznymi neuronálnymi oblasťami počas spánku je kontrolovaná EEG rytmi (Buzsáki and Draguhn 2004). V prípade spánkovo dependentnej systémovej konsolidácie je šírenie reaktivovaných hipokampálnych pamäťových stôp riadené pomocou troch rôznych oscilačných rytmov: pomalými osciláciami (SO), 12-15 Hz vretienkami a sharp-wave ripples (S-WR), ktoré oscilujú s 100 až 300 Hz frekvenciou (Diekelmann and Born 2010).

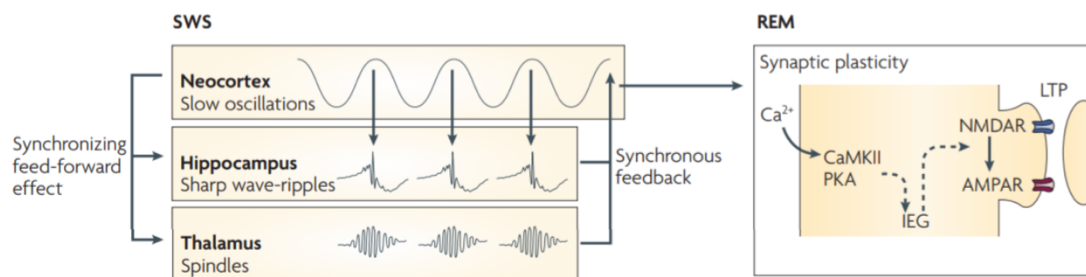
Vysoko synchronizované pomalé oscilácie pochádzajúce primárne z neokortexu nám vďaka periodickému striedaniu svojich depolarizačných up a hyperpolarizačných

down stavov poskytujú časový obraz o tom, kedy je neuronálna sieť aktívna (Mölle and Born 2011). Predpokladáme, že synaptická aktivita, ktorá spúšťa depolarizačné up stavy pomalých vln je výsledkom zvýšenej aktivity potenciovaných príslušných synapsí (Bazhenov et al. 2002). To znamená, že ak je počas bdenia týmito obvody kódovaná nejaká informácia, počas nasledujúceho spánku budú tieto obvody disponovať vyššou synaptickou aktivitou. Pri rovnakom stimule budú vykazovať vyššiu odpoveď.

Komunikácia medzi hipokampom a extrahipokampálnymi oblasťami počas SWS je regulovaná synchronizáciou neokortikálnych pomalých vln a hipokampálnych SW-R (Diekelman a Born, 2010). Vďaka tejto synchronizácii môžu hipokampálne reaktivácie putovať do neokortexu a striatálnych oblastí. Transformácia hipokampálnych informácií prebieha počas synchronizovaných up stavov pomalých vln a SW-R, ktoré vyvolajú spustenie intracelulárneho influxu Ca^{2+} (Sejnowski and Destexhe 2000). Tento mechanizmus spánkovej konsolidácie na hipokampe závislých spomienok bol prakticky demonštrovaný potlačením alebo podporením SO a SW-R pomocou elektrickej stimulácie (Girardeau et al. 2009; Marshall et al. 2011; Marshall and Born 2007).

Štúdie preukázali významné zvýšenie vretiekovej aktivity počas spánku po učení (Fogel and Smith 2011; Gais, Lucas, and Born 2006). Tieto vretienka pochádzajú z GABAergných thalamických neurónov a ďalej do kortikálnych oblastí sú rozširované pomocou glutamátergnych thalamokortikálnych projekcií (Gennaro and Ferrara 2003). Synchronizujú sa s up stavmi pomalých vln. Rovnako ako SO a S-WR sa preferenčne vyskytujú v predtým potenciovaných synaptických sieťach (Behrens et al. 2005; Bergmann et al. 2008; Cirelli and Tononi 2000). Svojou prítomnosťou v týchto obvodoch môžu podporovať dlhodobú potenciáciu (LTP) (King et al. 1999; Rosanova and Ulrich 2005). Predpokladá sa, že hlavnou úlohou vretienok v pamäťovom procese však bude udržiavať pamäťové spracovanie vďaka posilňovaniu pomalých vln (Mölle et al. 2011).

Dialóg medzi hipokampom a neokortexom, ktorý je esenciálny pre transformáciu reaktivovaných hipokampálnych spomienok prebieha vďaka prítomnosti potenciovaných EEG oscilácií počas SWS.



Obrázok č. 7: Hypotéza aktívnej spánkovej konsolidácie – počas SWS prebieha replay hipokampálnych neurónov a neuronálna aktivita v hipokampe a thalame sa synchronizuje s up stavmi pomalých vln pochádzajúcich z neokortexu, táto synchronizácia vedie k podnieteniu plastických zmien, pre ktoré je esenciálny nasledujúci REM spánok. Prevzaté a upravené od (Diekelmann and Born 2010).

2. CIELE PRÁCE

Hlavným cieľom mojej diplomovej práce bolo skúmať prepojenie pamäti spracovávajúcej spomienky na udalosti s ich časovým a priestorovým kontextom a spánku u animálneho modelu. Mojou hypotézou je, že spánok aktívne podporuje konsolidáciu kontextových spomienok v súhlase s teóriou aktívnej spánkovej konsolidácie. Svoj postulát som sa rozhodla overiť nasledovne:

1. Porovnaním behaviorálnych výsledkov v časopriestorovej úlohe medzi spánkovou a bdelou skupinou laboratórnych zvierat.
2. Vyhodnotením a porovnaním spánkového EEG signálu nahrávaného v priebehu experimentu pred a po učení časopriestorovej úlohy.

Pre dosiahnutie môjho cieľu som si pripravila plán, ktorý sa skladal z niekoľkých logicky na seba nadväzujúcich bodov:

- Vymyslieť vhodnú behaviorálnu úlohu pre animálny model, ktorá bude spĺňať požiadavky pre testovanie kontextovej pamäti.
- Naučiť sa vyrábať intrakraniálne animálne EEG implantáty.
- Naučiť sa stereotaktickú operáciu za účelom zavedenia vyššie spomínaného implantátu.
- Naučiť sa nahrávať a vyhodnocovať EEG signál.

3. METODIKA

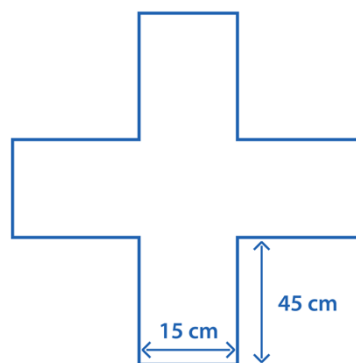
3.1 APARATÚRA

Pri experimente bolo pre testovanie kontextovej pamäti použité špecifické vyvýšené plus bludisko upravené oproti štandardnej verzii šírkou svojich ramien (viď obrázok č. 8-B) pre možnosť lepšieho pohybu a bezpečnosti skúmaných zvierat. Bolo vyrobené z plastových materiálov.

A)



B)



Obrázok č. 8: A) Fotka vyvýšeného plus bludiska B) Nákres plochy plus bludiska s rozmermi

Experiment bol prevádzaný vždy v rovnakej obdĺžnikovej miestnosti s vizuálnymi značkami na dvoch oproti sebe stojacich stenách. V miestnosti boli tieto značky počas celého trvania experimentu rovnaké a nemenili spolu s nábytkom nachádzajúcim sa v experimentálnej miestnosti svoje miesto. Tento poznatok je dôležitý vzhľadom na priestorovú orientáciu zvieráťa na bludisku počas úlohy.

V experimentálnej miestnosti sa nachádzala aj kamera pripevnená na držiak nachádzajúci sa na jednej zo stien. Táto kamera slúžila na nahrávanie jednotlivých pokusov zvierat.

3.2 PRIEBEH EXPERIMENTU

Zmyslom experimentu bolo sledovať ako spánok vplýva na konsolidáciu časopriestorovej spomienky. Zvieratá sa preto postupne učili komplexnú časopriestorovú úlohu s následnou manipuláciou ich spánku. Pred experimentom teda boli náhodne rozdelené na dve skupiny – spánkovú, ktorej bol po tréningu umožnený ničím nerušený 2 hodinový spánok v spánkových boxoch, na ktoré boli vopred habituované a bdelú, ktorá bola 2 hodiny po tréningu udržiavaná v bdelosti pomocou tzv. gentle handling metódy.

Experiment prebiehal každý deň v presnom poradí v intervale medzi 8 až 16 hodinou s odchýlkou maximálne jednej hodiny spôsobenej technickými problémami pri nahrávaní. Pribeh experimentu bol nasledovný:

| | |
|-----------------|--|
| 8:00 – 10:00 : | nahrávanie EEG naimplantovaných zvierat zo spánkovej skupiny |
| 10:00 – 13:00 : | učenie sa / tréning časopriestorovej úlohy |
| 13:00 – 15:00 : | spánok zvierat v spánkovej skupine spolu s nahrávaním EEG naimplantovaných zvierat + udržiavanie bdelosti u zvierat v bdelej skupine |

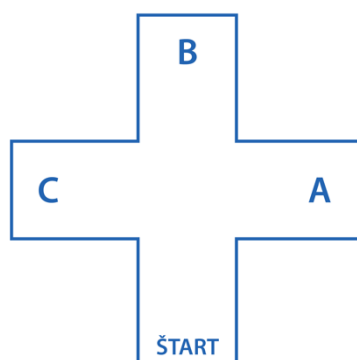
Tréning i spánok boli pravidelne nahrávané pomocou programov EthoVision (Noldus), Logi Capture a Pylon (Noldus) vo formáte AVI.

3.2.1 ČASOPRIESTOROVÁ ÚLOHA

V priebehu môjho magisterského štúdia sme sa snažili vymyslieť funkčnú úlohu pre testovanie pamäti epizodického typu u animálnych modelov. Jedným z prvých nápadov bolo testovanie kontextu kde-kedy-čo pomocou radiálneho bludiska s 8 ramenami. Na konci každého ramena sa nachádzali 4 predmety, z ktorých len 1 bol odmenený. Úlohou zvieratá bolo naučiť sa cestu do konkrétnych ramien (kde) v presnom časovom poradí (kedy) a následne si vybrať odmeňovaný objekt (čo). Pilotné skupiny však vykazovali príliš dlhú dobu pre pochopenie a zapamätanie si súvislostí v tejto úlohe vedúce k apetitívnej odmene. Tieto zistenia nás preto priviedli k záveru úlohu zjednodušiť a skúmať kontextovú pamäť zloženú len z dvoch aspektov udalosti.

Zvieratá sa teda v súčasnej úlohe postupne na plus bludisku učia sekvenciu dvoch ciest v presnom časopriestorovom poradí pomocou apetitívnej motivácie. Úloha prebieha nasledovne (pre lepšiu vizualizáciu viď obrázok č. 9):

1. Zviera položíme na štartovacie rameno.
2. Zo štartovacieho ramena musí prísť pre apetitívnu odmenu na rameno „A“.
3. Z ramena „A“ sa pre ďalšiu apetitívnu odmenu musí vrátiť naspäť na štartovacie rameno.
4. Zo štartovacieho ramena tento krát pre apetitívnu odmenu musí plynule prísť na rameno „B“.
5. Z ramena „B“ sa pre odmenu musí znova vrátiť na štartovacie rameno.
6. Po zožratí odmeny sa úloha na štartovacom ramene končí.



