

ДЕЛТА-ПЕПТИД СПАВАЊА И ЊЕГОВ УТИЦАЈ НА ЕЛЕКТРОЕНЦЕФАЛОГРАМ И СПЕКТРАЛНУ ГУСТИНУ СНАГЕ КОД ПАЦОВА С МЕТАФИТСКОМ ЕПИЛЕПСИЈОМ

Оливера СТАНОЈЛОВИЋ, Драгана ЖИВАНОВИЋ, Веселинка ШУШИЋ
Институт за физиологију Медицинског факултета Универзитета, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ: Студирани су ефекти делта-пептида спавања (DSIP) на метафитом (*1-(1*3*-isothiocyano-*n*-tophenyl)-cyclohexyl (piperidine)*) изазвану епилепсију код пацова. Животиње су подељене у групе: 1. Контролна; 2. Метафитом третирана (10 mg/kg); 3. Метафит плус делта-пептид спавања (1 mg/kg) - делта-пептид спавања је администриран после осам аудиогених тестирања, када је метафитска епилепсија најинтензивнија; 4. Делта-пептид спавања (1 mg/kg). За извор звука коришћено је електрично звено ($100 \pm 3 \text{ dB}$, 60 s) на један сат, за све време огледа и оцењивања је инциденција, интезитет и трајање конвулзивних компоненти епилепсије (трчање, клонична и тонична компонента). Електроенцефалографски записи у метафитској групи показују активности шиљак и шиљак-талас и повећану густину спектралне снаге, с пиком 8-10 сати после администрације. Делта-пептид спавања у дози од 1 mg/kg , делује као антikonвулзантно средство, редукује инциденцију, трајање, као и средњи интезитет конвулзије, и значајно повећава спектралну снагу у опсегу делта. Резултати указују да делта-пептид спавања може бити потенцијални антиепилепсијски лек у хуманој медицини.

Кључне речи: делта-пептид спавања, антиепилепсијско средство, метафит, електроенцефалограм. (СРП АРХ ЦЕЛОК ЛЕК).

УВОД

Постоје заједничке одлике два феномена спавања и епилепсије, заправо, то су спонтани, поновљиви до гађаји с хиперсинхронизацијом електроенцефалограма, где потенцијали електроенцефалограма веома личе на епилептиформне комплексе шиљак-талас, или спавање није епилепсија [1]. Спори синхронизовани таласи у електроенцефалограму, заједно с врстенима спавања, типичним за спороталасно спавање, фаворизују епилепсију [2], за разлику од спавања с брзим очним покретима, које представља антиепилепсијско стање у циклусу будност-спавање [3]. Монијер (Monnier) и сарасници [4] су изоловали супстанцију спавања из венске крви зеца код кога је спавање индуковано електричном стимулацијом таламичних једара. Због повећане активности у електроенцефалограму у опсегу делта ($1-4 \text{ Hz}$) супстанција је добила име делта-пептид спавања (DSIP). Деценијама се испитују дејства делта-пептида спавања: сомногена, неуроимунолошка [5] и терморегулациона, локомоторна [6], а у последње време интересантно је и антиепилепсијско дејство. Метафит је синтетисан [7] у циљу дизајнирања ковалентног маркера за фенциклидински (PCP) рецептор. Ова супстанција иреверзибилно се везује за јонски канал рецепторског комплекса NMDA/PCP, који има значајну улогу у епилептогенези. Везивањем метафита за јонотропни канал на рецептору NMDA повећава се инфлукс за јоне калицијума и натријума, настаје деполаризација и повећање ексцитабилности мозга, што у родената изазива аудиогену епилепсију [8].

Ми смо опсервисали у овом раду утицај природ-

ног, сомногеног делта-пептида спавања на метафитом изазвану аудиогену епилепсију код пацова, с циљем да испитамо могућност укључивања делта-пептида спавања у листу антиепилепсијских супстанција.

