

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА δ -СНА И ЕГО АНАЛОГОВ НА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРОЛИКОВ

БАХАРЕВ В. Д., САРГСЯН А. С., МИХАЛЕВА И. И.

Исследованы эффекты пептида δ -сна (ПДС) и некоторых его аналогов с помощью регистрации электроэнцефалограммы кроликов при внутрижелудочковом введении в различных дозах. Показано, что пептид вызывает увеличение выраженности δ -волн в суммарной энцефалограмме в дозах 20—150 мкг/кг, отмечено наличие индивидуальной чувствительности животных к препарату. Из аналогов наиболее выразительным эффектом, хотя и более слабым, чем у природного пептида, обладали цикло-(Gly-DSIP), Asp⁵-DSIP и D-Ala³-DSIP. Показано, что действие пептида δ -сна у крыс с искусственно депривированным сном более существенно.

В последние годы значительное внимание уделяется исследованиям эндогенных факторов сна, имеющих пептидную природу [1—6]. Одним из них — ПДС или DSIP (Delta-Sleep Inducing Peptide) — был выделен Монпьер и соавт. [3] из мозговой венозной крови кроликов в процессе сна, вызванного электростимуляцией таламической области мозга. Согласно сообщению авторов, этот пептид, имеющий структуру Трг-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu, вызывает при внутрижелудочковом и внутривенном введении увеличение выраженности медленных или δ -волн в энцефалограмме животных и ряд поведенческих реакций, характерных для сна [4—6].

С целью изучения взаимосвязи между структурой и функцией этого эндогенного фактора в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР был предпринят синтез ПДС и ряда его аналогов [7, 8], структура которых схематически приведена на рисунке.

Изучение сомногенных свойств ПДС, синтезированного в ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР, привело к противоречивым результатам. Так, с одной стороны, был обнаружен сильный эффект больших доз ПДС (до 200 нмоль) при центральном введении кроликам, кошкам, крысам [9—11]. С другой стороны, попытки воспроизведения данных Монпьер и соавт. не привели к успеху. Так, например, введение препарата в дозе 6 нмоль центрально и 30 нмоль внутривенно кроликам и крысам не давало достоверного увеличения сна [12].

Столь же противоречивые данные об активности ПДС появились и в литературе. Сомногенное действие пептида было подтверждено несколькими авторами [13—15] на кошках, крысах и мышах при систем-

ном введении в дозах 30—80 нмоль. Более того, согласно последним сообщениям, это вещество в качестве лекарственного средства успешно используется при лечении людей с различными нарушениями сна [16, 17]. В то же время, опыты Tobler и Borbely [18] на крысах не выявили достоверного действия ни при системном, ни при внутрижелудочковом введениях. В противоположность ожидаемому отмечалось повышение двигательной активности и уменьшение выраженности δ -волн в электроэнцефалограмме.

В связи со столь неоднозначными результатами тестирования, полученными разными авторами, возникла необходимость дальнейшего исследования сомногенных свойств ПДС. Задачей настоящей работы являлось изучение влияния нативного пептида δ -сна и его аналогов на энцефалограмму животных (кролики, крысы) при внутрижелудочковом введении в различных дозах в нормальных условиях и в условиях стрессорных воздействий искусственной депривации сна.

Материалы и методы

В 144 опытах на 48 кроликах породы шиншилла обоего пола массой $1,8 \pm 0,3$ кг регистрировали электрокортикограмму до и после введения препарата. Животные находились в условиях, ограничивающих их подвижность в свето- и звукоизолированной камере. Активный электрод вводили субдурально в крышу черепа над зрительной областью коры больших полушарий (17 поле), индифферентный—в носовые кости. Животное использовали не более чем в 3 экспериментах с промежутком не менее 7 суток. Пептиды растворяли непосредственно перед употреблением в стерильном физиологическом растворе и инъецировали в боковой желудочек мозга на стороне регистрации. В контрольной части опыта до препарата кроликам вводили в эквивалентном объеме физиологический раствор (0,04 мл) и регистрировали фоновую энцефалограмму в течение 45—60 мин.

