

Nirooshitha Ganesaratnam

Medicine with Industrial Specialisation

Profile: Translational Medicine

Aalborg University

In collaboration with Centre for
Psychiatric Research

1st of June 2012



MASTER THESIS:
**CIRCADIAN RHYTHMS OF CORTISOL AND
MELATONIN IN YOUNG ADULTS WITH DIFFERENT
CHRONOTYPES - A PILOT STUDY**

Aalborg University

Institute of Health Science and Technology, Fredrik Bajers Vej 7D, DK-9220 Aalborg East

Master thesis: Circadian Rhythms of Cortisol and Melatonin in Young Adults with Different Chronotypes – a Pilot Study

Nirooshitha Ganesaratnam
10th semester
Medicine with Industrial Specialisation
Aalborg University
1st of June 2012

Supervisors:
Jacek Lichota, ph.D, Associate professor, Aalborg University
Mahmoud Ashkanian, MD, BSc (Biomed Eng), PhD, Aarhus University Hospital

Numbers Printed: 4

Pages: 127

Appendices: A-E

Date

Nirooshitha Ganesaratnam

Preface

This master thesis: “Circadian Rhythms of Cortisol and Melatonin in Young Adults with Different Chronotypes – a Pilot Study” is written by Nirooshitha Gansarathnam, student at Aalborg University.

The project is based on clinical experimental work performed at Centre for Psychiatric Research in Risskov under the supervision of Jacek Lichota and Mahmoud Ashkanian. The project period lasted from September 2011 till June 2012. The project has been approved by the Ethics Committee of Middle Jutland and The Danish Data Protection Agency. Approvals and funding have been given to this project under the Danish working title: “Søvnarkitektur og perifere biomarkører for depression”

The report is constructed as an article, and uses the Harvard-method for referencing. The first section is an introduction giving the reader an overview of studies relevant to the project. The following sections include materials and methods, results and discussion, which leads to a general conclusion of the report. Appendix A contains a list of materials. Appendix B and C contains the study protocol and approval letters. Appendix C and D contains actograms and raw data, respectively.

The knowledge acquired during the project was primarily from scientific articles of high validity found on databases such as PubMed. Keywords used during the literature search were: Circadian rhythms, circadian rhythm disorders, sleep disorders, depression, melatonin, cortisol and morningness-eveningness.

Acknowledgement

The project is funded by Fonden for lægevidenskabens fremme, Overlæge dr.med. Poul M. Færgemans Legat and Center for Psychiatric Research.

I would like to thank my supervisor at Aalborg University Jacek Lichta. I would also like to thank my external supervisor Mahmoud Ashkanian for great support.

A special thanks to Elisabeth Tehrani and Ove Wiborg for initiating the project with my external supervisor. Thanks to my colleagues at Center for Psychiatric Research.

Thanks to the doctors who helped me place venflons in the arm of the test subjects, when I could not do it myself.

Lastly, a very special thanks to ph.D student Anne Virring Sørensen for her optimism and for always being there when I need it the most!

Table of Contents

Preface	4
Abstract	8
1 Introduction	9
1.1 Circadian Rhythms.....	9
1.2 Circadian Rhythm Disturbances.....	10
1.2.1 Lesions to the SCN.....	10
1.2.2 Depression – a Circadian Rhythm Disorder.....	11
1.3 Chronotypes	14
2 Aim of The Study.....	15
3 Methods	16
3.1 Materials.....	16
3.2 Participants	16
3.3 Study Protocol	16
1.1.1 First Study Session.....	16
1.1.2 Second Study Session.....	16
3.4 Analysis of Blood Samples.....	17
3.5 Analysis of Saliva samples	17
3.6 Data Analysis.....	17
3.6.1 Sleep Analysis.....	17
3.6.2 Plasma Cortisol, Plasma Melatonin, and Salivary Cortisol	18
4 Results.....	19
4.1 Sleep Analysis	19
4.2 Plasma Cortisol Concentrations	20
4.2.1 Subjects with Morning Types Profiles.....	20
Subjects with Intermediate Type Profiles.....	21
4.2.2 Mean Plasma Cortisol Levels of Subjects with Morning and Intermediate Type Profiles	23
4.3 Salivary Cortisol Concentrations.....	25
4.4 Plasma Cortisol Versus Saliva Cortisol.....	27
4.5 Plasma Melatonin Concentrations.....	28
4.5.1 Subjects with Morning Type Profiles	28
Subjects with Intermediate Type Profiles	30
4.5.2 Mean Plasma Melatonin Levels of Subjects with Morning and Intermediate Type Profiles	31
5 Discussion.....	33
5.1 The Clinical Setup	33
5.2 Sleep Analysis	33
5.3 Hormone Concentrations	33
5.3.1 Plasma Cortisol.....	33
5.3.2 Salivary Cortisol.....	34
5.3.3 Plasma Melatonin	35
5.3.4 What Could Have Been Expected?.....	35
6 Conclusion	36
7 References	37

Appendix A: Materials.....	43
Appendix B: Study Protocol.....	45
Appendix C: Approval Letters	81
Appendix D: Actograms	91
Appendix E: Raw Data.....	99

Abstract

Introduction: Circadian rhythms are biochemical, physiological or behavioural processes expressed in a temporal manner of approximately 24 hours. For the circadian system to function properly it must be entrained every 24 hours by exogenous time cues, also known as zeitgebers. Light is the major zeitgeber, which entrains the master clock. The central pacemaker is located in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. It generates and regulates the circadian rhythms. Other biological clocks are located throughout the entire body and these are all entrained by the SCN. Thereby, changes to the central pacemaker can be traced in the peripheral tissues. Disturbances of the rhythms are for instance found in sleep disorders and depression. The disturbances might be expressed by altered sleeping patterns, dysregulation of hormones like cortisol and melatonin, changes in body temperature etc.

Aim: The aim of this study is to investigate whether difference in sleeping patterns, also referred to as chronotypes, have different expression of melatonin and cortisol.

Method: 12 healthy volunteers were recruited for this study. The subjects were divided into two groups according to their chronotypes; morning or intermediate chronotypes. The chronotypes were defined, based on a questionnaire by Horne and Östberg. The study was divided into two different sessions; A pre-laboratory session where the subjects were asked to wear an actigraph for 5 consecutive days to validate their sleeping patterns; And a laboratory session where the subjects were admitted at the hospital. Each hour a blood sample was taken and in the morning saliva samples were taken. Plasma melatonin, plasma cortisol, and salivary cortisol concentrations were quantified by ELISA.

Results: No significant difference in the circadian rhythms of cortisol and melatonin were observed between the two groups of chronotypes. However, an amplitude reduction and phase delay in the circadian rhythm of melatonin was observed in the intermediate type profile group compared to the morning type profile group.

Conclusion: Further study with larger sample size is needed to investigate whether an actual difference between the chronotypes exist and whether one chronotype is more prone to develop depression than the other.

1 Introduction

1.1 Circadian Rhythms

In living organisms, circadian rhythms are biochemical, physiological or behavioural processes expressed in a temporal manner of approximately 24 hours. The sleep/wake cycle, cardiovascular activity, body temperature, hormonal regulations, metabolic functions, and gene expressions are all examples of rhythms that are assigned in a time specific circadian rhythm. (Schulz & Steimer 2009). In a free-running state, where humans are placed in a temporal isolation, the cycles of sleep-wake behaviour still exists. However, the length of the period deviates from 24 hours. Endogenous biological clocks or pacemakers are responsible for the free-running rhythms. However, for the circadian system to function properly it must be entrained every 24 hours by exogenous time cues, also known as zeitgebers.

Figure 1 illustrates the entrainment of circadian rhythms to the zeitgeber light and the circadian rhythms in temporal isolation. The generation of endogenous pacemakers and entrainment by the environment are two fundamental properties of the circadian system (Moore 1997; Golombek 2010).

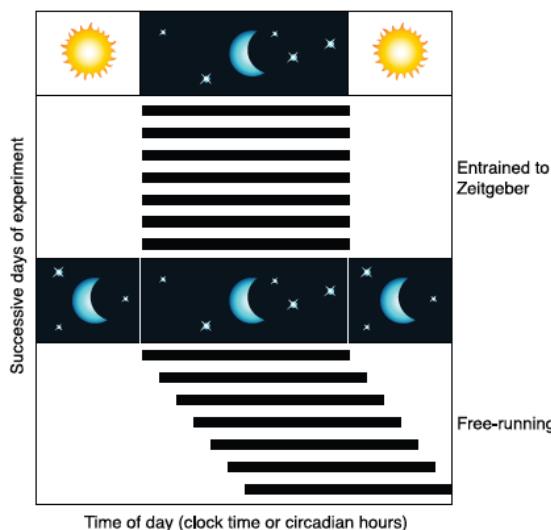


Figure 1: An experimental setup for the study of circadian rhythms. In the presence of a zeitgeber, the biological clock adjusts its period and phase to the environmental cycle. In a free-running state, like constant darkness, the biological clock resumes with its endogenous cycle which differs from 24 hours (Golombek 2010).

The master circadian pacemaker is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the anterior part of the hypothalamus above the optic chiasm. Other clocks are located in the peripheral tissue and these clocks are synchronised with the circadian rhythms generated in the SCN. Thereby changes in circadian rhythms can be traced in peripheral tissue (Schulz & Steimer 2009).

The endogenous clock is predominantly entrained by the light, which serves as the primary circadian zeitgeber. Specialised retinal ganglion cells receive photic information and convey this information to the SCN via the retinohypothalamic tract. Thereby the light-dark cycle entrains the circadian rhythms. From the SCN, major efferent projections are to the hypothalamus with limited projections to the basal forebrain and the thalamus, see Figure 2. From the minor primary projection areas; the basal forebrain and the thalamus, information is conveyed to the neocortex, hippocampus, limbic system, and basal ganglia which controls a variety of higher functions. From the hypothalamus, information projects to the anterior

pituitary gland which regulates a number of endocrine functions; other areas of the hypothalamus and the reticular formation of the brainstem which regulate physiological functions as body temperature, autonomic regulation metabolism and sleep-wake cycle; lastly projections from the hypothalamus to the pineal gland regulates the secretion of melatonin (Moore 1997).

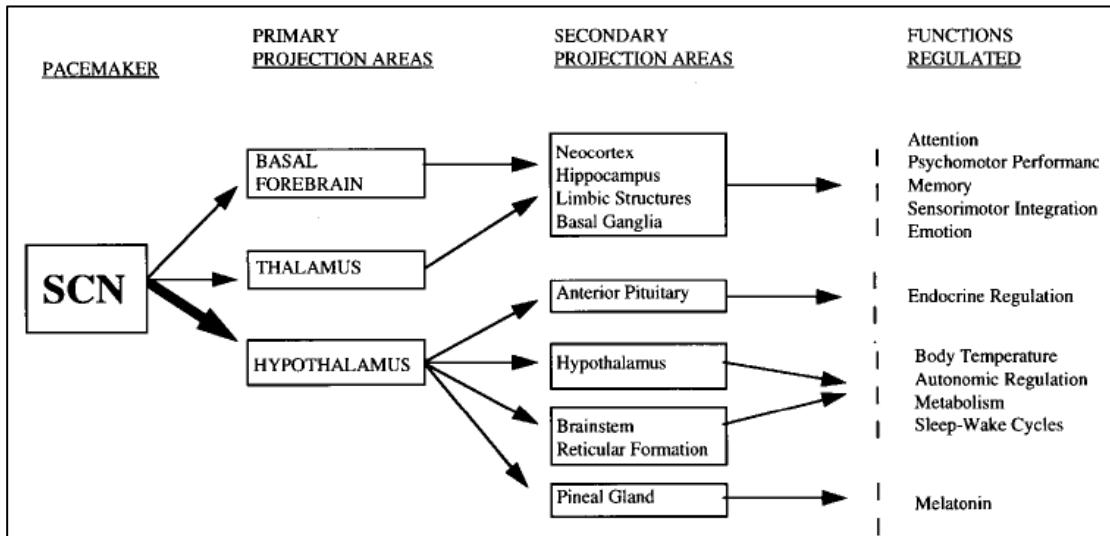


Figure 2: Schematic drawing of the efferent SCN projections. The SCN regulates numerous functions through information projected to different areas of the brain (Moore 1997).

On a molecular level the endogenous clock generated and regulated by genes known as clock genes (Schulz & Steimer 2009). Through autoregulatory transcriptional and translational feedback loops, four genes have been proposed to play the most important role in molecular circadian system. These genes are the period genes (PER), the cryptochrome genes (CRY), the brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like factor 1 gene (BMAL1), and the circadian locomotor output cycle kaput gene (CLOCK). Polymorphisms and/or mutations in these genes can result in circadian rhythm disturbances and are therefore proposed to play a role in psychiatric disorders (Albrecht 2010; Boivin 2000; Barnard & Nolan 2008).

1.2 Circadian Rhythm Disturbances

The functions regulated by the SCN are also parameters, which are often used to examine the circadian rhythms. Many circadian rhythm studies use the sleep/wake cycle, melatonin, cortisol, body temperature, gene expression etc. to investigate circadian rhythms disturbances (Archer et al. 2008; Souêtre et al. 1989; Bailey & Heitkemper 2001). However, to obtain a better understanding of the important role the SCN plays in generating and regulating the circadian rhythms, numerous studies have been performed in animals.

1.2.1 Lesions to the SCN

In a study from 2006 performed by Guo et al., a group of hamsters were used in an experiment to investigate the connection between the central pacemaker of SCN and peripheral clocks. In seven different organs, the free-running rhythms of clock genes were explored after either 3 days or 11 weeks under a controlled condition. Ablation of the SCN resulted in eliminated circadian rhythms of clock gene expression in several organs. However,

transplantation of the SCN restores the circadian rhythms in some of the organs (Guo et al. 2006).

In another study performed by Reppert et al. from 1981, monkeys were exposed to either partial or full SCN lesion. The concentration of two hormones, melatonin and cortisol, were used as markers for the circadian rhythms. These hormones were determined from the cerebrospinal fluid. The study showed that the monkeys with full SCN lesion expressed different melatonin pattern compared to the control group. No clear pattern of melatonin could be established and the concentration of melatonin had different peaks and nadir within the group. The monkeys with partial SCN lesions were found to have a similar daily rhythm as the control monkeys, which had elevated melatonin concentrations during dark periods. However, the circadian rhythm was not rigidly controlled by the light/dark cycle, which could be seen by the elevating melatonin concentrations the first four hours into the light cycle. Furthermore, for both the lesioned groups constant light did not suppress the secretion of melatonin. No major differences were observed in the cortisol concentrations of the SCN lesioned monkeys compared to the controls (Perlow et al. 1981).

In a different study from 1983 conducted by Tobler et al., male rats were used to investigate the sleeping pattern after SCN lesion. Sleeping patterns were examined by electroencephalography. The study showed that the lesion resulted in either complete or extensive disruption of the circadian rhythm (Tobler et al. 1983). This was confirmed by another group of researchers. In 1993, Edgar et al. conducted a study on squirrel monkeys to investigate the circadian sleep-wake patterns after SCN lesion. Lesioned monkeys had a different sleep architecture compared to controls. They had eliminated sleep-wake cycle and sleep stages. Furthermore, the total sleep period were increased (Edgar & Dement 1993).

These studies confirm the fact that the SCN plays a major role in generating and regulating the circadian rhythms. However, circadian rhythm disorder is not synonymous with SCN lesions. A dysregulation of the endogenous pacemaker is expressed in numerous disorders. Depression is just one disease, which has been extensively studied.

1.2.2 Depression – a Circadian Rhythm Disorder

The Danish Mental Health Fund estimates that around 200,000 Danish people at this moment in time suffer from depression and that 15% of the population at some point in their lives will have a depression. The fact that 70% of the depressed patients have recurrent episodes makes depression an extensively studied disorder. Depression is a heterogenous disease, which is reflected through multiple symptoms. The three core symptoms, sadness, lack of desire and lack of energy/tiredness, are accompanied by numerous other symptoms such as low self-esteem, sleep disturbances and suicidal thoughts (Gerlach 2006). It is a know fact that depression is related to circadian rhythm disturbances, but whether depression leads to these disturbances or vice versa is still under discussion.

1.2.2.1 Sleep Abnormalities

In depression, one of the most predominant circadian abnormalities is sleep disturbances, which more than 90% of the depressed patients suffer from (Bunney & Potkin 2008; Riemann et al. 2001).

Figure 3 shows the difference in sleep architecture between a healthy individual and a depressed patient. Polysomnographic analysis of sleep in depressed patients has shown that

this group of patients often has increased sleep latency, which results in reduced sleep efficiency. They also have frequent nocturnal awakenings and early morning awakening, shorter rapid-eye-movement (REM) latency and increased REM density (Lam 2008; Riemann et al. 2001).

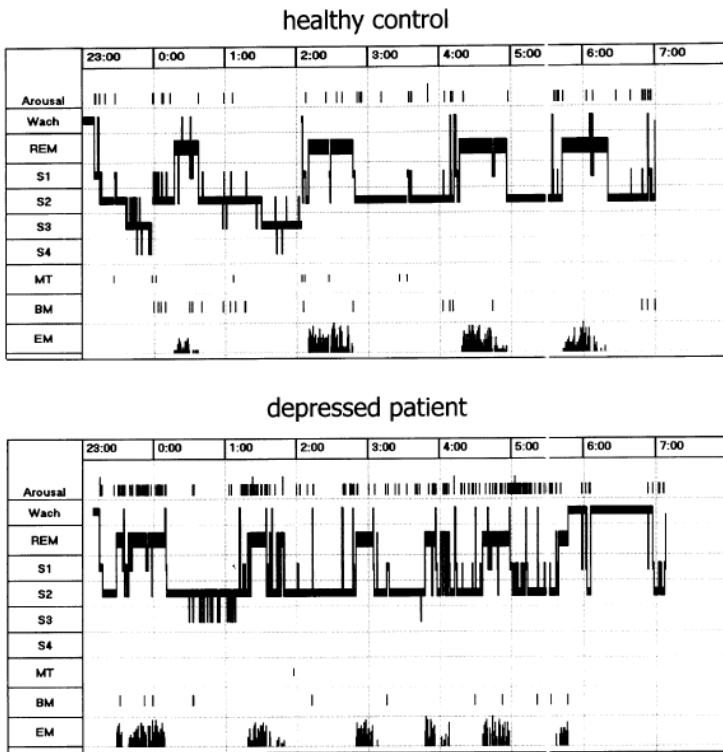


Figure 3: Polysomnographic analysis of sleep in a healthy control and a depressed patient. Notable is that the depressed patient has an increased number of awakenings, shorter REM latency and impaired sleep continuity. REM: rapid eye movement; S1-S4: sleep stages 1-4; MT: movement time; BM: Body movement; EM: rapid eye movements (Riemann et al. 2001).

An overall characteristic of the sleep pattern amongst patients with depression is quantitatively shorter sleep length and qualitatively poorer sleep.

While polysomnography might be the traditional way of measuring sleep, another untraditional but valid method has also been used in determining the sleep-wake cycle of depressed patients. Actigraphy is a non-invasive and cost-effective way of analysing sleep-wake activity (Souza et al. 2003).

In a study by Korszun et al., the sleep pattern of depressed individuals was compared to healthy individuals. Over a 5-7 day period both groups wore a wrist actigraphy. The study showed that the depressed group had significantly lower sleep efficiency; 79% compared to 92% in healthy individuals. Furthermore, an increased level of activity during the night was observed, see

Figure 4 (Korszun et al. 2002).

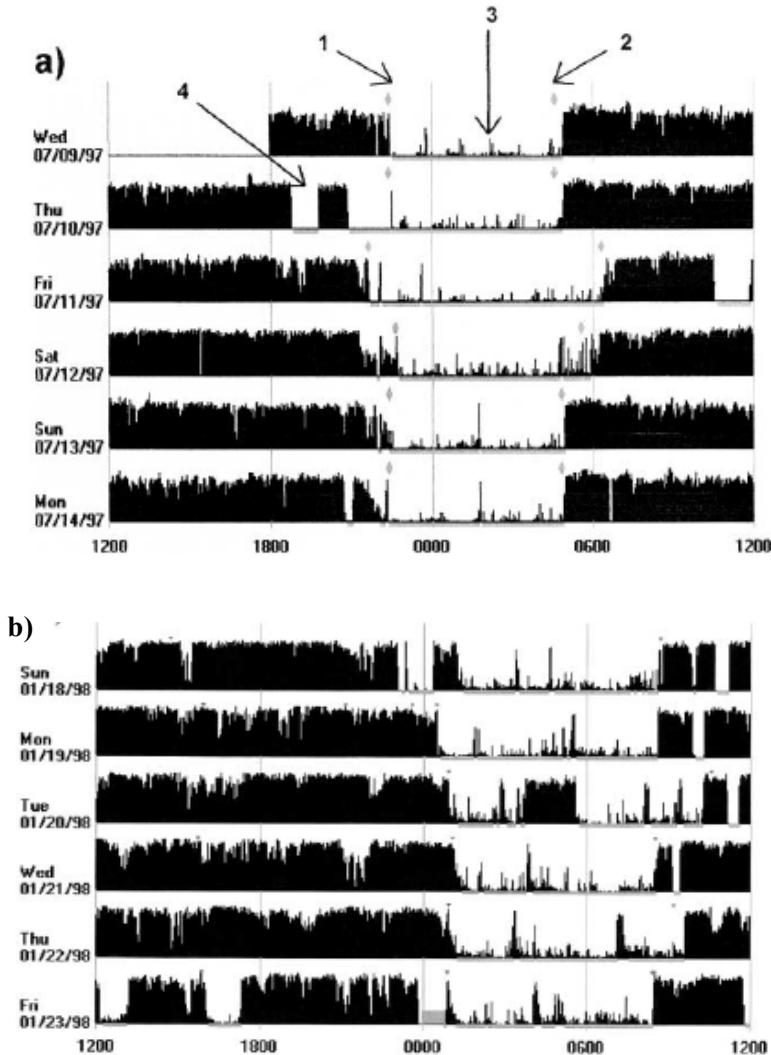


Figure 4: Actogram of the activity registered by an actigraph in a) a healthy control and b) a depressed patient. Increased night activity is observed in depression. The number indicate 1) time going to bed, 2) time of arising, 3) period of sleep, and 4) periods where the actigraph was taken off (Korszun et al. 2002).

1.2.2.2 Temperature Changes

The circadian rhythm for body temperature is also changed in depressed patients. Generally, a higher nocturnal temperature is seen and an overall higher body temperature (Bunney & Potkin 2008). In a study performed by Tsujimoto et al. it was found that the amplitude of the body temperature was significantly lowered in patients with depression compared to healthy volunteers (Tsujimoto et al. 1990). This finding was supported by Souêtre et al., who also found that patients recovered from depression almost had a normalised circadian rhythm (Souêtre et al. 1989).

1.2.2.3 Dysregulation of Hormones

Melatonin is a hormone, which is secreted by the pineal gland in response to darkness. As mentioned in section 1.1 it is regulated by the SCN. The secretion increases soon after the onset of darkness and peaks in the middle of the night, where after it gradually declines. A low level of melatonin is registered at daytime. Melatonin in depression has been extensively studies. A decrease in nocturnal melatonin has reported. (Souêtre et al. 1989; Beck-Friis 1985; Nair et al. 1984). Furthermore, recovered patients almost have an normalised circadian rhythm (Souêtre et al. 1989).

In response to stress the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is activated which leads to the secretion of cortisol. 40-60% of depressed patients have disturbed HPA axis (Bunney & Potkin 2008). Depressed patients have a diurnal elevation of cortisol concentration compared to healthy controls (Sachar et al. 1973; Souêtre et al. 1989). Furthermore, the phenomenon of cortisol awakening response, which is a 50-75% rise in cortisol levels 30-45 minutes after awakening, is blunted in depressed patients even though they secrete larger amounts of cortisol (Wilhelm et al. 2007; Huber et al. 2006).

1.3 Chronotypes

Individual differences in circadian rhythm exist. In chronobiology these differences are classified as morningness-eveningness. In 1976, Horne and Östberg released an article about a self-assessment questionnaire to define different chronotypes. The questionnaire was based on preferred sleep patterns, physical and mental performances after awakening and at different activities. Hereby, three different chronotypes could be established; the morning type, the intermediate type, and the evening type (Horne & Ostberg 1976). The questionnaire has since been used in numerous chronobiological studies (Baehr et al. 2000; Bailey & Heitkemper 2001; Kudielka et al. 2006; Mongrain et al. 2006). In general the morning type, has a relatively early circadian phase while the evening type has a late phase.

2 Aim of The Study

The introduction clearly describes how depression is associated with circadian rhythm disturbances. As depression is a widespread disease, method to discover the disease at an early stage is important. The aim of this study is to investigate whether different sleep patterns are more prone to circadian rhythm disturbances. This is done by:

- Investigating the sleep patterns of chronotypically different people; morning and intermediate types, respectively
- Investigating the circadian rhythm markers of melatonin and cortisol in the above mentioned chronotypes

By looking at the literature regarding circadian rhythms for melatonin and cortisol in depressed patients and by looking at the experimental outcome of the melatonin and cortisol level of the two groups a possible link between one of the groups and depressive patients might be seen.

3 Methods

3.1 Materials

A detailed list of all apparatus, materials, reagents ect. can be found in appendix A. In the following all materials are listed in *italic*.

3.2 Participants

12 subjects (9 women and 3 men) were recruited in this study. The study was approved by the Ethics Committee of Middle Jutland (journal number: M-20110287) and The Danish Data Protection Agency (journal number: 2007-58-0010). Informed written consent from the volunteers was obtained individually prior to study participation. See Appendix B for the study protocols that was approved and Appendix C for the approval letters.

All participants were healthy volunteers aged 18-29 (mean:23) and body mass index within 18.0-30.0 (mean:23). Candidates did not meet the criteria for participation, if they suffered from sleeping disorders or psychiatric illnesses, or if they were being treated for other diseases. Furthermore, candidates who had a history of night work or transmeridian travel (across more than two time zones) in the three months prior to the study where excluded.

Participants were divided into two groups of six according to their sleeping habits, which was defined through the morningness-eveningness questionnaire by Horne and Östberg. The two groups were made of the morning and intermediate chronotypes. Evening chronotypes were excluded from the study.

3.3 Study Protocol

The study took place between March and April at Centre for Psychiatric Research, Aarhus University Hospital in Risskov, Denmark. The study was divided into two investigational periods.

1.1.1 First Study Session

This session was a verification of the study participants' sleep-wake schedule using a wrist *actigraph*. The participants were asked to wear the actigraph for a 5-day period. During these 5 days, participants maintained a stable sleep-wake cycle, that is approximately 6-8 hours of sleep each night, no daytime naps and no major deviation in bedtime and awakening time within the 5 days. However, they were asked to keep their normal daily living. Participants were asked to note down their bedtime and awakening time for these consecutive 5 days. The purpose of the imposed sleep-wake schedule was to stabilise the entrainment of the endogenous circadian pacemakers.

1.1.2 Second Study Session

This session took place at Centre for Psychiatric Research in Risskov following the first session.

An *indwelling catheter* was inserted in the antecubital vein for each of the participants and fixed with a *dressing*. The blood sampling system included an *extension* to the catheter that permitted frequent blood sampling without interrupting the participants' sleep at night. From

the extension a *holder* and *luer adapter* were attached. Whole blood samples were collected in a 10 mL *lithium-heparin vacutainer* each hour for a duration of 24 hours. Each vacutainer was inverted 8-10 times immediately after collecting the blood to ensure thorough mixing of the anticoagulant with the blood and then placed in a container at room temperature until further processing. The blood sampling system was infused with *saline* after each blood withdrawal to reduce the risk of clotting at the catheter insertion site.

To standardise the study, blinds and curtains were closed at 6 PM to avoid possible daylight interference. Furthermore, all participants were in bed at 11 PM and lights were turned off. On the following morning at 7 AM, lights were turned on and participants were woken up.

Saliva samples were collected immediately after awakening at 7:00 AM, 7:15 AM, 7:30 AM, 7:45 AM, and 8:00 AM. Saliva samples were collected using *salivettes*. At each time point a salivette containing a cotton wool were placed in the month for at least 1 minute. The cotton wool was placed back into the salivette container and placed in a container at room temperature until further processing.

3.4 Analysis of Blood Samples

The blood samples were centrifuged at room temperature for 10 minutes at 400 x g. Three layers were visible; an upper plasma layer, a thin intermediate buffy coat containing leukocytes and platelets, and an lower erythrocyte containig layer. Plasma was transferred into eppendorf tubes and stores at -80°C.

Melatonin and cortisol concentrations were quantified by using commercially available *ELISA kits* and conducted according to the protocol of the manufacturer. All samples were performed in duplicates.

3.5 Analysis of Saliva samples

Salivettes were centrifuged at room temperature for 5 minutes at 1000 x g to separate saliva from the cotton wool. Saliva was transferred into eppendorf tubes and store at -80°C.

Cortisol concentrations were quantified by using commercially available *ELISA kits* and conducted according to the protocol of the manufacturer. All samples were performed in duplicates when possible.

3.6 Data Analysis

3.6.1 Sleep Analysis

The graph showing the activity level measured by the actigraph, the actograms, were created using the ActiLife 6.0 software. Individual sleep times were added to the actograms.

Two-tailed independent t-test was used to analyse the overall sleep pattern. The statistic program used was IBM SPSS Statistics version 19.

3.6.2 Plasma Cortisol, Plasma Melatonin, and Salivary Cortisol

24 hour plasma concentrations and one-hour salivary cortisol concentrations were plotted in to graphs. Unless otherwise stated, each graph show the mean with error bars representing ± 2 standard deviations (SD) or ± 2 standard error of mean (SE).

Two-tailed independent t-test was used to analyse the overall plasma concentrations. The statistic program used was IBM SPSS Statistics version 19.

Pearsons correlation was used to determine the correlation between plasma cortisol and salivary cortisol at specific time points.

4 Results

4.1 Sleep Analysis

The actograms for all the subjects can be found in Appendix D.

An MEQ-score of 59-70 corresponds to the morning type whereas a score of 42-58 corresponds to the intermediate type (Horne & Ostberg 1976). The group of subjects with morning type profiles have a mean bed time that ranges from 22.17-00.42, a mean arising time that ranges from 05.09-07.26, and a mean sleep length of 05.36-08.03, see Table 1. The intermediate type profiles group have a mean bed time ranging from 22.39-02.03, a mean arising time ranging from 06.39-10.19, and a mean sleep length of 05.41-08.06.

Table 1: An overview of the MEQ-score, mean bed time, mean arising time, and mean sleep length for each individual.

	MEQ-score	M/I/E types	Mean bed time	Mean arising time	Mean sleep length
Subject 1	60	M	22.17	05.09	06.52
Subject 2	59	M	23.21	07.18	07.57
Subject 3	60	M	22.36	06.08	07.32
Subject 4	62	M	00.42	06.18	05.36
Subject 5	61	M	22.23	06.10	07.47
Subject 6	47	I	22.39	06.39	08.06
Subject 7	56	I	23.03	07.06	08.03
Subject 8	42	I	02.03	10.19	08.16
Subject 9	44	I	23.54	07.03	07.09
Subject 10	56	I	00.00	08.06	08.00
Subject 11	44	I	01.24	07.14	05.41
Subject 12	61	M	23.17	07.26	08.03

There is no significant difference in the mean bed time, mean arising time, and mean sleep length between the morning type and the intermediate type groups.

Table 2: An overview of the MEQ-score, mean bed time, mean arising time and mean sleep length for the morning type profile group and the intermediate type profile group.

	Morning type	Intermediate type	P-value
MEQ-score	60.5	48.2	
Mean bed time	23.06	00.10	0.131
Mean arising time	06.24	07.44	0.068
Mean sleep length	07.17	07.32	0.669

4.2 Plasma Cortisol Concentrations

Raw data for each individual can be found in Appendix E.

4.2.1 Subjects with Morning Types Profiles

24 hour profiles for plasma cortisol concentrations in morning type subjects are illustrated in Figure 5. Table 3 gives an overview of the mean, maximum, and minimum cortisol concentration for each subject.

