

УДК: 612.821.7.08:612.53:615.832.9

**Изменения представленности и суточного распределения парадоксального сна у крыс после глубокой гипотермии**  
**А.В.Шило<sup>1</sup>, Е.А.Венцовская<sup>2</sup>, В.В.Ломако<sup>1</sup>, Г.А.Бабийчук<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ (Харьков, Украина)<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)  
avshilo@list.ru; elena.vens@gmail.com

У крыс с предварительно вживленными электродами для записи биоэлектрической активности мозга и мышц шеи изучали влияние глубокой гипотермии (ГГ) на представленность и суточное распределение парадоксального сна (ПС). Непрерывную регистрацию цикла бодрствование-сон осуществляли у животных в свободном поведении в течение 2 суток до и 3 суток после выхода из ГГ. В зависимости от времени появления первых эпизодов ПС в восстановительный период после ГГ животные были разбиты на 2 группы. ГГ не приводила к изменению общего количества ПС: при снижении количества ПС в дневное время происходило его увеличение в ночное время суток (что не характерно для крыс как животных с преимущественно ночным периодом активности) в основном за счет увеличения количества эпизодов ПС в обеих группах, что может быть связано с необходимостью гомеостатического регулирования температуры тела после ГГ.

**Ключевые слова:** парадоксальный сон, гипотермия, терморегуляция.**Зміни представленості і добового розподілу парадоксального сну у щурів після глибокої гіпотермії**  
**О.В.Шило, О.А.Венцовська, В.В.Ломако, Г.О.Бабійчук**

У щурів з попередньо імплантованими електродами для запису біоелектричної активності мозку та м'язів шиї вивчали вплив глибокої гіпотермії (ГГ) на представленість і добовий розподіл парадоксального сну (ПС). Безперервну реєстрацію циклу сон-неспання здійснювали у тварин у вільній поведінці впродовж 2 діб до і 3 діб після виходу з ГГ. Залежно від часу появи перших епізодів ПС у період виходу з ГГ тварини були розподілені на 2 групи. ГГ не призводила до зміни загальної кількості ПС: при зниженні кількості ПС вдень відбувалося його збільшення вночі (що не характерно для щурів як для тварин з переважно нічним характером активності) переважно за рахунок збільшення кількості епізодів ПС (як у 1-й, так і в 2-й групах тварин), що може бути пов'язано з необхідністю гомеостатичного регулювання температури тіла після ГГ.

**Ключові слова:** парадоксальний сон, гіпотермія, терморегуляція.**Changes of pattern of paradoxical sleep occurrence and its daily distribution in rats after deep hypothermia**  
**A.V.Shilo, E.A.Venskovskaya, V.V.Lomako, G.A.Babiychuck**

The influence of deep hypothermia (DH) on the pattern of paradoxical sleep (PS) occurrence and its daily distribution has been studied in rats with preliminary implanted electrodes for registration of brain and muscle bioelectrical activity. During 2 days prior to and 3 days after arousal from DH continuous record of sleep-wake cycle was carried out. Animals were divided into 2 groups depending on the time of the first PS episode occurrence during the recovery period after DH. There was no change in the total PS amount: there was decrease in PS amount in the light period and its increase in the dark period (that is not characteristic for rats as for animals with predominantly night period of activity) mainly due to an increase in the number of PS episodes (both in 1st and 2nd groups of animals) which can be connected with the necessity of homeostatic regulation of body temperature after DH.

**Key words:** paradoxical sleep, hypothermia, thermoregulation.**Введение**

Гипотермические воздействия с успехом применяют для повышения устойчивости органов и тканей к различным видам стресса, защиты организма от травматических повреждений, восстановления функции органов и тканей после ишемии-реперфузии, для коррекции и лечения различных заболеваний животных и человека (Carey et al., 2003).

Основным показанием к гипотермии является необходимость снижения интенсивности обмена веществ во всем организме или в отдельных органах для предупреждения или при возникновении угрозы гипоксии. Гипотермия показана при кардиохирургических операциях, сопровождающихся выключением сердца из кровоснабжения на необходимый срок. Реже гипотермию применяют в нейрохирургии.

Пути достижения гипотермии могут быть различны: охлаждение наружной поверхности тела; охлаждение крови вне организма; охлаждение в результате контакта холодного агента с внутренним органом. В то же время, любое изменение температуры, независимо от вызвавших его причин, например при внешнем охлаждении, в гомойотермном организме сопровождается активацией процессов терморегуляции, для предупреждения которых наиболее целесообразным считается применение адекватной блокады центров терморегуляции.