Регистрацию электрокортикограммы осуществляли монополярно с помощью чернилопишущего восьмиканального энцефалографа «Медикор 01—1751» и анализировали на широкополосном анализаторе-интеграторе «Медикор-4657». Постоянная времени фильтров верхних частот равнялась 0,3 с, что соответствовало предельной частоте 0,53 Гц. Предельная частота фильтров низких частот—70 Гц. Полосы частот фильтрационных контуров анализатора составляли для δ -ритма—1,5—3, θ —4—7, α —8—13, γ —31—70 Гц. Оценка результатов, кроме графических методов разделением суммарной биоэлектрической активности по полосам, осуществлялась также регистрацией показателей интегрирования с помощью трехзначного цифрового индикатора в мкВ/с. Параллельно с этим регистрировали электрокардиограмму и электромиограмму шейных мышц.

В работе производили также исследование влияния ПДС на животных с искусственно депривированным сном. С этой целью во второй половине дня крыс в металлическом контейнере помещали на 12 ч в

холодильник, где они находились при температуре $+4^{\circ}$ до утра. Утром через 2—3 ч после того, как животные согревались при комнатной температуре, у них регистрировали электрокортикограмму. В фоне в боковые желудочки мозга вводили физиологический раствор, в опыте — ПДС из расчета 50 мкг/кг массы в объеме 15 мкл. В контрольной серии ПДС и физиологический раствор вводили животным, которых не помещали в холодильник, а оставляли на 12 ч в контейнере при комнатной температуре.

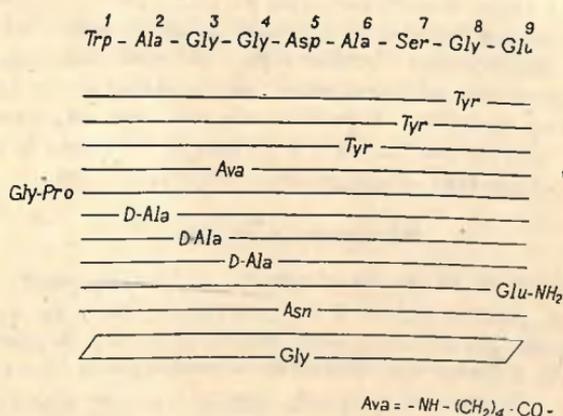


Рис. Структура ПДС и его аналогов

Депривацию сна осуществляли также болевым раздражением, накладывая вечером на 12 ч на хвост крыс жесткий металлический зажим.

Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с вычислением средних величин, среднего квадратичного отклонения, ошибок средних. Достоверность различий опыта и контроля оценивали с помощью критерия Стьюдента. В таблицах рядом с основным значением средней величины приведена удвоенная ошибка опыта, что позволяет быстро произвести ориентировочную оценку достоверности в сравнении с контролем [19].

Результаты и обсуждение

Было исследовано влияние ПДС и его аналогов на электроэнцефалограмму кроликов при внутрижелудочковом введении в различных дозах. Показано, что препарат вызывает увеличение количества δ -волн в суммарной энцефалограмме, спектр колебаний смещался в область низких частот, δ -волны становились более высокоамплитудными, появлялись медленные колебания с периодом более 2—3 с. Эти явления коррелировали с уменьшением активности миограммы шейных мышц и урежением частоты сердечных сокращений. При этом пептид

оказался эффективным лишь в узком диапазоне доз: 20—150 мкг/кг массы животного. Дозы 3 мкг/кг и менее совершенно не влияли на прирост δ -волн. Дозы 1000 мкг/кг и более стабилизировали δ -волны, уменьшая их разброс во времени, но не вызывая абсолютного или относительного их увеличения. Оптимальные дозы препарата не всегда приводили к абсолютному приросту δ -волн: стабилизация их на фоне уменьшения суммарной биоэлектрической активности общей энцефалограммы делала их преобладающими в общем спектре. Увеличение δ -волн относительно суммарной активности может быть обусловлено существенным уменьшением в общем спектре быстрых составляющих, в первую очередь так называемого α -, и особенно β -диапазонов. На диапазоны θ -, γ -ритмов препарат не оказывал заметного влияния.