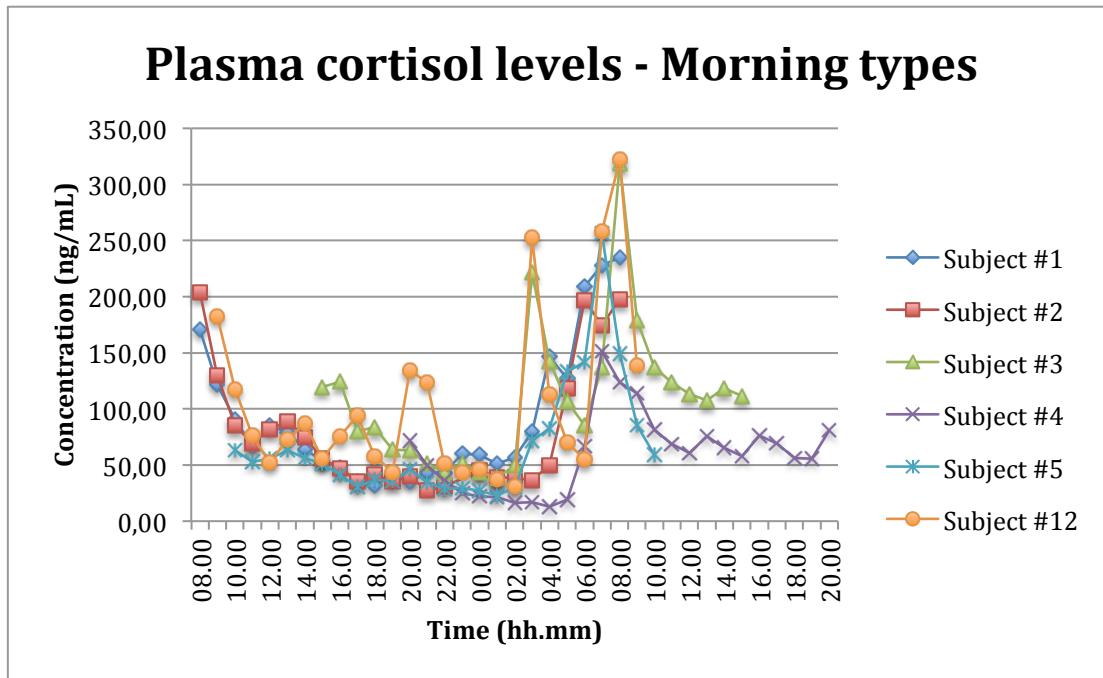


Figure 5: Plasma cortisol level for the group of morning chronotypes. The group consists of six subjects. X-axis represents the time and Y-axis represents the plasma cortisol concentration in ng/mL. Notice that each subject has different start times. For less confusion the standard deviations are not presented.

The concentration of plasma cortisol for subject #1 lies in the range of 32-85 ng/mL from 12.00 to 03.00. At 04.00 the concentration rises to 147 ng/mL, decreases to 127 ng/mL at 05.00 but then increases and reaches a peak of 235 ng/mL at 08.00. Hereafter, the level declines and reaches a concentration of 91 ng/mL at 11.00. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 91 ng/mL.

Between 12.00 and 04.00, the concentration of cortisol remains in the range of 27-89 ng/mL for subject #2. Within the next two hours the concentration rises rapidly to 197 ng/mL at 06.00, declines at 07.00 and then peaks again at 08.00 to a level of 201 ng/mL. The level declines to 86 ng/mL at 11.00. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 81 ng/mL.

Between 15 and 16.00, subject #3 has a concentration of cortisol between 119-124 ng/mL. Subsequently, the concentration declines and remains between 38-83 ng/mL until 02.00. At 03.00 the concentration peaks and reaches 222 ng/mL, where after it decreases and reaches a concentration of 55 ng/mL at 06.00. However, the concentration peaks again at 08.00 to a

level of 322 ng/mL and afterwards declines to a level of 112 ng/mL at 15.00. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 109 ng/mL.

Subject #4 has a concentration ranging from 13-72 ng/mL in the time period of 20.00-05.00. At 07.00, the level reaches its peak of 152 ng/mL, where after it declines to a level of 61 ng/mL at 12.00. Subsequently, the concentration remains stable at a range between 56-81 ng/mL. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 60 ng/mL.

From 10.00 to 02.00 the cortisol concentration of subject #5 remains in the range of 23-63 ng/mL. The level gradually increases and reaches a peak of 258 ng/mL at 07.00, where after it declines and reaches a concentration of 59 ng/mL at 10.00. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 68 ng/mL.

The last subject of the morning type group, subject #12, has a cortisol concentration of 183 ng/mL at 09.00. The concentration declines to 76 ng/mL at 12.00. Hereafter the concentration remains in the range between 44-94 ng/mL from 12.00 to 19.00. At 20.00, the concentration rises and reaches 135 ng/mL, hereafter it declines to 51 ng/mL at 22.00 and remains in the range between 31-51 ng/mL, until 03.00, where the concentration peaks at 252 ng/mL. Hereafter, it declines to a level of 55 ng/mL at 06.00, but rises abruptly and reaches another peak of 322 ng/mL at 08.00. At 9.00 the concentration has declined to 139 ng/mL. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 104 ng/mL.

Table 3: An overview of mean, maximum, and minimum concentration for each individual in the morning type group

	Mean concentration ± SE (ng/mL)	Time of peak	Maximum concentration ± SD (ng/mL)	Time of nadir	Minimum concentration ± SD (ng/mL)
Subject 1	90.5 ± 12.3	08.00	234.9 ± 0.8	18.00	32.3 ± 1.2
Subject 2	81.0 ± 11.8	08.00	204.0 ± 9.4	21.00	27.4 ± 2.7
Subject 3	108.6 ± 12.6	09.00	178.8 ± 2.2	01.00	38.4 ± 3.6
Subject 4	59.8 ± 7.0	07.00	123.6 ± 6.4	04.00	12.9 ± 1.9
Subject 5	67.5 ± 10.6	07.00	256.2 ± 5.27	01.00	22.8 ± 2.8
Subject 12	103.6 ± 15.2	08.00	322.2 ± 21.7	02.00	31.2 ± 2.9

Subjects with Intermediate Type Profiles

24 hour profiles for plasma cortisol concentrations are illustrated in Figure 6. Table 4 gives an overview of the mean, maximum and minimum cortisol concentration for each subject.

Plasma cortisol levels - Intermediate types

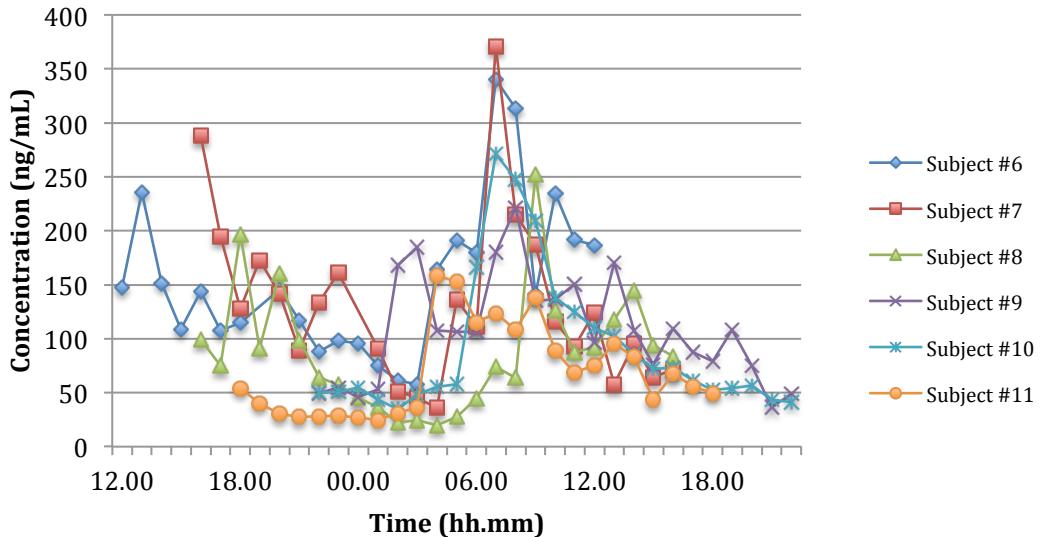


Figure 6: Plasma cortisol level for the group of intermediate chronotypes. The group consists of six subjects. X-axis represents the time and Y-axis represents the plasma cortisol concentration in ng/mL. Notice that each subject has different start times. For less confusion the standard deviations are not presented.

At noon, subject #6 has a plasma cortisol concentration of 147 ng/mL. At 13.00 the concentration rises to 236 ng/mL, where after it declines to 109 ng/mL at 15.00. Subsequently, the concentration remains within 142 ng/mL until 20.00. During the rest of the evening and the beginning of the night the concentration gradually declines to 58 ng/mL at 03.00. Hereafter, the concentration starts rising and reaches its peak of 371 ng/mL at 07.00 and declines to 139 ng/mL at 09.00. Yet again the concentration rises to 234 ng/mL before declining to 192 ng/mL at 11.00. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 154 ng/mL.

Subject #7 has a cortisol concentration of 288 ng/mL at 16.00. It declines to 128 ng/mL at 18.00. Hereafter, the level rises and declines every one to two hours. The concentration varies from 35-173 ng/mL. At 06.00 the concentration is 111 ng/mL and at 07.00 it reaches a peak of 371 ng/mL. It gradually declines to 88 ng/mL at 11.00. From 11.00 to 15.00 the level remains in the range of 58-124 ng/mL. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 132 ng/mL.

The concentration of cortisol for subject #8 rises and declines every one to two hours, varying in the range of 91-197 ng/mL, from 16.00 to 21.00. Hereafter, the concentration gradually declines to 20 ng/mL at 04.00, subsequently it starts to rise and reaches a peak of 252 ng/mL at 09.00. The level declines to 88 ng/mL at 11.00, before rising to 145 ng/mL at 14.00 and decreasing to 84 ng/mL the end. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 88 ng/mL.

Subject #9 has a stable cortisol concentration from 22.00 til 01.00, ranging from 46-55 ng/mL. At 03.00 the concentration peaks to 185 ng/mL and from 04.00 to 06.00 it remains stable at approximately 107 ng/mL. At 09.00 the concentration peaks again to a level of 221

ng/mL. At 10.00 the level declines to 139 ng/mL, whereafter it rises and declines every one to two hours until 22.00. The concentration ranges between 44-170 ng/mL. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 108 ng/mL.

Subject #10 has a stable cortisol concentration from 22.00 to 05.00 ranging from 35-58 ng/mL. A rapid increase in concentration leads to a peak concentration of 271 ng/mL at 07.00, where after the concentration gradually declines to a level of 41 ng/mL at 22.00. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 92 ng/mL.

The last subject, subject #11, has a cortisol concentration ranging from 25-54 ng/mL from 18.00 to 03.00. At 04.00 the level peaks to 159 ng/mL, where after it declines to 115 at 06.00. Hereafter, the cortisol level rises and declines every one to two hours until 18.00, ranging from 44-139 ng/mL. The mean plasma cortisol concentration through out the day is 70 ng/mL.

Table 4: An overview of mean, maximum, and minimum concentration for each individual in the intermediate type group

	Mean concentration ± SE (ng/mL)	Time of peak	Maximum concentration ± SD (ng/mL)	Time of nadir	Minimum concentration ± SE (ng/mL)
Subject 6	153.8 ± 14.8	07.00	340.2 ± 32.0	03.00	57.7 ± 18.7
Subject 7	132.3 ± 16.0	07.00	370.9 ± 12.4	04.00	35.7 ± 0.1
Subject 8	88.0 ± 11.2	09.00	252.0 ± 8.1	04.00	19.6 ± 7.2
Subject 9	107.8 ± 10.0	08.00	221.4 ± 4.1	21.00	36.2 ± 2.2
Subject 10	92.2 ± 13.2	07.00	271.4 ± 3.0	02.00	34.7 ± 2.6
Subject 11	70.1 ± 8.5	04.00	158.9 ± 0.5	01.00	24.7 ± 3.7

4.2.2 Mean Plasma Cortisol Levels of Subjects with Morning and Intermediate Type Profiles

The 24-hour profiles for mean plasma cortisol concentrations are illustrated in Figure 7.

The group with the morning type profiles have a mean plasma cortisol concentration in the range 35-81 ng/mL in the time period 12.00 to 02.00. The group with the intermediate type profiles has a higher cortisol level in the same time period ranging from 45-130 ng/mL. The mean peak concentration is reached at 08.00 and 07.00 for morning and intermediate types, respectively. After the peaks have been reached the melatonin levels for morning types remains lower than the levels for intermediate types.

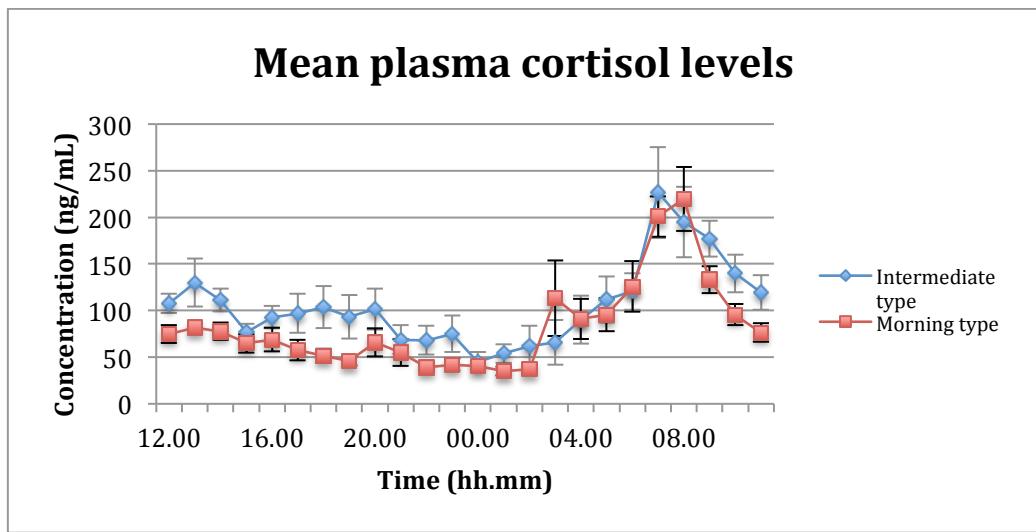


Figure 7: Mean plasma cortisol level for the groups of morning and intermediate chronotypes.. X-axis represents the time and Y-axis represents the plasma cortisol concentration in ng/mL. For less confusion the standard deviations are not presented.

The mean plasma cortisol concentration through out the day for the morning type profile is 85 ng/mL, see Table 5, which is lower than the mean concentration for the intermediate type profiles at 107 ng/mL. However, there is no significant difference between the two groups.

The mean cortisol concentration in the period where the subjects are awake is 248 ng/mL for the morning type group and a slightly higher concentration of 270 ng/mL for the intermediate type group. However, there is no significant difference between the two groups.

The mean cortisol concentration in the period where the subjects are asleep is 92 ng/mL for the morning type group and 100 ng/mL for the intermediate type group. Also here there is no significant difference between the two groups.

The mean of the maximum plasma cortisol level for the subjects in the group, is 248 ng/mL for the morning group and 269 ng/mL for the intermediate group. There is no significant difference between the two groups. The maximum level does not correspond to the peak concentration in Figure 7. As the maximum cortisol level happens at different time point for each subject.

Table 5: An overview of the statistical differences of the mean concentration during 24 hour, wakefulness and sleep. Furthermore, the maximum and minimum concentrations of the morning and intermediate chronotypes are listed.

	Morning type	Intermediate type	P-value
24 hour mean \pm SE	85.1 ± 7.9	107.4 ± 12.6	0.167
Wakefulness mean \pm SE	81.7 ± 8.6	111.0 ± 13.6	0.099
Sleep mean \pm SE	92.4 ± 11.2	99.5 ± 15.5	0.720
Maximum concentration \pm SE	247.9 ± 27.0	269.1 ± 31.7	0.621
Minimum concentration \pm SE	27.5 ± 3.6	37.8 ± 5.4	0.288

The mean of the minimum plasma cortisol level for the subjects in the group is 28 ng/mL for the morning group and 38 ng/mL for the intermediate group. There is no significant difference between two groups.

4.3 Salivary Cortisol Concentrations

Figure 8 and Figure 9 illustrate the salivary cortisol concentrations during the first hours after awakening for the group with morning type profiles and the group with intermediate type profile, respectively. Data can be found in Appendix E.

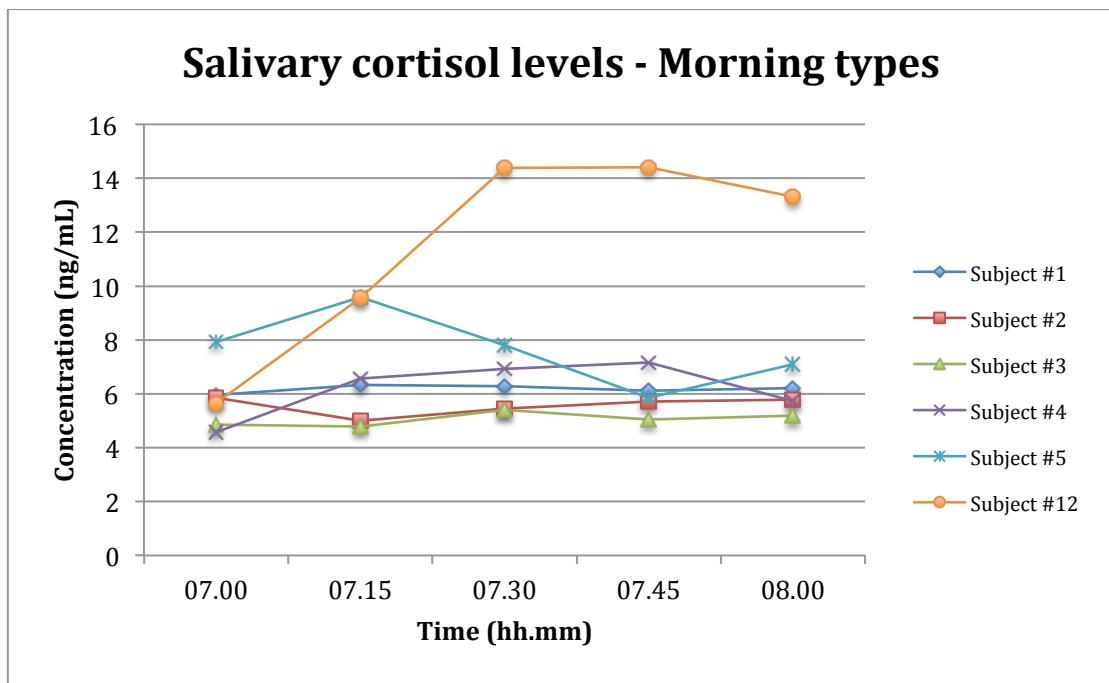


Figure 8: Salivary cortisol level for the group of morning chronotypes. The group consists of six subjects. X-axis represents the time and Y-axis represents the salivary cortisol concentration in ng/mL. For less confusion standard deviations are not presented.

Subject #1, #2 and, #3 have salivary cortisol concentrations with minor changes during the hour of awakening. The concentration ranges from 6.0-6.3 ng/mL, 5.0-5.9 ng/mL and 4.8-5.4 ng/mL for each subject, respectively.

Subject #4 has an increase in the cortisol level from 4.6 ng/mL at 07.00 to 7.2 ng/mL at 07.45. Hereafter, the level declines to 5.7 ng/mL at 08.00.

Subject #5 has a slight increase in the cortisol concentration the first 15 minutes, from a concentration of 7.9 ng/mL to 9.6 ng/mL. Hereafter, the level declines to 5.9 ng/mL at 07.45 and rises again to 7.0 ng/mL at 08.00.

During the first half an hour, subject #12 has an increase in cortisol concentrations from 5.7 ng/mL to 14.4 ng/mL. Hereafter, the level slightly declines to 13.3 ng/mL at 08.00.

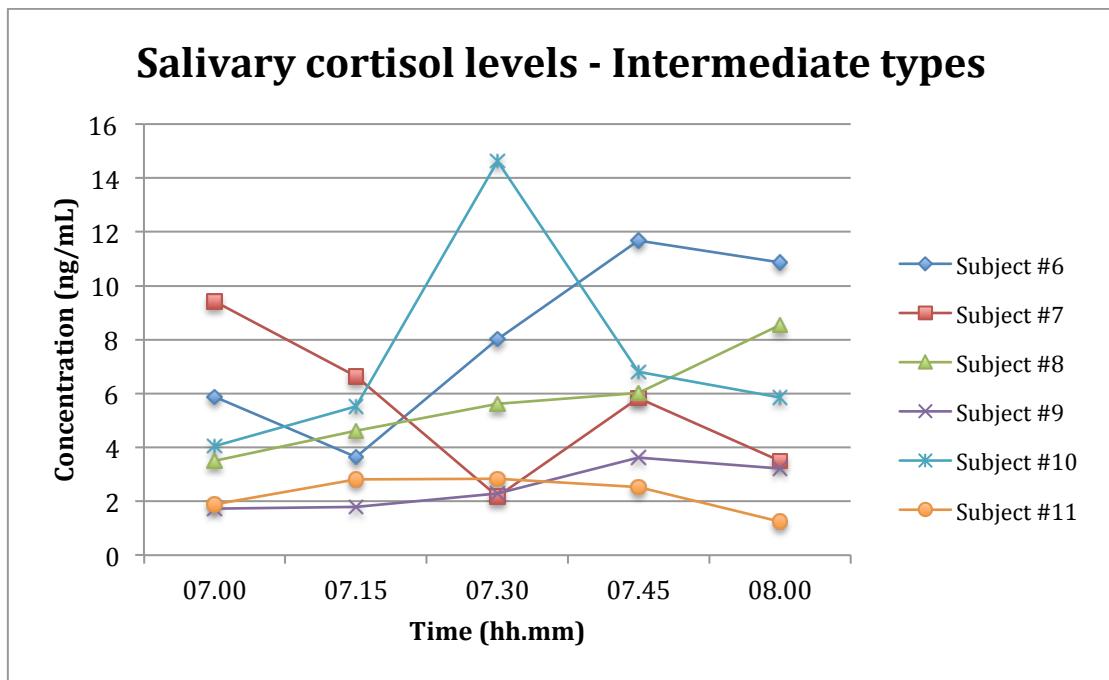


Figure 9: Salivary cortisol level for the group of intermediate chronotypes. The group consists of six subjects. X-axis represents the time and Y-axis represents the salivary cortisol concentration in ng/mL. For less confusion standard deviations are not presented.

Subject #6 has a decline in cortisol concentration from 5.9 ng/mL to 3.7 ng/mL the first 15 minutes. Hereafter, the level increases and reaches 11.7 ng/mL at 07.45, where after, the level slight declines again to 10.9 ng/mL.

Subject #7 has a decline in cortisol concentration the first half an hour from 9.4 ng/mL to 2.2 ng/mL. Hereafter, the level increases to 8.5 ng/mL before decreasing again to 3.5 ng/mL at 08.00.

Subject #8 has a rise in cortisol concentration from 3.5 ng/mL to 6.0 ng/mL in the time periode 07.00 to 08.00

Subject #9 also has an increase in cortisol concentration from 1.7 ng/mL to 3.6 ng/mL. Where after, the level slightly declines to 3.2 ng/mL.

Subject #10 has an increase in cortisol concentration from 4.0 ng/mL 14.6 ng/mL the first half an hour. Hereafter, the level declines to 5.8 ng/mL at 08.00.

Subject #11 has a slight increase in concentration from 1.9 ng/mL to 2.8 ng/mL during the first half an hour. Hereafter, the level slightly declines again to a concentration of 1.3 ng/mL at 08.00.

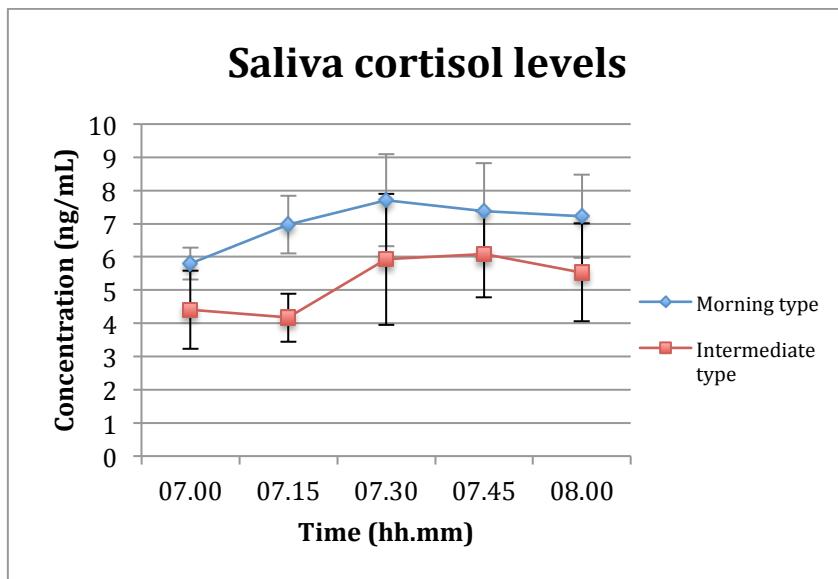


Figure 10: Mean salivary cortisol level for the groups of morning and intermediate chronotypes. X-axis represents the time and Y-axis represents the salivary cortisol concentration in ng/mL.

The mean salivary cortisol level for the group with morning type profiles is higher than the mean concentration of salivary cortisol in the group with intermediate type profiles. The morning type group has a mean cortisol concentration ranging from 5.8-7.7 ng/mL whereas the intermediate type group has a concentration ranging 4.2-6.1 ng/mL.

4.4 Plasma Cortisol Versus Saliva Cortisol

Figure 11 and Figure 12 show the correlation between the plasma cortisol level and the saliva cortisol level at 07.00 and 08.00, respectively.

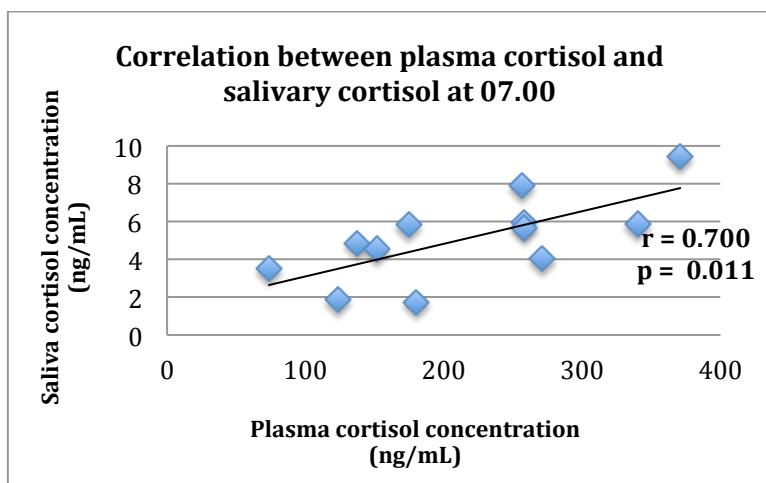


Figure 11: Correlation between plasma and salivary cortisol at 07.00 ($p = 0.011$)

There is a positive linear association between the plasma cortisol level and the saliva cortisol level at 07.00 ($r = 0.700$, $p < 0.05$). However, at 08.00 there is no correlation ($r=0.409$, $p = 0.186$).

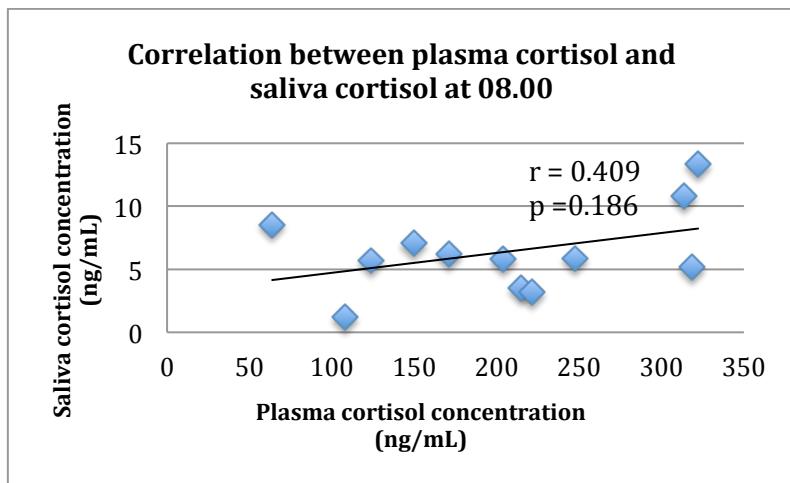


Figure 12: Correlation between plasma and salivary cortisol at 07.00 ($p = 0.186$)

4.5 Plasma Melatonin Concentrations

All data can be found in Appendix E

4.5.1 Subjects with Morning Type Profiles

24 hour profiles for plasma melatonin concentrations in morning type subjects are illustrated in Figure 13. Table 6 gives an overview of the mean, maximum, and minimum cortisol concentration for each subject.

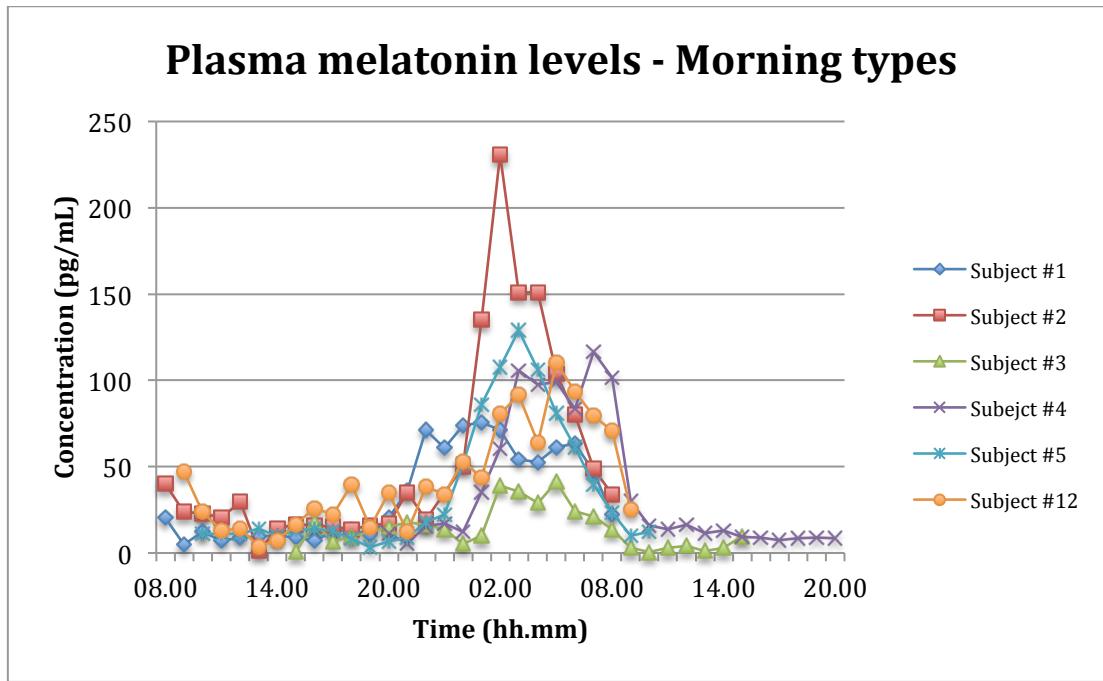


Figure 13: Plasma melatonin level for the group of morning chronotypes. The group consists of six subjects. X-axis represents the time and Y-axis represents the plasma cortisol concentration in ng/mL. Notice that each subject has different start times. For less confusion the standard deviations are not presented.

Subject #1 has a low concentration of melatonin between 08.00 and 20.00 varying from 5-21 pg/mL. From 19.00 to 22.00 the concentration rises to 71 pg/mL and during the night from 22.00 to 06.00 it remains in an interval of 52-74 pg/mL. From 7.00 to 11.00 the concentration

declines and reaches a concentration of 12 pg/mL at the end. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 34 pg/mL.

Subject #2 also has a low concentration of melatonin between 08.00 and 22.00, which varies from 1-40 pg/mL. Within the next three hours the concentration elevates drastically and reaches a peak of 230 pg/mL at 02.00. During the rest of the night and the morning the concentration declines and reaches a concentration of 34 pg/mL at 08.00. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 54 pg/mL.

Subject #3 has a low concentration of melatonin between 15.00 and 01.00, ranging from 1-18 pg/mL. From 02.00 to 05.00 the concentration lies between 29-41 pg/mL. Hereafter the level declines and reaches a concentration of 3 pg/mL at 09.00 and remains low and stable until 14.00. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 14 pg/mL.

The concentration of melatonin for subject #4 remains low and stable between 6-17 pg/mL from 20.00 until midnight. Within the next three hours the concentration rises to a level of 106 pg/mL. Hereafter, it declines to 83 pg/mL at 06.00 but reaches its peak of 117 pg/mL at 07.00. The concentration hereafter declines and reaches 12 pg/mL at 10.00. The level remains low and stable until the end. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 37 pg/mL.

Subject #5 has a low concentration of melatonin between 3-14 pg/mL from 10.00 to 21.00. Hereafter, the concentration gradually rises to reach a peak of 129 pg/mL at 03.00. During the rest of the night and the morning, the concentration declines and reaches 12 pg/mL at 10.00. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 35 pg/mL.