Особое место при получении гипотермических состояний занимают нейролептики (в частности, аминазин), широко применяемые в клинической практике, которые, однако, в больших (наркотических) дозах довольно опасны и могут приводить к тяжелым, иногда необратимым поражениям мозга.

Еще одним способом достижения гипотермии является применение газов и газовых смесей. Так, используя сероводород (Blackstone et al., 2005) и газовые смеси (Тимофеев, 1983; Мельничук, Мельничук, 2007), содержащие кислород и углекислый газ в различных пропорциях, можно достичь состояния глубокой гипотермии (ГГ). Это связано с тем, что гипоксия и гиперкапния, как полагают, приводят к смещению установочной точки температурного гомеостаза, подавлению химической терморегуляции, последующему замедлению метаболизма и к гипотермии.

Гипотермия, особенно при пролонгировании, может вызвать ряд осложнений: нарушение сердечной деятельности, гипотензия, послеоперационные кровотечения и гипертермия.

Негативными эффектами гипотермии также являются: сдвиг с глюкозного метаболизма на липидный, иммуносупрессия, смещение баланса в сторону избыточной генерации свободных радикалов и возникновение дефицита антиоксидантов, уменьшение концентрации гормона роста, нестабильность кардио-легочной циркуляции из-за сниженного уровня катехоламинов во время гипотермии и последующего согревания организма (Hayashi, 2004).

Таким образом, выявление специфических факторов, ограничивающих потенциальные возможности гипотермической терапии, остается актуальным и может способствовать усовершенствованию существующих и созданию новых способов погружения организма в искусственную гипотермию.

Функциональное состояние мозга и организма в целом после охлаждения можно оценить по характеру изменения цикла бодрствование-сон и отдельных его стадий, так как именно парадоксальный сон (ПС) наиболее чувствителен к гипотермическим воздействиям (Amici et al., 2008). Эта стадия сна является хорошим критерием для оценки функциональной активности ЦНС (Логинов и др., 2007) и других гомеостатических показателей организма. Характер изменения ПС после гипотермических воздействий остается невыясненным, поэтому целью нашей работы явилось изучение влияния глубокой гипотермии на представленность и распределение ПС у крыс.

#### **Объекты и методы исследования**

Эксперименты были проведены в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», одобренными Первым национальным конгрессом по биоэтике (20 сентября 2001 г., г. Киев, Украина) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985 г.).

Работа проведена на крысах-самцах *Rattus norvegicus* линии Вистар (7–8 мес., масса 250–300 г), содержащихся до начала эксперимента группами по 4–5 животных в условиях вивария при естественном фотопериоде. За 1–2 мес. до начала экспериментов животных помещали в звуконепроницаемую камеру с регулируемым световым режимом (свет : темнота – 12:12),  $T_{cp}=22-24^{\circ}\text{C}$ , где они находились в отдельных клетках со свободным доступом к воде и пище.

Электроды для регистрации биоэлектрической активности мозга (электроэнцефалограммы, ЭЭГ) (винты,  $d=1,6$  мм) и мышц (электромиограммы, ЭМГ) (серебряные проволочки,  $d=0,5$  мм) имплантировали наркотизированному животному (внутрибрюшинное введение смеси тиопентала и оксибутирата натрия из расчета 30 и 100 мг/кг массы, соответственно). Корковые электроды вживляли во фронтальную и париетальные области коры, индифферентный электрод – в носовую кость, электроды для регистрации ЭМГ размещали в мышцах шеи. Через 5–7 дней после операции животных помещали в экспериментальную камеру, подсоединяли к компьютерному электроэнцефалографу («Нейрософт», Россия) через вращающийся токосъемник (фирмы «Moog»,

Великобританія), не обмежуючий двигальну активність тварин, і проводили тривалу реєстрацію циклу бодрствование-сон (2-е сутки до і 3-е сутки після виходу з ГГ).

Стадірування записи (визначення початку і закінчення стадій сну) здійснювали за загальноприйнятими критеріями (Борбелі, 1989) по 4-секундним інтервалам з допомогою спеціально розробленої програми в середовищі Matlab. Бодрствование (Б) характеризується високоамплітудною і низькоамплітудною активністю мозку і високим рівнем м'язової активності, медленноволновою сном (МВС) – високоамплітудною регулярною ЕЕГ в дельта-діапазоні частот і зниженою ЕМГ, а ПС – регулярним тета-ритмом на фоні повного подавлення м'язової активності. По закінченні процедури стадірування сну розраховували частоту часу, проведеного в фазі ПС, кількість і тривалість епізодів ПС в кожному годині спостереження і будували сомнограми – послідовність чередування фаз бодрствования і сну за годину.