Пик основной активности препарата по δ -волнам наступал через 30—60 мин после введения. У некоторых животных через 2—3 ч после введения наблюдали активацию α -ритма, что позволило высказать нам предположение о двухфазности действия препарата. Кроме того, анализ графических записей доказывает существование индивидуальной чувствительности животных к пептиду. Некоторые кролики к нему вообще не чувствительны или слабо чувствительны. Ориентировочно, по видам чувствительности кроликов можно разделить на несколько групп: 1—высокочувствительные, с преобладанием первой фазы действия препарата, под влиянием которого δ -волны в абсолютном значении увеличиваются по сравнению с фоном в 1,5—2 раза и более. Вторая фаза активации α -ритма отсутствует полностью. Такие эффекты мы наблюдали у 3 кроликов, то есть у 17 % особой исследованной группы; 2—среднечувствительные, у которых абсолютный прирост δ -волн не превышает 20—30% по сравнению с фоном, и их можно разделить на 2 подгруппы: а) с преобладанием через 60—90 мин после введения пептида 1-й фазы активации δ -волн (6 кроликов, то есть 33%); б) с преобладанием через 120—180 мин после введения пептида 2-й фазы активации α -волн (2 кролика, то есть 11%). 3—низкочувствительные, у которых δ -волны почти не увеличиваются, в основном снижаются α - и β -ритмы; 2-я фаза активации α -волн также выражена слабо, чаще отсутствует (5 кроликов, то есть 28%). 4—нечувствительные (2 кролика, то есть 11%).

Среди исследованных животных, включая и эксперименты с тестированием аналогов, преобладали особи 2а и 3 групп, реже встречались животные 1 и 4 групп, почти не встречались особи 2б группы.

Выраженная индивидуальная чувствительность к препарату подтверждает факт, что ПДС не фармакологическое, а физиологически активное вещество, эффект которого зависит от исходного уровня функционального состояния ЦНС, то есть от того, взято в эксперимент утомленное или отдохнувшее животное, от времени года и времени суток, пола животного, его возраста. По всей видимости, определяющим фактором эффективности препарата является активность дельтаритмоводящих систем, предположительно серотонинергических систем среднего мозга.

Опубликованные ранее результаты исследования ПДС на кроликах, кошках и собаках [11] были получены в осенне-зимний период 1978—79 гг., опыты проводились во второй половине дня и поэтому эффекты оказывались значительно более выраженными по сравнению с результатами данной серии, которая проводилась весной 1981 года, в основном, в первой половине дня.

Таблица 1

Влияние ПДС и его аналогов на δ -диапазон энцефалограммы кролика*

| Название вещества | δ -активность и сфалограммы по результатам интегрирования в мкВ/с | |
|--|--|----------------|
| | контроль | опыт |
| ПДС | 273 \pm 49 | 486 \pm 37** |
| Tyr ⁸ -ПДС | 228 \pm 51 | 275 \pm 32 |
| Tyr ⁷ -ПДС | 269 \pm 34 | 366 \pm 47 |
| Tyr ⁶ -ПДС | 207 \pm 32 | 221 \pm 54 |
| Asn ⁵ -ПДС | 212 \pm 26 | 295 \pm 31* |
| (Glu-NH ₂) ⁹ -ПДС | 250 \pm 47 | 232 \pm 39 |
| Ava ^{3,4} -ПДС | 317 \pm 53 | 388 \pm 27 |
| (Gly-Pro) ¹ -ПДС | 329 \pm 35 | 401 \pm 42 |
| D-Ala ³ -ПДС | 233 \pm 29 | 325 \pm 36* |
| D-Ala ⁴ -ПДС | 202 \pm 48 | 230 \pm 56 |
| Цикло-(Gly-ПДС) | 311 \pm 32 | 385 \pm 23* |

* через 60 мин после внутрижелудочковой инъекции 50 мкг/кг препарата в объеме 40 мкл. Каждый аналог исследовали в 4—7 опытах на 3 кроликах, основной фактор—ПДС—в 54 опытах на 18 кроликах. Результаты, имеющие вероятность различия с контролем по критерию Стьюдента более 0,99, помечены звездочкой, более 0,999—двумя звездочками