Obrázok č. 9: Označenie ramien na plus bludisku

Úlohu sa zviera učí postupne, tzn. najprv sa zviera naučí od položenia na štartovacie rameno prísť na rameno „A“ a vrátiť sa na štart. Túto časť úlohy sme nazvali fáza 1. Pre tento účel prebehne jeden celý „učiaci deň“, v ktorom zvieratú experimentátor ukáže túto cestu 10 krát. Medzi jednotlivými pokusmi je vždy krátka pauza, v ktorej je zviera uložené do svojej domácej klietky a je mu umožnený prístup k vode. V tejto pauze experimentátor postupne trénuje ďalšie zvieratá z oboch skupín rovnakým spôsobom. Pauza je natoľko krátka, že je upadnutie zvieratá do spánku je veľmi nepravdepodobné. V ďalších dňoch prebehnú kontrolné tréningy, v ktorých sa zviera rozhoduje slobodne o návšteve jednotlivých ramien, na základe čoho je buď

odmenené alebo mu je ukázaná správna cesta. Tréning každého zvieratá sa skladá z 10 pokusov s pauzami. Ak zviera splní kritérium: z 10 pokusov aspoň 9 krát navštívi od štartovacieho ramena rameno „A“ a vráti sa na štart postupuje do druhej fázy.

Po splnení kritéria zviera na ďalší deň čaká „učiaci deň“, v ktorom experimentátor ukáže zvieratú 10 krát s rovnakými pauzami medzi jednotlivými pokusmi ako je uvedené vyššie sekvenciu celej úlohy:

ZAČIATOK = ŠTART -> RAMENO A -> ŠTART -> RAMENO B -> ŠTART = KONIEC

V ďalšie dni zvieratá absolvujú kontrolné tréningy zhodnocujúce konsolidáciu celej sekvencie s rovnakými podmienkami ako mali v prvej fáze (pauzy medzi pokusmi, slobodná návšteva ramien, odmena/ navedenie experimentátorom).

Experiment sa ukončuje v deň, keď zviera počas tréningu z 10 pokusov aspoň 9 krát navštívi ramená v súhlase s učiacou sa sekvenciou.

Počas tréningov experimentátor detailne zaznamenáva chyby, ktoré zviera pri vykonávaní úlohy urobí (viď nižšie).

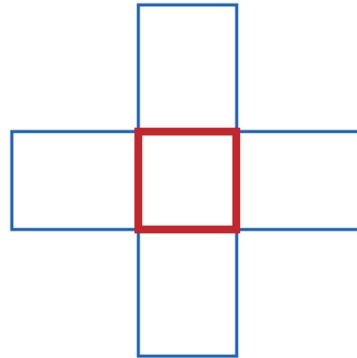
Zvieratám je sekvencia pridelená náhodne, tzn. jednotlivé zvieratá majú rozdielnu kombináciu ramien, ktoré majú navštíviť v správnom poradí za účelom odmeny, napr.: Š – A – Š – B – Š / Š – C – Š – A – Š / Š – B – Š – C – Š / atď.

3.2.1.1 CHYBY POČAS TRÉNINGOV

Počas úlohy môže zviera spraviť dva typy chýb. Prvým typom je prekročenie hranice ramena v nesprávnom poradí, či prekročenie ramena so žiadnou apetitívnu asociáciou. Ak zviera prekročí hranicu známeho ramena v nesprávnom poradí, znamená to, že v tomto ramene už niekedy bolo odmenené a teda s ním má spojené apetitívne odmeňovanie. Z toho dôvodu túto chybu považujeme za asociačnú. Ak zviera prekročí rameno, v ktorom nikdy nedostalo žiadnu odmenu a teda s ním nemá spojenú žiadnu apetitívnu asociáciu, považujeme chybu za neasociačnú. O rozlišovaní asociačných a neasociačných chýb má však zmysel hovoriť až počas druhej fázy. V priebehu prvej fázy je v podstate každá chyba neasociačná. Druhým typom chyby je zastavenie zvieratá na viac ako 30 sekúnd (tzv. freezing).

V prípade výskytu tohto spávania sa považuje konkrétny pokus za chybný a experimentátor si danú chybu detailne zaznamená (konkrétne chybne navštívené

rameno/ freezing). Zviera potom správne naviguje až do konca sekvencie bez toho, aby sa mohlo v danom pokuse slobodne rozhodnúť.



Obrázok č. 10: Vyznačenie hraníc ramien na plus bludisku

3.3 EXPERIMENTÁLNE ZVIERATÁ

V experimente boli použité laboratórne potkany kmeňa Long Evans (SPF, Velaz s. r. o., Česká republika) vo veku 3 – 4 mesiacov o hmotnosti 350 – 450 g v dobe prebiehania experimentu. Experimentálne zvieratá boli chované v priehľadných plastových boxoch vo dvojiciach. Zvieratá po stereotaktickej operácii pre ich bezpečie boli ďalej chované jednotlivo. Vo zverinci bola udržiavaná konštantná vlhkosť ($\approx 40\%$), teplota ($\approx 21^\circ$) a zvieratá mali pravidelný dvanásť hodinový denný režim striedania svetla/tmy.

Zvieratám sa tri dni pred začatím experimentu zaviedla reštrikčná diéta. Tieto tri dni a v priebehu experimentu dostávali 15 – 20 g krmiva denne oproti ich dovtedajšiemu príjmu *ad libitum*. Reštrikčná diéta sa zaviedla kvôli motivácii zvierat riešiť behaviorálnu časopriestorovú úlohu, počas ktorej boli apetitívne odmeňované.

Všetky zvieratá pred experimentom boli naivné.

3.3.1 MANIPULÁCIA SO ZVIERATAMI

3.3.1.1 HANDLING

Pred samotným začiatkom experimentu boli všetky zvieratá zoznamené s experimentátorom a riadne označené. Tento krok slúžil k navyknutiu zvierat na manipuláciu a kontakt s experimentátorom.

3.3.1.2 HABITUÁCIA NA SPÁNKOVÝ BOX

Vzhľadom na to, že časopriestorová úloha prebieha na vyvýšenom plus bludisku, sme sa rozhodli všetky zvieratá predom na toto bludisko habituovať. Zvieratá vďaka tomu prešli prvotnou exploračiou v novom prostredí a prekonalí strach vyvolaný vyvýšenou plochou. Pred experimentom sa vďaka habituácii naučili na bludisku zožrať odmenu používanú ďalej v experimente. Tento moment habituácie s ohľadom na apetitívnu motiváciu v úlohe počas pokusu bol kľúčový. Zvieratá strávili pred začiatkom experimentu na bludisku minimálne tri krát 15 minút.

Všetky zvieratá boli taktiež habituované na spánkový box. Spánkový box bol vyrobený z plastového materiálu, pričom jeho steny boli nepriehľadné. Dno spánkového boxu bolo vystlané pilinami. Každé zviera strávilo v spánkovom boxe so svojimi pilinami minimálne 3 krát dve hodiny. K tejto dlhšie trvajúcej habituácii nás priviedli skúsenosti z pilotných skupín, u ktorých sa kratšia habituácia na spánkový box neosvedčila.

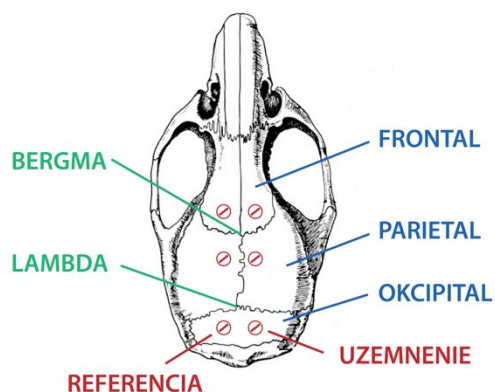
3.3.1.3 STEREOTAKTICKÁ OPERÁCIA

Stereotaktická operácia sa zahájila uvedením potkana do hlbkej anestézie pomocou inhalačnej 5% zmesi isofluranu. Následne boli zvieratá umiestené do stereotaktického stojanu (Stoelting). Operácia od tohto momentu trvala približne dve hodiny. Počas prvej pol hodiny bol potkan udržiavaný v hlbkej anestézii pomocou 3% inhalačnej zmesi isofluranu. Následne až do skončenia bola pre anestéziu použitá 1,5% zmes isofluranu.

Po oholení srsti na hlave, odhalení a očistení lebky od ostatných tkanív do nej bolo vyvrtaných 6 rovnako veľkých otvorov (viď obrázok č. 11). Do každého otvoru bola zavrtaná skrutka, ktorá bola súčasťou predom pripraveného EEG implantátu. Pred upevnením implantátu boli zvieratú pod kožu zavedené dve EMG elektródy. Implantát bol k lebke trvalo pripevnený pomocou rýchlo tuhnúceho duracrolu. Dentálny cement upevňujúci implantát bol po stuhnutí obrúsený tak, aby sa predišlo dreniu náhodnej ostrej časti o kožu zvieratá. Okolie implantátu bolo následne riadne dezinfikované a pre lepšie hojenie bola aplikovaná masť framykoin.

Po prebudení zvieratá z anestézie bolo každému zvieratú podané antibiotikum enroxyl a analgetikum loxikom v správnej dávke prislúchajúcej hmotnosti zvieratá.

Rekonvalescencia z operácie trvala 7 dní



Obrázok č. 11: Nákres lebky potkana po stereotaktickej operácii - na nákrese lebky potkana vidíme 2 skrutky pripevnené na frontálnu lebečnú kosť a dve skrutky pripevnené na parietálnu lebečnú kosť, z týchto skrutiek bola snímaná EEG aktivita, skrutka na okcipitálnej lebečnej kosti vľavo slúžila ako referencia a skrutka vpravo ako uzemnenie

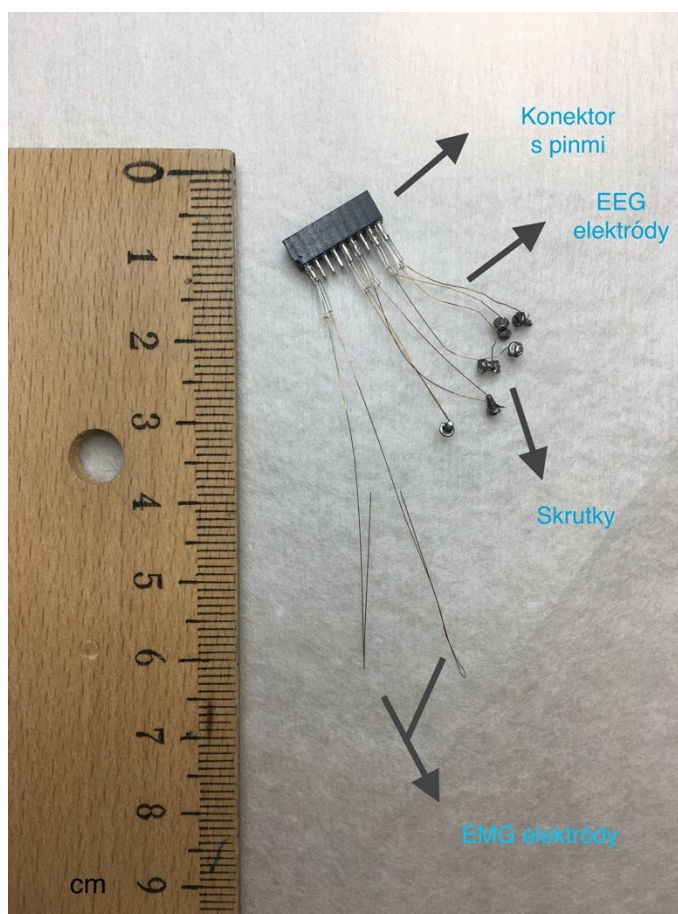
3.3.1.4 METÓDA GENTLE HANDLING

Počas experimentu boli zvieratá patriace do bdelej skupiny pravidelne vždy bezprostredne po učení sa/ tréningu dve hodiny udržiavané v bdelom stave. Udržiavanie bdelosti prebiehalo pomocou metódy tzv. gentle handling. Zvieratá boli umiestnené do plastových boxov, ktoré boli vystlané pilinami. Boxy so zvieratami sa nachádzali v miestnosti s experimentátorom. Experimentátor počas týchto dvoch hodín pozorne sledoval zvieratá a pri náznaku zaspávania ich prebudil jemným dotykom či slabým zvukom pochádzajúcim z klopania prstov o plastový box.