Стан глибокої гіпотермії досягали за допомогою методу Анджуса-Бахметьєва-Джайя (модель «закритого суду») (Тимофєєв, 1983; Мельничук, Мельничук, 2007): через 2,5 год перебування в темноті при температурі 2–4°C на фоні наростаючої гіпоксії і гіперкапнії у тварин розвивалась ГГ ( $T_{cp}=16\pm 1^\circ C$ ). Тварини самостійно виходили з ГГ в умовах з нормальним газовим складом повітря і  $T_{cp}=22-24^\circ C$ , уже через 2–3 год їх поведінка візуально не відрізнялась від нормальної.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за допомогою парного критерію Ст'юдента і непараметричного критерію Уїлкоксона.

### Результати і обговорення

Суточне розподілення ПС у щурів в нормі характеризується більшою представленістю його в світле час доби (рис. 1), коли на частку ПС приходилося близько  $7,8\pm 0,7\%$  від загального часу запису, порівняно з темним часом доби, де його кількість не перевищує  $5\pm 1,7\%$ , що узгоджується з даними літератури (Amici et al., 1998). При цьому кількість епізодів ПС в нормі в світле час доби становило  $28\pm 0,6$ , в темне час доби –  $25\pm 5,2$ , а тривалість епізоду ПС –  $99,9\pm 5,9$  сек в денний і  $97,8\pm 5,7$  сек в нічний час доби відповідно (табл. 1).

В залежності від часу появи перших епізодів ПС в період відновлення після розвитку ГГ тварини були розбиті на 2 групи (рис. 2, 3).

В 1-й групі перші епізоди ПС з'являлись не раніше 6-го часу запису після досягнення ГГ (рис. 2, 4). Впродовж 7-го часу (19.00) спостереження частіше ПС була знижена порівняно з контролем, потім спостерігався поступовий ріст представленості ПС. З 12-го (24.00) по 17-й (5.00) години запису відмічено достовірне збільшення кількості ПС порівняно з контролем. Частіше ПС в цей період зростала з  $2,4\pm 1,4\%$  до  $10,1\pm 2,3\%$  ( $p<0,05$ ). Крім того, в світле час доби після охолодження відбувалося різке скорочення кількості ПС (з  $8,4\pm 0,2\%$  до  $1,1\pm 0,3\%$  (рис. 5а)) і зменшення кількості епізодів ПС з  $28,06\pm 0,6$  до  $5,7\pm 1,5$  (табл. 1).

Таблиця 1.

Зміна тривалості і кількості епізодів ПС після ГГ

	Кількість епізодів ПС		Тривалість епізодів ПС (сек)	
	Світле час доби	Темне час доби	Світле час доби	Темне час доби
Контроль	$28\pm 0,6$	$25\pm 5,2$	$99,9\pm 5,9$	$97,8\pm 5,7$
ГГ – 1-я група	$5,7\pm 1,5^*$	$35,7\pm 7,5$	$97,7\pm 16,3$	$113,6\pm 5,2^*$
ГГ – 2-я група	$24,3\pm 1,5$	$32,5\pm 6,5$	$106,5\pm 6,2$	$128,4\pm 6,6^*$

Примітка:  $n=6$ , \* –  $p<0,05$ .

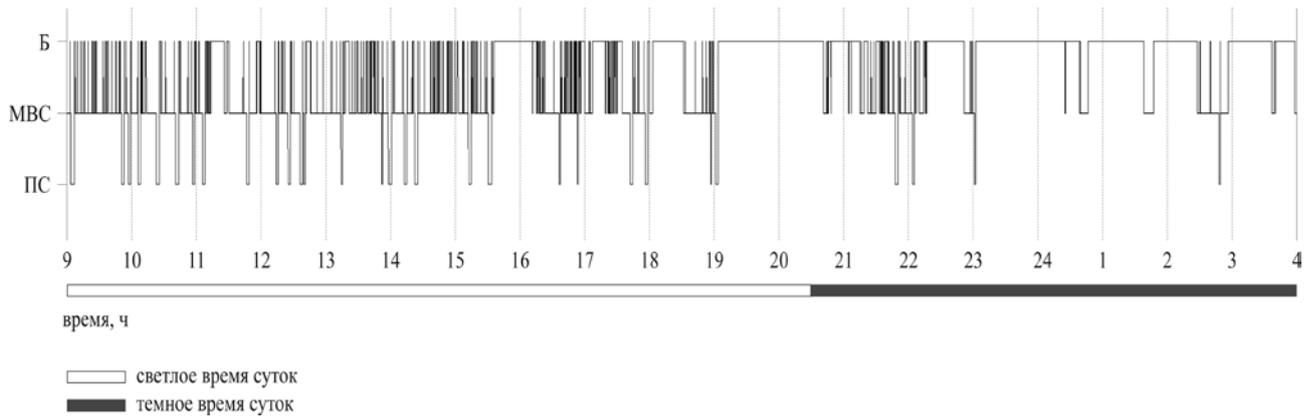


Рис. 1. Сомнограмма, регистрация в течение контрольных суток (пример)