The last subject in the morning type group, subject #12, has a decline in cortisol concentration within the first four hours from 47 pg/mL to 3 pg/mL. Hereafter, the level rises and reaches 40 pg/mL at 18.00. During the next five hours the level rises and declines every hour, varying from 12-40 pg/mL, where after the level rises and reaches 91 pg/mL at 03.00. However, the level declines to 64 pg/mL at 04.00 but reaches its peak of 110 pg/mL at 05.00. The concentration hereafter gradually declines to 25 pg/mL at 09.00. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 42 pg/mL.

Table 6: An overview of the mean, maximum, and minimum plasma melatonin concentration in the morning type group.

	Mean concentration ± SE (pg/mL)	Time of peak	Maximum concentration ± SD (pg/mL)	Time of nadir	Minimum concentration ± SD (pg/mL)
Subject 1	33.5 ± 5.2	01.00	75.6 ± 0.9	09.00	4.9 ± 1.4
Subject 2	53.6 ± 11.9	02.00	230.8 ± 7.0	13.00	1.2 ± 1.96
Subject 3	14.1 ± 2.5	05.00	41.1 ± 4.7	15.00	0.6 ± 0.7
Subject 4	36.5 ± 7.8	07.00	116.6 ± 6.3	21.00	5.6 ± 0.1
Subject 5	34.9 ± 7.5	03.00	128.9 ± 1.7	19.00	3.3 ± 0.7
Subject 12	42.4 ± 6.1	05.00	110.1 ± 26.8	13.00	3.7 ± 0.2

Subjects with Intermediate Type Profiles

24 hour profiles for plasma melatonin concentrations in intermediate type subjects are illustrated in Figure 14. Table 7 gives an overview of the mean, maximum and minimum cortisol concentration for each subject.

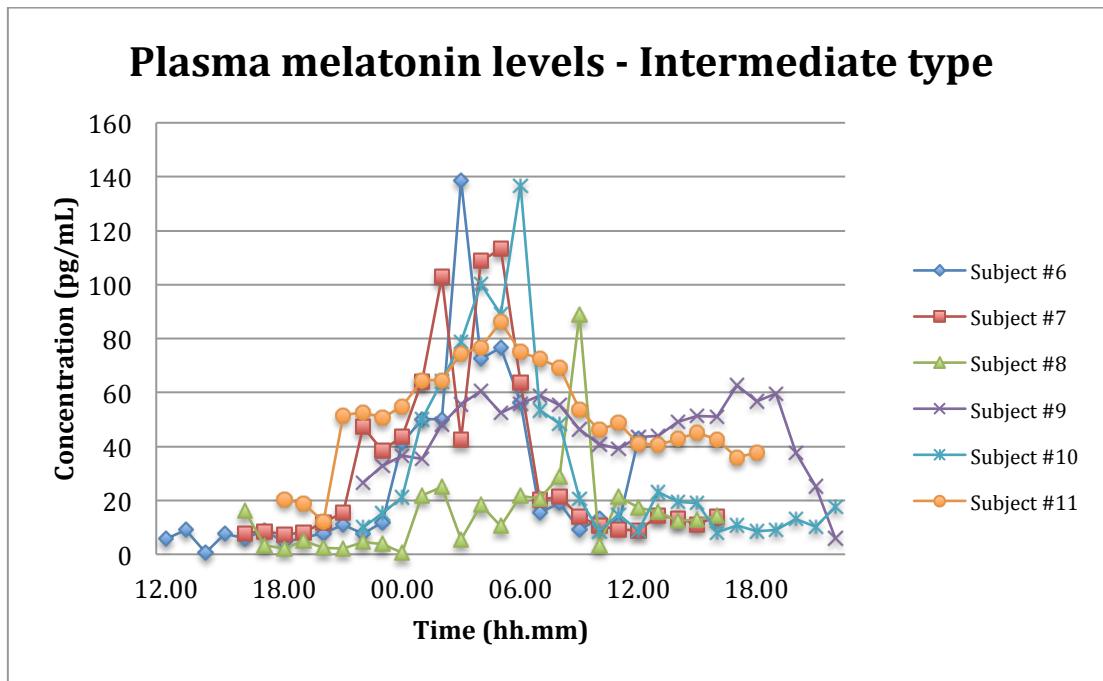


Figure 14: Plasma melatonin level for the group of intermediate chronotypes. The group consists of six subjects. X-axis represents the time and Y-axis represents the plasma cortisol concentration in ng/mL. Notice that each subject has different start times. For less confusion the standard deviations are not presented.

Subject #6 has a low concentration of melatonin ranging from 1-12 pg/mL from 12.00 to 23.00. Hereafter, the level rapidly increases to reach a peak of 139 pg/mL at 03.00 and afterwards declines to reach 16 pg/mL at 07.00. Hereafter, the level remains in the range 9-19 pg/mL until the end. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 28 pg/mL.

Subject #7 has a low concentration of melatonin ranging from 8-15 pg/mL from 16.00 to 21.00. Hereafter, the level increases and reaches 103 pg/mL at 02.00. However, at 03.00 the concentration declines to 42 pg/mL, but afterwards it rises and reaches its peak of 113 pg/mL at 05.00. The level rapidly decreases to 21 pg/mL at 07.00 and remains low and stable until the end. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 33 pg/mL.

Subject #8 has a melatonin concentration of 16 pg/mL at 16.00. From 17.00 to 00.00 the level remains low between 1-5 pg/mL. At 02.00 it reaches 25 pg/mL, where after it declines and rises every hour until 08.00. At 09.00 a peak concentration of 89 pg/mL is reached and at 10.00 the concentration has abruptly decreased to 3 pg/mL. From 11.00 until the end the level remains stable. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 15 pg/mL.

Subejct #9 has a meltonin concentration from 22.00 to 04.00 that gradually increases from 27 pg/mL to 61 pg/mL. Until 08.00 the level remains in the range of 52-59 pg/mL. Hereafter, the level decreases to 39 pg/mL at 11.00 and gradually increases to 63 pg/mL at 17.00. Within the next two hour the level remains between 57-60 pg/mL, before rapidly decreasing to a

level of 6 pg/mL at 22.00. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 45 pg/mL.

The concentration of melatonin for subject #10 increases from 10 pg/mL at 22.00 to 100 pg/mL at 04.00. At 05.00 the level decreases to 86 pg/mL but at 06.00 the peak melatonin concentration of 137 pg/mL is reached. The level declines and at 09.00 it reaches 21 pg/mL. Hereafter, the level remains in the range of 8-23 pg/mL until 22.00. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 34 pg/mL.

The last subject of the intermediate type group, subject #11, has a decline in melatonin concentration from 20 pg/mL at 18.00 to 12 pg/mL at 20.00. However, the level starts to increase and reaches a peak concentration of 86 pg/mL at 05.00. Hereafter the level declines and at 11.00 the concentration is 54 pg/mL, where after the level remains stable in the range of 36-49 pg/mL. The mean plasma melatonin concentration through out the day is 51 pg/mL.

Table 7: An overview of the mean, maximum, and minimum plasma melatonin concentration in the intermediate type group

	Mean concentration ± SE	Time of peak	Maximum concentration ± SD	Time of nadir	Minimum concentration
Subject 6	28.2 ± 6.7	03.00	138.6 ± 18.0	14.00	0.6 ± 0.6
Subject 7	32.8 ± 6.6	05.00	113.3 ± 7.3	18.00	7.3 ± 1.3
Subject 8	15.1 ± 3.5	09.00	88.7 ± 4.9	00.00	0.6 ± 0.4
Subject 9	45.3 ± 2.7	17.00	62.7 ± 0.8	22.00	5.9 ± 0.4
Subject 10	34.4 ± 6.9	06.00	136.8 ± 7.8	16.00	8.2 ± 0.2
Subject 11	51.1 ± 3.8	05.00	86.3 ± 1.8	20.00	12.0 ± 0.6

4.5.2 Mean Plasma Melatonin Levels of Subjects with Morning and Intermediate Type Profiles

During the afternoon, the morning type profile group has a lower mean plasma melatonin concentration compared to the intermediate type profile group. See Figure 15. However, during the evening and night, the morning type group has a higher mean plasma concentration compared to the other group. The mean peak concentration is reached at 02.00 and 04.00 for the morning and intermediate type groups, respectively. During the morning from 08.00, yet again the intermediate type group has the highest plasma melatonin concentration.

Table 8 gives an overview of the statistical differences between the two groups of morning and intermediate type profiles. The mean 24 hour melatonin concentration is 36 pg/mL for the morning type and 35 pg/mL for the intermediate type group. No significant difference is reached between the two groups.

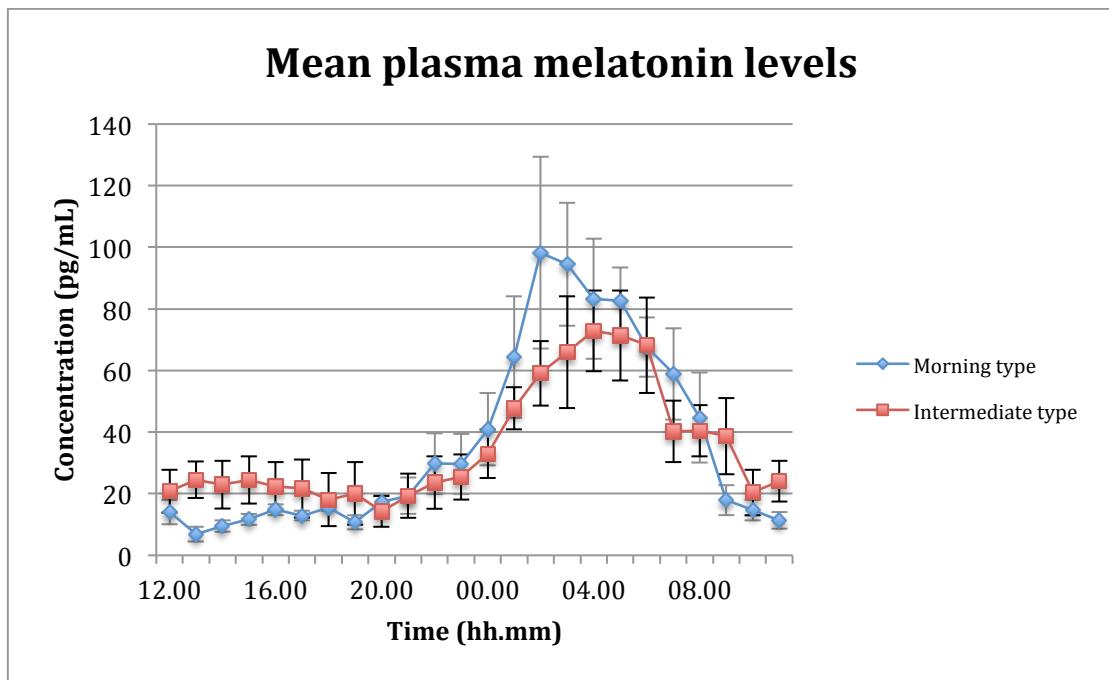


Figure 15: Mean plasma melatonin level for the groups of morning and intermediate chronotypes. X-axis represents the time and Y-axis represents the plasma cortisol concentration in ng/mL. For less confusion the standard deviations are not presented.

The periods where the subjects of the morning type are awake and asleep, the mean plasma melatonin concentration is 18 pg/mL and 79 pg/mL, respectively. However, during the sleep period the intermediate type group has a lower mean melatonin concentration of 57 pg/mL and during the period of awakens the concentration is 24 pg/mL which is higher than the other group. There is no significant difference between the two groups in both time periods.

The mean of the maximum plasma melatonin level for the subjects in the group, is 115 pg/mL for the morning group and 104 pg/mL for the intermediate group. There is no significant difference between to two groups. The maximum level does not correspond to the peak concentration in Figure 15. As the maximum melatonin level happens at different time point for each subject.

The mean of the minimum plasma melatonin level for the subjects in the group is 3 ng/mL for the morning group and 6 ng/mL for the intermediate group. There is no significant difference between to two groups.

Table 8: An overview of the statistical differences of the mean concentration during 24 hour, wakefulness and sleep. Furthermore, the maximum and minimum concentrations of the morning and intermediate chronotypes are listed.

	Morning type	Intermediate type	P-value
24 hour mean \pm SE	35.8 \pm 5.2	34.5 \pm 5.2	0.858
Wakefulness mean \pm SE	17.6 \pm 2.6	23.6 \pm 6.0	0.378
Sleep mean \pm SE	73.8 \pm 12.4	57.3 \pm 9.1	0.306
Maximum concentration \pm SE	115.3 \pm 26.3	104.4 \pm 12.4	0.715
Minimum concentration \pm SE	3.2 \pm 0.8	5.7 \pm 1.8	0.232

5 Discussion

The aim of this study was to investigate the correlation between chronotypes (morning and intermediate types) and circadian rhythm markers (melatonin and cortisol). A clinical experiment was performed in humans in order to study the possible correlation. The chronotypes were defined through a questionnaire and the hormones were quantified from human plasma and saliva.

5.1 The Clinical Setup

Drawing blood from a venflon was not without problems. In many cases the venflon only lasted 12-14 hours before it needed replacing. However, this should not be the case as venflons are used for intraventrous saline and drug administration and can remain in the vein for approximately 72 hours. Furthermore, drawing blood at night through the venflon with an extension was not optimal. 10 out of 12 test subjects reported waking up almost every hour when the blood had to be drawn. Only subject #8 and #11 sleep through the night.

5.2 Sleep Analysis

The actigraph was only used to validate the test subjects' sleep/wake cycles to ensure stable circadian rhythms prior to the laboratory investigation day. Unfortunately, for this study the full feature of the actigraph was not explored. The algorithms provided with the actigraph could have measured sleep latency, sleep efficacy, intermittent awakenings and total sleep length. However, the author did not find these parameters necessary in correlation to this study. Each subject made a sleep log so a comparison of the actograms and sleep logs could be made. In all cases the sleep log somewhat corresponded to the inactive period measured by the actigraph.

The sleep times did not correspond well to the chronotypes. This was mainly due to the fact that students and workers were used in the study. These people all had commitments to school or work and therefore could not exhibit their preferred sleep times in the pre-laboratory day. However, the mean bed time and mean arising time for the morning type group were earlier than for the intermediate type group. This is as expected even though no significant difference were observed. Furthermore, no difference was observed between the sleep lengths of the group. This is also as expected, as in theory morning types go to bed earlier than intermediate types and in the same way wakes up earlier.

The main reason for choosing to compare the morning type and the intermediate type was that in most studies the people with an intermediate type profile represent the largest group of chronotypes, and the morning type group represents the second largest group (Duffy et al. 2001; Taillard & Philip 1999). Furthermore, most studies explore the difference between the morningness and eveningness and does not incorporate the intermediate type (Mongrain et al. 2006; Bailey & Heitkemper 2001).

5.3 Hormone Concentrations

5.3.1 Plasma Cortisol

Hourly plasma cortisol quantifications were made. Each subject expressed a circadian rhythm of cortisol, however, the subjects did not express one precise rhythm.

Two subjects complained of pain near the insertion area of the venflon. Subject #3 had an episode of pain around 03.00 and was given paracetamol, where after the pain subsided. Also around 03.00 subject #9 had an episode pain. This subject requested to have the venflon taken out and place in the opposite arm. The pain event explains why the cortisol concentrations for these subjects are elevated in the night. This finding is in accordance with a study performed by Domzal et al. in 1983 where a positive correlation between the intensity of pain and increased plasma cortisol level was found (Domzał et al. 1983).

When looking at the time of peak plasma cortisol level, two subject with the morning type peak at around 7.00 while the other four peak at 08.00. When comparing this to the intermediate type group, one subject peaks at 04.00, three peak at 07.00, one peaks at 08.00 and the last one peaks at 09.00. Even though there was not any significant difference between the peak concentrations of the morning and the intermediate type. The mean peak concentrations resemble that of other studies. In this study a mean peak concentrations of 220 ng/mL and 227 ng/mL for the morning and intermediate type group were found, respectively. In three other studies where healthy controls were used to determine the diurnal cortisol concentrations, the peak concentration ranged between 150-300 ng/mL (Domzał et al. 1983; Souêtre et al. 1989; Kusanagi et al. 2008). However, then looking at the individual subjects, subject #4 has a lower peak concentration and subject #6, #7 and #12 has a higher peak concentration. Even though high plasma cortisol concentration is associated with depression. There is no possible way of determining whether the subjects with a higher peak concentration are more prone to having a depression. Further investigate of these subject will be necessary to either confirm or dismiss this allegation.

5.3.2 Salivary Cortisol

Salivary cortisol was measured each 15 minutes through out the first hour of awakening.

The findings of the salivary cortisol concentrations are partially supported by another study. Kudikela et al. investigated the difference between salivary cortisol in morning and evening types during the first hour of awakening. The study showed that that morning types have a higher cortisol level compared to the evening type (Kudielka et al. 2006). Even though this study focuses on morning type versus intermediate type the finding of Kudikela et al. can be supportive of the findings in this study.

The finding of a correlation between plasma cortisol and salivary cortisol at 07.00 is supported by another study (Putignano et al. 2001). However, at 08.00 there is no correlation between the salivary cortisol and the plasma cortisol.

Only subject #6, #10, and #12 exhibit a cortisol awakening response. This could be due to the fact that most of the subjects reported not sleeping very well under the laboratory experiment. In normal healthy humans a cortisol response is exhibited within the first hour of awakening. However, in depression this response is blunted (Huber et al. 2006). Whether the subjects that do not show an increase in cortisol level within the first hour of awakening are more disposed to depression is something worth investigating.

5.3.3 Plasma Melatonin

Hourly plasma melatonin quantifications were made. Each subject expressed a circadian rhythm of melatonin, however, the subjects did not express one precise rhythm.

As mentioned in section 5.3.1, subject #9 complained of pain around 03.00 and the venflon was replaced. At this time the lights were turned on for about 10 minutes to replace the venflon. However, when looking at the graph for subject #9 it does not look like the light had a suppressing effect on the melatonin concentration. Also subject #12 had the venflon replace around 4.00. This is notable on the graph as the melatonin concentration decreases from 91 pg/mL at 03.00 to 64 pg/mL at 04.00.

When looking at the time of peak plasma melatonin level, only three subjects #2, #5, and #6 had a peak during the middle of the night, which is reported to be the normal peak time in healthy humans (Brezezinski 1997). Two people in the intermediate group show a peak at 06.00 and 09.00, respectively. The 06.00 peak could be explained by the chronotype, that intermediate type people have a later onset of melatonin secretion than morning type people. However, the 09.00 peak can not be explained by that fact. Clearly the light has not suppressed the secretion of melatonin in this subject. Also subject #9 has no suppression of melatonin in the daytime. This subject's nocturnal level is the same as in the day.

When looking at the other studies to see what the normal melatonin peak concentration is, concentrations from 40 to 140 pg/mL are reported (James et al. 2007; Kusanagi et al. 2008; Nair et al. 1984; Takimoto et al. 2005; Souêtre et al. 1989). In this study all of the subjects had a peak concentration above 40 pg/mL so this might indicate that all of them have normal circadian rhythms of melatonin.

5.3.4 What Could Have Been Expected?

As the two groups consisted of healthy volunteers, a change in amplitude for the circadian rhythms of cortisol and melatonin was not expected from the beginning. However, the inter-individual differences in amplitude was so large in this study, that only looking at the mean 24 hour profile of each group can exhibit a clear pattern. The circadian rhythm for melatonin displays reduced amplitude in the intermediate type group compared to the morning group. However, the circadian rhythm for cortisol does not display a change in amplitude.

A phase shift as in a phase delay or phase advance could have been expected between the two groups. Even though the circadian rhythm for cortisol does not display a phase shift, the circadian rhythm for melatonin displays a phase delay for the intermediate type. Phase shifts between the chronotypes of morning and evening type have been investigated (Bailey & Heitkemper 2001; Schulz & Steimer 2009).

This pilot study has shown that there might be a difference in circadian rhythm patterns of melatonin and cortisol amongst the chronotypes of morning and intermediate types. But nothing definite can be said. Further investigation with larger sample size is needed for the speculations to confirmed or dismissed.

6 Conclusion

This clinical study was performed in healthy young adults, who had the chronotypes of morning type or intermediate type. Quantification of plasma melatonin and cortisol together with salivary cortisol was performed in order to see if a difference in circadian rhythms was exhibited in these chronotypes.

Unfortunately, no significant differences were observed between the circadian rhythms of melatonin and cortisol in morning and intermediate types.

However, the results of this study might indicate that there is an amplitude reduction and phase delay in the circadian rhythm of melatonin in intermediate type people compared to morning type people. Further investigation is needed to support this hypothesis!

7 References

- Albrecht, U., 2010. Circadian clocks in mood-related behaviors. *Annals of medicine*, 42(4), pp.241-51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350255> [Accessed August 1, 2011].
- Archer, S.N. et al., 2008. Inter-individual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes. *Sleep*, 31(5), pp.608-17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2398752/> [Accessed November 6, 2011].
- Baehr, E.K., Revelle, W. & Eastman, C.I., 2000. Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm: with an emphasis on morningness-eveningness. *Journal of sleep research*, 9(2), pp.117-27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849238>.
- Bailey, S.L. & Heitkemper, M.M., 2001. Circadian rhythmicity of cortisol and body temperature: morningness-eveningness effects. *Chronobiology international*, 18(2), pp.249-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11379665>.
- Barnard, A.R. & Nolan, P.M., 2008. When Clocks Go Bad: Neurobehavioural Consequences of Disrupted Circadian Timing E. M. C. Fisher, ed. *PLoS Genetics*, 4(5), p.e1000040. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000040> [Accessed May 4, 2012].
- Beck-Friis, 1985. MELATONIN , CORTISOL AND ACTH IN PATIENTS WITH MAJOR DEPRESSIVE DISORDER AND HEALTHY HUMANS WITH SPECIAL REFERENCE TO THE OUTCOME OF THE DEXAMETHASONE SUPPRESSION TEST cortisol (Sachar et al ., 1980) and abnormal , non-suppression of cortisol in the . , 10(2), pp.173-186.
- Boivin, D.B., 2000. Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 25(5), pp.446-58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1408010/> [Accessed November 6, 2011].
- Brezezinski, A., 1997. Melatonin in humans. *The new england journal of medicine*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3462326> [Accessed June 1, 2012].
- Bunney, J.N. & Potkin, S.G., 2008. Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression. *British medical bulletin*, 86, pp.23-32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18487629/> [Accessed November 6, 2011].
- Domzał, T. et al., 1983. Plasma cortisol concentrations in patients with different circadian pain rhythm. *Pain*, 17(1), pp.67-70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6634213>.
- Duffy, J.F., Rimmer, D.W. & Czeisler, C. a., 2001. Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. *Behavioral*

Neuroscience, 115(4), pp.895-899. Available at:
<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.115.4.895> [Accessed May 31, 2012].

Edgar, D.M. & Dement, C., 1993. Effect of SCN Lesions on Sleep in Squirrel Monkeys : Opponent Processes in Sleep-Wake Regulation Evidence for. , 13(March).

Gerlach, J., 2006. *Depression* 1st editio., PsykiatriFondens Forlag.

Golombek, D., 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, pp.1063-1102. Available at: <http://physrev.physiology.org/content/90/3/1063.short> [Accessed May 31, 2012].

Guo, H. et al., 2006. Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(24), pp.6406-12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16775127> [Accessed May 26, 2012].

Horne, J.A. & Ostberg, O., 1976. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International journal of chronobiology*, 4(2), pp.97-110.

Huber, T.J. et al., 2006. The cortisol awakening response is blunted in psychotherapy inpatients suffering from depression. *Psychoneuroendocrinology*, 31(7), pp.900-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707227> [Accessed May 29, 2012].

James, F.O. et al., 2007. Expression of clock genes in human peripheral blood mononuclear cells throughout the sleep/wake and circadian cycles. *Chronobiology international*, 24(6), pp.1009-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18075796> [Accessed October 24, 2011].

Korszun, A. et al., 2002. Use of actigraphy for monitoring sleep and activity levels in patients with fibromyalgia and depression. *Journal of psychosomatic research*, 52(6), pp.439-43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069867>.

Kudielka, B.M. et al., 2006. Morningness and eveningness: the free cortisol rise after awakening in “early birds” and “night owls”. *Biological psychology*, 72(2), pp.141-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236420> [Accessed April 2, 2012].

Kusanagi, H. et al., 2008. Expression profiles of 10 circadian clock genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Neuroscience research*, 61(2), pp.136-42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336944> [Accessed October 21, 2011].

Lam, R., 2008. [Sleep disturbances and depression: a challenge for antidepressants]. *Zhurnal nevrologii i psichiatrii imeni S.S. Korsakova / Ministerstvo zdravookhranenia i meditsinskoj promyshlennosti Rossijskoj Federatsii, Vserossijskoe obshchestvo nevrologov [i] Vserossijskoe obshchestvo psichiatrov*, 108(12), pp.75-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19256091>.

- Mongrain, V., Carrier, J. & Dumont, M., 2006. Circadian and homeostatic sleep regulation in morningness-eveningness. *Journal of sleep research*, 15(2), pp.162-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704571>.
- Moore, R.Y., 1997. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annual review of medicine*, 48, pp.253-66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9046960>.
- Nair, N.P., Hariharasubramanian, N. & Pilapil, C., 1984. Circadian rhythm of plasma melatonin in endogenous depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 8(4-6), pp.715-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6531443>.
- Perlow, J. et al., 1981. EFFECTS ANTERIOR OF DAMAGE TO THE SUPRACHIASMATIC AREA US ON THE DAILY RHYTHMS IN THE RHESUS OF THE AND.
- Putignano, P. et al., 2001. Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 145(2), pp.165-71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454512>.
- Riemann, D., Berger, M. & Voderholzer, U., 2001. Sleep and depression--results from psychobiological studies: an overview. *Biological psychology*, 57(1-3), pp.67-103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454435>.
- Sachar, E.J. et al., 1973. Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression. *Archives of general psychiatry*, 28(1), pp.19-24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4683141>.
- Schulz, P. & Steimer, T., 2009. Neurobiology of Circadian Systems. *CNS Drugs*, 23. Available at: http://adisonline.com/cnsdrugs/Fulltext/2009/23002/Neurobiology_of_Circadian_Systems.2.aspx.
- Souza, L.D. et al., 2003. Further Validation of Actigraphy for Sleep Studies SLEEP EVALUATION IN HUMANS HAS BEEN USUALLY PER-. *Ethics*.
- Souêtre, E. et al., 1989. Circadian rhythms in depression and recovery: evidence for blunted amplitude as the main chronobiological abnormality. *Psychiatry research*, 28(3), pp.263-78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2762432>.
- Taillard, J. & Philip, P., 1999. Morningness/eveningness and the need for sleep. *Journal of Sleep Research*, (August 1999), pp.291-295. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2869.1999.00176.x/full> [Accessed May 31, 2012].
- Takimoto, M. et al., 2005. Daily expression of clock genes in whole blood cells in healthy subjects and a patient with circadian rhythm sleep disorder. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(5), p.R1273. Available at: <http://ajpregu.physiology.org/content/289/5/R1273.short> [Accessed January 2, 2012].

Tobler, I., Borbély, A.A. & Groos, G., 1983. The effect of sleep deprivation on sleep in rats with suprachiasmatic lesions. *Neuroscience letters*, 42(1), pp.49-54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6657146>.

Tsujimoto, T. et al., 1990. Circadian Part II : Circadian rhythms in depression with various mental disorders rhythms in inpatients. *Journal of Affective Disorders*, 18, pp.199-210.

Wilhelm, I. et al., 2007. Is the cortisol awakening rise a response to awakening? *Psychoneuroendocrinology*, 32(4), pp.358-66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408865> [Accessed May 1, 2012].

Appendix A: Materials

Apparatus

Actigraph: ActiSleep Monitor (Maribo Medico, Denmark)
ActiLife: ActiLife 6.0 (Maribo Medico, Denmark)

Blood sampling system

Indwelling catheter: Venflon Pro 20GA, BD (Becton, Dickinson and Company), Albertslund, Denmark, LOT no: 9107031S44
Dressing: BD Vecafix I.V. Dressing, BD (Becton, Dickinson and Company), Albertslund, Denmark, Lot no: 107420
Extension: BD Q-Syte Extension set, BD (Becton, Dickinson and Company), Albertslund, Denmark, LOT no: 1273921
Holder: VenoSafe Quick Fit Holder, Terumo, Belgium, Lot no: 0901011
Luer adapter: VenoJect Quick Fit Luer Adapter, Terumo, Seelen Care, Holsterbro, Denmark, Lot no: 1108009
Vacutainer: BD Vacutainer LH 170 I.U, Plus Blood Collection Tubes 10 mL, BD (Becton, Dickinson and Company), Albertslund, Denmark, Lot no: 1293063
NaCl: NaCl 0.9%, B. Braun, Seelen Care, Holsterbro, Denmark, Lot no: 11381410

Saliva samples

Salivette: Salivette, Sarstedt, Hounissen, Risskov, Denmark, Lot no: 1073601

ELISA kits

Plasma melatonin Human ELISA kit: Melatonin ELISA, Biosupply, United Kingdom, Lot no: EME161
Plasma cortisol Human ELISA kit: Cortisol (Human) ELISA kit, Abnova, Taiwan, Lot no: COS3759
Salivary cortisol Human ELISA kit: Cortisol ELISA kit, Abnova, Taiwan, Lot no: 63K012

Appendix B: The Study Protocol (Danish)

Søvnarkitektur og Perifere Biomarkører for Depression

- Et pilot studie

Forskningsprojekt af:

Nirooshitha Ganesaratnam, Bsc. i Medicin med Industriel Specialisering

Kandidatstuderende, 9-10 semester, Aalborg Universitet

I samarbejde med:

Center for Psykiatrisk Forskning

Psykiatrisk Sygehus, Risskov

Indhold:

Forsøgsprotokol	47
Opslag til rekruttering af forsøgspersoner	66
Retningslinjer for mundtlig information og informeret samtykke	67
Skriftlig deltagerinformation	69
Samtykkeerklæring	73
Forsøgspersonens rettigheder i et biomedicinsk forskningsprojekt	74
Lægmandsinformation	75
Redegørelse for, at den forsøgsansvarlige udfører et erhverv, der er anerkendt til udførelse af forskning	80

Forsøgsprotokol

Søvnarkitektur og Perifere Biomarkører for Depression - Et pilot studie

Nirooshitha Ganesaratnam, BSc. i Medicin med Industriel Specialisering
Kandidatstuderende, 9-10. semester, Aalborg Universitet

Under supervision af:

Jacek Lichota, ph.d
Neurobiologisk laboratorium
Biomedicin, Aalborg Universitet
Fredrik Bajers Vej 3B
9220 Aalborg Øst

Sponsor:

Ove Wiborg
Lab for Molekylær Neurobiologi
Center for Psykiatrisk Forskning
Psykiatrisk Hospital, Risskov-Skejby
Incuba Science Park
Brendstrupgårdvej 102
8200 Århus N

Klinisk ansvarlig:

Mahmoud Ashkanian, læge, ph.d.
Neuropsykiatrisk klinik
Århus Universitetshospital
Psykiatrisk Sygehus Risskov
Skovagervej 2
8240 Risskov

Forsøgsansvarlig og kontaktperson:

Nirooshitha Ganesaratnam, stud.scient.med
EEG afdelingen
Center for Psykiatrisk Forskning
Psykiatrisk Sygehus Risskov
Skovagervej 2
8240 Risskov
Tlf.: 6133 3421
E-mail adresse: nganes07@student.aau.dk

Forsøget udføres i overensstemmelse med nedenstående protokol og gældende myndighedskrav.

Indholdsfortegnelse

1	Baggrund	49
2	Formål	50
3	Materiale og metoder	51
3.1	<i>Forsøgsdeltagere</i>	51
3.1.1	Informationssamtale	51
3.1.2	Inklusionskriterier	51
3.1.3	Eksklusionskriterier	51
4	Forsøgsdesign	51
4.1	<i>Session 1: Screening</i>	51
4.2	<i>Session 2: Præ-laboratorium</i>	52
4.3	<i>Session 3: Laboratorium</i>	52
4.4	<i>Analysemetoder</i>	53
5	Økonomisk godtgørelse	53
6	Risici og ulemper	53
7	Statistik	54
8	Etisk overvejelser	55
9	Personfølsomme data	55
10	Økonomi	55
11	Tidsplan	55
12	Publicering af resultater	55
13	Referencer	56
14	Appendix I	58
15	Appendix II	60

1 Baggrund

Depression er en hyppig og alvorlig affektiv sindslidelse, som rammer ca. 15% af befolkningen. Af disse mennesker får 70-80% recidiverende episoder. Sygdommens heterogene forekomst afspejler sig ved mangfoldige symptomer, men kernesymptomerne defineres som tristhed, nedsat lyst og nedsat energi (Gerlach, 2006).