3.4 NAHRÁVANIE ANIMÁLNEHO EEG & EMG SIGNÁLU

3.4.1 VÝROBA IMPLANTÁTOV

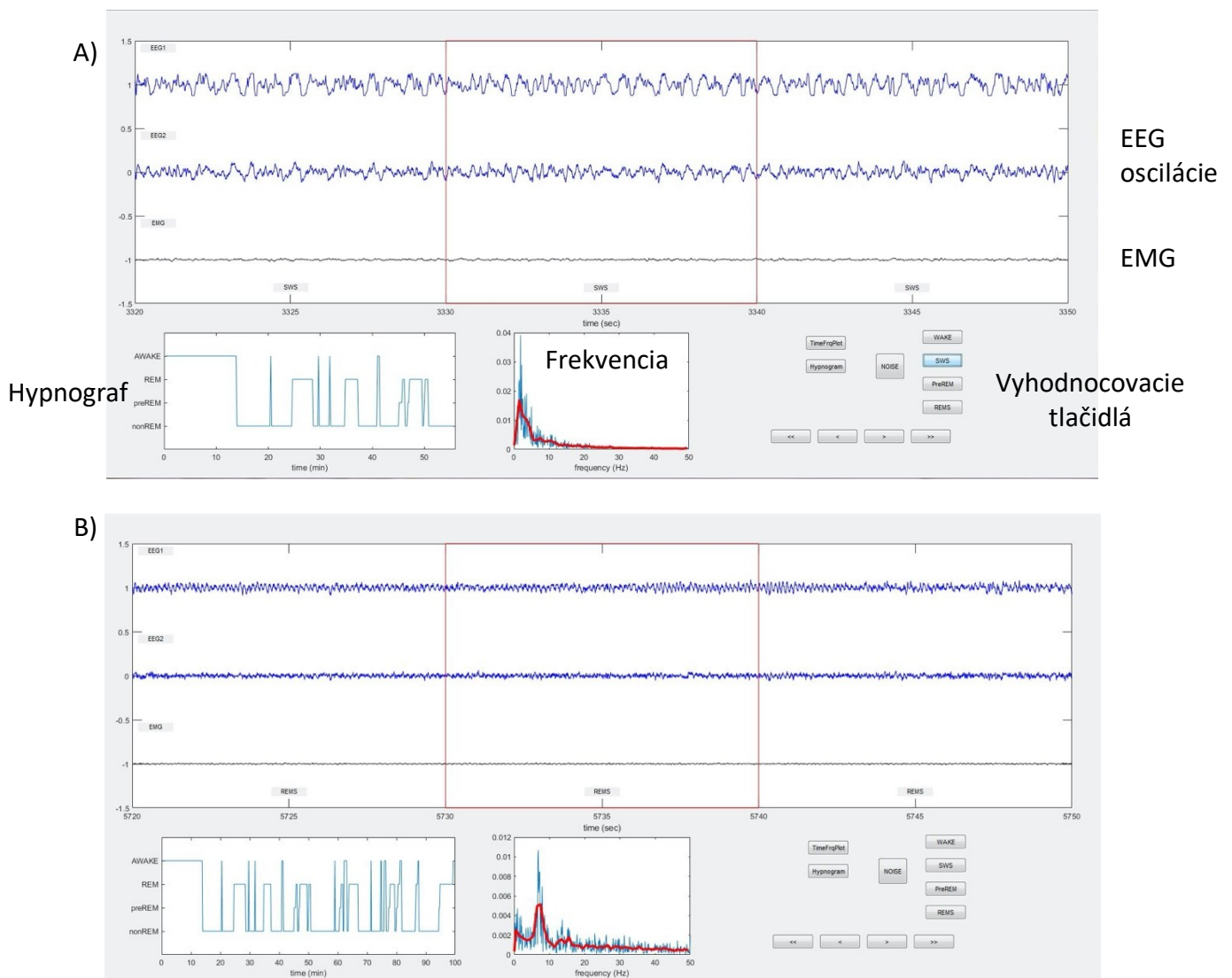
Pre každé implantované zviera sa pred operáciou musel vyrobiť implantát, pomocou ktorého sme mohli následne nahrávať EEG a EMG signál. Implantát sa skladal z konektoru s 18 pinmi. Na 10 pinov bolo plastovými bužírkami odpovedajúcej veľkosti pripevnených 10 nikel-chrómových elektród o priemere 0,075 mm (California Fine Wire Company). Na opačnom konci 4 elektród bola jednotlivou pripájaná skrutka (M1x2), ďalším 4 elektródam boli skrutky pripájané vo dvojiciach (k dvom elektródam bola pripájaná jedna skrutka), posledné dve elektródy boli ohnuté do tvaru očka a zostali odizolované (slúžili pre nahrávanie EMG).

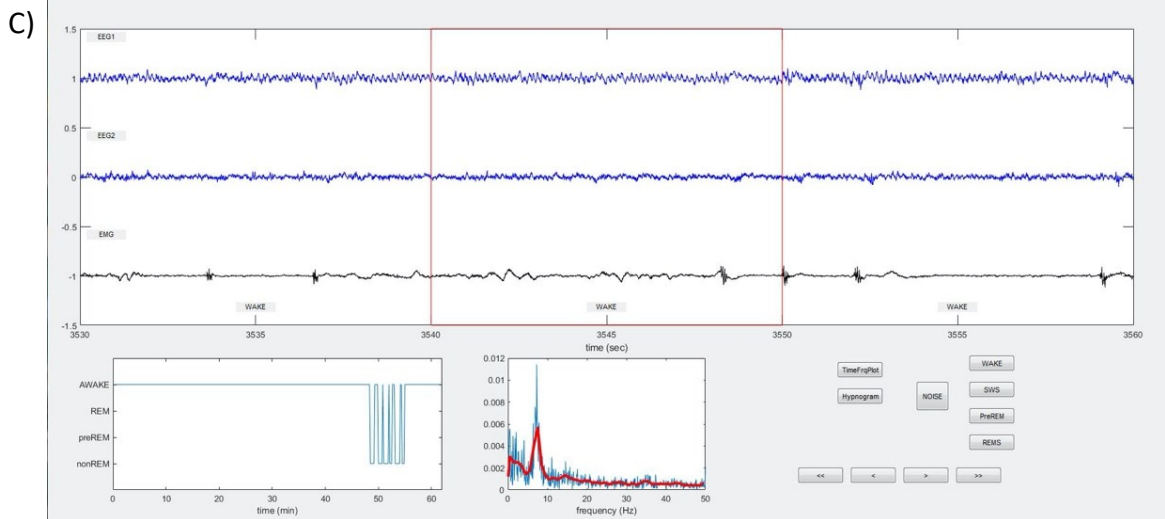


Obrázok č. 12: Implantát s popísanými súčiastkami

3.4.2 NAHRÁVANIE & VYHODNOCOVANIE SIGNÁLU

Behom spánku sme nahrávali EEG a EMG signál pomocou systému Axona Ltd. (St. Albans, UK). Signál sme následne vyhodnocovali v programe MatLab (MathWorks, Natic, MA, USA) pomocou skriptu vytvoreného v našom laboratóriu. Celkový čas nahrávky bol rozdelený na 10 sekundové epochy, ktoré boli vyhodnocované manuálne. Podľa frekvencie EEG a EMG oscilácií boli jednotlivé epochy rozdelené na SWS, pre REM, REM alebo WAKE (bdenie). Výsledky rozdelenia jednotlivých epoch boli na konci sčítané a bol spočítaný celkový čas, ktorý zvieratá strávili v jednotlivých fázach. Pre každú vyhodnotenú nahrávku bol tiež vytvorený hypnogram.





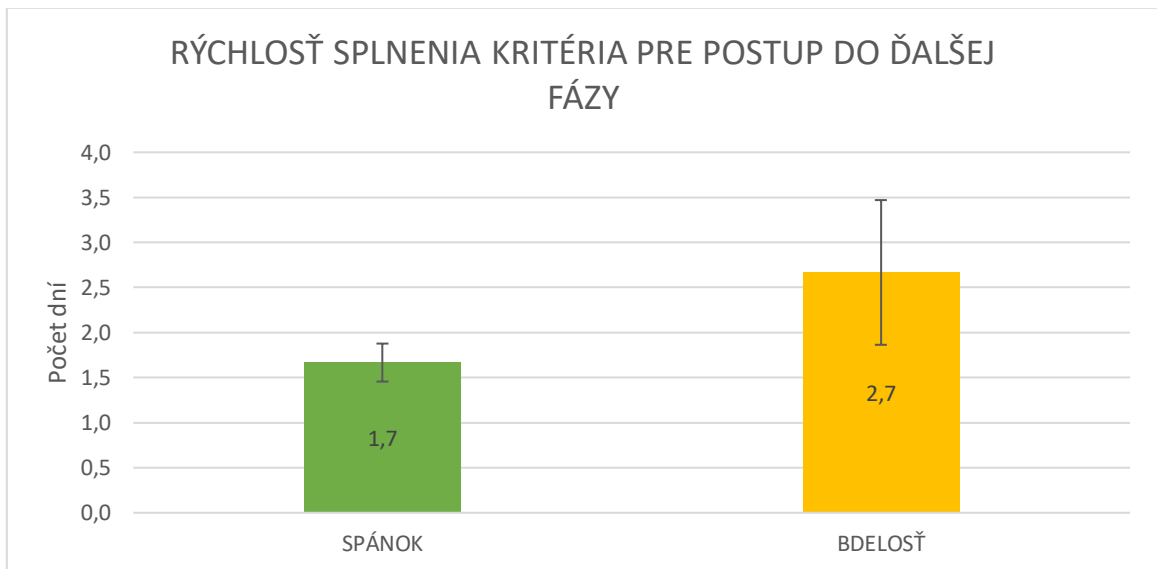
Obrázok č. 13: Vyhodnocovanie animálneho EEG záznamu v programe MatLab -
 A) SWS – vyznačuje sa pomalými EEG vlnami s frekvenciou približne 2 až 4 Hz a ochabnutím svalového tonu zaznamenaného pomocou EMG signálu, B) REM – u animálneho EEG záznamu sa REM fáza vyznačuje pravidelným theta rytmom a ochabnutím svalového tonu, C) Bdelosť – na zázname bdelosť rozlišujeme najmä vďaka nepravidelným EEG osciláciám a nárastom EMG aktivity, ktorá signalizuje pohyb zvieratá