МЕТОД РАДА

У огледима смо користили пацове Вистар-албино, мужјаке, масе $180-220 \text{ g}$ и старости око 60 дана. Набављени су из Војномедицинске академије у Београду. Храна и вода су били доступни за све време огледа. Температура у лабораторији је одржавана константном ($22-24^\circ\text{C}$), док је циклус светло-тама регулисан на 12 сати, са светлим периодом од 9. до 21. сата. Аудиогена стимулација је остварена електричним звоном ($100 \pm 0,3 \text{ dB}$; 60 s) на један сат за све време огледа. За оцењивање интезитета аудиогене епилепсије коришћена је дескриптивна скала од нуле до три (0 = без одговора, 1 = трчање, 2 = клоничка епилепсија, и 3 = тоничка епилепсија). За непрекидно регистровање електроенцефалограма и спектралне густине снаге имплантисане су електроде у фронтални, паријетални и окципитални кортекс, у анестезији пентобарбиталом (50 mg/kg). Животиње су подељене у следеће групе: 1. контролна група ($n = 6$), третирана физиолошким раствором; 2. метафитом третирана (10 mg/kg ; $n = 12$); 3. метафит плус делта-пептид спавања (1 mg/kg ; $n = 14$), 4. делта-пептид спавања (1 mg/kg ; $n = 6$). Супстанције су администриране системски, у инјекционом волумену $0,1 \text{ ml}$ (и.п.). Коришћен је класичан четвороканални електроенцефалограф (фирма Алвар), чији је излазни степен модификован, те су аналогни излазни сигнали доведени на улазно коло осмоканалне, 12-то битне AD-картице PCL-711, која је постављена у рачунар. За дигиталну аквизицију и обраду сигнала електро-

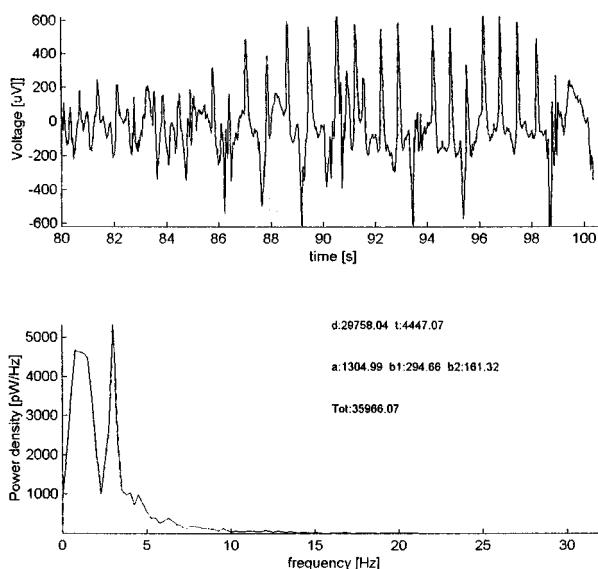
енцефалограма развијен је одговарајући софтвер, помоћу кога се сигнали електроенцефалограма трајно и континуисано бележе на хард-диску рачунара. Добијене епохе су спектрално анализоване у математичком програму МА-ТЛАБ. Спектрална снага је у функцији секвенције (pW/Hz или $\mu V^2/Hz$). Супстанције које смо користили у овом огледу су метафит (*methanesulfonate*) и делта-пептид спавања (*Sigma-Aldrich, USA*).

РЕЗУЛТАТИ

У контролној групи под дејством аудиогене стимулације нема бихевиоралних ни електроенцефалографских промена.

У метафитској групи (10 mg/kg , и.п.), 30 до 60 минута после администрације настају иницијални и спорадични елементи спилепсије (изоловани шиљци) који прогредишу у груписане шиљке и комплексе шиљак-талас (Слика 1). На аудиогене стимулације број конвулзивних одговора се повећава, као и спектрална снага. После 8-10 сати од примесе метафита настаје пик конвулзивне активност, који се оцењује према броју конвулзивних одговора (инциденција) и интезитету, док после 30 сати престаје конвулзија. На сликама 2, 3, 4 и 5 види се ток испо-

љавања напада спилепсије у времену у групи метафит плус делта-пептид спавања. Све конвулзивне компоненте лагано се редукују 2-5 сати после инјекције делта-пептид спавања у односу на метафитску групу, са запаженим статистички значајним разликама: за трчање 23 сата ($p < 0,05$), 24 сата ($p < 0,05$) и 25 сати ($p < 0,05$) (Слика 2), за клоничку компоненту 24 сата ($p < 0,05$) и 25 сати ($p < 0,05$) (Слика 3) и за тоничку компоненту 19 сати ($p < 0,05$), 24 сата ($p < 0,05$) и 25 сати ($p < 0,05$) (Слика 4) после адми-