Аналоги ПДС, исследованные в таких же условиях, как и основное вещество, оказались либо слабее природного фактора, либо полностью неактивны. Сравнительная активность аналогов представлена в табл. 1. Цикло-(Gly-ПДС), Asn⁵-ПДС и D-Ala³-ПДС проявляют наиболее выраженный эффект. В то время как аналоги Ava^{3,4}-ПДС, (Gly-Pro)¹-ПДС—менее активны, а Tyr⁷-ПДС, Tyr⁶-ПДС и D-Ala⁴-ПДС полностью неактивны. Аналог (Glu-NH₂)⁹-ПДС вызывал уменьшение количества δ -волн в энцефалограмме и проявлял слабое активирующее действие. Следует отметить, что высокочувствительные к ПДС кролики были чувствительны к влиянию аналогов, а нечувствительные животные оставались таковыми и при исследовании аналогов. На основании полученных результатов и анализа литературных данных можно предположить, что ПДС является представителем группы нейропептидов—кардинально новых веществ в физиологии, не пусковых, или адаптационно-трофических, известных нам ранее, а принципиально отличных от них, готовящих клетки к нормальному протеканию процессов, а в данном случае защищающих клетки от избыточной афферентной импульсации. Их эффект зависит от уровня готовности и проявляется, в основном, при его понижении. По-видимому, меняя уровень готовности протекания нормальных физиологических реакций, ПДС способствует ему, повышает готовность к реакции, а не вызывает её. Системные воздей-

ствия ПДС не могут быть ограничены одним лишь влиянием на сон, который является сложным, многокомпонентным процессом и тесно связан с организацией и запечатлением воспринимаемой информации. Не исключено влияние ПДС на другие интегративные процессы мозга, в частности на память.

Таблица 2

Влияние ПДС на энцефалограмму крыс, лишенных сна*

| Номер группы | Условия эксперимента | Количество крыс | Суммарная биоэлектрическая активность в мкВ/с | Показатель интегрирования δ -ритма в мкВ/с |
|--------------|---|-----------------|---|---|
| 1 | Интактные крысы в контроле | 8 | 456 \pm 39 | 214 \pm 21 |
| 2 | Депривация сна низкой температурой, введение физиологического раствора | 6 | 327 \pm 47 | 214 \pm 25 |
| 3 | Депривация сна болевой импульсацией, введение физиологического раствора | 6 | 403 \pm 26 | 202 \pm 39 |
| 4 | Интактные крысы, введение ПДС | 8 | 480 \pm 23 | 260 \pm 17 |
| 5 | Депривация сна низкой температурой, введение ПДС | 6 | 520 \pm 51 | 360 \pm 38 |
| 6 | Депривация сна болевой импульсацией, введение ПДС | 6 | 496 \pm 38 | 310 \pm 11 |

* препарат вводили в боковой желудочек мозга в дозе 50 мкг/кг, в контроле— эквивалентный (15 мкл) объем физиологического раствора. Вероятность различий выраженности δ -ритма у разных групп крыс по критерию Стьюдента следующая:

№ 1—№ 2—недостаточно;

№ 1—№ 3—недостаточно;

№ 1—№ 4—более 0,99;

№ 1—№ 5—более 0,999;

№ 1—№ 6—более 0,999;

№ 4—№ 6—более 0,999;

№ 2—№ 5—более 0,999;

№ 3—№ 6—более 0,999;

№ 4—№ 5—более 0,999.

Имеющиеся сообщения о неэффективности ПДС могут быть объяснены несоблюдением условий тестирования эффектов и способов хранения. В частности, тестирование длительно хранившегося в растворе препарата [12] было заранее обречено на неудачу, так как пептид весьма неустойчив в растворе, подвержен воздействиям микроорганизмов и других разрушающих факторов. Целесообразно исследовать эффекты пептида не вручную, не по изменению латентного периода появления δ -волн [20], не по сонным веретенам [12], а с помощью соответствующей электронной аппаратуры, анализирующей энцефалограмму по заданным алгоритмам, позволяющей четко тестировать δ -волны и другие компоненты энцефалограммы. Показанная индивидуальная чувствительность животных к ПДС подвергает сомнению

результаты [20], полученные на трех кроликах. Результаты исследования эффектов ПДС у животных с нарушенным сном оказались следующими: он слабо влиял на энцефалограмму интактных животных, то есть статистически значимо, но не постоянно, на некоторых крыс вообще не оказывал влияния. Значительно сильнее препарат воздействовал на крыс, лишенных сна, особенно помещенных в холодную среду. Энцефалографическое исследование до и после введения пептида у крыс после депривации сна болше в сравнении с контролем подтвердило выраженный эффект ПДС у животных с нарушенным сном (табл. 2). Следует отметить, что нарушения сна привели к относительному увеличению δ -ритма в энцефалограмме у животных после предварительной депривации. Тем не менее, с учетом этого факта прирост δ -колебаний после инъекций исследуемого вещества болше, чем у животных после введения пептида без депривации.