4. VÝSLEDKY

4.1 BEHAVIORÁLNA ČASŤ EXPERIMENTU

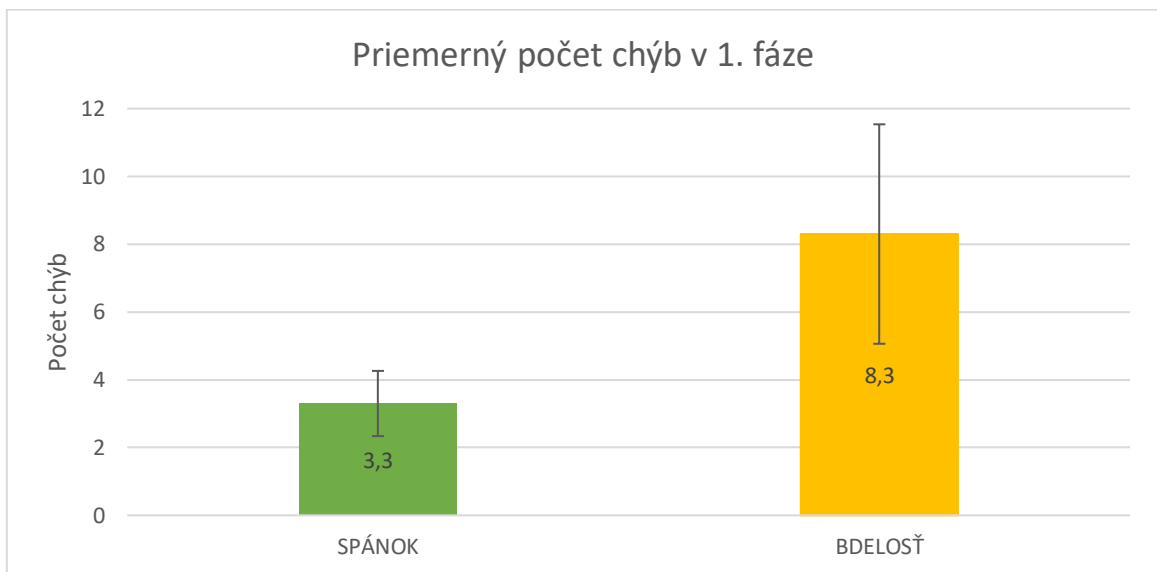
Behaviorálna časť experimentu predstavuje behaviorálnu pamäťovú úlohu, v ktorej sa zvieratá učili v presnom časopriestorovom poradí navštevovať ramená bludiska pre získanie apetitívnej odmeny. Pamäťová úloha bola rozdelená na dve fázy a postup z jednej fázy do druhej, príp. do ukončenia experimentu podliehal splneniu daného kritéria. V behaviorálnej úlohe bolo testovaných celkom 12 zvierat, pričom zvieratá boli náhodne pred samotným začatím experimentu rozdelené do dvoch skupín – 6 zvierat patrilo do spánkovej a 6 zvierat do bdelej skupiny. Všetkým zvieratám so spánkovej skupiny sa podarilo experiment úspešne dokončiť. V skupine bdelosť sme museli v druhej fáze experimentu vylúčiť z testovania jedno zviera, ostatné zvieratá zo skupiny experiment úspešne ukončili. Vo výsledkoch druhej fázy behaviorálnej časti experimentu preto porovnáваме skupinu 6 spánkových a skupinu 5 v bdelosti udržiavaných zvierat.

4.1.1 VÝSLEDKY Z PRVEJ FÁZY BEHAVIORÁLNEJ ČASTI



Graf č. 1: Rýchlosť splnenia kritéria pre postup do nasledujúcej fázy – ukazuje priemerný počet dní v skupine potrebných na splnenie kritéria pre postup do nasledujúcej fázy, chybová úsečka predstavuje strednú chybu priemeru

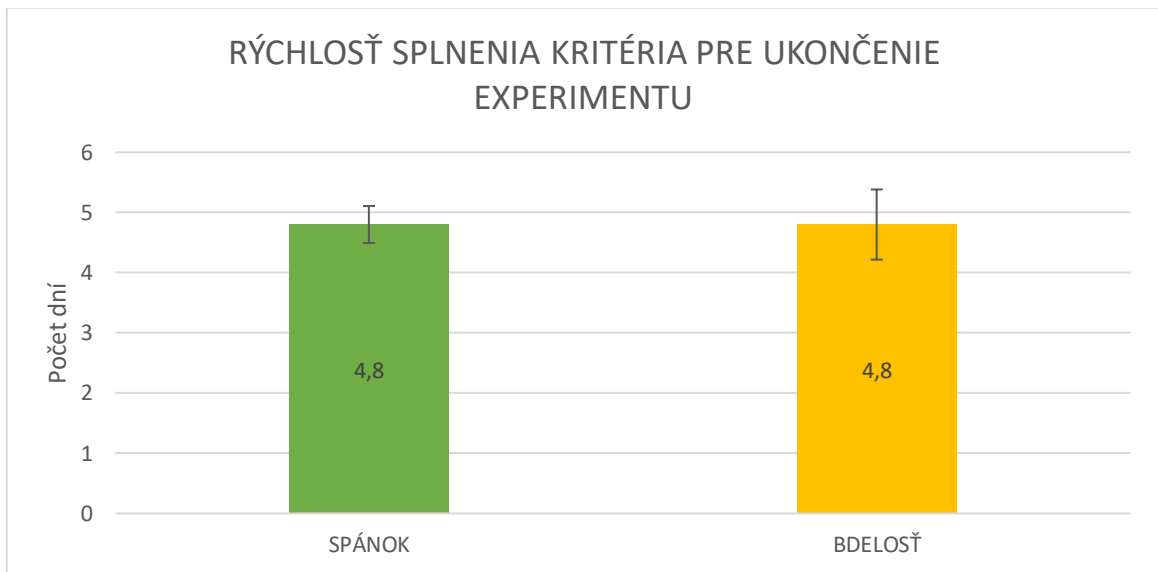
Zvieratá zo spánkovej skupiny potrebovali v priemere na postup do 2. fázy po učiacom dni 1,7 dní, zatiaľ čo zvieratá z bdelej skupiny potrebovali priemerne 2,7 dní. Rozdiel medzi spánkovou ($Mdn = 2$) a bdelou ($Mdn = 2$) skupinou podľa Mann-Whitney U testu nie je signifikantný $U = 14, p = 0,485$.



Graf č. 2: Priemerný počet chýb v 1. fáze – ukazuje priemerný počet chýb v každej skupine v priebehu prvej fázy, chybová úsečka predstavuje strednú chybu priemeru

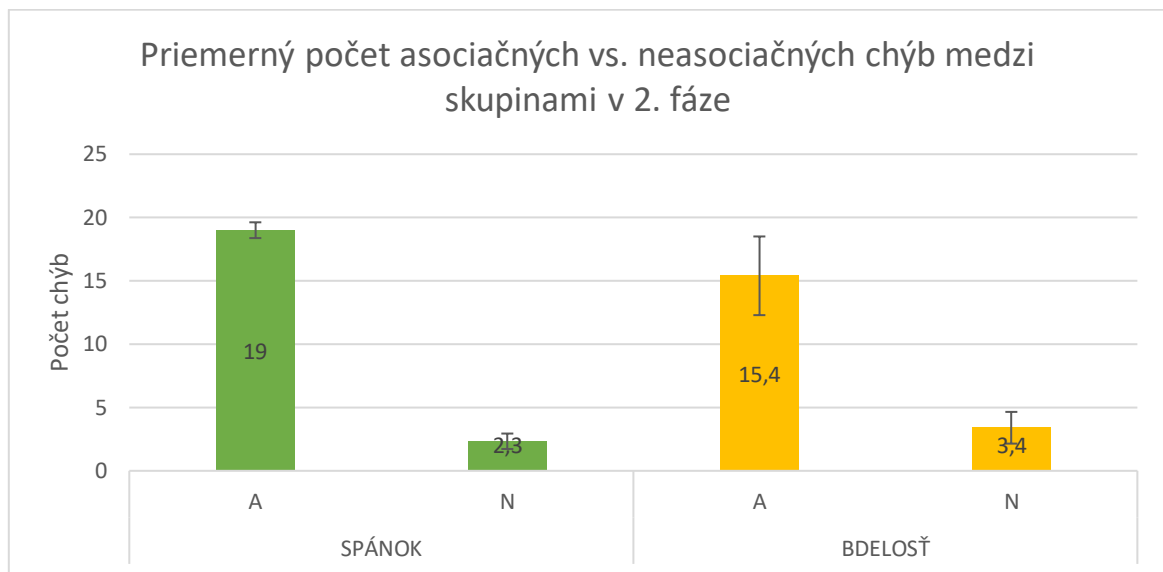
Zvieratá zo spánkovej skupiny urobili v priebehu tréningov 1. fázy priemerne 3,3 chýb. Zvieratá z bdelej skupiny urobili priemerne 8,3 chýb. Rozdiel medzi spánkovou ($Mdn = 3$) a bdelou ($Mdn = 5$) skupinou podľa Mann-Whitney U testu nie je signifikantný $U = 14,5, p = 0,567$.

4.1.2 VÝSLEDKY Z DRUHEJ FÁZY BEHAVIORÁLNEJ ČASTI



Graf č. 3: Rýchlosť splnenia kritéria pre ukončenie experimentu – ukazuje priemerný počet dní v skupine potrebných na splnenie kritéria pre ukončenie experimentu, chybová úsečka predstavuje strednú chybu priemeru

Počas druhej fázy potrebovali zvieratá zo spánkovej skupiny na splnenie kritéria pre ukončenie experimentu v priemere rovnako veľa dní ako zvieratá z bdelej skupiny. Pre jednotnosť výsledkov rozdiel medzi spánkovou ($Mdn = 5$) a bdelou ($Mdn = 5$) skupinou nie je podľa Mann-Whintey U testu signifikantný $U = 14,5, p = 0,485$.