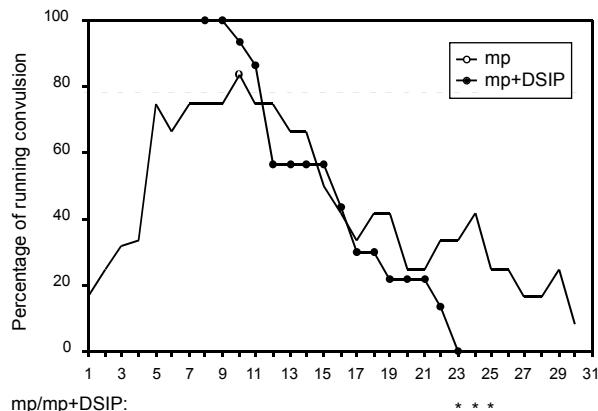


СЛИКА 1. Електроенцефалограм комплетног, моторног, епилепсијског одговора (градус 3) индукованог аудиогеном стимулацијом ($100 \pm 3 \text{ dB}$, 60 s) у метафитом (ДСИП.) (10 mg/kg и.п.) третираних пацова.

Висока амплитуда и мала фреквенција синхронизованих шиљака ($1-4 \text{ Hz}$) (горе) и одговарајућа спектрална снага (доле), повећани су у метафитској епилепсији. Временска калибрација 0,5 s, калибрација амплитуде $100 \mu\text{V}$.

FIGURE 1. EEG record of complete motor seizure response (grade 3) induced by audiogenic stimulation ($100 \pm 3 \text{ dB}$, 60 s) in a metaphit (10 mg/kg i.p.) treated rat.

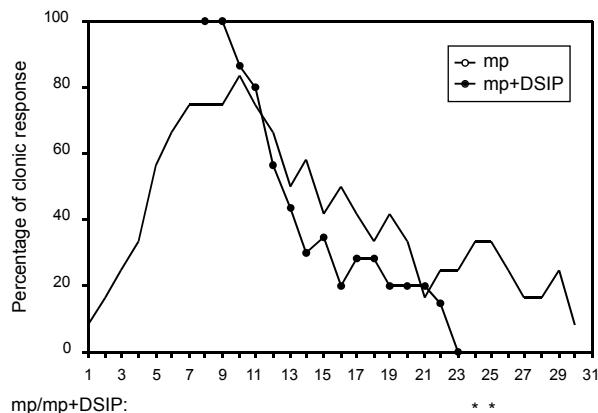
High amplitude of low frequency synchronized spiking activity ($1-4 \text{ Hz}$) (upper) and the corresponding power spectra (bottom) increase in the course of metaphit epilepsy. Time calibration 1 s, amplitude calibration $100 \mu\text{V}$.



СЛИКА 2. Инциденција за трчање, компоненту метафитске епилепсије код пацова после администрације ДСИП (1 mg/kg , и.п.), (8 сати после метафита). Све животиње су излагане интезивном звуку у једночасовним интервалима после администрације.

у-оса = инциденција у процентима; х-оса = време (сати). Поређење између група метафит и метафит + ДСИП (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, Фишеров тест вероватноће).

FIGURE 2. Incidence of running component of metaphit-induced seizures followed by DSIP after 8 h (1 mg/kg , i.p.). All animals were exposed to an intense hourly intervals after the injection. y axis = incidence in percentage; x axis = time (h). Comparison between metaphit and metaphit + DSIP group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Fisher's exact probability test).

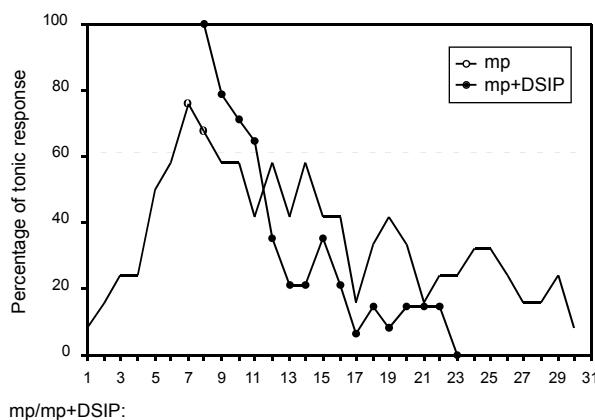


СЛИКА 3. Инциденција за клоничку компоненту метафитом индуковане епилепсије код пацова после администрације ДСИП. За детаље погледати слику 2.

FIGURE 3. Incidence of clonic component of metaphit-induced seizures followed by DSIP administration. For details see caption to Fig. 2.