Humane studier har vist, at der findes en særlig sammenhæng mellem depression og døgnrytmeforstyrrelser, men hvorledes depressionen skyldes døgnrytmeforstyrrelse eller vice versa diskuteres stadig (Buckley & Schatzberg, 2010; Souêtre et al., 1989; Tsujimoto, Yamada, Shimoda, Hanada, & Takahashi, 1990; Zerssen, Doerr, Emrich, Lund, & Pirke, 1987).

Døgnrytmerne, også kaldt de circadiane rytmer, er vigtige fysiologiske og biokemiske processer, som styres af en række biologiske ure i den menneskelige organisme. Et centralt ur, lokaliseret i den suprachiasmatiske nukleus (SCN) i hypothalamus i hjernen, styrer og synkroniserer en række perifere ure (Schulz & Steimer, 2009). Herved generes døgnrytmerne for søvnregulering, hormonsekretion og temperaturregulering (Albrecht, 2010). Den rytmiske generering i SCN, styres af de såkaldte klokkegener, samt deres afledte proteiner, gennem en række positive og negative feedback mekanismer (Schulz & Steimer, 2009). Der findes over 20 gener (Schulz & Steimer, 2009), men blandt de mest studerede gener er Per1/2/3, Cry1/2, Bmal1, Clock, CK1 δ/ϵ (Ebisawa, 2007).

Forstyrrelser i de circadiane rytmer

Som ovenfornævnt er depression associeret med døgnrytmeforstyrrelser. 70-80% af depressive patienter lider af søvnforstyrrelser, og derved er dette fænomen en af de mest fremtrædende circadiane abnormiteter ved depression (J. N. Bunney & Potkin, 2008). Søvnen inddeltes i to faser, henholdsvis REM (rapid eye movement) søvn, også kaldt drømmesøvn, samt ikke-REM søvn. Ikke-REM inddeltes yderligere i stadierne N1, N2 og N3. Disse faser følger hinanden i et bestemt mønster gennem natten (Iber, S Ancoli-Israel, Chesson, & S. F. Quan, 2007). Studier har vist, at depressive har en reduceret første REM-søvnslatens med øget øjenbevægelser, øget mængde REM søvn, mindre dybsøvn og flere natlige opvågninger. Desuden lider mange patienter af insomni, hvor de typisk har svært ved at falde i søvn, jævnligt natlige opvågninger, tidlig opvågning og dagtræthed på grund af dårlig søvnkvalitet (Gorwood, 2007).

Forskning har vist, at depression og dysregulering af hormonerne melatonin og kortisol korrelerer. Sekretionen af melatonin, som sker i koglekirtlen i hjernen, er kontrolleret af SCN og afhænger af lys-mørke cyklussen (Gorwood, 2007). Depressive patienter har en forsinket melatonin udskillelse, hvilket antyder, at der er en faseforsinkelse i denne circadiane rytme (J. N. Bunney & Potkin, 2008). Derudover reporteres det, at depressive har et reduceret plasma melatonin niveau (Souêtre et al., 1989). Stresshormonet kortisol sekerneret af binyrerne gennem regulering af hypothalamus-hypofysen-binyrerne, også kaldt HPA aksen. Dysregulering af denne akse ses hos 40-60% af depressive patienter (J. N. Bunney & Potkin, 2008). Dysreguleringen opleves ved en fasefremskydning i den circadiane rytme for kortisol, hvilket ses ved at sekretionen begynder tidligere om morgen, samt at kortisol niveauet generelt er højere hos patienterne (Gorwood, 2007; Souêtre et al., 1989). Desuden er kortisol opvågning responset (CAR) signifikant højere end hos normal personer (Vreeburg et al., 2009).

Den circadiane rytme for legemstemperaturen er også ændret hos depressive patienter. Som hos normale, raske personer følger reguleringen af legemstemperaturen et bestemt mønster. Legemstemperaturen begynder at stige om morgenens indtil om eftermiddagen, hvor temperaturen igen falder. Men hos depressive ses en øget kernetemperatur om natten og desuden en højere samlet gennemsnitstemperatur (J. N. Bunney & Potkin, 2008).

I 1989 undersøgte den franske gruppe Souêtre et al. de circadiane rytmer for en række hormoner samt legemstemperaturen. Her sammenlignede gruppen depressive patienter med og patienter restitueret fra depression. Gruppen fandt ud af, at deprimerede patienter udviste klare abnormiteter i de circadiane rytmer samt at de circadiane rytmer efter restitution var tilnærmedesvis normaliseret (Souêtre et al., 1989).

Ud over at kigge på selve de circadiane rytmer, har flere studier også undersøgt den underliggende genetik i reguleringen af de circadiane rytmer. Det har vist sig, at individer med et tidligere depressivt sygdomsforløb udviser et ændret mønster af ekspressionen af circadiane klokkegener i forhold til individer uden en sådan sygdomshistorie. I et studie af Gouin et al. blev genekspresionen af fire circadiane klokkegener, henholdsvis Per1, Per2, Bmal1 og Clock, undersøgt hos tidligere depressive patienter. Resultatet af dette studie viste klart, at en overekspressionen af messenger RNA (mRNA) fra klokkegenerne Per1, Bmal1 og Clock fandtes hos disse patienter (Gouin et al., 2010).

I et andet studiet udført af Lavebratt et al. blev klokkegenet CRY2 undersøgt. Her fandt man, at mRNA niveauet for CRY2 var reduceret hos patienter med depression (Lavebratt et al., 2010).

Ud fra studierne om en reduceret ekspression eller en overekspression af visse klokkegener ved depression, antages det, at ændret ekspression af klokkegener i raske individer, kan være en risikofaktor for udviklingen af depression (Gouin et al., 2010).

For at kunne forebygge forekomsten af depression og hjælpe patienter med depression i at få den bedst mulige behandling, er det vigtigt at få en bedre forståelse af sygdommen. Dette fører til formålet for projektet.

2 Formål

I 1976 udgav Horne & Östberg en artikel omkring et selvevalueringsskema omkring søvnvaner. Ved hjælp af skemaet kunne man definere forskellige typer af søvnvaner; henholdsvis morgen-, mellem- og aftentyper. Søvnvanerne korrelerede de med den circadiane rytme for legemstemperatur (Horne & Ostberg, 1976). Sidenhen er dette skema blevet brugt i mange studier omkring circadiane rytmer (V Mongrain, Carrier, & M Dumont, 2006; Valérie Mongrain, Lavoie, Selmaoui, Paquet, & Marie Dumont, 2004).

I dette pilot projekt ønskes der at kigge nærmere på sammenhæng mellem søvn og perifere markører for depression hos raske mennesker. Med viden om at deprimerede har et ændret søvnmonster, kigges på to grupper med forskellige søvnvaner, henholdsvis morgentypen og mellemtypen.

Dette fører til følgende formål for projektet:

- At undersøge forskellen mellem morgentypen og mellemtypens søvnvaner
- At undersøge sammenhængen mellem søvnvaner og de circadiane rytmer for melatonin og kortisol
- At undersøge sammenhængen mellem søvnvaner og ekspressionen af klokkegener

3 Materiale og metoder

3.1 Forsøgsdeltagere

12 raske forsøgspersoner rekrutteres blandt studerende på Århus Universitet samt ansatte på Center for Psykiatrisk Forskning. De 12 forsøgspersoner opdeles i to grupper á seks afhængig af deres søvnvaner. Se venligst vedlagte ark om opslag til rekruttering af forsøgspersoner.

3.1.1 Informationssamtale

Inden forsøgets start vil hver af de mulige forsøgsdeltagere blive indkaldt til et møde, hvor de vil modtage mundtlig og skriftlig deltagerinformation, og hvor eventuelle spørgsmål besvares. De mulige forsøgsdeltagere har mindst 24 timer til at overveje, om de vil underskrive samtykkeerklæringen. Se venligst vedlagte ark om retningslinjer for mundtlig information og informeret samtykke, skriftlig deltagerinformation samt samtykkeerklæring.

3.1.2 Inklusionskriterier

- Raske mænd og kvinder
- Alder over 18 år

3.1.3 Eksklusionskriterier

- Konstaterede søvnsygdomme
- En score på ≤ 41 på Horne og Östbergs evalueringsskema, hvilket svarer til aftentypen
- Diagnosticerede psykiatriske sygdomme
- Andre konstaterede sygdomme, som der behandles for
- Natarbejde de seneste 3 måneder
- Transmeridiane flyvnninger indenfor den sidste måned
- Abnormitet i søvnrytmen i præ-laboratoriedagene, herunder søvn i dagstimerne

4 Forsøgsdesign

Studiet er et eksperimentelt studie, som tilstræber at undersøge de humane circadiane rytmer. Studiet forløber over tre sessioner.

4.1 Session 1: Screening

Denne session varer cirka 30 minutter og er uafhængig af tidspunktet for de næste to sessioner. Her screenes de forsøgspersoner, som har afgivet samtykke til deltagelse i forsøget. Den forsøgsansvarlige udfylder et skema (appendix I). Skemaet indeholder to dele; første del er et registreringsskema, hvor alle personlige data noteres; anden del er en tjkliste for at sikre, at forsøgsdeltagerne opfylder alle kriterierne for at kunne deltage i forsøget.

Forud for sessionen sender den forsøgsansvarlige et evalueringsskema til forsøgspersonen, som denne bedes udfylde og medbringe til screeningssessionen. Skemaet er en modificeret udgave af Horne og Östbergs selvevalueringsskema til definering af morgen-, mellem- og aftentyper i den human circadiane søvnrytme (appendix II). En score på 42-58 defineres som mellemtypen og en score på 59-86 defineres som morgentypen. Hvis forsøgspersonen har en score på 16-41, defineret som aftentypen, vil vedkommende blive ekskluderet fra studiet.

4.2 Session 2: Præ-laboratorium

Denne session forløber over fem døgn. Forsøgspersonen møder op på Center for Psykiatrisk Forskning, hvor den forsøgsansvarlige vil placere en aktigraf om forsøgspersonens håndled på den ikke-dominerende arm (Sonia Ancoli-Israel et al., 2003). Aktigrafi er en metode, hvorpå søvn-vågen mørnsteret kan fastslås. Metoden er valideret og har været brugt i mange år (Sonia Ancoli-Israel et al., 2003; Souza et al., 1994). Aktigrafen måler personens bevægelser, og ved hjælp af elektronisk analyse kan det fastslås, om forsøgspersonen er i vågentilstand eller søvn (Souza et al., 1994). Selvom polysomnografi har været anset for at være den gyldne standard ved søvnstudier, har aktigrafi vist sig at have sine fordele sammenlignet med traditionel polysomnografi (Sonia Ancoli-Israel et al., 2003). Aktigrafen måler følgende parametre relateret til søvn (Souza et al., 1994):

- Søvnlatensen
- Den totale søvn periode
- Intermitterende opvågninger
- Søvneffektiviteten

Forsøgspersonen bærer aktigrafen over fem døgn og må ikke tage denne af. Forsøgspersonen bedes opretholde en stabil søvnrytmme uden alt for store afvigelser i hvornår personen går i seng og står op. Viser det sig, at forsøgspersonen har en anormal søvnrytmme ekskluderes denne fra studiet.

Desuden foretages spytpøver til måling af kortisol opvågning respons (CAR) også af forsøgspersonen på enten den fjerde eller femte morgen. Forsøgspersonen får seks steril opsamlingsrør (Salivette) med til spytpøverne. Salivetten indeholder også vat. Opsamling af spytpøverne sker ved at placere den lille rulle vat i munnen i mindst 1 minut og gennemvæde vattet. Herefter anbringes vattet tilbage i røret. Prøvetagningerne foregår ved tidspunktet 0 (straks efter personen er vågen), 15 minutter, 30 minutter, 45 minutter og 60 minutter. Rørene stilles i køleskabet eller ved stuetemperatur, indtil de returneres til laboratoriet. Forsøgspersonen bedes ikke børste tænder eller spise umiddelbart før prøvetagningen (Stetler & Miller, 2005).

Når den forsøgsansvarlige har givet alle instruktioner omkring aktigrafen og CAR målingerne, tager forsøgspersonen hjem og fortsætter sin daglige gang.

4.3 Session 3: Laboratorium

Denne session forløber over ét døgn og foregår døgnet efter sidste præ-laboratoriedag. Forsøgspersonen ankommer til laboratoriet om aftenen. Et perifert intravenøst kateter (venflon) placeres i forsøgspersonens antecubitale vene (Buckley & Schatzberg, 2010; James, Boivin, Charbonneau, Bélanger, & Cermakian, 2007; Souêtre et al., 1989). På venflonet påsættes en ekstension, så blodprøverne kan udtages uden at forstyrre forsøgspersonerne søvn (James et al., 2007). I nattetimerne skal blodprøverne helst tages i mørke eller under minimale lysforhold, for ikke at påvirke koncentrationen af melatonin i blodet. Der udtages én blodprøve i et 10 ml lithium-heparin rør. Blodprøverne tages hver time gennem døgnet. Kateteret skylles igennem med natriumchlorid både før og efter blodprøvetagningen.

4.4 Analysemetoder

Blodprøverne til kvantificering af melatonin og kortisol: Plasma separeres ved centrifugering og opbevares ved -20° C indtil analyseprocessen (Archer et al., 2008). Plasma melatonin og kortisol koncentrationer kvantificeres ved hjælp af kommersielt tilgængelige ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kits og ifølge producentens protokol.

Blodprøverne til kvantificering af mRNA fra klokkegener: Metoden følger protokollen af Gouin et al. (Gouin et al., 2010). Perifere blod leukocytter (PBL) isoleres ved brug af Accuspin og Histopaque-1077 separationsopløsning. RNA isoleres fra PBL ved brug af TRIzol reagent. Spektrofotometrisk fastsættes RNA koncentrationen. Komplementær DNA produceres ved revers transkriptase ved brug af Superscript III Reverse Transcriptase og tilfældige hexamere. mRNA mængden fra klokkegenerne Per1, Bmal1, Clock, Cry2 fastlægges ved hjælp af Q-PCR (quantitative real time polymerase chain reaction).

Spytprøverne: Spytprøverne centrifugeres og supernatanten nedfryse i -70° C indtil analyseprocessen (Stetler & Miller, 2005). Kortisol koncentrationen kvantificeres ved hjælp af et kommersielt tilgængeligt ELISA kit og ifølge producentens protokol.

Blod- og spytprøver vil blive destrueret umiddelbart efter analyseprocessen.

5 Økonomisk godtgørelse

Forsøgsdeltagerne vil ikke blive betalt for deltagelse i forsøget.

6 Risici og ulemper

De anvendte metoder er alle undersøgt og udført i henhold til normale kliniske procedurer. Anlæggelse af venflon samt udtagning af blodprøver vil foregå under klinisk rene forhold, med de krævede sikkerhedsforanstaltninger. Den forsøgsansvarlige vil ligeført under hver af metoderne bære kittel samt handsker. Der er ingen rapporter fra andre institutioner om langtidsbivirkninger ved metoderne. Undersøgelsen kan afbrydes på ethvert tidspunkt.

Ulemper ved at deltage i forsøget er minimale. Der kan opstå mild smerte ved anlæggelse af venflon. Natten, som forsøgspersonen tilbringer på Center for Psykiatrisk Forskning, kan blive forstyrrende eftersom blodprøver skal tages fra forsøgspersonens håndryg hver time.

Forsøgsdeltagerne vil være under observation igennem forsøget og vil ligge ned under alle målinger. Skulle der ske et uheld er forsøgsdeltagerne og den forsøgsansvarlig dækket af Region Midtjyllands forsikring.

7 Statistik

Da dette er et pilot studie, er det ikke muligt at foretage en styrkeberegning. Nedenstående tabel viser en oversigt over nogle studier omhandlende circadiane rytmer.

Forfatter, årstal	Titel på artiklen	Antal forsøgs- personer	Hvilke circadiane rytmer undersøges
Archer et al., 2008	Inter-Individual Differences In Habitual Sleep Timing and Entrained Phase of Endogenous Circadian Rhythms of <i>BMAL1</i> , <i>PER2</i> and <i>PER3</i> mRNA in Human Leukocytes	24 (én gruppe)	Melatonin, kortisol, klokkegener
Buckley et al., 2009	A pilot study of the phase angle between cortisol and melatonin in major depression – A potential biomarker?	12 (opdelt i to grupper á 6)	Kortisol, melatonin
Fukuyama et al., 2007	Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes	8 (én gruppe)	Klokkegener
Hallam et al., 2008	An investigation of the effect of immediate and extended release venlafaxine on nocturnal melatonin and cortisol release in healthy adult volunteers	8 (én gruppe)	Melatonin, kortisol
James et al., 2007	Expression of clock genes in human peripheral blood mononuclear cells throughout the sleep/wake and circadian cycles	6 (én gruppe)	Melatonin, klokkegener
Kusanagi et al., 2008	Expression profiles of 10 circadian clock genes in human peripheral blood mononuclear cells	8 (én gruppe)	Melatonin, kortisol, klokkegener
Souêtre et al., 1989	Circadian Rhythms in Depression and Recovery: Evidence for Blunted Amplitude as the Main Chronobiological Abnormality	37 (opdelt i tre grupper á)	Melatonin, kortisol
Teboul et al., 2005	Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells	10 (én gruppe)	Melatonin, kortisol, klokkegener

Ud fra tabellen ses det, at antallet af forsøgspræsenter varierer fra seks til 37 deltagere for de enkelte studier. Det mindste antal præsenter brugt i et studie er seks. Derudover har et studie brugt 12 præsenter, opdelt i to grupper á seks præsenter. Ingen andre studier har brugt færre end seks præsenter i hvert enkeltt gruppe. Derfor vurderes det, at 12 præsenter, med seks præsenter i hver gruppe, dvs. seks præsenter med morgentypen og seks præsenter med mellemtypen, er tilstrækkelig til at gennemfører forsøget.

Med dette pilotprojekt vil det ikke være muligt at opnå resultater, som er statistisk signifikante. Dog vil resultaterne kunne bruges til at foretage en styrkeberegning, som et led i et større, randomiseret studie omkring forstyrrelser i de circadiane rytmer.

8 Etisk overvejelser

Undersøgelsen overholder kravene i Helsinki-deklarationen og forelægges Den Videnskabsetiske Komité for Region Midtjylland. De anvendte metoder er blevet testet og udført i henhold til normale kliniske procedurer. Der er ikke rapporteret om langtidsbivirkninger fra andre institutioners forsøg.

Der er ikke nogle umiddelbare fordele ved deltagelse i forsøget for deltagerne, men forsøgene vil bidrage til en bedre videnskabelig forståelse af sammenhængen mellem den circadiane søvnrytme og perifere biomarkører for depression. Ulempen ved disse forsøg er minimal sammenlignet med bidraget fra den opnåede viden til den medicinske verden.

Alle forsøgsdeltager vil blive informeret omkring nye fremkommende helbredsoplysninger, medmindre forsøgspersonerne frabeder sig disse oplysninger. Den klinisk ansvarlige læge vil sørge for viderehenvisning, hvis dette ønskes.

Hvis kollegaer på Center for Psykiatrisk Forskning ønsker at deltage i forsøget, vil disse blive behandlet som de andre forsøgsdeltagere. Da oplysninger om forsøgsdeltagerne er omfattet af tavshedspligten, vil kolleger, som ønsker at deltage i forsøget ikke være en del af projektgruppen, som udfører forsøget.

Alle alvorlige bivirkninger vil blive rapporteret til Den Videnskabsetiske Komité af den klinisk ansvarlige læge. Forsøgsdeltagerne er dækket af Region Midtjyllands forsikring.

9 Personfølsomme data

Efter forsøget gemmes data i anonymiseret form i henhold til gældende regler. Disse data er reelt alene anvendelige for fortolkningen af nærværende forsøg, og de vil derfor være uinteressante for tredjepart. For hver person udarbejdes et registreringsskema, hvori personlige data for personen noteres (appendix I). Alle data vil blive anonymiseret og behandles fortroligt. Blod- og spytprøver vil blive behandlet anonymt, kun etikkeret med forsøgspersonnummer. Data vil blive opbevaret på Center for Psykiatrisk Forskning, Århus Universitetssygehus, Risskov. Forsøget anmeldes til Datatilsynet.

10 Økonomi

Center for Psykiatrisk Forskning, Århus Universitetshospital, Risskov igangsætter dette projekt og støtter det økonomisk. Det planlagte budget for projektet er 70.000 kr. Den projektansvarlige bag protokollen har ingen personlig økonomisk interesse i studiet. Der udbetales ingen kompensation til forsøgsdeltagerne.

11 Tidsplan

Studiet forventes færdiggjort i løbet af ca. 6 måneder fra godkendelsesdato.

12 Publicering af resultater

Studiets resultater, uanset udfald, vil blive offentliggjort i en kandidatafhandling.

13 Referencer

- Albrecht, U. (2010). Circadian clocks in mood-related behaviors. *Annals of medicine*, 42(4), 241-51. doi:10.3109/07853891003677432
- Ancoli-Israel, Sonia, Cole, R., Alessi, C., Chambers, M., Moorcroft, W., & Pollak, C. P. (2003). The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep*, 26(3), 342-92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749557>
- Archer, S. N., Viola, A. U., Kyriakopoulou, V., von Schantz, M., & Dijk, D.-J. (2008). Inter-individual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes. *Sleep*, 31(5), 608-17. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2398752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Buckley, T. M., & Schatzberg, A. F. (2010). A pilot study of the phase angle between cortisol and melatonin in major depression - a potential biomarker? *Journal of psychiatric research*, 44(2), 69-74. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jpsychires.2009.06.012
- Bunney, J. N., & Potkin, S. G. (2008). Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression. *British medical bulletin*, 86, 23-32. doi:10.1093/bmb/ldn019
- Ebisawa, T. (2007). Circadian Rhythms in the CNS and Peripheral Clock Disorders: Human Sleep Disorders and Clock Genes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 103(2), 150-154. doi:10.1254/jphs.FMJ06003X5
- Gerlach, J. (2006). *Depression* (1st ed., pp. 11-44). PsykiatriFondens Forlag.
- Gorwood, P. (2007). Depression and circadian rhythm disturbances. *Medicographia*, 29(1), 22-27.
- Gouin, J.-P., Connors, J., Kiecolt-Glaser, J. K., Glaser, R., Malarkey, W. B., Atkinson, C., Beversdorf, D., et al. (2010). Altered expression of circadian rhythm genes among individuals with a history of depression. *Journal of affective disorders*, 126(1-2), 161-6. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.jad.2010.04.002
- Horne, J. A., & Ostberg, O. (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International journal of chronobiology*, 4(2), 97-110.
- Iber, C., Ancoli-Israel, S., Chesson, A. L., & Quan, S. F. (2007). *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications*. American Academy of Sleep Medicine.
- James, F. O., Boivin, D. B., Charbonneau, S., Bélanger, V., & Cermakian, N. (2007). Expression of clock genes in human peripheral blood mononuclear cells throughout the sleep/wake and circadian cycles. *Chronobiology international*, 24(6), 1009-34. doi:10.1080/07420520701800736

- Lavebratt, C., Sjöholm, L. K., Soronen, P., Paunio, T., Vawter, M. P., Bunney, W. E., Adolfsson, R., et al. (2010). CRY2 is associated with depression. *PLoS One*, 5(2), e9407. doi:10.1371/Citation
- Mongrain, V., Carrier, J., & Dumont, M. (2006). Circadian and homeostatic sleep regulation in morningness-eveningness. *Journal of sleep research*, 15(2), 162-6. doi:10.1111/j.1365-2869.2006.00532.x
- Mongrain, Valérie, Lavoie, S., Selmaoui, B., Paquet, J., & Dumont, Marie. (2004). Phase relationships between sleep-wake cycle and underlying circadian rhythms in Morningness-Eveningness. *Journal of biological rhythms*, 19(3), 248-57. doi:10.1177/0748730404264365
- Schulz, P., & Steimer, T. (2009). Neurobiology of Circadian Systems. *CNS Drugs*, 23. Retrieved from http://adisonline.com/cnsdrugs/Fulltext/2009/23002/Neurobiology_of_Circadian_Systems.2.aspx
- Souza, L. D., Benedito-silva, A. A., Laura, M., Pires, N., Poyares, D., Tufik, S., & Calil, H. M. (1994). Further Validation of Actigraphy for Sleep Studies SLEEP EVALUATION IN HUMANS HAS BEEN USUALLY PER-. *Ethics*.
- Souêtre, E., Salvati, E., Belugou, J. L., Pringuey, D., Candito, M., Krebs, B., Ardisson, J. L., et al. (1989). Circadian rhythms in depression and recovery: evidence for blunted amplitude as the main chronobiological abnormality. *Psychiatry research*, 28(3), 263-78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2762432>
- Stetler, C., & Miller, G. E. (2005). Blunted cortisol response to awakening in mild to moderate depression: regulatory influences of sleep patterns and social contacts. *Journal of abnormal psychology*, 114(4), 697-705. doi:10.1037/0021-843X.114.4.697
- Tsujimoto, T., Yamada, N., Shimoda, K., Hanada, K., & Takahashi, S. (1990). Circadian Part II : Circadian rhythms in depression with various mental disorders rhythms in inpatients. *Journal of Affective Disorders*, 18, 199-210.
- Vreeburg, S. a, Hoogendoijk, W. J. G., van Pelt, J., Derijk, R. H., Verhagen, J. C. M., van Dyck, R., Smit, J. H., et al. (2009). Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Archives of general psychiatry*, 66(6), 617-26. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.50
- Zerssen, D., Doerr, P., Emrich, H. M., Lund, R., & Pirke, K. M. (1987). Diurnal variation of mood and the cortisol rhythm in depression and normal states of mind. *European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences*, 237(1), 36-45. doi:10.1007/BF00385665

14 Appendix I

Registreringsskema

Forsøgsperson nr.:

Dato:

Navn:

Køn: Mand Kvinde

Kontaktinfo:

Tlf.:

E-mail:

Alder:

Højde:

Vægt:

BMI:

Screeningsskema

Forsøgsperson nr.:

Dato:

1. Lider du af søvnsygdomme Ja Nej

Ja □

Nej □

Hvis Ja, hvilke:

2. Hvilke type menneske vurderer du dig selv til at være? Morgen-menneske Aften-menneske

Morgen- menneske

Aften- menneske

MEO score:

3. Lider du af psykiatriske sygdomme Ja Nej

Ja □

Nej □

Hvis Ja, hvilke:

4. Lider du af andre sygdomme: Ja Nej

Ja □

Nej □

Hvis Ja, hvilke:

5. Har du haft regelmæssig natarbejde indenfor de sidste 3 måneder? Ja Nej

Ja □

Nei □

6. Har du indenfor den sidste måned været ude på transmeridiane flyveture, dvs. flyveture hvor du har krydset flere tidszoner? Ja Nej

Ja □

Nei □

Har forsøgspersonen svaret:

- Nej til spørgsmål 1, 3, 5, 6
 - Opnået en MEQ-SA score ≥ 42
 - Nej til spørgsmål til 4

er personen godkendt til at kunne deltage i forsøget.

Svarer personen Ja til spørgsmål 4, vurderer den forsøgsansvarlige om personen er egne til forsøget

STATUS:

15 Appendix II

MORGEN-AFTEN SPØRGESKEMA (MEQ) (Morningness-Eveningness Questionnaire -revised)¹

For hvert spørgsmål bedes du sætte kryds i boksen ved dét svar, der kommer tættest på dig selv. Lav din vurdering **på baggrund af de seneste uger.**

1.	<i>Omtrent</i> hvornår ville du stå op, hvis planlægningen af din dag var helt op til dig selv?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> kl. 05.00 -06.30	5
	<input type="checkbox"/> kl. 06.30 -07.45	4
	<input type="checkbox"/> kl. 07.45 -09.45	3
	<input type="checkbox"/> kl. 09.45 -11.00	2
	<input type="checkbox"/> kl. 11.00 -12.00	1

2.	<i>Omtrent</i> hvornår ville du gå i seng hvis planlægningen af din aften var helt op til dig selv?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> kl. 20.00 -21.00	5
	<input type="checkbox"/> kl. 21.00 -22.15	4
	<input type="checkbox"/> kl. 22.15 -00.30	3
	<input type="checkbox"/> kl. 00.30 -01.45	2
	<input type="checkbox"/> kl. 01.45 -03.00	1

¹ Nogle af de originale spørgsmål og svarkategorier (Horne JA, Östberg O*) er blevet formuleret til amerikansk omgangssprog; svarkategorier har erstattet fortløbende grafiske skalaer (Terman M, Rifkin JB, Jacobs J, White TM). New York, New York State Psychiatric Institute, 1052 Riverside Drive, Unit 50, New York, NY, 10032 (2000). Med støtte af U.S. National Institutes of Health Grant MH42931. Se også: Automatiseret udgave (AutoMEQ) på www.cet.org. Den danske udgave (2004) inkl. Tilbageoversættelsesprocedure er lavet i samarbejde med Center for Environmental Therapeutics, New York (admin@cet.org), under supervision af Klaus Martiny, PhD, Psykiatrisk Forskningsenhed, Psykiatrisk Hospital, 3400 Hillerød (kmar@fa.dk).

*Horne JA, Östberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. International Journal of Chronobiology 1976;4:97-100.