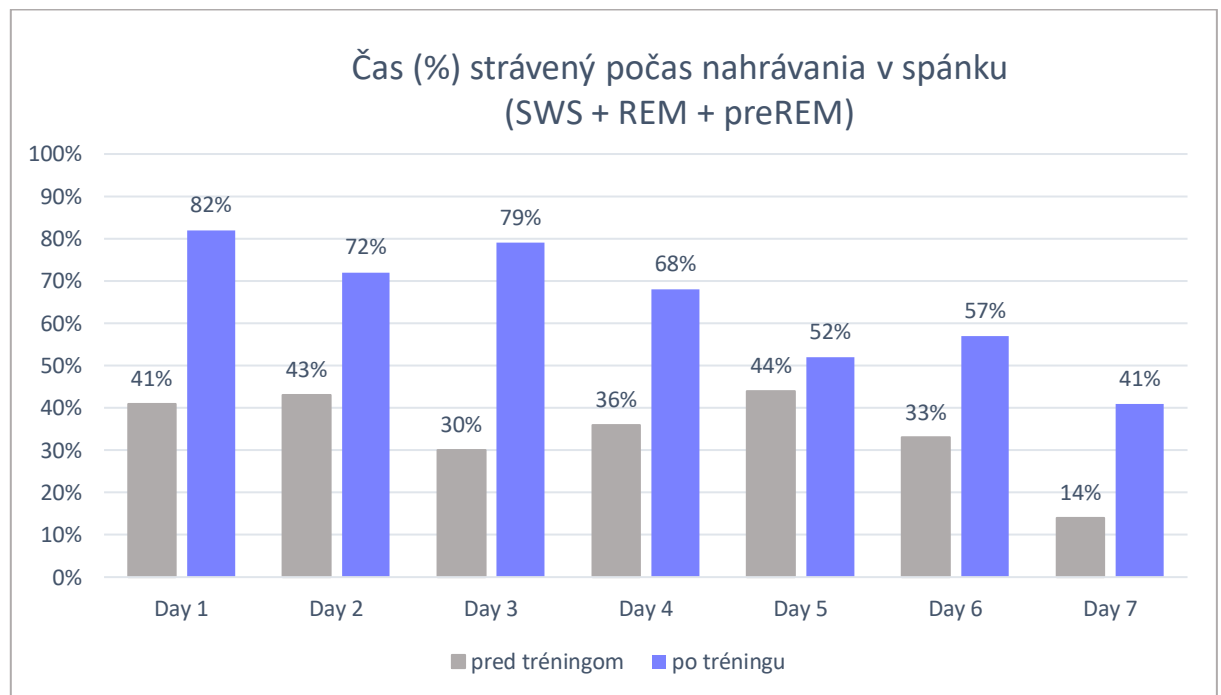
Graf č. 4: Počet asociačných a neasociačných chýb v druhej fáze - ukazuje priemerný počet asociačných a neasociačných chýb v skupine v priebehu druhej fázy, chybová úsečka predstavuje strednú chybu priemeru

V priebehu tréningov druhej fázy zvieratá zo spánkovej skupiny urobili celkovo v priemere 19 asociačných chýb. Zvieratá zo spánkovo deprivovanej skupiny urobili celkovo v priemere 15,4 asociačných chýb. Rozdiel medzi spánkovou ($Mdn = 19,5$) a bdelou ($Mdn = 17$) skupinou podľa Mann-Whitney U testu nie je signifikantný $U = 11$, $p = 0,457$.

Priemerný počet neasociačných chýb bol 2,3 v spánkovej skupine a 3,4 v bdelej skupine. Rozdiel medzi spánkovou ($Mdn = 2,5$) a bdelou ($Mdn = 4$) skupinou nie je podľa Mann-Whitney U testu signifikantný $U = 12$, $p = 0,573$.

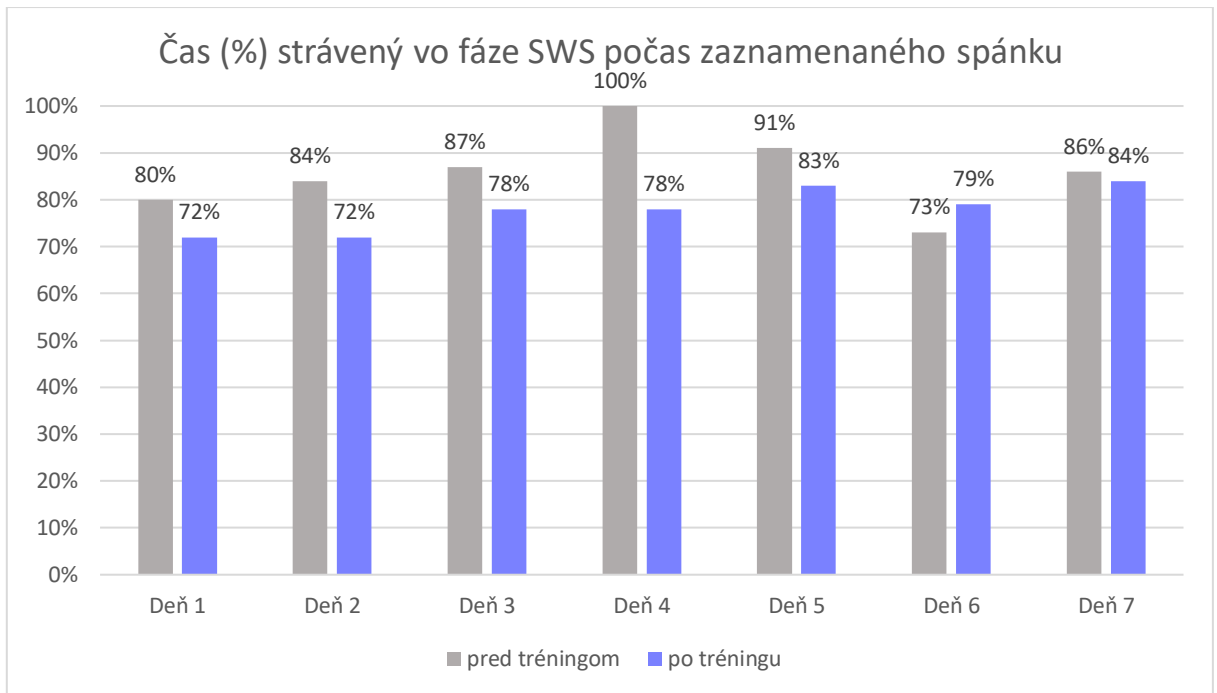
4.2 Analýza EEG

V tomto experimente bola nahrávaná a následne analyzovaná EEG aktivita jedného zvierťa zo spánkovej skupiny vždy dve hodiny pred učením/ tréningom a dve hodiny po učení/ tréningu.



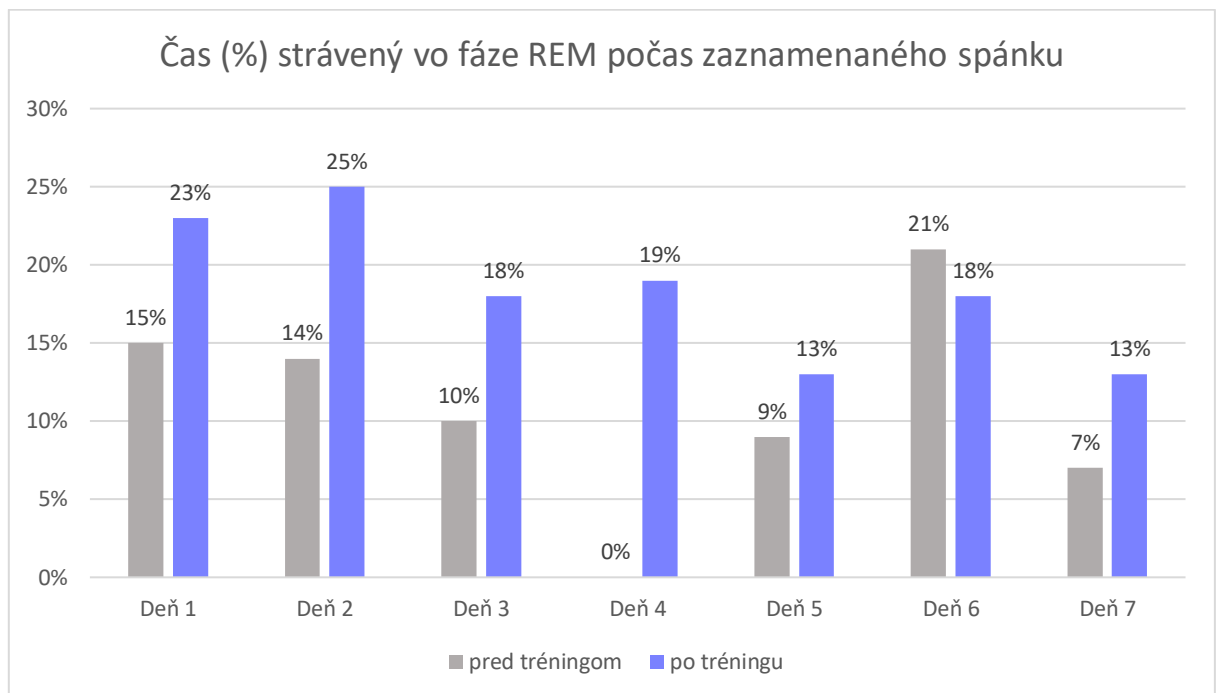
Graf č. 5: Čas (%) strávený počas nahrávania v spánku (SWS + REM + preREM) – ukazuje percentuálny časový údaj o celkovom spánku počas jednotlivých nahrávaní

Vďaka analýze EEG nahrávok vidíme rozdiel v čase strávenom v spánku medzi nahrávaním pred a po učení/ tréningu. Podľa párového T testu je tento rozdiel signifikantný $t_{(6)} = -6,1$, $p = 0,001$.



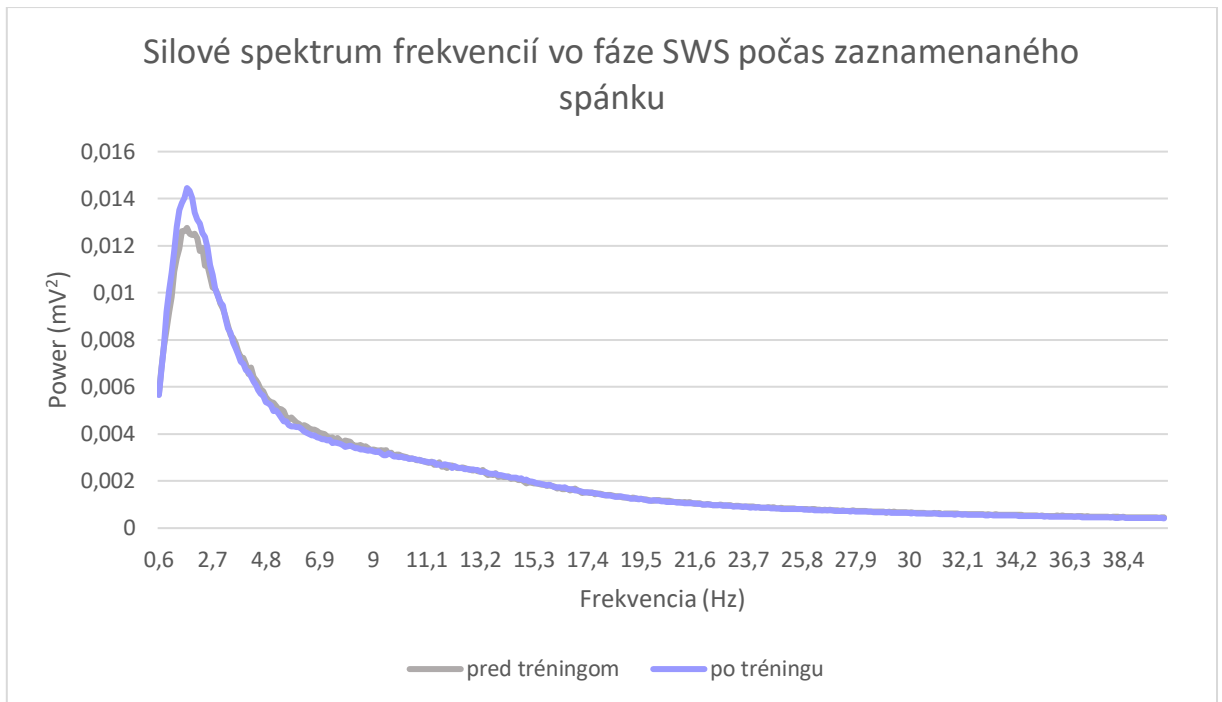
Graf č. 6: Čas (%) strávený vo fáze SWS počas zaznamenaného spánku – ukazuje percentuálny časový údaj o zastúpení SWS počas zaznamenaného celkového spánku v jednotlivých nahrávaníach

Zastúpenie SWS počas zaznamenaného spánku medzi nahrávaním pred a po učení/ tréningu vykazuje jemné rozdiely, ktoré sú podľa párového T testu na hranici signifikantného rozdielu $t_{(6)} = 2,414$, $p = 0,05$.