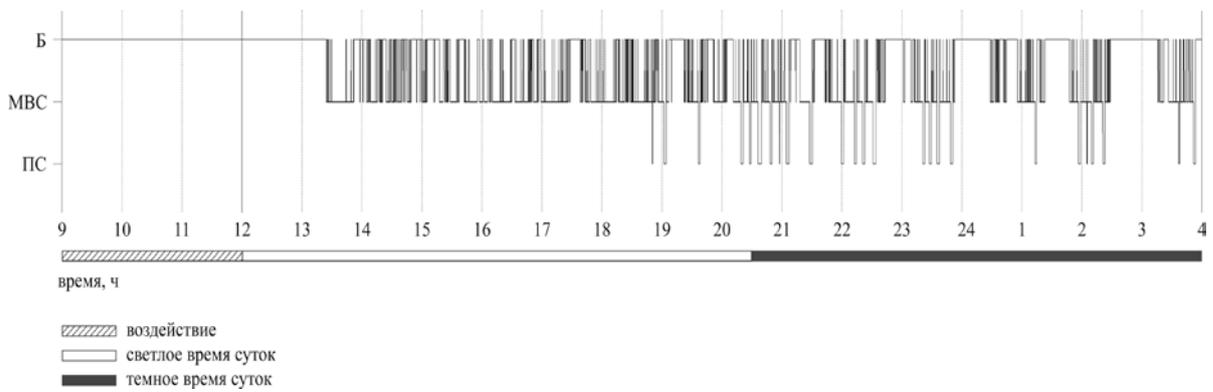


Рис. 2. Сомнограмма, регистрация в период восстановления после глубокой гипотермии крыс первой группы (пример)

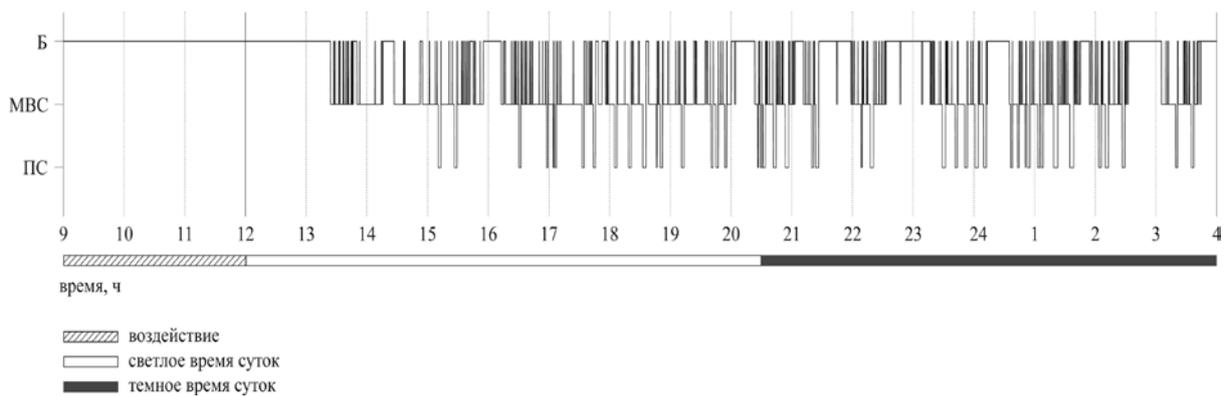


Рис. 3. Сомнограмма, регистрация в период восстановления после глубокой гипотермии крыс второй группы (пример)