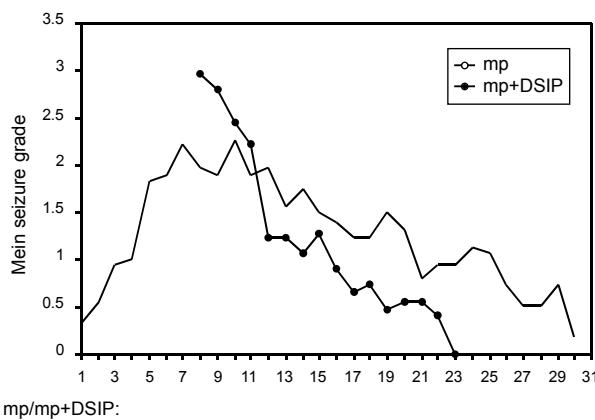
нистрације метафита. Средњи интезитет конвулзије (Слика 5) је такође редукован у групи метафит плус делта-пептид спавања у поређењу с метефитском групом и то 13 сати, 14 сати и 15 сати ($U = 10,50, p < 0,05; U = 10,50, p < 0,01$ и $U = 17,50, p < 0,05$) после администрације метафита.

Средње трајање појединих компоненти конвултивног одговора је статистички значајно скраћено у



СЛИКА 4. Инциденција за тоничку компоненту метафитом индуковане епилепсије код пацова после администрације ДСИП. За детаље погледати слику 2.

FIGURE 4. Incidence of tonic component of metaphit-induced seizures followed by DSIP injection. For details see caption to Fig. 2.



СЛИКА 5. Временски ток ефекта ДСИП на средњи интезитет метафитом изазване епилепсије.

Интезитет епилепсије (изражен градусом) начињен је на основу дескриптивне скале од 0 до 3 (0 = без одговора; 1 = трчање; 2 = клоничка епилепсија; 3 = тоничка епилепсија). Поређење средњег интезитета напада између групе метафит и метафит+ДСИП: Крускал-Валисова једнотактна анализа (ANOVA) и Ман Витнијев У-тест (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). За детаље погледати слику 2.

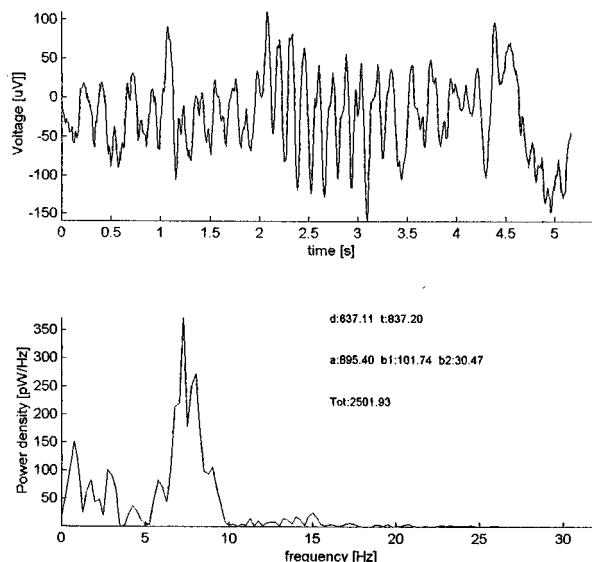
FIGURE 5. Time course of DSIP effects on mean seizure grade in metaphit-treated rats.

Severity of seizures (expressed as a seizure score) was determined by a descriptive rating scale ranging from 0-3 (0-no response; 1-wild running only; 2-clonic seizures; 3-tonic extension). Comparison of mean seizure grades between metaphit and metaphit+DSIP group: Kruskal-Wallis one-way ANOVA and Man Whitney U-test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) For details see caption to Fig. 2.

групи метафит плус делта-пептид спавања у поређењу с метефитском групом, за трчање 11 сати, $F(8,53) = 21,05; p < 0,01$ и 14 сати, $F(8,40) = 4,51, p < 0,05$, док је трајање тоничке компоненте 13 сати после администрације метафита значајно краће, $F(8,29) = 6,90, p < 0,01$, у односу на метефитску групу. Статистички значајно повећање делта-спектара електроенцефалограма у групи делта-пептид спавања (1 mg/kg , и.п.) опсервирано је (Ман Витнијев У-тест) 2 сата ($p < 0,05$), 4 сата ($p < 0,05$), 5 сати ($p < 0,05$), 6 сати ($p < 0,05$), 7 сати ($p < 0,01$) и 11 сати ($p < 0,05$) после инјекције делта-пептид спавања. Комплекс шиљак-талас типичан за метефитску епилепсију модификује се таласима велике амплитуде, 1-9 Hz (δ и θ) (Слика 6).