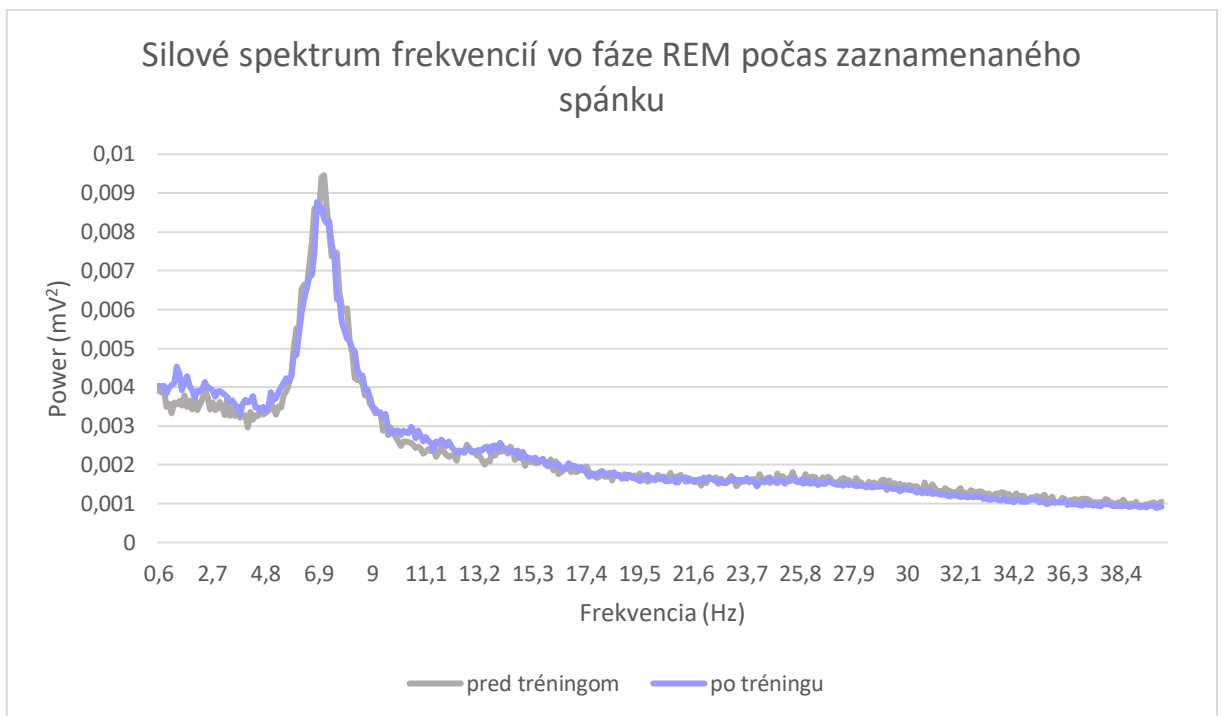
Graf č. 7: Čas (%) strávený vo fáze REM počas zaznamenaného spánku – ukazuje percentuálny časový údaj o zastúpení REM fázy počas zaznamenaného celkového spánku v jednotlivých nahrávaniach

Medzi nahrávami pred a po učením/ tréningu pozorujeme rozdiel v zastúpení REM fázy počas zaznamenaného spánku. Tento rozdiel je podľa párového T testu signifikantný $t(6) = -2,998, p = 0,024$.



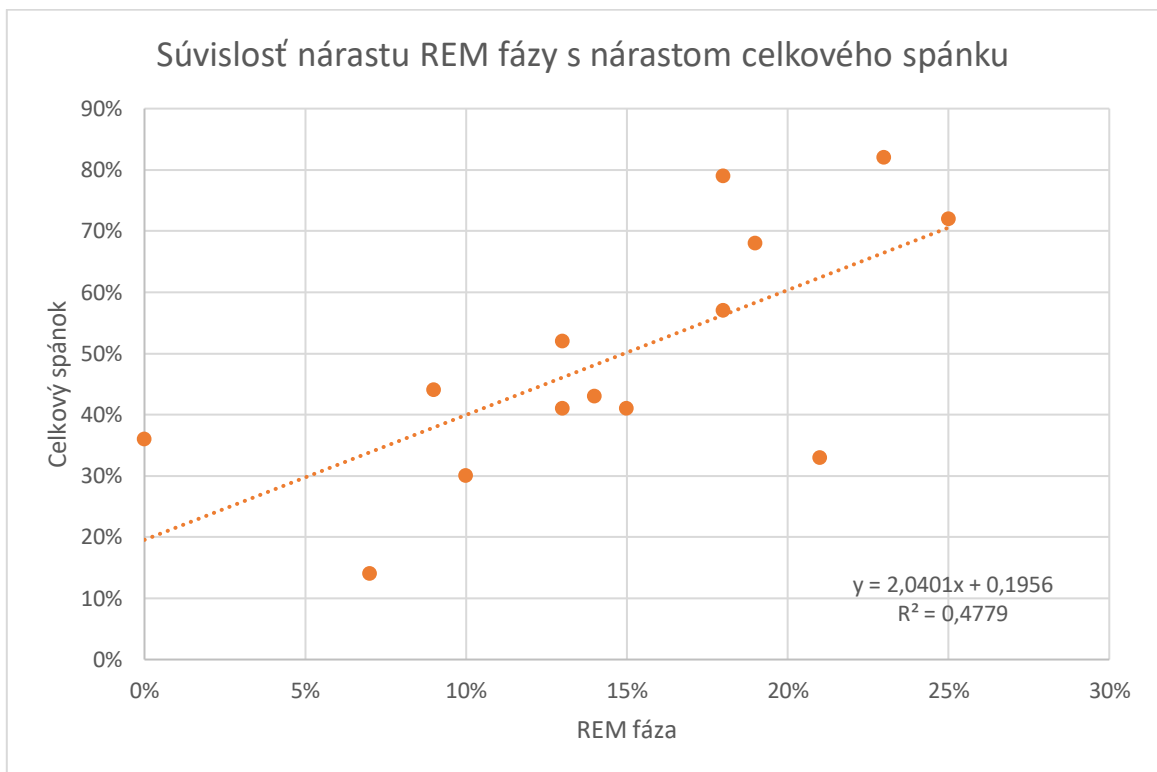
Graf č. 8: Silové spektrum frekvencií vo fáze SWS počas zaznamenaného spánku – ukazuje spracovanie zaznamenaného spánku vo fáze SWS z časovej oblasti do oblasti frekvenčnej pomocou Fourierovej transformácie

Spracovaním signálu pomocou Fourierovej transformácie sme zistili, že počas zaznamenaného spánku pred i po tréningu vo fáze SWS najintenzívnejšie oscilácie kmitali s frekvenciou okolo 2,2 Hz.



Graf č. 8: Silové spektrum frekvencií vo fáze REM počas zaznamenaného spánku – ukazuje spracovanie zaznamenaného spánku vo fáze REM z časovej oblasti do oblasti frekvenčnej pomocou Fourierovej transformácie

Spracovaním signálu pomocou Fourierovej transformácie sme zistili, že počas zaznamenaného spánku pred i po tréningu vo fáze REM najintenzívnejšie oscilácie kmitali s frekvenciou okolo 7,5 Hz.



Graf č. 10: Súvislosť nárastu REM fázy s nárastom celkového spánku – potvrdzuje súvislosť nárastu času stráveného v REM fáze počas zaznamenaného spánku s nárastom času celkového spánku počas nahrávania

5. DISKUSIA

Našou hypotézou bolo, že spánok po učení/ tréningu pozitívne ovplyvňuje konsolidáciu spomienok na udalosti s časopriestorovým kontextom v súhlase s teóriou aktívnej spánkovej konsolidácie. Túto hypotézu sme sa rozhodli overiť na animálnom modeli pomocou experimentu zahŕňajúc časopriestorovú úlohu vytvorenú v našom laboratóriu s následnou manipuláciou spánku po učení/ tréningu experimentálnych zvierat. Rozhodli sme sa preto vytvoriť dve skupiny, ktoré boli rovnako učené a tréňované, avšak ich následný spánkový režim bol ovplyvnený rozdielne. Pozitívny efekt spánku po učení na kontextovú pamäť bol u animálnych modelov potvrdení niekoľkými experimentmi pomocou rôznych metód (Binder et al. 2012; Inostroza, Binder, and Born 2013). U zvierat, ktoré boli po učení/ tréningu udržiavané 2 hodiny v bdlosti sme preto očakávali horšie výsledky v zmysle dlhšieho času potrebného pre konsolidáciu spomienky na časopriestorovú úlohu a teda aj väčšiu chybovosť počas tréningov, v prípade druhej fázy tvorbu najmä neasociatívnych chýb.

Z našich výsledkov môžeme konštatovať, že sme zaznamenali rozdiel v priemernej rýchlosti postupu z prvej do nasledujúcej fázy medzi skupinou spánkových a bdelych zvierat v prospech spánkovej skupiny, čomu odpovedá i v priemere nižší počet chýb počas tréningov v prvej fáze u spánkovej skupiny. Tento rozdiel však podľa štatistického Mann-Whitney U testu nebol signifikantný. Počas druhej fázy bola rýchlosť splnenia kritéria pre ukončenie experimentu v oboch skupinách v priemere rovnaká. Zvieratá v spánkovej skupine robili priemerne viac asociačných chýb oproti zvieratám v bdelej skupine. Neasociačné chyby v priebehu tréningov druhej fázy robili v priemere viac zvieratá zo skupiny spánkovej deprivácie. Tieto rozdiely medzi skupinami však nie sú štatisticky signifikantné a teda vedecky nepotvrdzujú, ale ani nevyvracajú našu hypotézu.

Zaujímavým pozorovaním z nášho pohľadu boli výrazné rozdiely medzi jednotlivcami v skupine bdelych zvierat. Zatiaľ čo niektoré zvieratá v tejto skupine vykazovali pomerne rovnaké výsledky ako zvieratá zo spánkovej skupiny a nezaznamenali sme medzi nimi ani napriek udržiavaniu bdelého stavu po učení sa a tréningoch žiaden významný rozdiel, iné zvieratá vykazovali výrazne zhoršené výsledky v zmysle pomalšieho splnenia kritéria a teda i väčšej chybovosti oproti zvieratám vo

svojej i spánkovej skupine. Naproti tomu zvieratá v spánkovej skupine interne vykazovali relatívne uniformné výsledky v každej časti behaviorálneho experimentu. Kvôli veľmi malej vzorke testovaných jedincov však neprinášame žiadnu hypotézu danej skutočnosti a zostávame len pri jej konštatovaní.

Našu hypotézu sme sa tiež rozhodli otestovať pomocou nahrávania EEG signálu v spánkovej skupine 2 hodiny pred a 2 hodiny po učení/ tréningu. Napriek tomu, že v hypotéze aktívnej spánkovej konsolidácie má spánok pomalých vln nezastupiteľnú úlohu pri prehrávaní hipokampálnych pamäťových stôp kódovaných počas bdlosti, naše očakávania neboli zamerané na vidinu rozdielu v čase strávenom v tejto fáze pred a po učení/ tréningu. Výskyt pomalých oscilácií je totižto pri hodnotení animálnych EEG nahrávok spolu s ochabnutím svalového tonu premietnutého do EMG signálu „vstupnou bránou“ do spánku. Domnievali sme sa, že markantný rozdiel medzi spánkom pred a po učení/ tréningu budeme pozorovať, ak sa zameriame na čas strávený vo fáze REM. REM spánok by mal podľa našej hypotézy súvisieť so zvýšenou aktivitou tzv. plasticity-related immediate-early gene a vďaka vysokej cholinergickej a theta aktivite napomáhať následnej synaptickej konsolidácii pamäti v kortexe (Diekelman a Born, 2010).