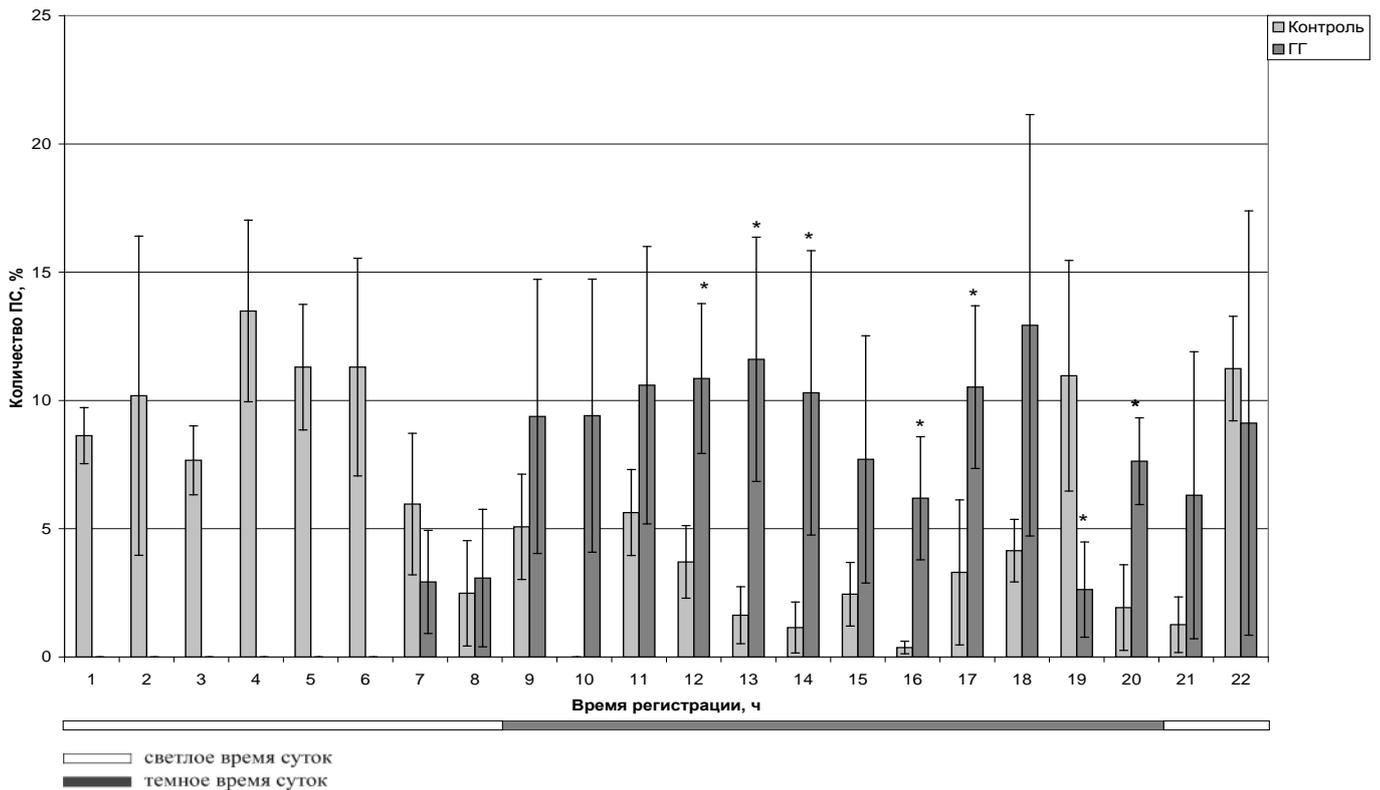


Рис. 4. Динамика представленности ПС в процессе выхода крыс первой группы из глубокой гипотермии (n=3, \* – p<0,05)

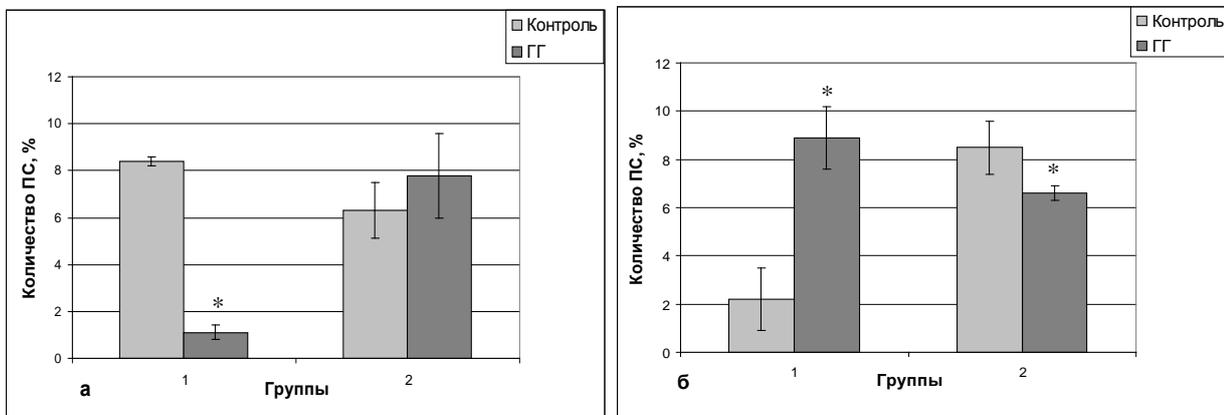


Рис. 5. Представленность ПС в контроле и после глубокой гипотермии у крыс в светлое (а) и темное время (б) суток (n=6, \* – p<0,05)

В темное время суток в первой группе наблюдали значительное увеличение представленности ПС (с  $2,2 \pm 1,3$  % до  $8,9 \pm 1,3$  %) (рис. 5б) за счет увеличения количества его эпизодов во время отдачи ПС с  $1,7 \pm 0,3$  до  $2,9 \pm 0,4$ . Длительность эпизодов ПС при этом увеличивалась недостоверно с  $101,07 \pm 10,43$  до  $117,6 \pm 6,67$  (табл. 2).