Полученные результаты позволяют высказаться о болшей эффективности ПДС в ситуации с предварительно сниженным уровнем функционирования системы сна, после искусственно вызванных нарушений. По-видимому, в зависимости от уровня функционирования будет и ответ организма на инъекцию препарата, а отсюда неоднозначность реакций, которые может вызвать ПДС.

Воздействия холодом или болевым раздражителем являются комплексными факторами, поэтому ситуацию, возникающую вследствие их влияния, нельзя рассматривать как чистую депривацию сна. В то же время длительное охлаждение и сильная боль являются мощными стрессорными факторами, а наблюдение за поведением животных и проведенные эксперименты с регистрацией энцефалограммы до и после инъекций препарата показывают неспецифические антистрессорные эффекты ПДС.

EFFECT OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE AND ITS ANALOGS ON THE RABBIT BRAIN BIOELECTRIC ACTIVITY

BAKHAREV V. D., SARGSYAN A. S., MIKHALEVA I. I.

S. M. Kirov Military Medical Academy, Leningrad

M. M. Shenyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The effect of Delta-Sleep Inducing Peptide (DSIP) and its analogs (intraventricular injection) on rabbit electroencephalogram has been studied. DSIP (20–150 mcg/kg bw) makes delta waves more prominent (the animals appeared to be individually sensitive to this compound). Cyclo-(Gly-DSIP), Asn⁵-DSIP and D-Ala³-DSIP proved to be the most potent analogs among those tested, although not as potent as DSIP. It was demonstrated that DSIP is extremely effective in animals deprived from sleep.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nagasaki H., Iriki M., Inoue S., Ushizono K. Proc. Japan Acad., 50, 241—246, 1974.
2. Pappenheimer J. R., Koski G., Fencf U., Karnovsky M. L., Krueger J. J. Neurophysiol., 38, 1299—1311, 1975.
3. Schoenenberger G. A., Maier P. F., Tobler H. J., Monnier M. Pflügers Arch., 369, 99—109, 1977.
4. Monnier M., Dudler L., Gächter R., Maier P. F., Tobler H. J., Schoenenberger G. A. Experientia, 33, 548—552, 1976.
5. Schoenenberger G. A., Monnier M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1282—1286, 1977.
6. Monnier M., Dudler L., Gächter R., Schoenenberger G. A. Neurosci. Letters, 6, 9—13, 1977.
7. Саргсян А. С., Сумская Л. В., Александрова И. Ю., Безруков М. В., Михалёва И. Н., Иванов В. Т., Балабан П. М. Биоорганич. химия, 7, 1125—1149, 1981.
8. Саргсян А. С., Михалева И. Н. Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. (Тезисы Всесоюз. симп). Рига, с. Р19, 1982.
9. Богословский М. М., Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Альбертин С. В. Ж. эвол. биох. физиол., 15, 430—433, 1979.
10. Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Воронов Н. Б., Богословский М. М., Демин Н. Н., Рыбинская И. П., Альбертин С. В. Ж. эвол. биох. физиол., 15, 583—589, 1979.
11. Медведев В. Н., Бахарев В. Д. Ж. эвол. биох. физиол., 15, 379—384, 1979.
12. Ковальзон В. М., Цибульский В. Л. Ж. высш. нервн. деят., 30, 1064—1066, 1980.
13. Pole P., Schneeberger J., Haefely W. Neurosci. Letters, 9, 33—36, 1976.
14. Kafi S., Monnier M., Gaillard J.-M. Neurosci. Letters, 13, 169—172, 1979.
15. Nagasaki H., Kitahama K., Valatx J. M. Brain Res., 192, 276—280, 1980.
16. Schnelder-Helmert D., Gnirss F., Monnier M., Schenker F., Schoenenberger G. A. Int. J. Clin. Pharm. Ther. Toxicol., 19, 341—345, 1981.
17. Blois R., Monnier M., Schoenenberger G. A., Tissot R., Gaillard J.-M. Abstracts of the 11th European Sleep Congress, Amsterdam, p. P—16, 1980.
18. Tobler I., Borbely A. A. Waking and Sleeping, 4, 139—153, 1980.
19. Бендат Дж., Пирсал Л. Измерение и анализ случайных процессов. М., Мир, 470 с., 1971.
20. Гринявичюс К.-К. А., Милашюс А. М. Ж. высш. нервн. деят., 32, 1084—1089, 1982.

Военно-медицинская академия
им. С. М. Кирова, Ленинград
Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Поступила 19. 11 1982