3.	Hvor afhængig er du af et vækkeur, hvis du skal op på et bestemt tidspunkt om morgenen?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Slet ikke	4
	<input type="checkbox"/> En anelse	3
	<input type="checkbox"/> En del	2
	<input type="checkbox"/> Vældig meget	1

4.	Hvor let synes du det er at komme op om morgenen (hvis du ikke uventet er blevet vækket)?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Meget vanskeligt	1
	<input type="checkbox"/> Noget vanskeligt	2
	<input type="checkbox"/> Forholdsvis let	3
	<input type="checkbox"/> Meget let	4

5.	Hvor vågen føler du dig den første halve time efter du er vågnet om morgenen?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Ikke spor vågen	1
	<input type="checkbox"/> En smule vågen	2
	<input type="checkbox"/> Temmelig vågen	3
	<input type="checkbox"/> Helt vågen	4

6.	Hvor sulten føler du dig i den første halve time efter du er vågnet?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Ikke spor sulten	1
	<input type="checkbox"/> En smule sulten	2
	<input type="checkbox"/> Temmelig sulten	3
	<input type="checkbox"/> Helt sulten	4

7.	Hvordan træt føler du dig i den første halve time efter du er vågnet?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Meget træt	1
	<input type="checkbox"/> Noget træt	2
	<input type="checkbox"/> Forholdsvis udvilet	3
	<input type="checkbox"/> Meget udvilet	4

8.	Hvis du ikke havde nogen forpligtelser næste dag, hvornår ville du gå i seng sammenlignet med din sædvanlige sengetid?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Aldrig eller sjældent senere	4
	<input type="checkbox"/> Mindre end 1 time senere	3
	<input type="checkbox"/> 1-2 timer senere	2
	<input type="checkbox"/> Mere end to timer senere	1

9.	Du har besluttet at motionere. En ven foreslår, at du gør det én time to gange om ugen, og den bedste tid for ham ville være mellem kl. 7.00 og 8.00 om morgenen. Hvis du kun tænker på dit eget 'indre ur', hvor godt ville du kunne klare det?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Ville være i fin form	4
	<input type="checkbox"/> Ville være i rimelig god form	3
	<input type="checkbox"/> Ville finde det vanskeligt	2
	<input type="checkbox"/> Ville finde det meget vanskeligt	1

10.	<i>Omtrent</i> hvornår på aftenen føler du dig træt og har derfor brug for søvn?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> kl. 20.00 -21.00	5
	<input type="checkbox"/> kl. 21.00 -22.15	4
	<input type="checkbox"/> kl. 22.15 -00.45	3
	<input type="checkbox"/> kl. 00.45 -02.00	2
	<input type="checkbox"/> kl. 02.00 -03.00	1

11.	Du vil gerne være helt på toppen fordi du skal op til en eksamen/prøve, som er psykisk udmattende og varer i 2 timer. Du kan planlægge dagen, som du vil. Hvis du kun tager hensyn til dit 'indre ur', i hvilken af de 4 tidsintervaller ville du vælge at gå op?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> kl. 08.00 -09.00	6
	<input type="checkbox"/> kl. 11.00 -13.00	4
	<input type="checkbox"/> kl. 15.00 -17.00	2
	<input type="checkbox"/> kl. 19.00 -21.00	0

12.	Hvis du kom i seng kl. 23.00, hvor træt ville du være?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Ikke spor træt	0
	<input type="checkbox"/> En smule træt	2
	<input type="checkbox"/> Temmelig træt	3
	<input type="checkbox"/> Meget træt	5

13.	Af en eller anden grund er du gået i seng nogle timer senere end du plejer, men du skal ikke op på noget bestemt tidspunkt næste morgen. Hvilken af de følgende muligheder er den mest sandsynlige for dig?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Vågne til sædvanlig tid og ikke falde i søvn igen	4
	<input type="checkbox"/> Vågne til sædvanlig tid og blunde bagefter	3
	<input type="checkbox"/> Vågne til sædvanlig tid og falde i søvn igen	2
	<input type="checkbox"/> Ville vågne senere end sædvanlig	1
14.	Du skal være vågen hele natten, også fra kl. 04.00 til 06.00, fordi du har nattevagt. Du har ingen forpligtelser dagen efter. Hvilket alternativ ville passe dig bedst?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Ville slet ikke gå i seng inden nattevagten er forbi	1
	<input type="checkbox"/> Ville tage en lur både før og efter nattevagten	2
	<input type="checkbox"/> Ville sove rigtigt før nattevagten og tage en lur bagefter	3
	<input type="checkbox"/> Ville kun sove før nattevagten	4
15.	Du skal lave 2 timers tungt fysisk arbejde. Planlægningen for dagen er helt op til dig selv. Hvis du kun tager hensyn til dit 'indre ur', hvilken tid på dagen ville du vælge?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> kl. 08.00 - 10.00	1
	<input type="checkbox"/> kl. 11.00 - 13.00	2
	<input type="checkbox"/> kl. 15.00 - 17.00	3
	<input type="checkbox"/> kl. 19.00 - 21.00	4
16.	Du har besluttet at motionere. En ven foreslår, at I gør det sammen én time to gange om ugen. Den bedste tid for hende er mellem kl. 22.00 og 23.00 om aftenen. Hvis du kun tænker på dit 'indre ur', hvor godt ville du kunne klare det?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Ville være i fin form	1
	<input type="checkbox"/> Ville være i rimelig god form	2
	<input type="checkbox"/> Ville finde det vanskeligt	3
	<input type="checkbox"/> Ville finde det meget vanskeligt	4

17.	Forestil dig, at du selv kan vælge din arbejdstid. Forestil dig, at du har en 5-timers arbejdssdag (inklusive pauser), dit arbejde er spændende og du betales efter hvor meget du når. Omtrent hvilket tidsinterval ville du vælge som arbejdstidsbegyndelse?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> 5 timer begyndende mellem kl. 04.00 og 08.00	5
	<input type="checkbox"/> 5 timer begyndende mellem kl. 08.00 og 09.00	4
	<input type="checkbox"/> 5 timer begyndende mellem kl. 09.00 og 14.00	3
	<input type="checkbox"/> 5 timer begyndende mellem kl. 14.00 og 17.00	2
	<input type="checkbox"/> 5 timer begyndende mellem kl. 17.00 og 04.00	1
18.	Omtrent hvornår på dagen har du det bedst?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> kl. 05.00 - 08.00	5
	<input type="checkbox"/> kl. 08.00 - 10.00	4
	<input type="checkbox"/> kl. 10.00 - 17.00	3
	<input type="checkbox"/> kl. 17.00 - 22.00	2
	<input type="checkbox"/> kl. 22.00 - 05.00	1
19.	Man taler om 'morgenmennesker' og 'aftenmennesker'. Hvilken gruppe tror du, du selv hører til?	Denne kolonne udfyldes ikke
	<input type="checkbox"/> Afgjort morgenmenneske	6
	<input type="checkbox"/> Mere morgen- end aftenmenneske	4
	<input type="checkbox"/> Mere aften- end morgenmenneske	2
	<input type="checkbox"/> Afgjort aftenmenneske	0

Fortolkning af morgen-aften scoren

Den totale score: _____

16-30	31-41	42-58	59-69	70-86
Bestemt aftentypen	Moderat aftentype	Mellemtypen	Moderat morgentype	Bestemt morgentypen

Opslag til rekruttering af forsøgspersoner

Deltagere søges til forsøg

I forbindelse med mit kandidatprojekt, søger jeg i alt 12 raske mænd og kvinder, som har lyst til at deltage i et forsøg. Forsøget forventes at finde sted i perioden januar-marts. Formålet med projektet er at finde sammenhængen mellem søvn og biomarkører for depression.

Du kan deltage hvis bl.a. følgende er opfyldt:

- Du skal være sund og rask
- Du skal være over 18 år
- Du må ikke lide af søvn- eller psykiatriske sygdomme

Selve undersøgelsen forløber over to sessioner; en præ-laboratoriesession og en laboratoriesession. Præ-laboratoriesessionen forløber over 5 døgn. I disse 5 døgn vil du gå rundt med en aktigraf, et specielt ur som monitorer dine bevægelser, for at fastlægge dit søvnmonster. Desuden skal du en af dagene opsamle i alt 5 spytprøver over én time. Gennem de 5 dage skal du foretage dig det, som du foretager dig til dagligt. Laboratoriesessionen forløber over ét døgn. Dette døgn tilbringer du på Center for Psykiatrisk Forskning i Risskov. Ved ankomst anlægger jeg et drop i din arm ved albuebøjningen og herfra vil jeg hver time tage én blodprøve. Forsøget foregår under stille og rolige omgivelser. Forsøget er godkendt af Den Videnskabsetisk Komité for Region Midtjylland (Sagsnr.: M-20110287).

Jeg kan desværre ikke tilbyde nogen kontant kompensation, men der vil være mad, drikke og andre forfriskninger. Men vigtigst af alt er, at du vil være med til at fremskaffe ny nyttig viden omkring døgnrytmmer. Denne viden ville kunne bruges i videre bearbejdelse af døgnrytmeforstyrrelser associeret med psykiatrisk sygdomme såsom depression.

Forsøget foregår på:

Center for Psykiatrisk Forskning
Psykiatrisk Sygehus
Skovagervej 2
8240 Risskov

Har du lyst til at deltage i forsøget eller er du interesseret i at høre mere om forsøget, er du velkommen til at kontakte mig på:

Tlf: 61 33 34 21
E-mail: nganes07@student.aau.dk

Med venlig hilsen

Nirooshitha Ganesaratnam
Kandidatstuderende
Medicin med Industriel Specialisering
Aalborg Universitet

Retningslinjer for mundtlig information og informeret samtykke

Indkaldelse af mulige forsøgspersoner

E-mail sendes ud til ansatte på Center for Psykiatrisk Forskning samt studerende på Århus Universitet. Se venligst arket om opslag til rekruttering af forsøgspersoner. Når de mulige forsøgspersoner kontaktes med henblik på deltagelse i forsøget, skal følgende oplyses:

- At der er tale om en anmodning om deltagelse i et videnskabeligt forsøg.
- Formålet med forsøget.
- At forsøgspersonen har ret til betænkningstid, før samtykket afgives, og at forsøgspersonen ligeledes har ret til at medbringe en bisidder, når den mundtlige information gives. Forsøgspersonen vil få udleveret skriftet ”Forsøgspersonens rettigheder i et biomedicinsk forskningsprojekt”, som indeholder oplysninger omkring tavshedspligt, aktindsigt og klageadgang.
- At det er frivilligt at deltage, og at forsøgspersonen når som helst kan trække sit tilbagesagn om deltagelse tilbage, uden at dette vil påvirke forsøgspersonen.
- At materialet ”Skriftlig deltagerinformation” fremsendes pr. e-mail til forsøgspersonen, således at denne kan få oplysninger om forsøget inden informationssamtalen.
- Til slut aftales et tidspunkt og sted for informationssamtalen.

Informationssamtalen

Informationssamtalen foregår inde på den projektansvarliges kontor eller et tilsvarende lokale, hvor samtalen kan gennemføres uforstyrret. Der kan evt. serveres kaffe, te og/eller sodavand. Selve informationssamtalen skal afholdes af den projektansvarlige eller en seniorforsker, der har fået bemyndigelse til dette.

Samtalen skal indeholde følgende oplysninger/spørgersmål:

- Det er frivilligt at deltage, og forsøgspersonen kan når som helst trække sit tilbagesagn om deltagelse tilbage.
- Forsøgspersonen har ret til betænkningstid før samtykket afgives, og forsøgspersonen har ligeledes ret til at medbringe en bisidder, når han/hun modtager den mundtlige information.
- Forsøgspersonen spørges, om han/hun ønsker, at der er en bisidder tilstede.
- Formålet med forsøget oplyses, og det forklares, hvordan forsøget skal udføres. Der tages udgangspunkt i ”Skriftlig deltagerinformation”, som forsøgspersonen har modtaget inden informationssamtalen.
- Forsøgspersonen spørges, om han/hun er sund og rask, og om han/hun er bærer af en smitsom sygdom
- Forsøgspersonen spørges, om vedkommende er dansk statsborger. Hvis svaret er nej, spørges vedkommende, om han/hun har en gyldig arbejdstilladelse.

- Skriftet ”Forsøgspersonens rettigheder i et biomedicinsk forskningsprojekt” udleveres.
- Det forklares, at det udleverede skrift ”Forsøgspersonens rettigheder i et biomedicinsk forskningsprojekt” indeholder oplysninger omkring tavshedspligt, aktindsigt og klageadgang.
- Forsøgspersonen spørges om han/hun har gennemlæst ”Deltagerinformation”. Hvis dette ikke er tilfældet, bedes forsøgspersonen gennemlæse denne.
- Når det er sikret, at forsøgspersonen har gennemlæst deltagerinformationen, spørges forsøgspersonen, om han/hun har spørgsmål til forsøget.
- Herefter gives forsøgspersonen en demonstration i laboratoriet og diverse måleudstyr og dets anvendelse i forsøget fremvises.
- Forsøgspersonen gøres opmærksom på, at han/hun har ret til betænkningstid, før samtykket afgives (vær opmærksom på, at Den Centrale Videnskabsetiske Komité anbefaler, at man så vidt muligt skal give 24 timers betænkningstid!).
- Forsøgspersonen oplyses om, at såfremt han/hun ikke ønsker at gøre brug af betænkningstiden, kan samtykket afgives herefter.
- Der aftales tidspunkt og sted for forsøgets afholdelse.
- Morgen-aften spørgeskemaet udleveres til forsøgspersonen. I så frem han/hun ønsker at deltag i forsøget, bedes han/hun om at udfylde skemaet og medbringe det til screeningssessionen.
- Til slut informeres der om, hvem der er kontaktperson for projektet (det vises, at dette navn fremgår af ”Deltagerinformation”), og at denne person til hver en tid kan kontaktes, hvis der er yderligere spørgsmål.

Skriftlig deltagerinformation

Søvnarkitektur og perifere biomarkører for depression – et pilot studie

I forbindelse med min kandidatafhandling på uddannelsen Medicin med Industriel Specialisering fra Aalborg Universitet søger jeg raske, frivillige forsøgspersoner til et videnskabeligt forsøg. Forsøget udføres på Center for Psykiatrisk Forskning, Psykiatrisk sygehus i Risskov.

Nedenstående indeholder information om, hvad formålet med forsøget er, og hvordan det udføres. Jeg beder dig læse nedenstående grundigt, før du beslutter dig for, om du vil deltag i forsøget.

Du vil blive inviteret til en samtale om forsøget, hvor denne deltagerinformation vil blive uddybet, og hvor du kan stille de spørgsmål, du har til forsøget. Du er velkommen til at tage et familiemedlem, en ven eller en bekendt med til samtalen.

Hvis du beslutter dig for at deltag i forsøget, vil jeg bede dig om at underskrive en samtykkeerklæring. Husk at du har ret til betænkningstid, inden du underskriver samtykkeerklæringen.

Det er frivilligt at deltag i forsøget. Du kan når som helst og uden at give en grund trække dit samtykke tilbage.

Baggrund

Depression er en hyppig og alvorlig sindslidelse, som rammer ca. 15% af befolkningen. Af disse mennesker får 70-80% tilbagevendende episoder. Sygdommen afspejler sig ved mangfoldige symptomer, men kernesymptomerne defineres som tristhed, nedsat lyst og nedsat energi.

Humane studier har vist, at der findes en særlig sammenhæng mellem depression og døgnrytmeforstyrrelser, men hvorledes depressionen skyldes døgnrytmeforstyrrelser eller omvendt vides ikke.

Døgnrytmerne, også kaldt de circadiane rytmer, er vigtige fysiologiske og biokemiske processer som styres af en række biologiske ure i den menneskelige organisme. Et centralt ur, lokaliseret i hjernen, styrer og synkroniserer en række perifere ure i resten af kroppen. Herved generes døgnrytmerne for søvnregulering, hormonsekretion og temperaturregulering. Den rytmiske generering i hjernen, styres af de såkaldte klokkegener. Der findes over 20 gener, men blandt de mest studerede gener er Per1/2/3, Cry1/2, Bmal1, Clock, CK1 δ/ϵ .

Nogle af de døgnrytmeforstyrrelser som deprimerede patienter oplever er:

- *Søvnforstyrrelser*: Opleves af 70-80% af patienterne, hvor de generelt oplever mindre og ringere søvn.
- *Dysregulering af hormoner*: Melatonin, hormonet som udskilles i respons til mørke, er hos deprimerede nedsat om natten. Udskillelsen af stresshormonet kortisol

begynder tidligt om morgen, niveauet er generelt højere døgnet rundt og desuden ses et kraftig stigning i hormonniveauet lige efter patienten er vågnet.

- *Øget kropstemperatur.*
- *Ændret ekspression af klokkegener:* Nogle af de underliggende gener, som styrer døgnrytmene, er overudtrykt hos deprimerede. Blandt disse gener er Per1, Clock og Bmal1. Desuden er genet Cry2 underudtrykt.

For at kunne forebygge forekomsten af depression og hjælpe patienter med depression i at få den bedst mulige behandling, er det vigtigt at få en bedre forståelse af sygdommen. Dette fører til formålet for projektet.

Formål

Ud fra et evalueringsskema omkring menneskers søvnvaner kan man definere om individet er en morgentype, en mellemtype eller en aftentype, Langt størstedelen af mennesker er mellemtypen.

Herudfra defineres projektet formål:

- At undersøge forskellen mellem morgentypen og mellemtypens søvnvaner.
- At undersøge sammenhængen mellem søvnvaner og de circadiane rytmer for melatonin og kortisol.
- At undersøge sammenhængen mellem søvnvaner og ekspressionen af klokkegener.

Forsøgspersoner

Jeg skal bruge 12 raske mænd og kvinder over 18 år, som ikke lider af søvnsygdomme.

Hvad indebærer det at deltage?

Når du har deltaget i informationssamtalen og underskrevet samtykkeblanketten, mødes vi først til en kort samtale for at undersøge, om du opfylder kriterierne for forsøget. Til dette møde bedes du udfylde og medbringe et skema, som jeg sender til dig på mail. Skemaet omhandler dit søvnmonster. Herefter vil jeg gerne se dig to gange.

Session 1: Denne session varer 5 dage, men du skal foretage dig det, som du laver på en normal dag. Du møder op på Center for Psykiatrisk Forskning, Psykiatrisk Sygehus i Risskov. Her får du tildelt et ur, som du skal gå rundt med de næste 5 dage på din ikke-dominerende arm. Uret hedder en actigraf, og den måler dine bevægelser, så man derved kan analysere din søvn-vågen cyklus. Det er en slags objektiv søvnlogbog. Du bedes de kommende dage sove på nogenlunde samme tidspunkt og have en søvnlængde på omkring 8 timer. Variation er acceptabelt, så længe det ikke drejer sig om flere timer. Desuden er det forbudt at sove i dagstimerne. Husk at uret registrer dit søvnmonster. Du må gerne tage uret af, når du går i bad eller af anden grund, men kun i kortere perioder. Du skal have uret på under nattesøvnen. Skulle du glemme at tage uret på, bedes du venligst skrive tidperioden ned og informere mig heromkring, når vi mødes.

På enten dag 4 eller 5 om morgen bedes du tage spytprøver. Spytpørøver tages for at måle dit kortisol niveau den første time, du er vågen. Du får nogle sterile rør med hjem og i disse rør ligger en lille vatrulle. Du putter vatrullen i munden og gennemvæder den i din mund i cirka 1 minut, hvorefter du putter vatrullen tilbage i røret. Dette gør du i alt 5 gange. Første

gang idet du vågner. Herefter, efter henholdsvis 15, 30, 45 og 60 minutter. Du bedes opbevarer prøverne ved stuetemperatur eller i køleskabet og medbringe dem, når du kommer ind på Center for Psykiatrisk Forskning igen.

Session 2: Denne session kommer til at foregå døgnet efter den sidste dag, du har gået rundt med uret. Den tager i alt cirka 25 timer. Du ankommer til Center for Psykiatrisk Forskning i løbet af aftenen. Jeg lægger et kateter i din arm ved albuebøjningen. Herfra vil jeg hver time, tage én blodprøve, svarende til 10 mL blod, fra kateteret. Gennem natten vil jeg selvfølgelig prøve ikke at forstyrre dig. Hvis du ikke selv vågner, vil jeg vække dig efter 8 timers nattesøvn. Resten af dagen forløber stille og rolig på Center for Psykiatrisk Forskning. Du er velkommen til at tage computer, bøger, film og diverse andre underholdningsremedier med. Der vil selvfølgelig være gratis mad, drikke og andre forfriskelser døgnet rundt.

Mulige risici og eventuelle bivirkninger

De metoder som anvendes i forsøget er alle undersøgt og udført i henhold til normale kliniske procedurer. Der er ingen rapporter fra andre institutioner om langtidsbivirkninger ved metoderne. Undersøgelsen kan afbrydes på ethvert tidspunkt. Ulempene ved forsøget er minimale. Der kan opstå mild smerte ved anlæggelse af droppet i håndryggen.

Du vil være under observation igennem forsøget og vil ligge ned under alle målinger.

Nytte ved forsøget

Der er ikke nogle umiddelbare fordele ved deltagelse i forsøget, men forsøgene vil bidrage til en bedre forståelse af døgnrytmerne. På længere sigt kan dette forsøg lede til et større studie, hvor depressive patienter indgår. Herved kan døgnrytmeforstyrrelser hos depressive patienter undersøges nærmere og de prognostiske og diagnostiske muligheder indenfor sygdommen depression kan udforskes nærmere.

Afslutning af forsøget

Reagerer du efter forsøgslederens vurdering uventet på forsøgets procedurer, eller viser du dig på anden vis ikke egnet til videre deltagelse i forsøget, kan forsøget til ethvert tidspunkt afsluttes. Forsøget som helhed vil blive stoppet, hvis det skulle vise sig, at forsøgspersonerne generelt ikke tolererer forsøgsprocedurerne eller finder forsøget for udmattende.

Økonomi

Du modtager ingen betaling for deltagelse i forsøget.

Projektet sponsoreres af Center for Psykiatrisk Forskning med kr. 70.000. Den projektansvarlige bag protokollen har ingen personlig økonomisk interesse i studiet.

Godkendelse af forsøget

Forsøget er godkendt af Den Videnskabsetiske Komité for Region Midtjylland (sagsnr.: M-20110287)

Jeg håber, at du med denne information har fået tilstrækkeligt indblik i, hvad det vil sige at deltage i forsøget, og at du føler dig rustet til at tage beslutningen om din eventuelle deltagelse. Jeg beder dig også om at læse det vedlagte materiale ”Forsøgspersonens rettigheder i et biomedicinsk forskningsprojekt”.

Hvis du vil vide mere om forsøget, er du meget velkommen til at kontakte mig.

Med venlig hilsen
Nirooshitha Ganesaratnam, stud.scient.med

EEG-afdelingen
Center for Psykiatrisk Forskning
Psykiatrisk Sygehus, Risskov
Skovagervej 2
8240 Risskov

E-mail adresse: nganes07@student.aau.dk
Tlf.: 6133 3421

Samtykkeerklæring

Informert samtykke til deltagelse i et eksperimentelt forskningsprojekt

Forskningsprojektets titel: Søvnarkitektur og perifere biomarkører for depression – et pilot studie

Erklæring fra forsøgspersonen:

Jeg har fået skriftlig og mundtlig information, og jeg ved nok om formål, metode, fordele og ulemper til at sige ja til at deltage.

Jeg ved, at det er frivilligt at deltage, og at jeg altid kan trække mit samtykke tilbage.

Jeg giver samtykke til, at deltage i forskningsprojektet og har fået en kopi af dette samtykkeark samt en kopi af den skriftlige information om projektet til eget brug.

Forsøgspersonens navn (BLOKBOGSTAVER)

Dags dato

Forsøgspersonens underskrift

Fødselsdato

Hvis der kommer nye væsentlige helbredsoplysninger frem om dig i forskningsprojektet vil du blive informeret. Vil du **frabede** dig information om nye væsentlige helbredsoplysninger, som kommer frem i forskningsprojektet, bedes du markere her: _____(sæt x)

Ønsker du at blive informeret om forskningsprojektets resultat samt eventuelle konsekvenser for dig?:

Ja _____ (sæt x) Nej _____ (sæt x)

Erklæring fra den forsøgsansvarlige:

Jeg erklærer, at forsøgspersonen har modtaget mundtlig og skriftlig information om forsøget og har haft mulighed for at stille spørgsmål til mig.

Efter min overbevisning er der givet tilstrækkelig information til, at der kan træffes beslutning om deltagelse i forsøget.

Den forsøgsansvarliges navn: _____

Dato

Den forsøgsansvarliges underskrift

Projektidentifikation: (Fx komiteens Projekt-ID, EudraCT nr., versions nr./dato eller lign.)

Forsøgspersonens rettigheder i et biomedicinsk forskningsprojekt

Som deltager i et biomedicinsk forskningsprojekt skal du vide at:

- Din deltagelse i forskningsprojektet er helt frivillig og kan kun ske efter, at du har fået både skriftlig og mundtlig information om forskningsprojektet og underskrevet samtykkeerklæringen.
- Du til enhver tid mundtligt, skriftligt eller ved anden klar tilkendegivelse kan trække dit samtykke til deltagelse tilbage og udtræde af forskningsprojektet. Såfremt du trækker dit samtykke tilbage påvirker dette ikke din ret til nuværende eller fremtidig behandling eller andre rettigheder, som du måtte have.
- Du har ret til at tage et familiemedlem, en ven eller en bekendt med til informationssamtalen.
- Du har ret til betænkningstid, før du underskriver samtykkeerklæringen.
- Oplysninger om dine helbredsforhold, øvrige rent private forhold og andre fortrolige oplysninger om dig, som fremkommer i forbindelse med forskningsprojektet, er omfattet af tavshedspligt.
- Opbevaring af oplysninger om dig, herunder oplysninger i dine blodprøver og væv, sker efter reglerne i lov om behandling af personoplysninger og sundhedsloven der er mulighed for at få aktindsigt i forsøgsprotokoller efter offentlighedslovens bestemmelser. Det vil sige, at du kan få adgang til at se alle papirer vedrørende din deltagelse i forsøget, bortset fra de dele, som indeholder forretningshemmeligheder eller fortrolige oplysninger om andre.
- Der er mulighed for at klage og få erstatning efter reglerne i lov om klage- og erstatningsadgang inden for sundhedsvæsenet.

(Dette tillæg udgives af Den Centrale Videnskabsetiske komité og kan vedhæftes den skriftlige information om det biomedicinske forskningsprojekt. Spørgsmål til et projekt skal rettes til den regionale komité, som har godkendt projektet)

Lægmandsinformation

Søvnarkitektur og Perifere Biomarkører for Depression – Et pilot studie

Baggrund

Depression er en hyppig og alvorlig sindslidelse, som rammer ca. 15% af befolkningen. Af disse mennesker får 70-80% tilbagevendende episoder. Sygdommen afspejler sig ved mangfoldige symptomer, men kernesymptomerne defineres som tristhed, nedsat lyst og nedsat energi (Gerlach, 2006).

Humane studier har vist det der findes en særlig sammenhæng mellem depression og døgnrytmeforstyrrelser, men hvorledes depressionen skyldes døgnrytmeforstyrrelser eller omvendt vides ikke . (Buckley & Schatzberg, 2010; Souêtre et al., 1989; Tsujimoto, Yamada, Shimoda, Hanada, & Takahashi, 1990; Zerssen, Doerr, Emrich, Lund, & Pirke, 1987).

Døgnrytmerne, også kaldt de circadiane rytmer, er vigtige fysiologiske og biokemiske processer som styres af en række biologiske ure i den menneskelige organisme. Et centralt ur, lokaliseret i hjernen, styrer og synkroniserer en række perifere ure (Schulz & Steimer, 2009). Herved generes døgnrytmerne for søvnregulering, hormonsekretion og temperaturregulering (Albrecht, 2010). Den rytmiske generering i hjernen, styres af de såkaldte klokkegener (Schulz & Steimer, 2009). Der findes over 20 gener (Schulz & Steimer, 2009), men blandt de mest studerede gener er Per1/2/3, Cry1/2, Bmal1, Clock, CK1 δ/ϵ (Ebisawa, 2007).

Nogle af de døgnrytmeforstyrrelser som deprimerede patienter oplever er:

Søvnforstyrrelser: Opleves af 70-80% af patienterne, hvor de generelt oplever mindre og ringere søvn (J. N. Bunney & Potkin, 2008).

Dysregulering af hormoner: Melatonin, hormonet som udskilles i respons til mørke, er hos deprimerede nedsat om natten. Udskillelsen af stresshormonet kortisol begynder tidligt om morgen, niveauet er generelt højere døgnet rundt og desuden ses et kraftig stigning i hormonniveauet lige efter patienten er vågnnet (Gorwood, 2007; Vreeburg et al., 2009).

Øget kropstemperatur (J. N. Bunney & Potkin, 2008)

Ændret ekspression af klokkegener: Nogle af de underliggende gener, som styrer døgnrytmerne, er overudtrykt hos deprimerede. Blandt disse gener er Per1, Clock og Bmal1. Desuden ses en reduceret ekspression af genet Cry2 (Gouin et al., 2010; Lavebratt et al., 2010).

For at kunne forebygge forekomsten af depression og hjælpe patienter med depression i at få den bedst mulige behandling, er det vigtigt at få en bedre forståelse af sygdommen. Dette fører til formålet for projektet.

Formål

I dette pilot projekt ønskes det at kigge nærmere på sammenhæng mellem søvn og perifere markører for depression hos raske mennesker. Et individ kan defineres som enten morgen-, mellem- eller aftentypen afhængig af personens søvnvaner. Denne inddeling af søvnvaner blev for første gang introduceret af Horne og Östberg i 1976 (Horne & Ostberg, 1976). Med dette som grundlag opstilles følgende formål for projektet:

- At undersøge forskellen mellem morgentypen og mellemtypens søvnvaner
- At undersøge sammenhængen mellem søvnvaner og de circadiane rytmer for melatonin og kortisol
- At undersøge sammenhængen mellem søvnvaner og ekspressionen af klokkegener

Forsøgsdeltagere

12 raske forsøgspersoner rekrutteres blandt studerende på Århus Universitet samt ansatte på Center for Psykiatrisk Forskning.

Inklusionskriterier:

- Raske mænd og kvinder
- Alder over 18 år

Eksklusionskriterier:

- Konstaterede søvnsygdomme
- En score på ≤ 41 på Horne og Östbergs evalueringsskema, hvilket svarer til aftentypen
- Diagnosticerede psykiatriske sygdomme
- Andre konstaterede sygdomme, som der behandles for
- Natarbejde de seneste 3 måneder
- Transmeridiane flyvnninger indenfor den sidste måned
- Abnormitet i søvnrytmen i præ-laboratoriedagene, herunder søvn i dagstimerne

Forsøgsdesign

Studiet er et eksperimentelt studie, som tilstræber at undersøge de humane circadiane rytmer. Studiet forløber over tre sessioner.

Inden forsøgets start vil hver af de mulige forsøgsdeltagere blive indkaldt til infomationssamtale, hvor de vil modtage mundtlig og skriftlig deltagerinformation, og hvor eventuelle spørgsmål besvares. De mulige forsøgsdeltagere har mindst 24 timer til at overveje, om de vil underskrive samtykkeerklæringen.

Session 1: Screening

Varighed: Cirka 30 minutter. Uafhængig af de næste to sessioner.

Her screenes de forsøgspersoner, som har afgivet samtykke til deltagelse i forsøget. Den forsøgsansvarlige udfylder et skema (appendix I i forsøgsprotokollen). Desuden medbringer forsøgsdeltageren det tilsendte skema (appendix II i forsøgsprotokollen), som medtages i evalueringen om, hvorvidt personen opfylder kriterierne for at deltage i forsøget.

Session 2: Præ-laboratorium

Varighed: Fem døgn.

Forsøgspersonen får placeret en aktigraf om håndledet. Aktigrafen mäter, ud fra kropsbevægelser, om personen er i vågentilstand eller sovn. Aktigrafen må de næste fem døgn ikke tages af og forsøgspersonen bedes opretholde en stabil sovnrytme.

Desuden skal der på enten den fjerde eller femte morgen foretages spytprøver til måling af kortisol. Proceduren går ud på at gennemvæde en lille rulle vat og placere den i et steril rør. Dette gøres ved tidspunktet 0 (straks efter personen er vågen), 15 minutter, 30 minutter, 45 minutter og 60 minutter. Røret opbevares i køleskabet eller ved stuetemperatur.

Session 3: Laboratorium

Varighed: Én nat på laboratoriet. Natten efter session 2.

Et drop lægges i forsøgspersonens håndryg. Herfra tages der hver time blodprøver, fra det øjeblik forsøgspersonen lægger sig til at sove og 8 timer frem.

Analysemetoder

Blodprøverne bruges til at måle mængden af hormonerne melatonin og kortisol samt mængden af klokkegener. Melatonin og kortisol analyseres ved hjælp af en pålidelig biokemiske metode kaldt ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Klokkegenerne analyseres ved hjælp af en pålidelig biokemisk metode kaldt Q-PCR (Quantitative real time polymerase chain reaction).

Spytprøverne bruges til at måle mængden af kortisol, også her bruges ELISA metoden til at analysere prøverne.

Blod- og spytprøver vil blive destrueret umiddelbart efter analyseprocessen.

Risici og ulemper

De anvendte metoder er alle undersøgt og udført i henhold til normale kliniske procedurer. Anlæggelse af drop samt udtagning af blodprøver vil foregå under klinisk rene forhold, med de krævede sikkerhedsforanstaltninger. Den forsøgsansvarlige vil ligeledes under hver af metoderne bære kittel samt handsker. Der er ingen rapporter fra andre institutioner om langtidsbivirkninger ved metoderne. Undersøgelsen kan afbrydes på ethvert tidspunkt.

Ulemper ved at deltage i forsøget er minimale. Der kan opstå mild smerte ved anlæggelse af drop i håndryggen. Desuden kan natten, som forsøgspersonen tilbringer på Center for Psykiatrisk Forskning, blive forstyrret, eftersom blodprøverne skal tages fra forsøgspersonens håndryg hver time.

Forsøgsdeltagerne vil være under observation igennem forsøget og vil ligge ned under alle målinger. Skulle der ske et uheld er forsøgsdeltagerne og forsøgsansvarlig dækket af Region Midtjyllands forsikring.

Etiske overvejelser

Undersøgelsen overholder kravene i Helsinki-deklarationen og forelægges Den Videnskabsetiske Komité for Region Midtjylland.

Der er ikke nogle umiddelbare fordele ved deltagelse i forsøget for deltagerne, men forsøgene vil bidrage til en bedre videnskabelig forståelse af sammenhængen mellem den circadiane sovnrytme og perifere biomarkører for depression. Ulempen ved disse forsøg er minimal sammenlignet med bidraget fra den opnåede viden til den medicinske verden.

Alle forsøgsdeltager vil blive informeret omkring nye fremkommende helbredsoplysninger, medmindre forsøgspersonerne frabeder sig disse oplysninger. Den klinisk ansvarlige læge vil sørge for viderehenvisning, hvis dette ønskes.

Hvis kollegaer på Center for Psykiatrisk Forskning ønsker at deltage i forsøget, vil disse blive behandlet som de andre forsøgsdeltagere. Da oplysninger om forsøgsdeltagerne er omfattet af tavshedspligten, vil kolleger, som ønsker at deltage i forsøget ikke være en del af projektgruppen, som udfører forsøget.

Alle alvorlige bivirkninger vil blive rapporteret til Den Videnskabsetiske Komité af den klinisk ansvarlige læge. Forsøgsdeltagerne er dækket af Region Midtjyllands forsikring.

Økonomi

Center for Psykiatrisk Forskning, Århus Universitetshospital, Risskov igangsætter dette projekt og støtter det økonomisk. Det planlagte budget for projektet er 70.000 kr. Den projektansvarlige bag protokollen har ingen personlig økonomisk interesse i studiet. Der udbetales ingen kompensation til forsøgsdeltagerne.