Таким образом, «отдача» ПС в первой группе животных наступала лишь на 12-м часу наблюдения в темное время суток.

Таблица 2.

Изменение длительности и количества эпизодов ПС во время «отдачи» ПС

	Количество эпизодов ПС	Длительность эпизодов ПС (сек)
Контроль – 1-я группа	1,7±0,3	101,07±10,43
ГГ – 1-я группа	2,9±0,4*	117,6±6,67
Контроль – 2-я группа	2,5±0,4	97,6±9
ГГ – 2-я группа	4,5±0,5**	117±6,33**

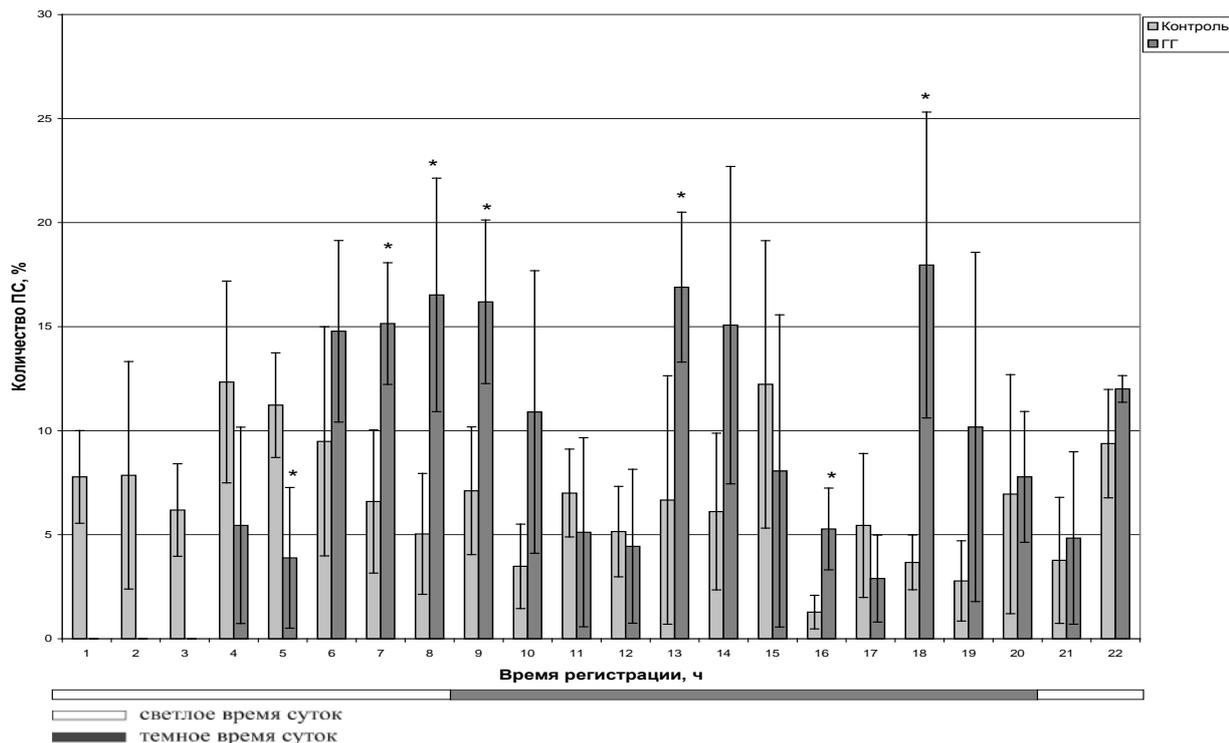
Примечание: n=6, \* – p<0,05, \*\* – p<0,05.

Во 2-й группе животных первые эпизоды ПС регистрировали уже на 4-м часу записи после выхода из ГГ (рис. 3, 6). При этом его количество до 6-го часа не превышало контрольных значений, а затем отмечался постепенный рост представленности ПС, и с 7-го (19.00) по 9-й (21.00) часы регистрации наблюдалась «отдача» фазы ПС: увеличение с 6,2±1,1 % до 15,9±0,7 % за счет увеличения количества эпизодов ПС (с 2,5±0,4 до 4,5±0,5, p<0,05). Последующие часы также характеризовались повышенными значениями ПС. Следовательно, у 2-й группы животных компенсаторное увеличение ПС наступало еще в светлое время суток (с 19.00 по 21.00 ч).