Z analýzy EEG nahrávok vyplynulo, že nahrávané zviera strávilo signifikantne viac času spánkom pri nahrávaní po tréningu. Tento efekt mohol byť spôsobený buď zlým načasovaním experimentu v neprospech skúmania spánku pred učením/ tréningom a teda časovým nevyladením experimentu s vrozeným cirkadiánnym rytmom zvieratá, alebo aj prirodzenou únavou spojenou s vykonávaním časopriestorovej úlohy pred spánkom po tréningu.

Zo zaznamenaného spánku počas jednotlivých nahrávaní sme pozorovali rozdiel v čase strávenom vo fáze SWS pred a po tréningu. Tento rozdiel podľa T testu bol na hranici štatistickej signifikantnosti.

Signifikantný rozdiel sme však súhlasne s našou teóriou pozorovali medzi časom stráveným vo fáze REM medzi spánkom zaznamenaným pred a po tréningu. Tento rozdiel sa dá vysvetliť minimálne dvoma možnými spôsobmi. Prvým z nich by bolo, že dlhší čas strávený v tejto fáze súvisí s aktívnou konsolidáciou pamäťovej stopy, čo by podporovalo našu teóriu. Druhým menej príťažlivejším vysvetlením pozorovania nárastu REM fázy v zaznamenanom spánku by bola súvislosť tohto javu s dlhšou dobou trvania celkového spánku pri nahrávaní po učení/ tréningu. Po vytvorení grafu súvislosti

REM fázy a celkového spánku konštatujeme, že ani týmto signifikantným rozdielom nemožno našu hypotézu vedecky potvrdiť, avšak ani vyvrátiť.

Vďaka spracovaniu nahraného signálu pomocou Fourierovej transformácie môžeme s istotou konštatovať, že sa nám zhodne s údajmi popísanými o spánkových EEG osciláciách v literárnom prehľade podarilo nahráť SWS a REM fázu pri nahrávaní pred i po tréningu. Počas SWS kmitali najintenzívnejšie oscilácie s frekvenciou okolo 2,2 Hz. Počas REM spánku sa frekvencia najintenzívnejších oscilácií pohybovala okolo 7,5 Hz.

Namerané dáta zatiaľ neposkytujú presvedčivé výsledky podporujúce teóriu aktívnej spánkovej konsolidácie, či samotného pozitívneho efektu spánku na posilňovanie kontextovej spomienky. Je však vhodné poznamenať, že dáta nepriniesli ani záver opačný. Preto v našom laboratóriu zostáva snaha pokračovať v dizajne tohto experimentu aj po ukončení mojej diplomovej práce a zozbierať dáta z väčšej vzorky experimentálnych zvierat. Experiment pri najmenšom teda priniesol novú metódu, pomocou ktorej možno skúmať kontextovú pamäť u potkanov.

6. ZÁVER

Súčasťou môjho magisterského štúdia neurobiológie bolo aktívne vypracovávanie tejto diplomovej práce, vďaka čomu som sa naučila mnohým praktickým zručnostiam, ktoré sa mi bezpochyby zídu v mojom budúcom kariérnom živote. Od začiatku mojej diplomovej práce bolo hlavným cieľom skúmanie prepojenia spánku a epizodickej pamäti. Tento fenomén fascinuje nielen mňa, ale aj širokú verejnosť a som veľmi rada, že som mohla touto prácou prispieť k jeho postupnému pochopeniu.

Počas štúdia som sa naučila stereotaktické operácie zavedenia vlastnoručne zostrojeného iEEG implantátu a následného nahrávania a vyhodnocovania EEG signálu. V neposlednej rade som tiež nabrala bohaté skúsenosti s animálnymi behaviorálnymi pamäťovými úlohami.

Vyladovaním behaviorálnej časopriestorovej úlohy sa mi s pomocou mojich kolegov podarilo vymyslieť a vyskúšať validnú metódu, pomocou ktorej možno skúmať kontextovú pamäť hlodavcov. Hoci moje výsledky vzhľadom na veľké množstvo inovácií, ktoré viedli ku konečnému vzhľadu experimentu zatiaľ nepriniesli signifikantné výsledky, verím, že táto metóda bude v budúcnosti ďalej používaná a prinesie výskumu spánku a pamäti nové poznatky.

7. REFERENCIE

- Achermann, Peter. 1998. "Temporal Evolution of Coherence and Power in the Human Sleep Electroencephalogram." *Journal of Sleep Research* 7(1):36–41.
- Aserinsky, Eugene, and Nathaniel Kleitman. 1953. "Regularly Occurring Periods of Eye Motility, and Concomitant Phenomena, during Sleep." *Science* 118(3062):273–74.
- Axmacher, Nikolai, Christoph Helmstaedter, Christian E. Elger, and Juergen Fell. 2008. "Enhancement of Neocortical-Medial Temporal EEG Correlations during Non-REM Sleep." *Neural Plasticity* 2008:1–7.
- Baumeister, Jochen, T. Barthel, K. R. Geiss, and M. Weiss. 2008. "Influence of Phosphatidylserine on Cognitive Performance and Cortical Activity after Induced Stress." *Nutritional Neuroscience* 11(3):103–10.
- Bazhenov, Maxim, Igor Timofeev, Mircea Steriade, and Terrence J. Sejnowski. 2002. "Model of Thalamocortical Slow-Wave Sleep Oscillations and Transitions to Activated States." *Journal of Neuroscience* 22(19):8691–8704.
- Behrens, Christoph J., Leander P. Van Den Boom, Livia De Hoz, Alon Friedman, and Uwe Heinemann. 2005. "Induction of Sharp Wave-Ripple Complexes in Vitro and Reorganization of Hippocampal Networks." *Nature Neuroscience* 8(11):1560–67.
- Berger, Hans. 1929. "Über Das Elektrenkephalogramm Des Menschen." *Archiv Für Psychiatrie Und Nervenkrankheiten* 94(1):16–60.
- Bergmann, Til Ole, Matthias Mölle, Lisa Marshall, Leval Kaya-Yildiz, Jan Born, and Hartwig Roman Siebner. 2008. "A Local Signature of LTP- and LTD-like Plasticity in Human NREM Sleep." *European Journal of Neuroscience* 27(9):2241–49.
- Besedovsky, Luciana, Tanja Lange, and Jan Born. 2012. "Sleep and Immune Function." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 463: 121–37.
- Binder, Sonja, Paul Christian Baier, Matthias Mölle, Marion Inostroza, Jan Born, and Lisa Marshall. 2012. "Sleep Enhances Memory Consolidation in the Hippocampus-Dependent Object-Place Recognition Task in Rats." *Neurobiology of Learning and Memory* 97(2):213–19.
- Bliss, T., Lomo, T. 1973. "Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Unanaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path." *The Journal of Physiology* 232(2):357–74.

- Brankačk, Jurij, Mark Stewart, and Steven E. Fox. 1993. "Current Source Density Analysis of the Hippocampal Theta Rhythm: Associated Sustained Potentials and Candidate Synaptic Generators." *Brain Research* 615(2):310–27.
- Buzsáki, György. 2005. "Theta Rhythm of Navigation: Link between Path Integration and Landmark Navigation, Episodic and Semantic Memory." *Hippocampus* 15(7): 827–40.
- Buzsáki, György. 2009. *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, New York.
- Buzsáki, György, and Andreas Draguhn. 2004. "Neuronal Oscillations in Cortical Networks." *Science* 304(5679): 1926–29.
- Buzsáki, György, and Edvard I. Moser. 2013. "Memory, Navigation and Theta Rhythm in the Hippocampal-Entorhinal System." *Nature Neuroscience* 16: 130–138.
- Cantero, Jose L., Mercedes Atienza, Robert Stickgold, Michael J. Kahana, Joseph R. Madsen, and Bernat Kocsis. 2003. "Sleep-Dependent θ Oscillations in the Human Hippocampus and Neocortex." *Journal of Neuroscience* 23(34):10897–903.
- Carr, Margaret F., Shantanu P. Jadhav, and Loren M. Frank. 2011. "Hippocampal Replay in the Awake State: A Potential Substrate for Memory Consolidation and Retrieval." *Nature Neuroscience* 14(2): 147-153.
- Carskadon, Mary A., and William C. Dement. 2010. "Normal Human Sleep: An Overview." *Medical Clinics of North America* 88(3): 551-557.
- Carter, Matt, and Jennifer C. Shieh. 2010. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press, London.
- Cirelli, C., and G. Tononi. 2000. "Differential Expression of Plasticity-Related Genes in Waking and Sleep and Their Regulation by the Noradrenergic System." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20(24):9187–94.
- Clayton, Nicola S., and Anthony Dickinson. 1998. "Episodic-like Memory during Cache Recovery by Scrub Jays." *Nature* 395(6699):272–74.
- Cole, Kenneth S., and Howard J. Curtis. 1939. "Electric Impedance of the Squid Giant Axon during Activity." *Journal of General Physiology* 22(5):649–70.
- Copara, Milagros S., Abdul S. Hassan, Colin T. Kyle, Laura A. Libby, Charan Ranganath, and Arne D. Ekstrom. 2014. "Complementary Roles of Human Hippocampal Subregions during Retrieval of Spatiotemporal Context." *Journal of Neuroscience*

34(20):6834–42.

- Dash, M. B., C. L. Douglas, V. V. Vyazovskiy, C. Cirelli, and G. Tononi. 2009. "Long-Term Homeostasis of Extracellular Glutamate in the Rat Cerebral Cortex across Sleep and Waking States." *Journal of Neuroscience* 29(3):620–29.
- Van Deursen, J. A., E. F. P. M. Vuurman, F. R. J. Verhey, V. H. J. M. Van Kranen-Mastenbroek, and W. J. Riedel. 2008. "Increased EEG Gamma Band Activity in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment." *Journal of Neural Transmission* 115(9):1301–11.
- Diekelmann, Susanne, and Jan Born. 2010. "The Memory Function of Sleep." *Nature Reviews Neuroscience* 11(2):114–26.
- Ebbinghaus H. 1885. "Über das Gedächtnis. Untersuchungen zur experimentellen Psychologie." Duncker und Humboldt, Leipzig.
- Eichenbaum, Howard. 2014. "Time Cells in the Hippocampus: A New Dimension for Mapping Memories." *Nature Reviews Neuroscience* 15(11): 732–44.
- Eldridge, L. L., B. J. Knowlton, C. S. Furmanski, S. Y. Bookheimer, and S. A. Engel. 2000. "Remembering Eposides: A Selective Role for the Hippocampus during Retrieval." *Nature Neuroscience* 3(11):1149–52.
- Feshchenko, Vladimir A., Robert A. Veselis, and Ruth A. Reinsel. 1997. "Comparison of the Eeg Effects of Midazolam, Thiopental, and Propofol: The Role of Underlying Oscillatory Systems." *Neuropsychobiology* 35(4):211–20.
- Fogel, Stuart M., and Carlyle T. Smith. 2011. "The Function of the Sleep Spindle: A Physiological Index of Intelligence and a Mechanism for Sleep-Dependent Memory Consolidation." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(5): 1154–65.
- Foster, Joshua J., David W. Sutterer, John T. Serences, Edward K. Vogel, and Edward Awh. 2017. "Alpha-Band Oscillations Enable Spatially and Temporally Resolved Tracking of Covert Spatial Attention." *Psychological Science* 28(7):929–41.
- Frankland, Paul W., Cátia M. Teixeira, and Szu Han Wang. 2007. "Grading the Gradient: Evidence for Time-Dependent Memory Reorganization in Experimental Animals." *Debates in Neuroscience* 1(2):67–78.
- Gais, Steffen, Brian Lucas, and Jan Born. 2006. "Sleep after Learning Aids Memory Recall." *Learning and Memory* 13(3):259–62.
- Gennaro, Luigi De, and Michele Ferrara. 2003. "Sleep Spindles: An Overview." *Sleep*