Referencer

- Albrecht, U. (2010). Circadian clocks in mood-related behaviors. *Annals of medicine*, 42(4), 241-51. doi:10.3109/07853891003677432
- Buckley, T. M., & Schatzberg, A. F. (2010). A pilot study of the phase angle between cortisol and melatonin in major depression - a potential biomarker? *Journal of psychiatric research*, 44(2), 69-74. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jpsychires.2009.06.012
- Bunney, J. N., & Potkin, S. G. (2008). Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression. *British medical bulletin*, 86, 23-32. doi:10.1093/bmb/ldn019
- Ebisawa, T. (2007). Circadian Rhythms in the CNS and Peripheral Clock Disorders: Human Sleep Disorders and Clock Genes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 103(2), 150-154. doi:10.1254/jphs.FMJ06003X5
- Gerlach, J. (2006). *Depression* (1st ed., pp. 11-44). PsykiatriFondens Forlag.
- Gorwood, P. (2007). Depression and circadian rhythm disturbances. *Medicographia*, 29(1), 22-27.
- Gouin, J.-P., Connors, J., Kiecolt-Glaser, J. K., Glaser, R., Malarkey, W. B., Atkinson, C., Beversdorf, D., et al. (2010). Altered expression of circadian rhythm genes among individuals with a history of depression. *Journal of affective disorders*, 126(1-2), 161-6. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.jad.2010.04.002
- Horne, J. A., & Ostberg, O. (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International journal of chronobiology*, 4(2), 97-110.

Lavebratt, C., Sjöholm, L. K., Soronen, P., Paunio, T., Vawter, M. P., Bunney, W. E., Adolfsson, R., et al. (2010). CRY2 is associated with depression. *PLoS One*, 5(2), e9407. doi:10.1371/Citation

Schulz, P., & Steimer, T. (2009). Neurobiology of Circadian Systems. *CNS Drugs*, 23. Retrieved from http://adisonline.com/cnsdrugs/Fulltext/2009/23002/Neurobiology_of_Circadian_Systems.2.aspx

Souêtre, E., Salvati, E., Belugou, J. L., Pringuey, D., Candito, M., Krebs, B., Ardisson, J. L., et al. (1989). Circadian rhythms in depression and recovery: evidence for blunted amplitude as the main chronobiological abnormality. *Psychiatry research*, 28(3), 263-78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2762432>

Tsujimoto, T., Yamada, N., Shimoda, K., Hanada, K., & Takahashi, S. (1990). Circadian Part II : Circadian rhythms in depression with various mental disorders rhythms in inpatients. *Journal of Affective Disorders*, 18, 199-210.

Vreeburg, S. a, Hoogendoijk, W. J. G., van Pelt, J., Derijk, R. H., Verhagen, J. C. M., van Dyck, R., Smit, J. H., et al. (2009). Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Archives of general psychiatry*, 66(6), 617-26. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.50

Zerssen, D., Doerr, P., Emrich, H. M., Lund, R., & Pirke, K. M. (1987). Diurnal variation of mood and the cortisol rhythm in depression and normal states of mind. *European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences*, 237(1), 36-45. doi:10.1007/BF00385665

Redegørelse for, at den forsøgsansvarlige udfører et erhverv, der er anerkendt til udførelse af forskning

Nirooshitha Ganesaratnam, den forsøgsansvarlige, er 9. semester kandidatstuderende på Aalborg Universitet. Hun har en bachelor i Medicin med Industriel Specialisering og er i gang med at lave et forskningsprojekt som kandidatafhandling. Forskningsprojektet udføres på Center for Psykiatrisk Forskning, Psykiatrisk Sygehus i Risskov. Projektet foregår under supervision af Jacek Lichota fra Aalborg Universitet samt Mahmoud Ashkanian fra Psykiatrisk Sygehus Risskov.

Kontaktinformation:

Jacek Lichota, ph.d
Neurobiologisk laboratorium
Biomedicin, Aalborg Universitet
Fredrik Bajers Vej 3B
9220 Aalborg Øst
Tlf.: +45 9940 7461
E-mail: jlichota@hst.aau.dk

Mahmoud Ashkanian, læge, ph.d.
Neuropsykiatrisk klinik
Århus Universitetshospital
Psykiatrisk Sygehus Risskov
Skovagervej 2
8240 Risskov
Tlf +4577893618
Fax: +4577893619
E-mail: mahmashk@rm.dk

Appendix C: Approval Letters

Center for Psykiatrisk Forskning, Psykiatrisk Sygehus
EEG afdelingen
Skovagervej 2
8240 Risskov
Att. Stud.scient.med. Nirooshitha Ganesaratnam

Regionshuset
Viborg
*Regionsssekretariatet
Juridisk kontor
De Videnskabsetiske Komiteer
For Region Midtjylland*
Skottenborg 26
DK-8800 Viborg
Tel. +45 7841 0183
komite@rm.dk
www.komite.rm.dk



Søvnarkitektur og Perifere Biomarkører for Depression.

De Videnskabsetiske Komitéer for Region Midtjylland, Komité I har behandlet sagen på sit møde den 15. december 2011 og truffet følgende

Afgørelse:

Projektet godkendes i henhold til lov om et videnskabsetisk komité-system, lov nr. 402 af 28. maj 2003 med senere ændringer.

Godkendelsen gælder for de anmeldte forsøgssteder, den anmeldte forsøgsansvarlige i Danmark samt for den angivne forsøgsperiode.

Godkendelsen gælder til den 1. juni 2012 og omfatter følgende dokumenter:

- Protokol version 25. november 2011
- Deltagerinformation version 25. november 2011
- Samtykkeerklæring version 25. november 2011

Iværksættelse af projektet i strid med godkendelsen kan straffes med bøde eller fængsel, jf. komitélovens § 29.

Ændringer:

Foretages der væsentlige ændringer i protokolmaterialet under genemførelsen af projektet, skal disse anmeldes til komiteen i form af tillægsprotokoller. Ændringerne må først iværksættes efter godkendelse fra komitéen, jf. komitélovens § 23, stk. 1, nr. 1.

Anmeldelse af tillægsprotokoller skal ske elektronisk på www.drvk.dk med det allerede tildelte anmeldelsesnummer og adgangskode.

Væsentlige ændringer er bl.a. ændringer, der kan få betydning for forsøgspersonernes sikkerhed, fortolkning af den videnskabelige dokumentation, som projektet bygger på samt gennemførelsen eller ledelsen af projektet. Det kan fx være ændringer i in- og eksklusionskriterier, forsøgsdesign, antal forsøgspersoner, forsøgsprocedurer, behandlingsvarighed, effektparametre, ændringer om de forsøgsansvarlige eller forsøgssteder samt indholdsmæssige ændringer i det

Dato 19.12.2011

Sagsbeandler:

HSR

Tel. +45 7841 0183

komite@rm.dk

Sagsnr. M-20110287

Side 1

skriftlige informationsmateriale til forsøgspersonerne.

Hvor nye oplysninger betyder, at forskeren overvejer at ændre proceduren eller stoppe forsøget, skal komiteen orienteres om det.

Bivirkninger og hændelser:

Komiteen skal omgående underrettes, hvis der under projektet optræder alvorlige bivirkninger eller alvorlige hændelser, jf. komitélovens § 22, stk. 3.

Én gang årligt i hele forsøgsperioden skal komitéen have tilsendt en liste over alle alvorlige bivirkninger og alvorlige hændelser, som er indtruffet i forsøgsperioden sammen med en rapport om forsøgspersonernes sikkerhed, jf. komitélovens § 22, stk. 4.

Materialet skal være på dansk. Listen over alvorlige bivirkninger og alvorlige hændelser kan dog være på engelsk, hvis der er vedlagt et dansk resumé.



Side 2

Afslutning:

Den forsøgsansvarlige skal senest 90 dage efter afslutningen af projektet underrette komiteen herom, jf. komitélovens § 22, stk. 5.

Afbrydes projektet tidligere end planlagt, skal en begrundelse herforsendes til komiteen senest 15 dage efter, at beslutningen er truffet, jf. komitélovens § 22, stk. 5.

Hvis projektet ikke påbegyndes, skal dette samt årsagen hertil meddeles komiteen.

Komiteen beder om kopi af den afsluttende forskningsrapport eller publikation, jf. komitélovens § 22, stk. 2. Vi skal i den forbindelse gøre opmærksom på, at der er pligt til at offentliggøre såvel negative som positive forsøgsresultater, jf. komitélovens § 14, stk. 1, nr. 6.

Tilsyn:

Komiteen fører tilsyn med, at projektet udføres i overensstemmelse med godkendelsen, jf. komitélovens § 22, stk. 1.

Følgende komitémedlemmer deltog i mødebehandlingen:

- Se vedlagte liste over komitémedlemmer.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Heidi Scheil Rasmussen".
Venlig hilsen
Heidi Scheil Rasmussen
sekretær

Nirooshitha Ganesaratnam, Stud.scient.med
Center for Psykiatrisk Forskning, Psykiatrisk Sygehus
EEG Afdelingen
Skovagervej 2
8240 Risskov

Regionshuset
Viborg
*Regionsssekretariatet
Juridisk kontor
De Videnskabsetiske Komiteer
For Region Midtjylland*
Skottenborg 26
DK-8800 Viborg
Tel. +45 7841 0183
komite@rm.dk
www.komite.rm.dk



**Vedrørende project: Søvnarkitektur og Perifere Biomarkører
for Depression**

De Videnskabsetiske Komitéer for Region Midtjylland har behandlet
de anmeldte ændringer modtaget den 11. januar 2012 til ovenstående
projekt.

Dato 08-02-2012
Sagsbeandler Heidi Scheil Rasmussen
komite@rm.dk
Tel. +45 7841 0183
Sagsnr. 1-10-72-69-12

Komiteén har godkendt

- Tillægsanmeldelse nr. 1, anm.nr. 32690
- Protokol version 11. januar 2012
- Opslag version 11. januar 2012
- Deltagerinformation version 11. januar 2012

Side 1

Alle henvendelser vedrørende projektet bedes rettet til komitéens
sekretariat med henvisning til komitéens journalnummer.

Venlig hilsen

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Heidi Scheil Rasmussen'. It is written in a cursive, flowing script.

Heidi Scheil Rasmussen
sekretær

Center for Psykiatrisk Forskning, Århus Universitetshospital, Risskov
Skovagervej 2
8240 Risskov

Att: Mahmoud Ashkanian



Vedrørende projektet " Søvnarkitektur og perifere biomarkører for depression - et pilotstudie"

Ovennævnte projekt er den 13. december 2011 anmeldt til Region Midtjylland. Der er samtidig søgt om tilladelse til projektet.

Det fremgår af anmeldelsen, at du er projektansvarlig for projektets oplysninger.

Dato 22-12-2011

Sagsbehandler Annette Sand

Annette.Sand@stab.rm.dk

Tel. +45 7841 0161

Sagsnr. 1-16-02-236-11

Side 1

Behandlingen af oplysningerne ønskes påbegyndt den 2. januar 2012 og forventes at ophøre den 1. juli 2012.

Data slettes, anonymiseres eller indsendes til Statens Arkiver .

Oplysningerne vil blive behandlet på følgende adresse:

EEG afdelingen
Center for Psykiatrisk Forskning, Århus Universitetshospital, Risskov
Skovagervej 2
8240 Risskov

Og

Lab for Molekylær Neurobiologi
Center for Psykiatrisk Forskning, Århus Universitetshospital, Risskov-Skejby
Incuba Sciense Park
Brendstrupgårdsvej 102
8200 Århus N

Projektet omfatter ikke biobank.

Tilladelse

Der meddeles herved tilladelse til projektets gennemførelse. Region Midtjylland fastsætter i den forbindelse nedenstående vilkår.

Tilladelsen gælder indtil den 1. juli 2012.

Projektanmeldelsen vil henhøre til Region Midtjyllands generelle anmeldelse til Datatilsynet, "Sundhedsvidenskabelig forskning i Region Midtjylland", jf. persondatalovens §43 og godkendt af Datatilsynet under journalnummer 2007-58-0010.

Bemærk, at Datatilsynets journalnummer skal oplyses ved anmodninger og henvendelser til andre myndigheder, herunder Sundhedsstyrelsen.

Ved henvendelse til Region Midtjylland bedes dette **og** journalnummer for nærværende projekt anført.

Side 2

Opmærksomheden henledes på, at videregivelse af oplysninger fra patientjournaler til konkrete forskningsprojekter forudsætter godkendelse fra Sundhedsstyrelsen, jf. det nedenfor under pkt. 20 anførte.

Ifølge persondatalovens § 45. stk. 1 skal der forinden iværksættelse af behandling, som udelukkende finder sted i videnskabeligt eller statistisk øjemed, og som er omfattet af anmeldelsespigen i § 43, indhentes en udtalelse fra Datatilsynet.

Det er mellem Datatilsynet og regionerne aftalt, at denne anmeldelse for de enkelte konkrete offentlige forskningsprojekter fremover skal ske til regionen til vurdering og godkendelse.

Opmærksomheden skal henledes på følgende:
Efter persondataloven § 10 stk. 1, kan der behandles oplysninger som nævnt i lovens § 7, stk. 1 eller § 8, hvis dette alene sker med henblik på at udføre statistiske eller videnskabelige undersøgelser af væsentlig samfundsmæssig betydning, og hvis behandlingen er nødvendig for udførelsen af undersøgelsen.

Af § 10, stk. 2 fremgår endvidere, at oplysninger omfattet af § 10 stk. 1 ikke senere må behandles i andet end statistisk eller videnskabeligt øjemed. Det samme gælder de ikke-følsomme oplysninger, som indgår i behandlingen, jfr. § 10, stk. 2. Oplysningerne må således ikke efterfølgende anvendes til at træffe foranstaltninger eller afgørelser vedrørende de registrerede personer. Oplysningerne må endvidere kun videregives til tredjemand efter forudgående tilladelse og i givet fald kun med henblik på udførelse af undersøgelser i statistisk eller videnskabeligt øjemed, jfr. lovens § 10 stk. 3.

Eventuelle ændringer af de forhold, der indgår i anmeldelsen, skal anmeldes til Regionen.

Forskningsprojektet vil indgå i den samlede indberetning til Datatilsynet for igangværende forskningsprojekter i Region Midtjylland for 2012.

Tilladelse gives endvidere på nedenstående Generelle vilkår:

Ved tilladelsens udløb skal De særligt være opmærksom på følgende:

Hvis De ikke inden denne dato har fået tilladelsen forlænget, går Region Midtjylland ud fra, at projektet er afsluttet, og at personoplysningerne er slettet, anonymiseret, tilintetgjort eller overført til arkiv, jf. nedenstående vilkår vedrørende projektets afslutning. Anmeldelsen af Deres projekt fjernes derfor fra fortægnelsen over anmeldte behandlinger på Region Midtjyllands hjemmeside.

Region Midtjylland gør samtidig opmærksom på, at al behandling (herunder også opbevaring) af personoplysninger efter tilladelsens udløb er en overtrædelse af persondataloven, jf. § 70.

1. Mahmoud Ashkanian, Neuropsykiatrisk klinik
Center for Psykiatrisk Forskning, Århus Universitetshospital,
Risskov
Skovagervej 2
8240 Risskov

er ansvarlig for overholdelsen af de fastsatte vilkår.
2. Oplysningerne må kun anvendes til brug for projektets gennemførelse.
3. Behandling af personoplysninger må kun foretages af den projektansvarlige eller på foranledning af den projektansvarlige og på dennes ansvar.
4. Enhver, der foretager behandling af projektets oplysninger, skal være bekendt med de fastsatte vilkår.
5. De fastsatte vilkår skal tillige iagttages ved behandling, der foretages af databehandler.
6. Lokaler, der benyttes til opbevaring og behandling af projektets oplysninger, skal være indrettet med henblik på at forhindre uvedkommende adgang.
7. Behandling af oplysninger skal tilrettelægges således, at oplysningerne ikke hændeligt eller ulovligt tilintetgøres, fortabes eller forringes. Der skal endvidere foretages den fornødne kontrol



for at sikre, at der ikke behandles urigtige eller vildledende oplysninger. Urigtige eller vildledende oplysninger eller oplysninger, som er behandlet i strid med loven eller disse vilkår, skal berigtes eller slettes.

8. Oplysninger må ikke opbevares på en måde, der giver mulighed for at identificere de registrerede i et længere tidsrum end det, der er nødvendigt af hensyn til projektets gennemførelse.
9. En eventuel offentliggørelse af undersøgelsens resultater må ikke ske på en sådan måde, at det er muligt at identificere enkeltpersoner.
10. Eventuelle vilkår, der fastsættes efter anden lovgivning, forudsættes overholdt.

Side 4

Elektroniske oplysninger

11. Identifikationsoplysninger skal krypteres eller erstattes af et kodenummer el. lign. Alternativt kan alle oplysninger lagres krypteret. Krypteringsnøgle, kodnøgle m.v. skal opbevares forsvarligt og adskilt fra personoplysningerne.
12. Adgangen til projektdata må kun finde sted ved benyttelse af et fortroligt password. Password skal udskiftes mindst én gang om året, og når forholdene tilsiger det.
13. Ved overførsel af personhenførbar oplysninger via Internet eller andet eksternt netværk skal der træffes de fornødne sikkerhedsforanstaltninger mod, at oplysningerne kommer til uvedkommendes kendskab. Oplysningerne skal som minimum være forsvarligt krypteret under hele transmissionen. Ved anvendelse af interne net skal det sikres, at uvedkommende ikke kan få adgang til oplysningerne.
14. Udtagelige lagringsmedier, sikkerhedskopier af data m.v. skal opbevares forsvarligt aflåst og således, at uvedkommende ikke kan få adgang til oplysningerne.

Manuelle oplysninger

15. Manuelt projektmateriale, udskrifter, fejl- og kontrollister, m.v., der direkte eller indirekte kan henføres til bestemte personer, skal opbevares forsvarligt aflåst og på en sådan måde, at uvedkommende ikke kan gøre sig bekendt med indholdet.

Senest ved projektets afslutning skal materialet tilintetgøres eller oplysningerne, der kan henføres til enkeltpersoner, anonymiseres, således at det efterfølgende ikke er muligt at identificere de enkeltpersoner, hvortil materialet har kunnet henføres.

Oplysningspligt over for den registrerede

16. Hvis der skal indsamles oplysninger hos den registrerede (ved interview, spørgeskema, klinisk eller paraklinisk undersøgelse, behandling, observation m.v.) skal der uddeles/fremsendes nærmere information om projektet. Den registrerede skal heri oplyses om den dataansvarliges og den projektansvarliges navn, formålet med projektet, at det er frivilligt at deltage, og at et samtykke til deltagelse til enhver tid kan trækkes tilbage. Hvis oplysningerne skal videregives til brug i anden videnskabelig eller statistisk sammenhæng, skal der også oplyses om formålet med videregivelsen samt modtagerens identitet.
17. Den registrerede bør endvidere oplyses om, at projektet er anmeldt til Datatilsynet efter persondataloven, samt at Datatilsynet har fastsat nærmere vilkår for projektet til beskyttelse af den registreredes privatliv.

Indsightsret

18. Den registrerede har ikke krav på indsigt i de oplysninger, der behandles om den pågældende.

Videregivelse

19. Videregivelse af personhenførbare oplysninger til tredjepart må kun ske til brug i andet statistisk eller videnskabeligt øjemed.
20. Sundhedsstyrelsen kan i medfør af sundhedslovens § 46. stk. 2 godkende, at der til brug for et konkret registerforskningsprojekt (det vil sige uden brug af menneskeligt biologisk materiale), videregives oplysninger om enkeltpersoners helbredsforhold, øvrige rent private forhold og andre fortrolige oplysninger fra patientjournaler mv. Nærmere oplysninger herom kan hentes i Vejledning nr. 9962 af 17/04/2008.
21. Videregivelse må kun ske efter forudgående tilladelse fra Datatilsynet. Datatilsynet kan stille nærmere vilkår for videregivelsen samt for modtagerens behandling af oplysningerne.

Ændringer i projektet

22. Væsentlige ændringer i projektet skal anmeldes til Region Midtjylland (som ændring af eksisterende anmeldelse). Ændringer af mindre væsentlig betydning kan meddeles Datatilsynet.
23. *Ændring af tidspunktet for projektets afslutning skal altid anmeldes.*

Ved projektets afslutning

24. *Senest ved projektets afslutning skal oplysningerne slettes, anonymiseres eller tilintetgøres, således at det efterfølgende ikke*

er muligt at identificere enkeltpersoner, der indgår i undersøgelsen.

25. Alternativt kan oplysningerne overføres til videre opbevaring i Statens Arkiver (herunder Dansk Dataarkiv) efter arkivlovens regler.
26. Sletning af oplysninger fra elektroniske medier skal ske på en sådan måde, at oplysningerne ikke kan genetableres.
27. Den projektansvarlige skal meddele Regionen, når projektet er afsluttet, og oplysningerne slettet, anonymiseret, tilintetgjort eller overført til Statens Arkiver.

Ovenstående vilkår er gældende indtil videre. Region Midtjylland forbeholder sig senere at tage vilkårene op til revision, hvis der skulle vise sig behov for det.

Side 6

Anmeldelsen offentliggøres i fortægnelsen over anmeldte behandlinger på Region Midtjyllands hjemmeside www.Regionmidtjylland.dk

Offentliggørelse af forskningsresultater

Offentliggørelse af forskningsprojektets resultater må ikke indeholde oplysninger, der kan henføres til de registrerede. Ved offentliggørelse af Wordfiler eller PowerPoint præsentationer skal sikres, at alle personlige oplysninger slettes.
Vejledning til sikring heraf findes på Regions Midtjyllands hjemmeside, www.regionmidtjylland.dk samt pjece fra IT- og Telestyrelsen "Gemmer I på skjulte data i Office-filer?"

Opmærksomheden henledes endvidere på

- Lov om behandling af personoplysninger (persondataloven),
- *Bekendtgørelse om sikkerheds-foranstaltninger til beskyttelse af personoplysninger, som behandles for den offentlige forvaltning* (sikkerhedsbekendtgørelsen)
(Bkg. nr. 528 af 15. juni 2000) (vedlagt)
- Vejledning til bekendtgørelse nr. 528 af 15. juni 2000
(vedlagt)

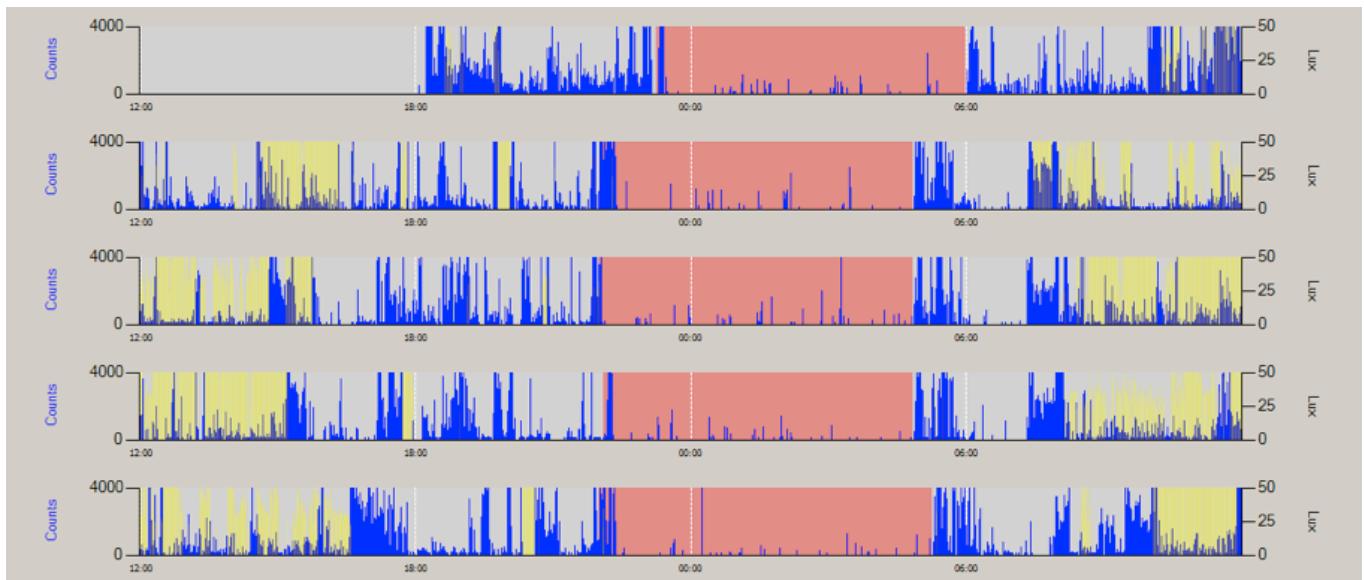
Alle kan læses/hentes på Datatilsynets hjemmeside under punktet "Lovgivning" på <http://www.datatilsynet.dk/>

Venlig hilsen

Annette Sand
Juridisk konsulent

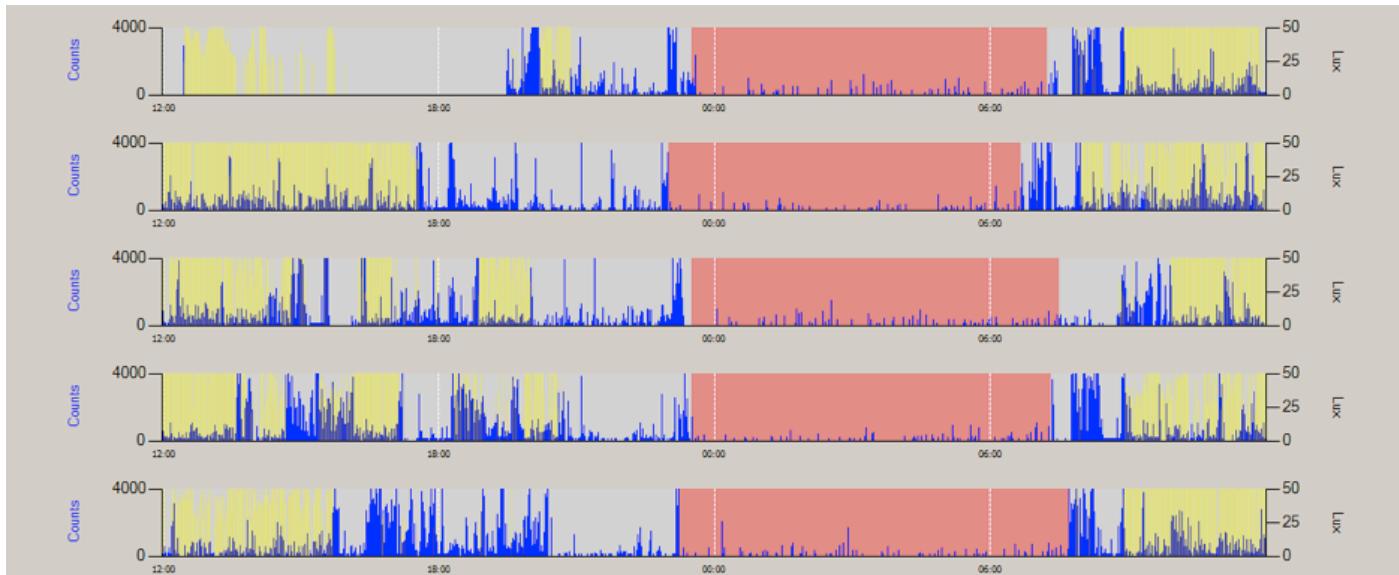
Appendix D: Actograms

Subject #1



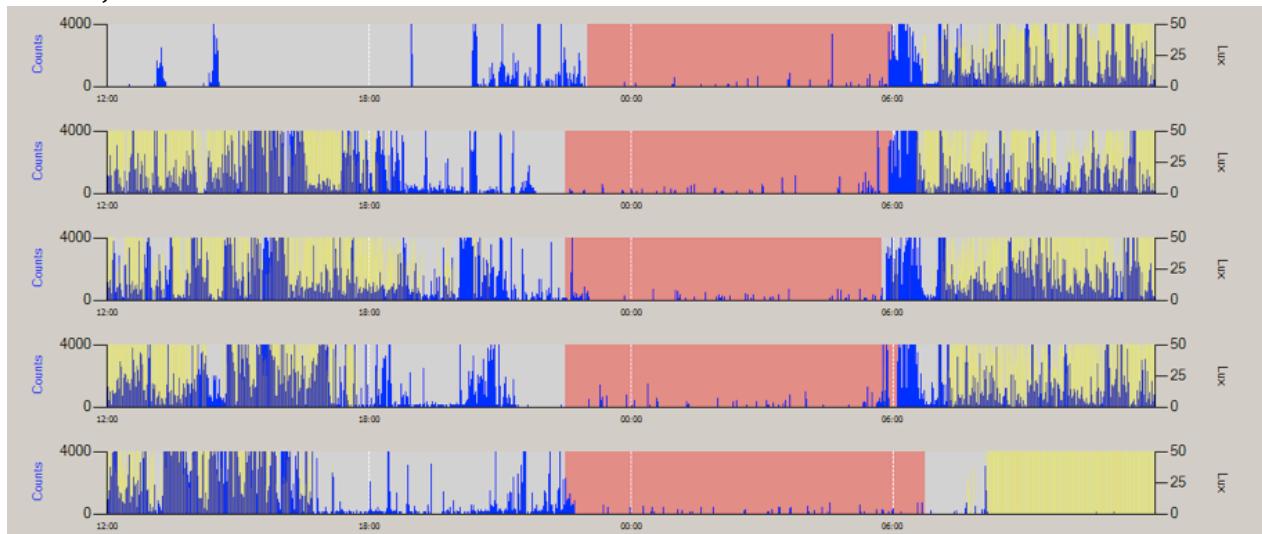
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	23.15	06.00	6.45
Day 2	22.05	04.50	6.45
Day 3	22.00	04.50	6.50
Day 4	22.05	04.50	6.45
Day 5	22.00	05.15	7.15

Subject #2



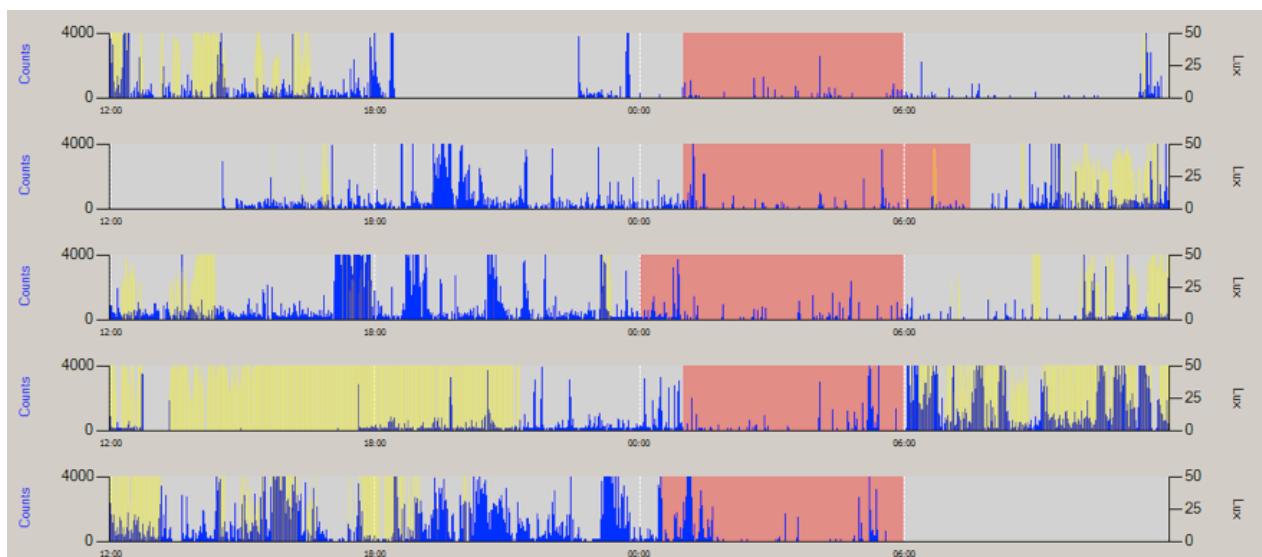
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	23.30	07.15	7.45
Day 2	23.00	06.40	7.40
Day 3	23.30	07.30	8.00
Day 4	23.30	07.20	7.50
Day 5	23.15	07.45	8.30