Известно, что пребывание животных при температурах окружающей среды, находящихся вне термонейтральной зоны, оказывает влияние как на терморегуляцию, так и на регуляцию сна. Гипоксия и гиперкапния на фоне действия холода способствуют развитию ГГ и приводят, как полагают, к смещению установочной точки температурного гомеостаза, последующему подавлению терморегуляции и к полной депривации сна. В восстановительный период после ГГ наблюдаемые изменения в структуре сна, вероятно, связаны с адекватным терморегуляторным поведением животных и с особенностями терморегуляции в различные стадии сна. Длительное отсутствие ПС в этот период, возможно, связано с особой чувствительностью именно этой стадии сна к изменениям в окружающей среде (в том числе и к низкой температуре) (Amici et al., 1998; Zamboni et al., 2001) и может быть следствием полной потери во время этой стадии сна гомеостатической регуляции. В экстремальных условиях включение гомеостатических механизмов регуляции параметров внутренней среды влечет за собой переход из ПС в другое функциональное состояние.

Переход организма в состояние ПС связан с инактивацией терморегуляторных реакций, за которые ответственен гипоталамус (Parmeggiani, 1985). Эта стадия сна характеризуется отсутствием как поведенческих (локомоция, адекватная температуре поза), так и большинства вегетативных терморегуляторных реакций организма (вазомоторные реакции, тахипноэ, пилоэрекция, сократительный и несократительный термогенез) (Parmeggiani, 2003). Можно предположить, что выход из ГГ сопровождается конфликтом между потребностью организма в ПС и необходимостью в активизации процессов терморегуляции, и до восстановления температурного гомеостаза гипоталамус препятствует переходу организма в состояние ПС. Согласно (Berger et al., 1985), подобная депрессия ПС в условиях гипотермии может рассматриваться как проявление адаптационной терморегуляторной реакции организма. По мере нарастания давления ПС в течение 4–6 часов после выхода из ГГ стволовые структуры, ответственные за развитие ПС, начинают «ускользать» от влияния гипоталамуса, и наступают первые эпизоды ПС. В связи с этим можно предположить, что именно в зависимости от скорости восстановления температурного гомеостаза животные разделились на две группы: с медленным восстановлением (при появлении ПС не ранее 6 ч саморазогревания) и более быстрым восстановлением (появление ПС в начале 4 ч саморазогревания) температуры тела.

Хорошо известно, что ПС и МВС имеют различные функции и регулируются независимо друг от друга (Borbely, 1998). Существуют две точки зрения по поводу гомеостатической регуляции ПС. Согласно первой (Benington, Heller, 1994), потребность в ПС возрастает исключительно во время эпизодов МВС, другие же авторы (Osato-Garces et al., 2000) предполагают, что необходимость в ПС накапливается в течение всего периода, когда животное находится вне этого состояния, то есть как во время МВС, так и во время бодрствования. Если принять во внимание первую гипотезу, то, возможно, что после выхода из ГГ в первую очередь восстанавливается МВС, в котором нарастает давление ПС, а при достижении необходимого порога и после восстановления температурного гомеостаза включаются механизмы ПС. Кроме того, увеличение медленноволновой активности во время первых эпизодов МВС после ГГ также может оказывать ингибирующее воздействие на развитие ПС (Endo et al., 1997) и отодвигать «отдачу» ПС на темное время суток.



**Рис. 6.** Динамика представленности ПС в процессе выхода крыс второй группы из глубокой гипотермии (n=3, \* – p<0,05)

Недавно было показано, что длительная депривация ПС (Biswas, 2006) и различные гипоксические состояния (Логинов, Дорохов, 2003; Логинов и др., 2007) приводят как к некротической, так и апоптической гибели нервных клеток. При этом рост ПС в восстановительный период рассматривается как хороший прогностический критерий восстановления поврежденной нервной ткани.

На активацию процессов клеточной смерти косвенно указывают данные (Самохина та ін., 2007), в которых было показано, что после развития ГГ, достигнутой методом Анджуза-Бахметьева-Джайя, происходит повышение уровня активности кальпаинов, которые в условиях гипоксии вовлекаются в реализацию механизма клеточной смерти по некротическому пути.