- Medicine* 7(800):422–40.
- Girardeau, Gabrielle, Karim Benchenane, Sidney I. Wiener, György Buzsáki, and Michaël B. Zugaro. 2009. "Selective Suppression of Hippocampal Ripples Impairs Spatial Memory." *Nature Neuroscience* 12(10):1222–23.
- Haas, L. F. 2003. "Hans Berger (1873-1941), Richard Caton (1842-1926), and Electroencephalography." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 74(1):7–9.
- Hassabis, D., D. Kumaran, and E. A. Maguire. 2007. "Using Imagination to Understand the Neural Basis of Episodic Memory." *Journal of Neuroscience* 27(52):14365–74.
- Hawsawi, Hassan B., David W. Carmichael, and Louis Lemieux. 2017. "Safety of Simultaneous Scalp or Intracranial EEG during MRI: A Review." *Frontiers in Physics* 1–25.
- Herrmann, Christoph S., Daniel Strüber, Randolph F. Helfrich, and Andreas K. Engel. 2016. "EEG Oscillations: From Correlation to Causality." *International Journal of Psychophysiology* 103:12–21.
- Hober R. 1905. "Über den Einfluss der Salze auf den Ruhestorm des Froschmuslkels." *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* 106:599-635.
- Hughes, John R. 2008. "Gamma, Fast, and Ultrafast Waves of the Brain: Their Relationships with Epilepsy and Behavior." *Epilepsy and Behavior* 13(1): 25–31.
- Hyman, James M., Bradley P. Wyble, Vikas Goyal, Christina A. Rossi, and Michael E. Hasselmo. 2003. "Stimulation in Hippocampal Region CA1 in Behaving Rats Yields Long-Term Potentiation When Delivered to the Peak of Theta and Long-Term Depression When Delivered to the Trough." *Journal of Neuroscience* 23(37):11725–31.
- Inostroza, Marion, Sonja Binder, and Jan Born. 2013. "Sleep-Dependency of Episodic-like Memory Consolidation in Rats." *Behavioural Brain Research* 237:15–22.
- Inostroza, Marion, and Jan Born. 2013. "Sleep for Preserving and Transforming Episodic Memory." *Annual Review of Neuroscience* 36(1):79–102.
- Jadhav, Shantanu P., Caleb Kemere, P. Walter German, and Loren M. Frank. 2012. "Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripples Support Spatial Memory." *Science* 336(6087):1454–58.
- Josselyn, Sheena A., Stefan Köhler, and Paul W. Frankland. 2015. "Finding the

- Engram." *Nature Reviews Neuroscience* 16(9): 521–34.
- Kahn, Michal, Gal Sheppes, and Avi Sadeh. 2013. "Sleep and Emotions: Bidirectional Links and Underlying Mechanisms." *International Journal of Psychophysiology* 89(2): 218–228.
- King, Charles, Darrell A. Henze, Xavier Leinekugel, and György Buzsáki. 1999. "Hebbian Modification of a Hippocampal Population Pattern in the Rat." *Journal of Physiology* 521(1):159–67.
- Kraus, Benjamin J., Robert J. Robinson, John A. White, Howard Eichenbaum, and Michael E. Hasselmo. 2013. "Hippocampal 'Time Cells': Time versus Path Integration." *Neuron* 78(6):1090–1101.
- Lee, Jungryun, Daesoo Kim, and Hee Sup Shin. 2004. "Lack of Delta Waves and Sleep Disturbances during Non-Rapid Eye Movement Sleep in Mice Lacking A1G-Subunit of T-Type Calcium Channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(52):18195–99.
- Van Lier, Hester, Wilhelmus H. I. M. Drinkenburg, Yvonne J. W. Van Eeten, and Anton M. L. Coenen. 2004. "Effects of Diazepam and Zolpidem on EEG Beta Frequencies Are Behavior-Specific in Rats." *Neuropharmacology* 47(2):163–74.
- Lutz, Antoine, Lawrence L. Greischar, Nancy B. Rawlings, Matthieu Ricard, and Richard J. Davidson. 2004. "Long-Term Meditators Self-Induce High-Amplitude Gamma Synchrony during Mental Practice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(46):69–73.
- MacDonald, Christopher J., Kyle Q. Lepage, Uri T. Eden, and Howard Eichenbaum. 2011. "Hippocampal 'Time Cells' Bridge the Gap in Memory for Discontiguous Events." *Neuron* 71(4):737–49.
- Maguire, Eleanor A. 2001. "The Retrosplenial Contribution to Human Navigation: A Review of Lesion and Neuroimaging Findings." *Scandinavian Journal of Psychology* 42(3):225–38.
- Maquet, Pierre, Christian Degueldre, Guy Delfiore, Joël Aerts, Jean Marie Péters, André Luxen, and Georges Franck. 1997. "Functional Neuroanatomy of Human Slow Wave Sleep." *Journal of Neuroscience* 17(8):2807–12.
- Marshall, Lisa, and Jan Born. 2007. "The Contribution of Sleep to Hippocampus-Dependent Memory Consolidation." *Trends in Cognitive Sciences* 11(10):442–50.

- Marshall, Lisa, Roumen Kirov, Julian Brade, Matthias Mölle, and Jan Born. 2011. "Transcranial Electrical Currents to Probe EEG Brain Rhythms and Memory Consolidation during Sleep in Humans." *PLoS ONE* 6(2):1–10.
- McDermott, Barry, Emily Porter, Diarmaid Hughes, Brian McGinley, Mark Lang, Martin O'Halloran, and Marggie Jones. 2018. "Gamma Band Neural Stimulation in Humans and the Promise of a New Modality to Prevent and Treat Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 65(2):363–92.
- Milner, Brenda, and William Scoville. 1957. "Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesion." *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 20(3):11–21.
- Möller, Matthias, Til O. Bergmann, Lisa Marshall, and Jan Born. 2011. "Fast and Slow Spindles during the Sleep Slow Oscillation: Disparate Coalescence and Engagement in Memory Processing." *Sleep* 34(10):1411–21.
- Möller, Matthias, and Jan Born. 2011. "Slow Oscillations Orchestrating Fast Oscillations and Memory Consolidation." *Progress in Brain Research* 193: 93-110.
- Muller, Robert. 1996. "A Quarter of a Century of Place Cells." *Neuron* 17(5): 813–22.
- Nadel, Lynn, and Morris Moscovitch. 1997. "Memory Consolidation, Retrograde Amnesia and the Hippocampal Complex." *Current Opinion in Neurobiology* 7(2):217–27.
- Nédélec, Mathieu, Shona Halson, Abd Elbasset Abaidia, Said Ahmaidi, and Gregory Dupont. 2015. "Stress, Sleep and Recovery in Elite Soccer: A Critical Review of the Literature." *Sports Medicine* 45(10): 1387–1400.
- O'Keefe, John, and Lynn Nadel. 1979. "The Hippocampus as a Cognitive Map." *Behavioral and Brain Sciences* 2(4):487–94.
- Pace-Schott, Edward F., and J. Allan Hobson. 2002. "The Neurobiology of Sleep: Genetics, Cellular Physiology and Subcortical Networks." *Nature Reviews Neuroscience* 3(8):591–605.
- Pastalkova, Eva, Vladimir Itskov, Asohan Amarasingham, and György Buzsáki. 2008. "Internally Generated Cell Assembly Sequences in the Rat Hippocampus." *Science* 321(5894):1322–27.
- Plihal, Werner, and Jan Born. 1997. "Effects of Early and Late Nocturnal Sleep on Declarative and Procedural Memory." *Journal of Cognitive Neuroscience*

- 9(4):534–74.
- Robertson, Edwin M. 2009. “From Creation to Consolidation: A Novel Framework for Memory Processing.” *PLoS Biology* 7(1): 11–19.
- Rosanova, M., and D. Ulrich. 2005. “Pattern-Specific Associative Long-Term Potentiation Induced by a Sleep Spindle-Related Spike Train.” *Journal of Neuroscience* 25(41):9398–9405.
- Rugg, M. D., L. J. Otten, and R. N. A. Henson. 2002. “The Neural Basis of Episodic Memory: Evidence from Functional Neuroimaging.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357(1424):1097–1110.
- Russell, W. Ritchie, and P. W. Nathan. 1946. “Traumatic Amnesia.” *Brain* 69(4):280–300.
- Sejnowski, Terrence J., and Alain Destexhe. 2000. “Why Do We Sleep?” *Brain Research* 886(2):208–23.
- Skou, Jens Christian, and Mikael Esmann. 1992. “The Na,K-ATPase.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24(3):249–61.
- Squire, Larry R., and Pablo Alvarez. 1995. “Retrograde Amnesia and Memory Consolidation: A Neurobiological Perspective.” *Current Opinion in Neurobiology* 5(2):169–77.
- Steinvorth, Sarah, Brian Levine, and Suzanne Corkin. 2005. “Medial Temporal Lobe Structures Are Needed to Re-Experience Remote Autobiographical Memories: Evidence from H.M. and W.R.” *Neuropsychologia* 43(4):479–96.
- Tononi, Giutio. 2000. “Correlates of Sleep and Waking in *Drosophila Melanogaster*.” *Science* 287(5459):1834–37.
- Tulving, Endel. 1972. “Episodic and Semantic Memory.” *Organization of Memory* 1:381–403.
- Tulving, Endel. 2002. “EPISODIC MEMORY : From Mind to Brain.” *Annual Review of Psychology* 53(1):1–25.
- Vanderwolf, C. H. 1969. “Hippocampal Electrical Activity and Voluntary Movement in the Rat.” *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 26(4):407–18.
- Vyazovskiy, Vladyslav V., Chiara Cirelli, Martha Pfister-Genskow, Ugo Faraguna, and Giulio Tononi. 2008. “Molecular and Electrophysiological Evidence for Net Synaptic Potentiation in Wake and Depression in Sleep.” *Nature Neuroscience*

11(2):200–208.

Whishaw, I. Q., and C. H. Vanderwolf. 1973. "Hippocampal EEG and Behavior: Change in Amplitude and Frequency of RSA (Theta Rhythm) Associated with Spontaneous and Learned Movement Patterns in Rats and Cats." *Behavioral Biology* 8(4):461–84.

Ylinen, Aarne, Anatol Bragin, Zoltán Nádasdy, Gábor Jandó, Imre Szabó, Attila Sik, and György Buzsáki. 1995. "Sharp Wave-Associated High-Frequency Oscillation (200 Hz) in the Intact Hippocampus: Network and Intracellular Mechanisms." *Journal of Neuroscience* 15(1):30–46.