Subject #3



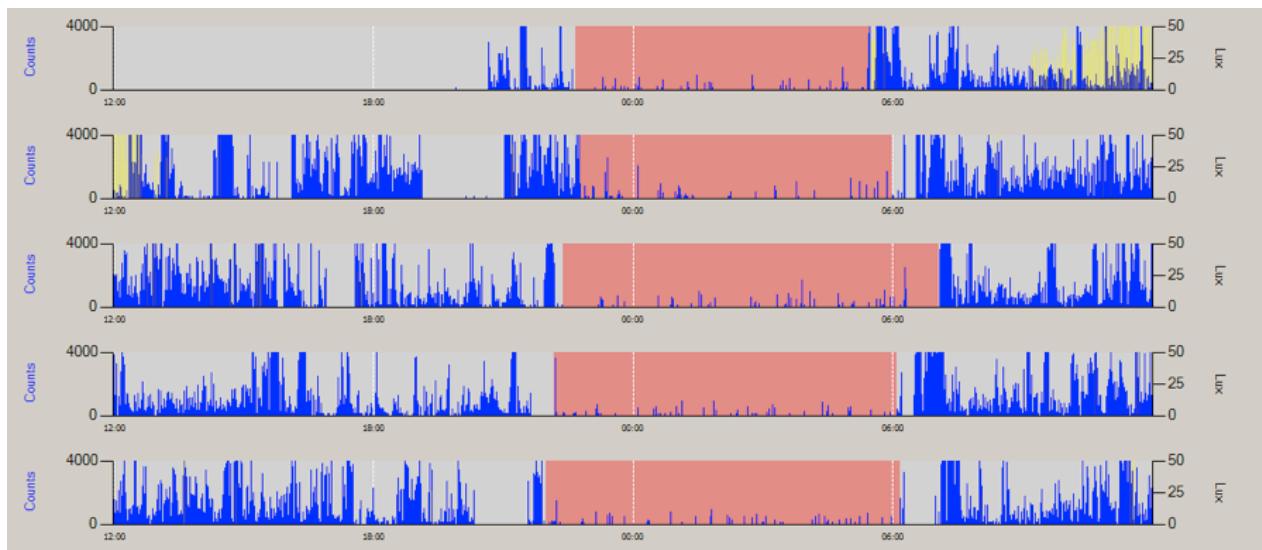
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	23.00	06.00	7.00
Day 2	22.30	06.00	7.30
Day 3	22.30	05.45	7.15
Day 4	22.30	06.10	7.40
Day 5	22.30	06.45	8.15

Subject #4



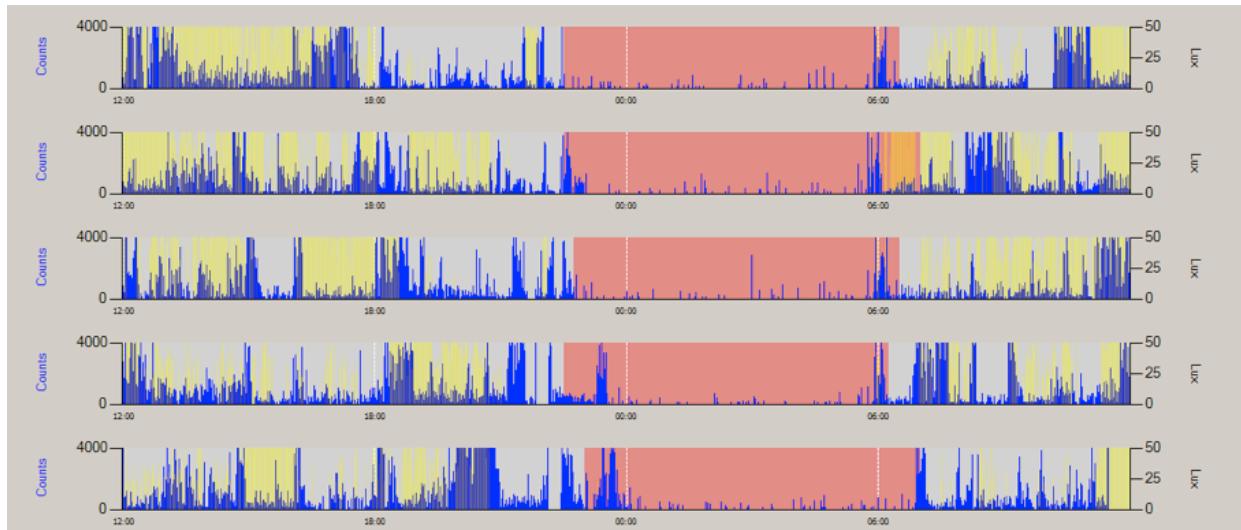
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	23.00	06.00	05.00
Day 2	22.30	07.30	06.30
Day 3	00.00	06.00	06.00
Day 4	01.00	06.00	05.00
Day 5	00.30	06.00	05.30

Subject #5



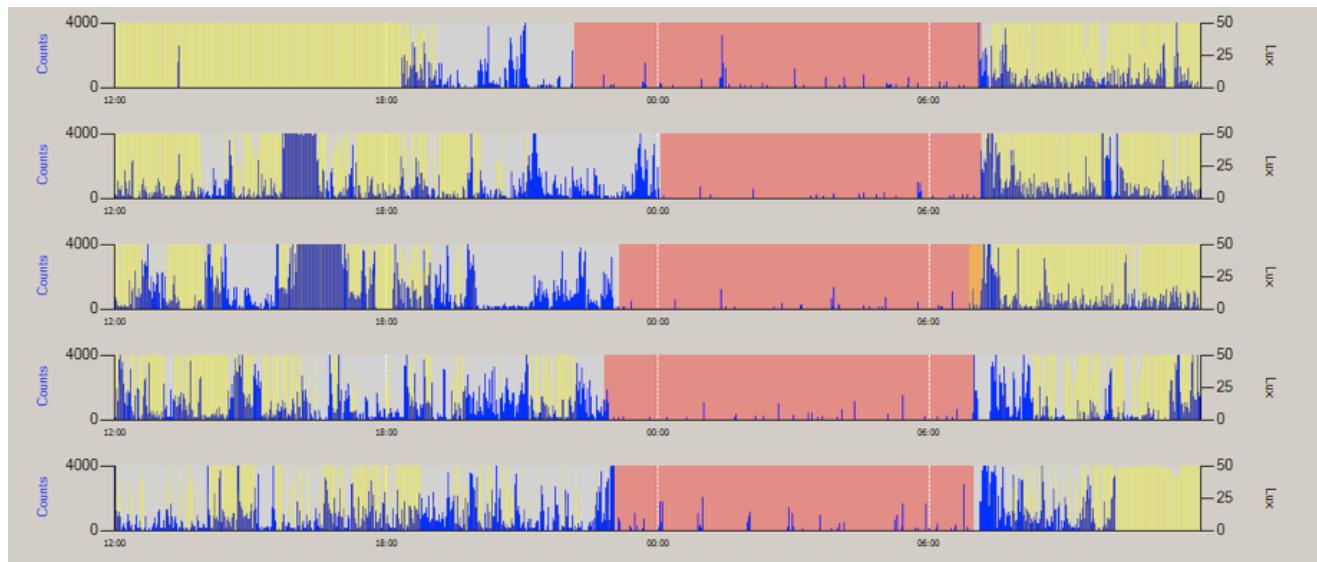
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	22.40	05.30	06.50
Day 2	22.45	06.00	07.15
Day 3	22.20	07.05	08.45
Day 4	22.10	06.05	07.55
Day 5	22.00	06.10	08.10

Subject #6



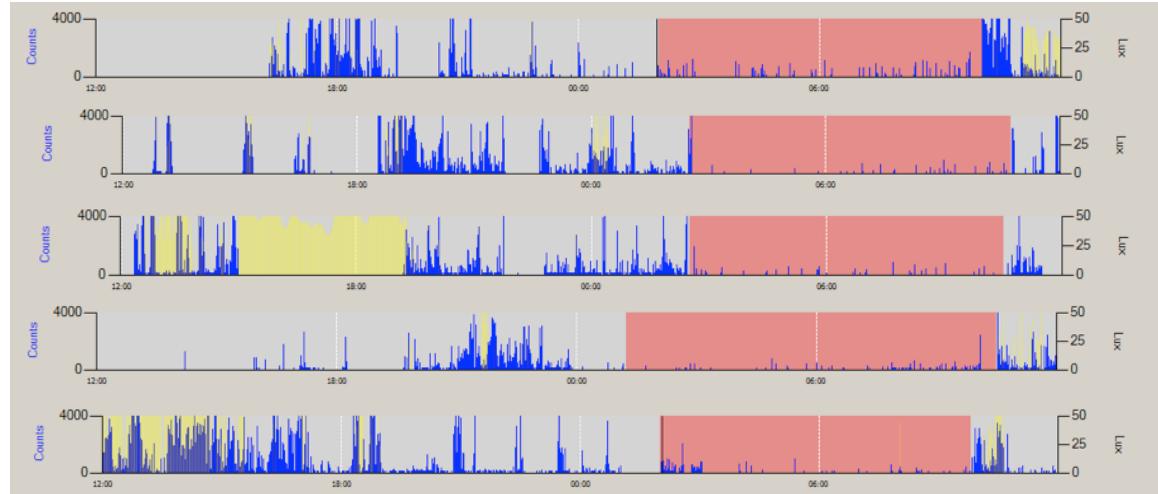
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	22.30	06.30	08.00
Day 2	22.30	07.00	08.30
Day 3	22.45	06.30	08.15
Day 4	22.30	06.15	07.45
Day 5	23.00	07.00	08.00

Subject #7



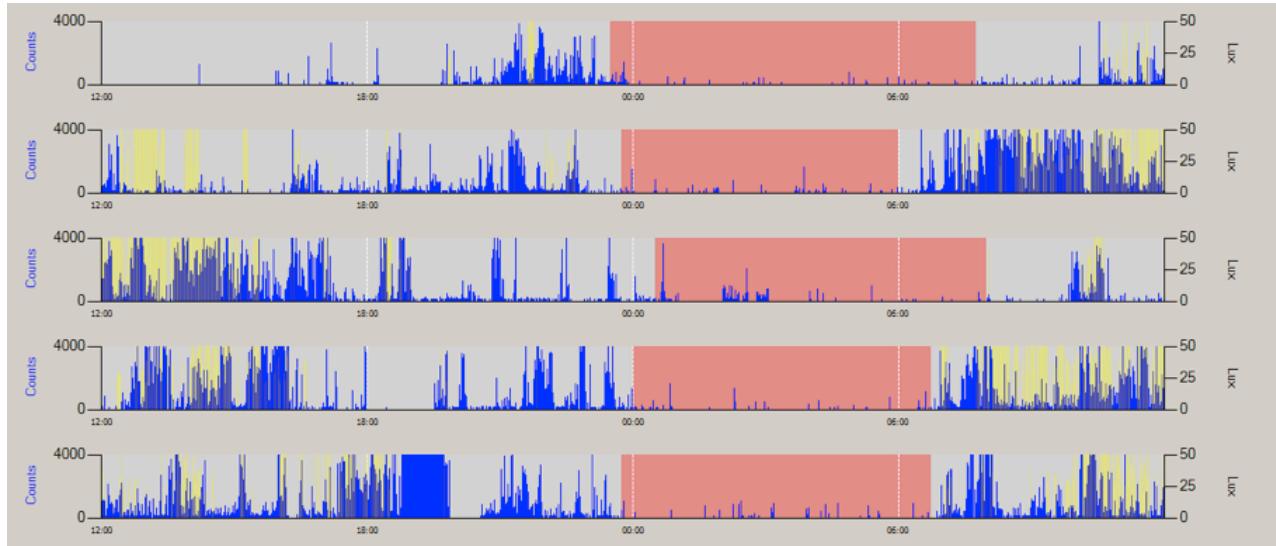
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day1	22.10	07.10	09.00
Day 2	00.05	07.10	07.05
Day 3	23.10	07.10	08.00
Day 4	22.50	07.00	08.10
Day 5	23.00	07.00	08.00

Subject #8



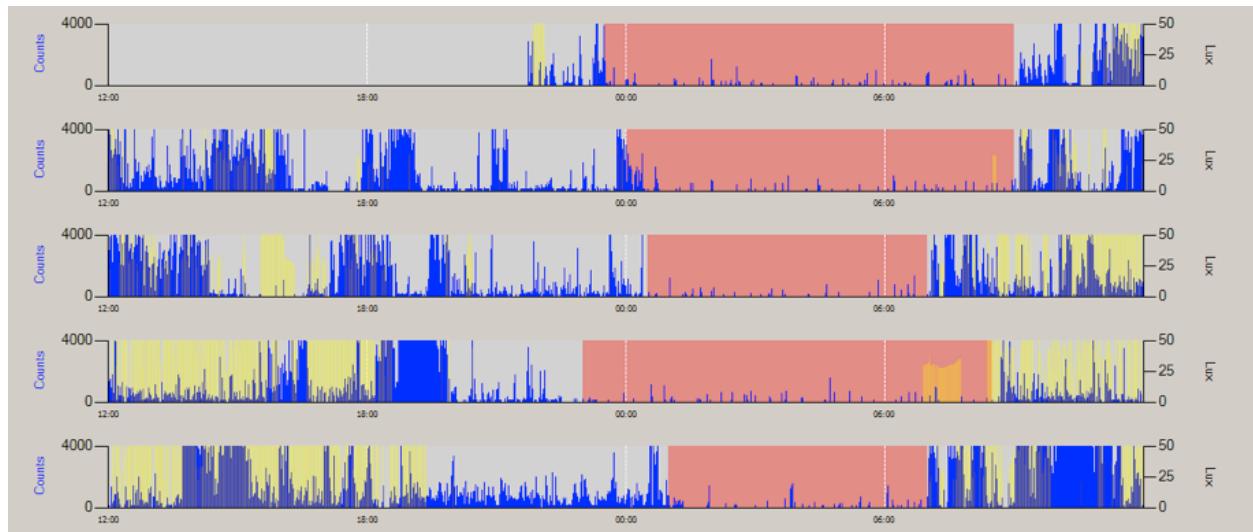
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day1	02.00	10.00	08.00
Day 2	02.30	10.45	08.15
Day 3	02.30	10.30	08.00
Day 4	01.15	10.30	09.15
Day 5	02.00	09.50	07.50

Subject #9



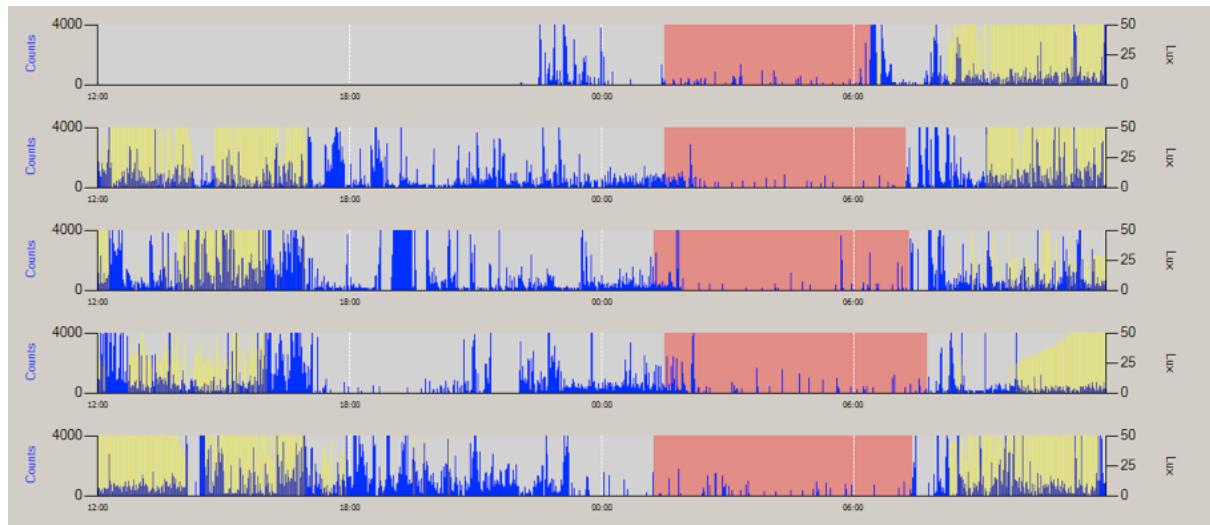
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	23.30	07.45	08.15
Day 2	23.45	06.00	06.15
Day 3	00.30	08.00	07.30
Day 4	00.00	06.45	06.45
Day 5	23.45	06.45	07.00

Subject #10



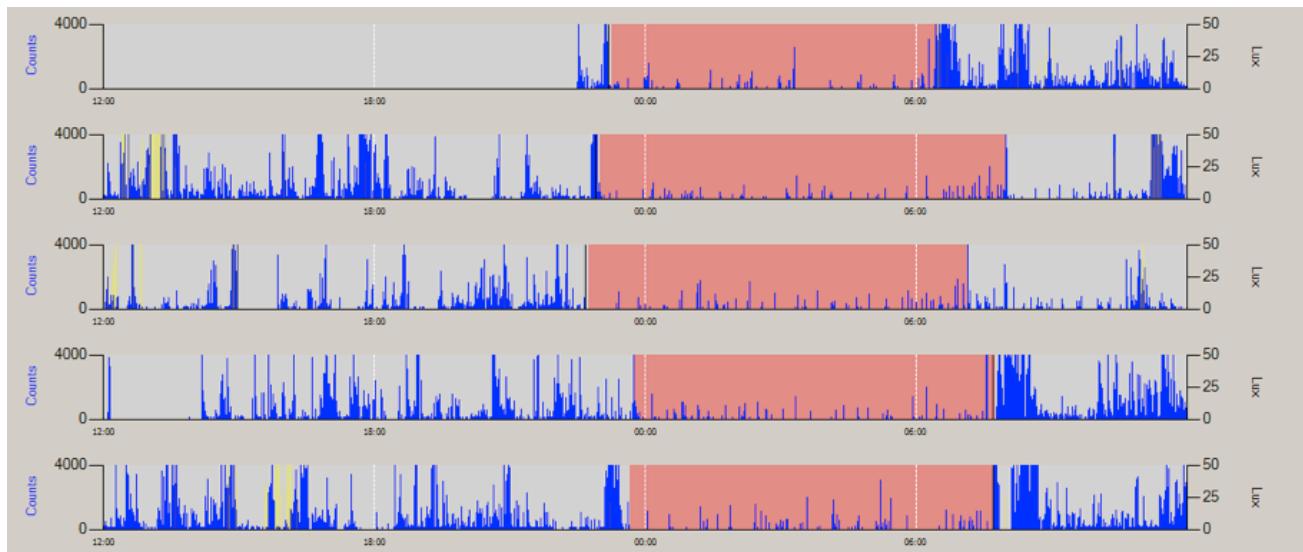
	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	23.30	09.00	09.30
Day 2	00.00	09.00	09.00
Day 3	00.30	07.00	06.30
Day 4	23.00	08.30	09.00
Day 5	01.00	07.00	06.00

Subject #11



	In bed	Out of bed	Total sleep time
Day 1	01.30	06.25	04.25
Day 2	01.30	07.15	05.45
Day 3	01.15	07.20	05.50
Day 4	01.30	07.45	06.15
Day 5	01.15	07.25	06.10

Subject #12



	In bed	Out of bed	Total bed time
Day 1	23.15	06.30	06.45
Day 2	23.00	08.00	09.00
Day 3	22.45	07.10	08.25
Day 4	23.45	07.45	08.00
Day 5	23.40	07.45	08.05

Appendix E: Raw Data

Subject #1

Plasma cortisol

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
08.00	1,198	1,151	1,174	171,10	5,53
09.00	1,498	1,613	1,556	121,67	8,16
10.00	1,891	1,982	1,937	90,59	4,30
11.00	2,411	2,32	2,366	66,83	2,97
12.00	1,887	2,151	2,019	85,31	11,59
13.00	2,209	2,033	2,121	79,28	7,01
14.00	2,398	2,451	2,424	64,18	1,66
15.00	2,742	2,633	2,688	53,66	2,80
16.00	3,042	2,698	2,87	47,43	7,86
17.00	3,238	3,371	3,304	35,18	2,33
18.00	3,391	3,462	3,427	32,26	1,16
19.00	3,082	3,116	3,099	40,58	0,66
20.00	3,42	3,171	3,296	35,40	4,38
21.00	2,958	3,027	2,992	43,65	1,45
22.00	3,056	2,962	3,009	43,16	1,94
23.00	2,518	2,524	2,521	60,08	0,19
00.00	2,567	2,524	2,546	59,09	1,20
01.00	2,836	2,669	2,752	51,37	4,10
02.00	2,627	2,567	2,597	57,07	1,64
03.00	2,164	2,064	2,114	79,66	4,01
04.00	1,411	1,264	1,338	146,60	13,66
05.00	1,496	1,518	1,507	126,69	1,66
06.00	0,947	1,009	0,978	209,24	10,16
07.00	0,92	0,887	0,903	227,66	6,25
08.00	0,88	0,876	0,878	234,89	0,79

Salivary cortisol

Time	Absorbances		Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	1,569	1,544	1,557	5,96	0,11
07.15	1,524	1,479	1,502	6,32	0,22
07.30	1,491	1,521	1,506	6,29	0,14
07.45	1,502	1,563	1,533	6,11	0,28
08.00	1,554	1,483	1,519	6,20	0,33

Plasma melatonin

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
08.00	2,240	2,331	2,286	20,57
09.00	3,149	2,996	3,073	4,88
10.00	2,635	2,595	2,615	12,39
11.00	2,976	2,845	2,911	7,11
12.00	2,809	2,784	2,797	8,95
13.00	2,711	2,807	2,759	9,61
14.00	2,791	2,683	2,737	10,01
15.00	2,788	2,801	2,795	8,98
16.00	2,991	2,816	2,903	7,22
17.00	2,608	2,592	2,600	12,70
18.00	2,571	2,577	2,574	13,26
19.00	2,655	2,765	2,710	10,50
20.00	2,320	2,260	2,290	20,44
21.00	1,936	1,792	1,864	36,17
22.00	1,349	1,283	1,316	71,34
23.00	1,399	1,489	1,444	60,96
00.00	1,273	1,304	1,289	73,78
01.00	1,263	1,276	1,269	75,56
02.00	1,313	1,320	1,317	71,28
03.00	1,583	1,499	1,541	54,13
04.00	1,487	1,637	1,562	52,73
05.00	1,475	1,405	1,440	61,26
06.00	1,428	1,399	1,413	63,30
07.00	1,685	*	1,685	47,28
08.00	2,245	2,213	2,229	22,28

Subject #2

Plasma cortisol

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
08.00	0,971	1,031	1,001	203,97
09.00	1,524	1,433	1,479	129,68
10.00	1,953	2,078	2,016	85,52
11.00	2,240	2,389	2,314	69,23
12.00	2,089	2,089	2,089	81,12
13.00	1,929	1,978	1,953	89,49
14.00	2,147	2,251	2,199	75,04
15.00	2,638	2,636	2,637	55,55
16.00	2,791	2,980	2,886	46,93
17.00	3,316	3,240	3,278	35,85
18.00	3,102	3,018	3,060	41,68
19.00	3,324	3,271	3,298	35,35
20.00	3,209	3,044	3,127	39,81
21.00	3,740	3,556	3,648	27,43
22.00	3,431	3,544	3,488	30,87
23.00				
00.00	2,989	2,882	2,936	45,37
01.00	3,242	3,000	3,121	39,34
02.00	3,229	3,080	3,154	38,41
03.00	3,113	3,329	3,221	36,57
04.00	2,784	2,762	2,773	49,90
05.00	1,411	1,511	1,461	118,13
06.00	0,869	0,884	0,877	197,20
07.00	1,051	0,942	0,997	174,40
08.00	0,880	0,867	0,873	197,92
				2,03

Salivary cortisol

Time	Absorbances	Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	1,606	1,542	1,574	5,85
07.15	1,696	1,751	1,723	5,00
07.30	1,638	1,644	1,641	5,45
07.45	1,611	1,581	1,596	5,72
08.00	1,590	1,580	1,585	5,78

Plasma melatonin

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
08.00	0,968	1,035	1,002	39,96
09.00	1,284	1,288	1,286	23,70
10.00	1,323	1,280	1,301	22,99
11.00	1,395	1,334	1,364	20,29
12.00	1,222	1,117	1,170	29,53
13.00	2,252	2,017	2,134	1,16
14.00	2,489	2,576	2,533	14,18
15.00	2,499	2,351	2,425	16,77
16.00	2,581	2,327	2,454	16,04
17.00	2,492	2,469	2,481	15,39
18.00	2,652	2,439	2,545	13,89
19.00	2,496	2,408	2,452	16,09
20.00	2,431	2,399	2,415	17,02
21.00	1,877	1,892	1,885	35,23
22.00	2,437	2,227	2,332	19,24
23.00				
00.00	1,635	1,575	1,605	50,03
01.00	0,793	0,832	0,813	135,05
02.00	0,420	0,448	0,434	230,80
03.00	0,453	0,453	0,453	151,05
04.00	0,463	0,444	0,453	151,05
05.00	0,603	0,552	0,577	104,04
06.00	0,637	0,725	0,681	80,30
07.00	1,003	0,819	0,911	49,00
08.00	1,108	1,068	1,088	34,19

Subject #3

Plasma cortisol

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
15.00	1,471	1,424	1,448	119,36
16.00	1,376	1,418	1,397	123,99
17.00	1,989	2,067	2,028	80,25
18.00	1,980	1,953	1,966	83,50
19.00	2,458	2,322	2,390	63,78
20.00	2,444	2,364	2,404	63,22
21.00	2,820	2,669	2,744	50,85
22.00	2,909	3,016	2,962	43,96
23.00	2,940	2,511	2,726	51,48
00.00	3,187	2,798	2,992	43,08
01.00	3,247	3,064	3,156	38,37
02.00	2,820	2,758	2,789	49,39
03.00	0,813	0,736	0,774	221,60
04.00	1,304	1,140	1,222	142,46
05.00	1,602	1,602	1,602	106,68
06.00	1,964	1,907	1,936	85,19
07.00	1,251	1,280	1,266	137,47
08.00	0,520	0,527	0,523	318,50
09.00	0,980	0,962	0,971	178,83
10.00	1,347	1,187	1,267	137,35
11.00	1,444	1,353	1,399	123,79
12.00	1,587	1,453	1,520	113,14
13.00	1,587	1,587	1,587	107,86
14.00	1,384	1,533	1,459	118,33
15.00	1,576	1,498	1,537	111,78

Salivary cortisol

Time	Absorbances	Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	1,787	1,713	1,750	4,86
07.15	1,634	1,899	1,767	4,78
07.30	1,568	1,731	1,649	5,40
07.45	1,851	1,576	1,713	5,05
08.00	1,718	1,656	1,687	5,20

Plasma melatonin

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
15.00	1,801	1,821	0,635	0,681
16.00	1,444	1,336	17,274	3,476
17.00	1,663	1,651	6,533	0,313
18.00	1,6	1,553	9,531	1,265
19.00				
20.00	1,423	1,461	14,977	1,175
21.00	1,417	1,335	17,915	2,702
22.00	1,395	1,423	16,434	0,881
23.00	1,531	1,415	13,679	3,426
00.00	1,684	1,705	5,138	0,553
01.00	1,548	1,577	10,07	0,802
02.00	1,037	1,015	38,791	1,26
03.00	1,048	1,088	35,618	2,056
04.00	1,187	1,152	28,863	1,501
05.00	1,037	0,957	41,108	4,711
06.00	1,249	1,255	24,106	0,204
07.00	1,319	1,3	21,121	0,661
08.00	1,479	1,457	13,874	0,632
09.00	1,725	1,791	2,793	1,763
10.00	1,816	1,809	0,564	0,236
11.00	1,786	1,725	2,878	1,637
12.00	1,765	1,681	4,085	2,201
13.00	1,805	1,798	1,058	0,213
14.00	1,751	1,765	2,793	0,393
15.00	1,692	1,451	9,716	6,614

Subject #4

Plasma cortisol

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
20.00	1,236	1,244	1,240	71,70
21.00	1,560	1,578	1,569	49,39
22.00	1,853	1,831	1,842	36,09
23.00	2,136	2,147	2,141	24,76
00.00	2,284	2,167	2,226	21,97
01.00	2,353	2,131	2,242	21,44
02.00	2,340	2,464	2,402	16,60
03.00	2,369	2,429	2,399	16,69
04.00	2,482	2,582	2,532	12,94
05.00	2,433	2,196	2,314	19,20
06.00	1,296	1,313	1,304	66,57
07.00	0,691	0,660	0,676	151,66
08.00	0,784	0,836	0,810	123,63
09.00	0,898	0,842	0,870	113,66
10.00	1,160	1,102	1,131	81,51
11.00	1,309	1,249	1,279	68,55
12.00	1,293	1,473	1,383	60,86
13.00	1,211	1,180	1,196	75,52
14.00	1,293	1,353	1,323	65,15
15.00	1,371	1,482	1,427	57,95
16.00	1,189	1,184	1,187	76,31
17.00	1,300	1,238	1,269	69,34
18.00	1,409	1,491	1,450	56,45
19.00	1,529	1,391	1,460	55,82
20.00	2,336	2,456	2,396	80,50

Salivary cortisol

Time	Absorbances	Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	1,792	1,830	1,811	4,56
07.15	1,430	1,501	1,466	6,57
07.30	1,446	1,389	1,417	6,92
07.45	1,414	1,359	1,387	7,16
08.00	1,587	1,602	1,594	5,73

Plasma melatonin

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
20.00	1,576	1,529	1,553	11,252	0,751
21.00	1,681	1,684	1,683	5,578	0,069
22.00	1,421	1,44	1,431	15,467	0,574
23.00	1,44	1,356	1,398	16,912	2,678
00.00	1,539	1,481	1,51	12,148	1,635
01.00	1,109	1,037	1,073	35,232	3,669
02.00	0,817	0,799	0,808	60,636	1,698
03.00	0,58	0,564	0,572	105,542	3,218
04.00	0,591	0,613	0,602	97,525	4,028
05.00	0,604	0,589	0,597	98,879	2,662
06.00	0,684	0,647	0,665	83,391	5,244
07.00	0,549	0,523	0,536	116,64	6,311
08.00	0,624	0,549	0,587	101,498	14,204
09.00	2,332	2,284	76,534	30,07	1,144
10.00	2,957	2,675	2,816	16,021	4,554
11.00	3,029	2,825	2,927	13,585	3,043
12.00	3,101	2,981	3,041	16,161	6,986
13.00	3,224	2,847	3,035	11,388	5,261
14.00	2,996	2,915	2,955	13,001	1,19
15.00	3,1	3,209	3,155	9,13	1,41
16.00	3,212	3,123	3,167	8,9	1,143
17.00	3,304	3,207	3,255	7,349	1,183
18.00	3,272	3,097	3,185	8,588	2,214
19.00	3,165	3,152	3,159	9,057	0,172
20.00	3,188	3,197	3,193	8,445	0,118

Subject #5

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
10.00	1,327	1,378	1,352	63,04
11.00	1,411	1,598	1,504	53,10
12.00	1,567	1,353	1,460	55,82
13.00	1,384	1,316	1,350	63,20
14.00	1,476	1,429	1,452	56,31
15.00	1,562	1,518	1,540	51,02
16.00	1,696	1,747	1,721	41,56
17.00	1,924	2,027	1,976	30,71
18.00	1,869	1,773	1,821	37,00
19.00	1,858	1,833	1,846	35,95
20.00	1,578	1,667	1,622	46,50
21.00	1,918	1,842	1,880	34,51
22.00	2,047	2,000	2,023	28,92
23.00	2,022	1,993	2,008	29,49
00.00	3,870	3,915	3,893	27,12
01.00	4,241	4,013	4,127	22,82
02.00	3,666	3,855	3,760	29,73
03.00	2,395	2,326	2,360	71,66
04.00	2,181	2,095	2,138	82,50
05.00	1,375	1,528	1,451	133,28
06.00	1,355	1,390	1,373	141,83
07.00	0,744	0,768	0,756	256,24
08.00	0,651	0,718	0,684	149,50
09.00	1,064	1,122	1,093	85,32
10.00	1,433	1,380	1,407	59,27

Salivary cortisol

Time	Absorbances	Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	1,331	1,263	1,297	7,91
07.15	1,190	1,081	1,136	9,58
07.30	1,271	1,348	1,309	7,80
07.45	1,490	1,660	1,575	5,85
08.00	1,394	1,396	1,395	7,09

Plasma melatonin

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
10.00	2,989	3,097	3,043	11,242	1,493
11.00	3,036	3,071	3,053	11,037	0,476
12.00	2,873	3,22	3,047	11,167	4,795
13.00	3,000	2,791	2,895	14,267	3,19
14.00	3,156	3,107	3,131	9,559	0,645
15.00	2,904	2,979	2,941	13,292	1,102
16.00	2,976	2,875	2,925	13,627	1,512
17.00	3,035	2,872	2,953	13,042	2,384
18.00	3,223	3,201	3,212	8,103	0,266
19.00	3,541	3,476	3,509	3,287	0,693
20.00	3,233	3,336	3,285	6,849	1,227
21.00	3,131	3,212	3,171	8,828	1,038
22.00	2,761	2,708	2,735	17,923	0,908
23.00	2,551	2,58	2,565	22,265	0,566
00.00	1,803	1,811	1,807	51,674	0,312
01.00	1,387	1,303	1,345	86,096	5,99
02.00	1,176	1,145	1,161	107,666	2,96
03.00	1,031	1,017	1,024	128,908	1,669
04.00	1,231	1,115	1,173	106,046	10,986
05.00	1,396	1,399	1,397	80,995	0,176
06.00	1,64	1,655	1,647	61,324	0,69
07.00	2,115	1,992	2,053	39,718	3,699
08.00	2,545	2,508	2,527	23,337	0,743
09.00	3,064	3,144	3,104	10,069	1,064
10.00	2,951	3,017	2,984	12,417	0,947