Обнаруженное нами при выходе из ГГ длительное отсутствие ПС, вероятно, указывает на то, что в первую очередь организм нуждается в восстановлении резервов функциональных (чему способствует МВС), а не структурных белков. Гибель клеток, если и происходит, то в незначительной степени, а гипотермия в данном случае играет защитную роль.

Таким образом, ГГ не приводит к изменению общего количества ПС: при снижении количества ПС в дневное время происходит его компенсаторное увеличение в ночное время суток в основном за счет увеличения количества эпизодов ПС, что может быть связано с необходимостью гомеостатического регулирования температуры тела в восстановительный период в светлое время суток.

#### Список литературы

Борбели А. Тайна сна. – М.: Знание, 1989. – 192с.

Логинов В.В., Дорохов В.Б. Увеличение продолжительности парадоксальной фазы сна у крыс, переживших окклюзию сонной артерии // Ж. высш. нервн. деят. – 2003. – Т.53, №6. – С. 677–680.

Логинов В.В., Дорохов В.Б., Ковальзон В.М. Парадоксальный сон и восстановительные функции мозговой ткани // Ж. нейронауки. – 2007. – Т.2, №10. – С. 29–32.

Мельничук С.Д., Мельничук Д.О. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини). – К., 2007. – 220с.

Самохіна Л.М., Ломако В.В., Шило О.В. Хімаза, тонін та кальпаїни за умов штучного гіпометаболічного стану у хом'яків // Проблеми кріобіології. – 2007. – Т.17, №4. – С. 347–355.

Тимофеев Н.Н. Искусственный гипобоз. – М.: Медицина, 1983. – 192с.

- Amici R., Cerri M., Ocampo-Garces A. et al. Cold exposure and sleep in the rat: REM sleep homeostasis and body size // *Sleep*. – 2008. – Vol.31. – P. 708–715.
- Amici R., Zamboni G., Perez E., Parmeggiani L. The influence of a heavy thermal load on REM sleep in the rat // *Brain Research*. – 1998. – Vol.781. – P. 254–258.
- Benington J., Heller H. REM-sleep timing is controlled homeostatically by accumulation of REM-sleep propensity in non-REM sleep // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 1994. – Vol.266. – P. 1992–2000.
- Berger R., Palca J., Walker J. Humans sleeping in cold: thermoregulatory and metabolic aspects // *Living in the Cold. Physiological and Biochemical Adaptations. Seventh international symposium on natural mammalian hibernation*. – 1985. – P. 523–529.
- Biswas S. Increased apoptosis in rat brain after REM sleep loss // *Neuroscience*. – 2006. – Vol.142. – P. 315–331.
- Blackstone E., Morrison M., Roth M. H<sub>2</sub>S induces a suspended animation-like state in mice // *Science*. – 2005. – Vol.308. – P.518.
- Borbely A. Processes underlying sleep regulation // *Horm. Res.* – 1998. – Vol.49. – P. 114–117.
- Carey H., Andrews M., Martin S. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol.83. – P. 1153–1181.
- Endo T., Schwierin B., Borbely A., Tobler I. Selective and total sleep deprivation: effect on the sleep EEG in the rat // *Psychiatry Research*. – 1997. – Vol.66. – P. 97–110.
- Hayashi N. The new concept and pitfall of brain hypothermia treatment // *Proceedings of International Brain Hypothermia Symposium*. – Tokyo, 2004. – P. 54.
- Ocampo-Garces A., Molina E., Rodrigues A., Vivaldi E. Homeostasis of REM sleep after total and selective sleep deprivation in the rat // *J. Neurophysiology*. – 2000. – Vol.84. – P. 2699–2702.
- Parmeggiani P.L. Interaction between temperature and sleep regulation // *Living in the Cold. Physiological and Biochemical Adaptations. Seventh international symposium on natural mammalian hibernation*. – 1985. – P. 177–183.
- Parmeggiani P.L. Thermoregulation and sleep // *Frontiers in Bioscience*. – 2003. – Vol.8. – P. 557–567.
- Zamboni G., Amici R., Perez E., Parmeggiani L. Pattern of REM sleep occurrence in continuous darkness following the exposure to low ambient temperature in the rat // *Behavioral Brain Research*. – 2001. – Vol.2. – P. 249–256.

**Представлено: Г.Ф.Жегуновим / Presented by: G.F.Zhegunov**

**Рекомендовано до друку: В.В.Мартиненко / Recommended for publishing by: V.V.Martynenko**

*Подано до редакції / Received: 27.03.2009.*

© О.В.Шило, О.А.Венцковська, В.В.Ломако, Г.О.Бабійчук, 2009

© A.V.Shilo, E.A.Venskovskaya, V.V.Lomako, G.A.Babiychuck, 2009