Subject #6

Plasma cortisol

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
12.00	1,513	1,511	1,512	147,06	0,14
13.00	1,016	0,816	0,916	235,89	33,56
14.00	1,453	1,476	1,464	151,78	1,60
15.00	1,904	2,138	2,021	108,77	9,80
16.00	1,498	1,593	1,546	143,90	6,27
17.00	2,062	2,011	2,037	107,86	2,11
18.00	1,838	2,009	1,923	114,81	7,79
19.00					
20.00	1,647	1,413	1,530	145,36	15,64
21.00	1,904	1,869	1,887	117,20	1,67
22.00	2,433	2,420	2,427	88,06	0,42
23.00	2,220	2,207	2,213	98,20	0,48
00.00	2,324	2,200	2,262	95,74	4,35
01.00	2,769	2,742	2,756	74,90	0,69
02.00	3,262	3,076	3,169	61,35	3,91
03.00	3,760	2,831	3,296	57,70	18,68
04.00	1,382	1,327	1,354	163,75	4,58
05.00	1,187	1,116	1,151	191,04	7,80
06.00	1,380	1,084	1,232	179,20	29,08
07.00	0,567	0,656	0,611	340,24	32,01
08.00	0,560	0,778	0,669	313,47	67,16
09.00	1,576	1,578	1,577	141,07	0,14
10.00	0,918	0,927	0,922	234,33	1,46
11.00	1,151	1,142	1,147	191,73	0,98
12.00	1,231	1,131	1,181	186,49	10,49

Salivary cortisol

Time	Absorbances		Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	1,436	1,704	1,570	5,88	1,19
07.15	1,971	2,071	2,021	3,64	0,28
07.30	1,299	1,274	1,287	8,01	0,16
07.45	0,881	1,084	0,983	11,68	2,35
08.00	1,023	1,051	1,037	10,86	0,28

Plasma melatonin

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
12.00	3,473	3,239	3,356	5,667
13.00	3,324	2,991	3,157	9,082
14.00	3,725	3,665	3,695	0,598
15.00	3,191	3,301	3,246	7,509
16.00	3,413	3,271	3,342	5,896
17.00	3,139	3,2	3,169	8,864
18.00	3,313	3,536	3,425	4,573
19.00				
20.00	3,315	3,317	3,316	7,899
21.00	3,153	3,068	3,111	10,991
22.00	3,377	3,311	3,344	7,496
23.00	3,137	2,96	3,049	11,981
00.00	1,988	1,763	1,875	41,209
01.00	1,669	1,689	1,679	50,046
02.00	1,679	1,683	1,681	49,979
03.00	0,929	0,828	0,879	138,641
04.00	1,34	1,336	1,338	72,366
05.00	1,431	1,145	1,288	76,792
06.00	1,599	1,529	1,564	56,371
07.00	2,885	2,796	2,841	15,545
08.00	2,873	2,445	2,659	19,026
09.00	3,187	3,291	3,239	9,034
10.00	2,944	2,997	2,971	13,271
11.00	3,135	3,056	3,095	11,233
12.00	1,808	1,873	1,841	42,627

Subject #7

Plasma cortisol

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
16.00	0,584	0,584	0,584	287,90	0,00
17.00	0,887	0,891	0,889	194,66	0,59
18.00	1,440	1,271	1,356	128,02	11,93
19.00	1,056	0,958	1,007	172,71	11,56
20.00	1,278	1,176	1,227	141,93	8,52
21.00	1,853	1,873	1,863	89,35	0,83
22.00	1,333	1,273	1,303	133,42	4,52
23.00	1,127	1,040	1,084	160,77	9,02
01.00	1,704	2,311	2,008	90,92	27,48
02.00	2,618	3,164	2,891	51,00	12,73
03.00	3,173	2,967	3,070	45,46	4,30
04.00	3,433	3,440	3,437	35,70	0,11
05.00	1,564	1,367	1,466	136,07	15,53
06.00	1,980	1,471	1,726	111,24	30,24
07.00	0,538	0,567	0,552	370,91	12,41
08.00	0,796	1,144	0,970	215,05	58,32
09.00	1,011	1,200	1,106	187,23	24,57
10.00	1,662	1,680	1,671	115,86	1,10
11.00	1,680	2,269	1,974	93,05	27,48
12.00	1,787	1,378	1,582	124,02	28,27
13.00	2,731	2,647	2,689	58,05	2,22
14.00	1,929	1,956	1,942	95,17	1,26
15.00	2,536	2,513	2,524	64,52	0,65
16.00	2,344	2,382	2,363	71,64	1,25

Salivary cortisol

Time	Absorbances		Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	1,139	1,159	1,149	9,42	0,16
07.15	1,443	1,469	1,456	6,64	0,13
07.30	2,447		2,447	2,18	
07.45	1,529	1,628	1,578	5,82	0,43
08.00	0,647	0,755	0,701	3,51	0,70

Plasma melatonin

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
16.00	3,360	3,265	3,312	7,95
17.00	3,359	3,173	3,266	8,63
18.00	3,297	3,425	3,361	7,25
19.00	3,452	3,149	3,301	8,12
20.00	2,983	3,124	3,053	11,91
21.00	2,852	2,845	2,849	15,40
22.00	1,951	1,527	1,739	47,15
23.00	1,940	1,957	1,949	38,38
00.00	1,975	1,660	1,817	43,61
01.00	1,455	1,435	1,445	64,11
02.00	1,045	1,087	1,066	102,73
03.00	1,832	1,857	1,845	42,46
04.00	1,028	1,028	1,028	108,62
05.00	1,029	0,971	1,000	113,34
06.00	1,445	1,460	1,453	63,54
07.00	2,681	2,524	2,603	20,20
08.00	2,596	2,511	2,553	21,26
09.00	2,888	2,975	2,931	13,94
10.00	3,171	3,125	3,148	10,41
11.00	3,280	3,160	3,220	9,31
12.00	3,232	3,277	3,255	8,80
13.00	3,111	2,709	2,910	14,31
14.00	2,980	2,951	2,965	13,36
15.00	3,163	3,036	3,099	11,17
16.00	2,929	2,945	2,929	13,98

Subject #8

Plasma cortisol

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
16.00	1,909	1,827	1,868	99,39	9,26
17.00	2,453	2,142	2,298	74,79	10,89
18.00	1,047	1,064	1,056	196,76	2,50
19.00	2,109	1,898	2,003	91,20	9,44
20.00	1,302	1,242	1,272	160,34	6,05
21.00	1,936	1,838	1,887	98,97	4,86
22.00	2,744	2,316	2,530	64,29	12,66
23.00	2,849	2,571	2,710	57,27	7,22
00.00	3,218	2,911	3,064	45,62	6,41
01.00	3,602	3,224	3,413	36,27	6,53
02.00	4,133	4,022	4,078	22,38	1,41
03.00	4,171	3,758	3,964	24,47	5,52
04.00	3,940	4,540	4,240	19,55	7,19
05.00	3,956	3,671	3,813	27,41	4,06
06.00	3,156	3,044	3,100	44,58	2,27
07.00	2,067	2,576	2,321	73,65	17,60
08.00	2,569	2,516	2,542	63,78	1,55
09.00	0,811	0,849	0,830	252,00	8,09
10.00	1,498	1,627	1,562	126,00	8,09
11.00	1,871	2,251	2,061	87,65	16,22
12.00	2,040	1,944	1,992	91,91	4,31
13.00	1,689	1,607	1,648	117,93	5,22
14.00	1,382	1,398	1,390	144,84	1,34
15.00	1,824	2,096	1,960	93,99	12,63
16.00	2,220	2,004	2,112	83,63	8,95

Salivary cortisol

Time	Absorbances		Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	2,04	2,077	2,058	3,498	0,1
07.15	1,86	1,739	1,799	4,617	0,416
07.30	1,629	1,597	1,613	5,616	0,135
07.45	1,472	1,622	1,547	6,019	0,679
08.00	1,301	1,162	1,232	8,532	0,985

Plasma melatonin

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
16.00	2,823	2,784	2,803	16,23
17.00	2,967	2,773	2,87	3,443
18.00	3,184	2,811	2,997	2,161
19.00	2,596	2,885	2,741	4,926
20.00	3	2,935	2,967	2,447
21.00	2,907	3,089	2,998	2,154
22.00	2,848	2,715	2,781	4,439
23.00	2,992	2,703	2,847	3,689
00.00	3,227	3,148	3,187	0,573
01.00	1,876	1,856	1,866	21,907
02.00	1,693	1,84	1,767	25,04
03.00	2,635	2,757	2,696	5,483
04.00	1,968	2,023	1,995	18,328
05.00	2,419	2,317	2,368	10,399
06.00	2,003	1,752	1,877	21,572
07.00	1,749	2,069	1,909	20,65
08.00	1,561	1,749	1,655	29,027
09.00	0,57	0,527	0,548	88,748
10.00	2,242	1,727	1,985	3,324
11.00	1,395	1,287	1,341	21,267
12.00	1,423	1,464	1,444	17,218
13.00	1,523	1,447	1,485	15,737
14.00	1,596	1,59	1,593	12,261
15.00	1,623	1,524	1,574	12,851
16.00	1,579	1,482	1,53	14,209

Subject #9

Plasma cortisol

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
22.00	3,011	3,500	49,77	9,65
23.00	2,889	3,271	54,86	8,25
00.00	3,382	3,409	46,00	0,49
01.00	3,191	3,073	53,29	2,47
02.00	1,211	1,340	168,34	12,33
03.00	1,253	1,076	184,54	19,89
04.00	1,807	2,009	107,87	9,77
05.00	2,002	1,853	106,52	7,06
06.00	1,149	1,240	106,52	7,06
07.00	0,978	0,951	179,92	9,73
08.00	1,529	1,613	221,43	4,08
09.00	1,560	1,542	134,91	5,67
10.00	1,409	1,431	136,83	1,22
11.00	2,256	1,922	150,53	1,77
12.00	1,282	1,236	96,44	13,84
13.00	1,876	1,956	170,62	4,56
14.00	2,598	2,384	107,34	3,83
15.00	1,764	2,011	76,22	6,55
16.00	2,222	2,293	109,25	12,14
17.00	2,553	2,293	87,21	2,58
18.00	1,929	1,884	79,23	8,37
19.00	2,620	2,409	107,95	2,14
20.00	3,736	3,880	75,22	6,38
21.00	3,736	3,880	36,24	2,21
22.00	3,313	3,251	49,02	1,20

Salivary cortisol

Time	Absorbances	Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	0,906	0,992	0,949	1,73
07.15	0,937		0,937	1,80
07.30	0,859		0,859	2,29
07.45	0,722	0,656	0,689	3,62
08.00	0,72	0,746	0,733	0,44
				0,15

Plasma melatonin

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
22.00	2,257	2,072	2,165	26,62	17,83
23.00	2,080	2,072	2,076	32,84	0,33
00.00	2,103	1,911	2,007	36,53	6,87
01.00	1,991	1,991	1,991	35,40	0,00
02.00	1,715	1,728	1,722	48,31	0,34
03.00	1,493	1,556	1,525	55,47	1,62
04.00	1,411	1,364	1,388	60,53	1,26
05.00	1,576	1,645	1,610	52,35	1,77
06.00	1,793	1,232	1,512	55,90	14,90
07.00	1,432		1,432	58,86	
08.00	1,487	1,571	1,529	55,30	2,16
09.00	1,849	1,704	1,776	46,25	3,90
10.00	1,911	1,909	1,910	40,94	0,06
11.00	1,957	1,947	1,952	39,11	0,32
12.00	1,841	1,851	1,846	43,56	0,28
13.00	1,829	1,841	1,835	43,99	0,33
14.00	1,665	1,739	1,702	49,03	1,92
15.00	1,684	1,595	1,640	51,30	2,28
16.00	1,652	1,641	1,646	51,05	0,28
17.00	1,345	1,317	1,331	62,70	0,77
18.00	1,532	1,447	1,490	56,74	2,20
19.00	1,391	1,436	1,414	59,55	1,19
20.00	1,889	2,076	1,982	37,71	6,35
21.00	1,275	1,230	1,252	25,27	1,53
22.00	1,874	1,844	1,846	5,92	0,44

Subject #10

Plasma cortisol

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
22.00	3,747	3,411	3,579	50,19	5,97
23.00	3,536	3,567	3,551	50,89	0,56
00.00	3,438	3,378	3,408	54,63	1,14
01.00	3,931	3,771	3,851	43,67	2,59
02.00	4,178	4,356	4,267	34,69	2,57
03.00	3,633	3,682	3,658	48,24	0,84
04.00	3,464	3,311	3,388	55,17	2,93
05.00	3,244	3,322	3,283	58,05	1,55
06.00	1,358	1,304	1,331	166,51	4,53
07.00	0,778	0,791	0,784	271,39	2,95
08.00	0,856	0,882	0,869	247,38	4,88
09.00	1,051	1,038	1,044	209,08	1,74
10.00	1,613	1,613	1,613	137,84	0,00
11.00	1,778	1,784	1,781	124,54	0,34
12.00	2,058	1,940	1,999	110,10	5,03
13.00	2,138	2,131	2,134	102,35	0,26
14.00	2,416	2,551	2,483	85,60	4,09
15.00	2,951	2,867	2,909	72,28	2,05
16.00	2,873	2,904	2,889	72,96	0,76
17.00	3,300	3,220	3,260	61,26	1,63
18.00	3,680	3,500	3,590	52,42	3,18
19.00	3,302	3,758	3,530	53,94	8,27
20.00	3,498	3,342	3,420	56,82	2,95
21.00	4,151	3,780	3,966	43,68	5,71
22.00	3,980	4,160	4,070	41,45	2,67

Salivary cortisol

Time	Absorbances		Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	0,701	0,592	0,647	4,04	0,81
07.15	0,519	0,537	0,528	5,53	0,19
07.30	0,255	0,247	0,251	14,62	0,41
07.45	0,455		0,455	6,81	
08.00	0,505	0,511	0,508	5,84	0,08

Plasma melatonin

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
22.00	2,639	2,157	2,398	9,88
23.00	2,253	2,005	2,129	15,12
00.00	1,932	1,853	1,893	21,13
01.00	1,232	1,260	1,246	50,07
02.00	1,068	1,073	1,071	64,03
03.00	0,849	1,012	0,931	14,04
04.00	0,820	0,743	0,781	100,23
05.00	0,772	0,935	0,853	89,05
06.00	0,629	0,588	0,609	136,81
07.00	1,241	1,156	1,199	53,44
08.00	1,280	1,264	1,272	48,32
09.00	1,808	2,012	1,910	20,63
10.00	2,535	2,425	2,480	8,54
11.00	2,153	2,137	2,145	14,77
12.00	2,401	2,520	2,461	8,85
13.00	1,896	1,756	1,826	23,13
14.00	1,929	1,973	1,951	19,49
15.00	1,996	1,941	1,969	19,02
16.00	2,495	2,515	2,505	8,16
17.00	2,400	2,311	2,355	10,62
18.00	2,467	2,483	2,475	8,63
19.00	2,409	2,488	2,449	9,04
20.00	2,212	2,337	2,225	13,10
21.00	2,417	2,331	2,374	10,29
22.00	2,019	2,025	2,022	17,64

Subject #11

Plasma cortisol

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
18.00	3,529	3,513	3,521	54,17
19.00	4,176	4,113	4,144	39,91
20.00	4,491	4,749	4,620	30,78
21.00	4,896	4,689	4,792	27,74
22.00	4,953	4,587	4,770	28,13
23.00	4,709	4,789	4,749	28,50
00.00	4,802	4,902	4,852	26,71
01.00	4,818	5,129	4,973	24,66
02.00	4,902	4,302	4,602	31,11
03.00	4,407	4,258	4,332	36,16
04.00	1,451	1,458	1,454	158,86
05.00	1,460	1,564	1,512	152,86
06.00	1,996	1,969	1,982	115,26
07.00	1,922	1,791	1,857	123,71
08.00	2,073	2,133	2,103	107,91
09.00	1,676	1,658	1,667	138,51
10.00	2,500	2,476	2,488	88,58
11.00	2,996	3,049	3,022	68,51
12.00	2,844	2,780	2,812	75,67
13.00	2,440	2,256	2,348	95,02
14.00	2,564	2,658	2,611	83,37
15.00	3,973	3,942	3,958	43,85
16.00	3,147	2,971	3,059	67,33
17.00	3,462	3,431	3,447	56,11
18.00	3,758	3,671	3,714	49,39

Salivary cortisol

Time	Absorbances	Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	1,045	0,803	0,924	1,875
07.15	0,893	0,678	0,786	2,804
07.30	0,613	0,948	0,781	2,843
07.45	0,782	0,863	0,823	2,532
08.00	1,122	0,949	1,036	1,247

Plasma melatonin

Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
18.00	1,787	2,045	1,916	20,46
19.00	2,004	1,947	1,975	18,85
20.00	2,301	2,256	2,279	12,03
21.00	1,640	1,623	1,632	51,59
22.00	1,571	1,632	1,602	52,68
23.00	1,648	1,673	1,660	50,54
00.00	1,567	1,513	1,540	54,90
01.00	1,209	1,355	1,282	64,64
02.00	1,308	1,256	1,282	64,64
03.00	1,071	1,043	1,057	74,64
04.00	1,036	0,995	1,016	76,78
05.00	0,840	0,876	0,858	86,28
06.00	1,080	1,021	1,050	74,97
07.00	1,105	1,096	1,100	72,53
08.00	1,200	1,145	1,172	69,24
09.00	1,595	1,552	1,574	53,69
10.00	1,764	1,805	1,784	45,95
11.00	1,720	1,700	1,710	48,73
12.00	1,755	2,061	1,908	41,02
13.00	1,940	1,901	1,920	40,49
14.00	1,873	1,860	1,866	42,74
15.00	1,764	1,848	1,806	45,12
16.00	1,947	1,799	1,873	42,47
17.00	2,091	1,952	2,022	35,80
18.00	1,957	2,008	1,982	37,71

Subject #12

Plasma cortisol

Time	Absorbance		Mean	Concentration	SD (conc.)
09.00	1,260	1,253	1,257	183,05	0,66
10.00	1,938	1,960	1,949	117,42	1,03
11.00	2,822	2,787	2,804	75,96	0,91
12.00	3,658	3,540	3,599	52,20	2,07
13.00	2,844	2,936	2,890	72,93	2,23
14.00	2,544	2,509	2,527	86,90	1,08
15.00	3,456	3,489	3,472	55,44	0,62
16.00	2,778	2,847	2,812	75,67	1,76
17.00	2,147	2,116	2,131	94,02	1,24
18.00	3,093	2,884	2,989	57,70	4,73
19.00	3,382	3,602	3,492	43,54	3,86
20.00	1,709	1,442	1,576	134,49	17,89
21.00	1,624	1,778	1,701	123,39	9,00
22.00	3,116	3,307	3,211	51,01	3,84
23.00	3,496	3,460	3,478	43,90	0,63
00.00	3,518	3,296	3,407	45,71	4,06
01.00	3,820	3,742	3,781	36,82	1,20
02.00	4,153	3,949	4,051	31,22	2,85
03.00	0,864	0,811	0,838	252,18	10,30
04.00	1,871	1,804	1,838	112,79	3,43
05.00	2,667	2,611	2,639	70,11	1,55
06.00	3,056	3,080	3,068	55,24	0,53
07.00	0,858	0,776	0,817	258,06	16,58
08.00	0,669	0,598	0,633	322,20	21,70
09.00	1,676	1,658	1,667	138,51	1,07

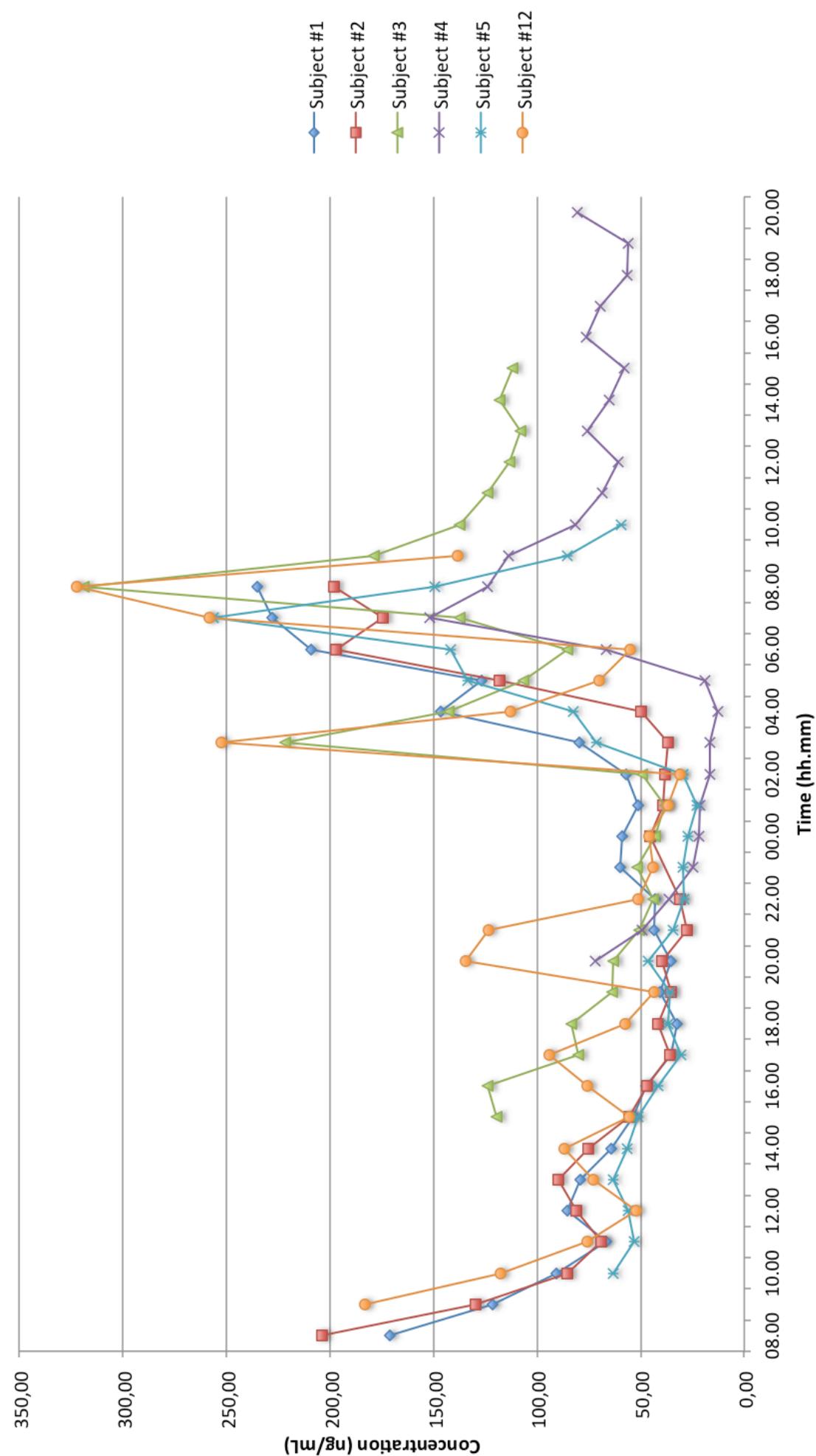
Salivary cortisol

Time	Absorbances		Mean	Concentration	SD (conc.)
07.00	0,527	0,513	0,52	5,649	0,147
07.15	0,326	0,376	0,351	9,552	1,232
07.30	0,222	0,286	0,254	14,373	3,334
07.45	0,251	0,256	0,253	14,414	0,229
08.00	0,275	0,265	0,27	13,323	0,445

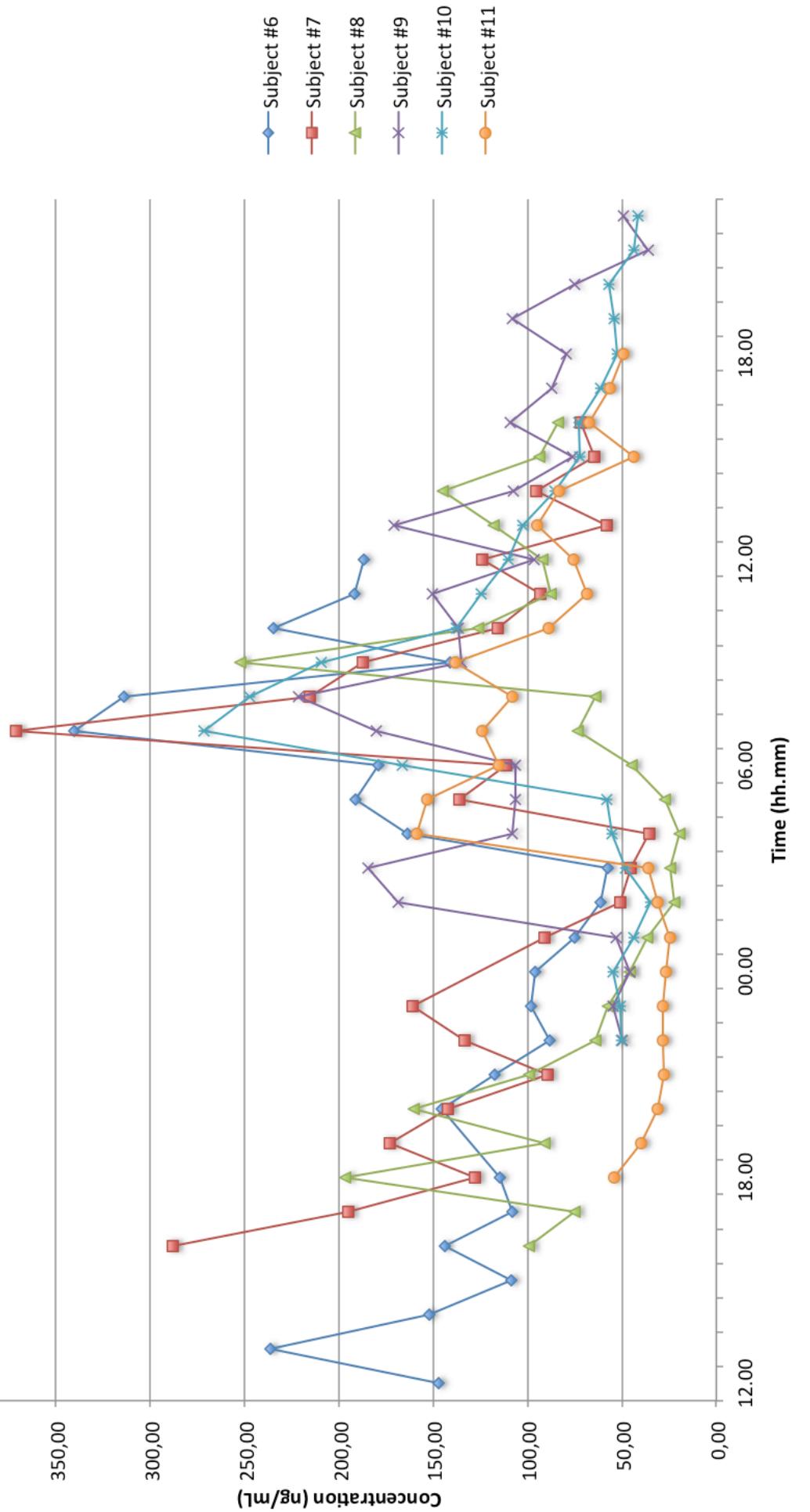
Plasma melatonin

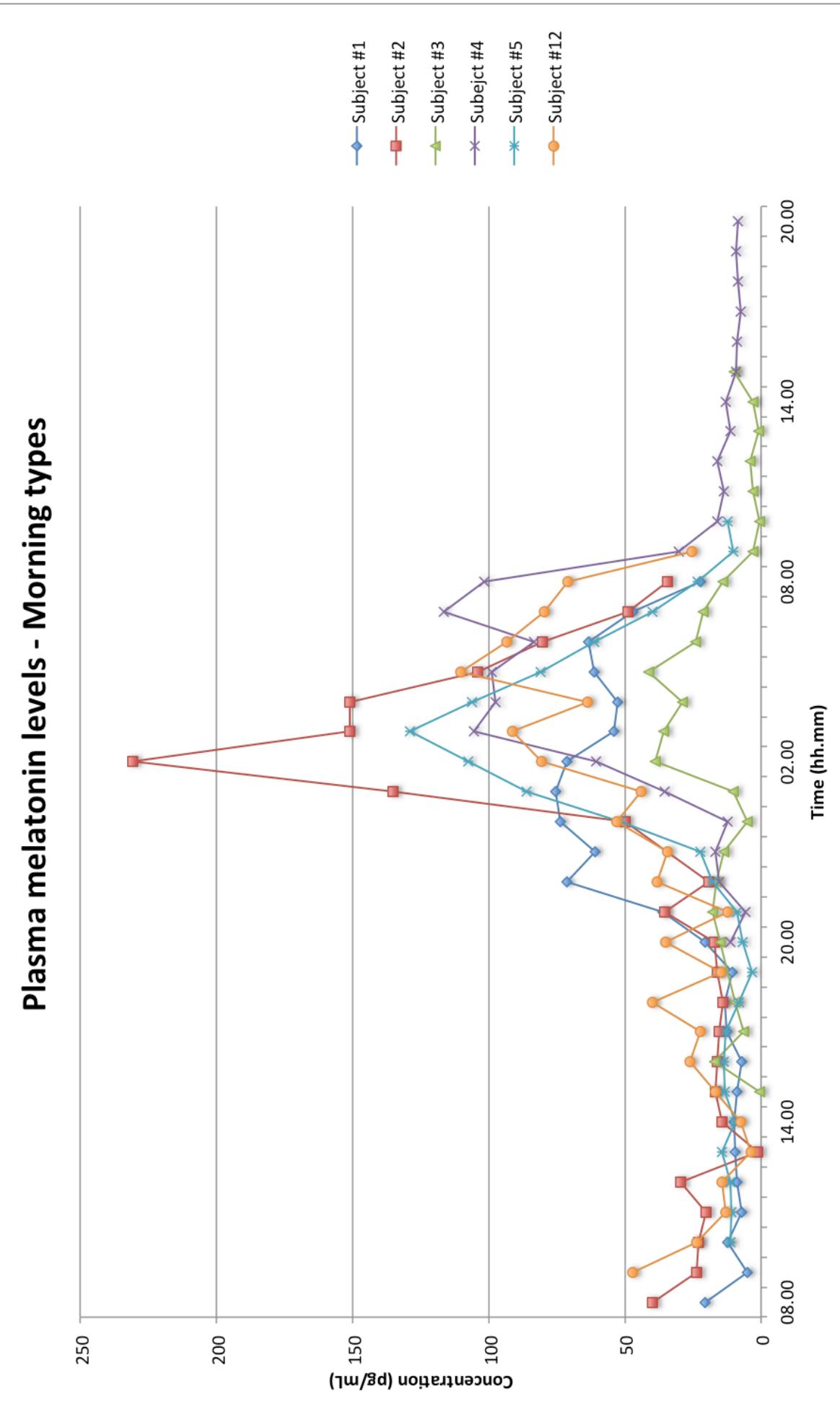
Time	Absorbance	Mean	Concentration	SD (conc.)
09.00	0,926	0,892	0,909	47,01
10.00	1,304	1,268	1,286	23,70
11.00	1,623	1,524	1,574	12,85
12.00	1,579	1,482	1,530	14,21
13.00	1,970	1,951	1,961	3,73
14.00	1,811	1,756	1,784	7,27
15.00	1,540	1,372	1,456	16,76
16.00	1,239	1,234	1,236	26,05
17.00	1,304	1,331	1,318	22,28
18.00	0,987	1,023	1,005	39,72
19.00	1,423	1,603	1,513	14,79
20.00	1,138	1,018	1,078	34,87
21.00	1,596	1,590	1,593	12,26
22.00	1,047	1,011	1,029	38,06
23.00	1,090	1,087	1,088	34,22
00.00	0,879	0,803	0,841	52,93
01.00	0,968	0,927	0,948	43,95
02.00	0,607	0,599	0,603	80,44
03.00	0,580	0,484	0,532	91,46
04.00	0,699	0,772	0,736	63,64
05.00	0,522	0,342	0,432	110,13
06.00	0,547	0,495	0,521	93,31
07.00	0,608	0,611	0,609	79,51
08.00	0,692	0,656	0,674	70,91
09.00	1,275	1,230	1,252	25,27

Plasma cortisol levels - Morning types



Plasma cortisol levels - Intermediate types





Plasma melatonin levels - Intermediate type