ДИСКУСИЈА

Постоје многа нерешена питања у вези с механизмом дејства делта-пептид спавања, као и рецептора за које се везује овај пептид, иако се о овом пептиду толико много зна. У нашим огледима системски је администрациран делта-пептид спавања у дози од 1 mg/kg . У овој дози пептид повећава спектралну снагу таласа делта, број епизода спороталасног спавања и укупно трајање спавања у периоду од 12 сати,



СЛИКА 6. Снимци ЕЕГ код метафитом третираних пацова (10 mg/kg и.п.) после администрације ДСИП (1 mg/kg и.п.). Запазите високе амплитуде таласа у опсегу 1-9 Hz (делта и тета) и врло интензивну спектралну снагу ($\mu\text{W}/\text{Hz}$) која прекрива метафитом индукован комплекс шиљак-талас.

Временска калибрација 0,5 s, калибрација амплитуде $100 \mu\text{V}$.

FIGURE 6. Different EEG recordings in a metaphit-treated rat (10 mg/kg i.p.) after DSIP (1 mg/kg i.p.) administration. Note high amplitude waves in 1-9 Hz range (δ and θ) and a very intense power spectrum ($\mu\text{W}/\text{Hz}$) overlapping a sharp metaphit-induced spike-wave complex.

Time calibration 1 sec, amplitude calibration $100 \mu\text{V}$

THE EFFECTS OF DELTA SLEEP-INDUCING PEPTIDE ON EEG AND POWER SPECTRA IN RATS WITH METAPHIT-INDUCED EPILEPSY

O. P. STANOJLOVITSH, D. P. ZHIVANOVITSH, V. T. SHUSHITSH

Department of Physiology, University School of Medicine, Belgrade

INTRADUCTION

Sleep has many common features with epilepsy (spontaneously, recurring event and EEG hypersynchrony including EEG potentials that look very similar to epileptiform sharp waves) [1]. Monnier et al. [4] reported the presence of a sleep-inducing factor inducing sleep with predominant EEG activity in the 8 band (1-4 Hz), and it was the reason for the term delta sleep-inducing peptide (DSIP). Metaphit was synthesized by Rafferty et al. (1985) [7] and was shown to increase general brain excitability and induce audiogenic seizures in small rodents.

The effects of a natural somnogenic nonapeptide DSIP on metaphit-induced audiogenic epilepsy in rats were studied with the aim of shedding more light on answering the question whether DSIP could be included in the list of antiepileptic agents.

MATERIALS AND METHODS

Adult, 2-month-old male Wistar rats (170-200 g) were used. None of the animals screened for audiogenic susceptibility showed seizure activity. Audiogenic stimulation was used for 60 s using an electric bell (100 ± 3 dB 5-8 kHz). Rats were divided into four groups: 1. Control, saline-injected ($n = 6$); 2. metaphit administered (10 mg/kg; $n = 12$); 3. metaphit + DSIP (1 mg/kg), ($n = 14$) group, DSIP administered after 8th to investigate blocking effect on fully developed metaphit seizure. 4. DSIP alone (1 mg/kg, $n = 6$).

RESULTS

In control saline-injected animals AGS provoked no convulsive response. Metaphit injection produced after 30 min initial EEG changes in the form of synchronized spikes and fast high-voltage activity that are typical seizure manifestations, power spectra increased and became more intense in the period of sound onset and seizure events. Our results demonstrate that DSIP acted increasing the EEG output in the 8 range and significantly elevated the mean power spectra in all checked experimental points. Besides, DSIP decreased the incidence and duration of convulsive component, as well as mean seizure grade in metaphit-induced seizures.

која је статистички значајно већа у односу на контролне животиње. Делта-пептид спавања редукује инциденцију конвулзивних одговора, средњи интезитет метафитом изазване аудиогене епилепсије и трајање појединих конвулзивних компоненти.

Метафит везујући се за рецепторски комплекс NMDA/PCP индукује генерализовану, рефлексну епилепсију и представља погодан експерименталан модел за изучавање механизама епилепсије. Блокатори овог рецептора, компетитивни NMDA антагонисти CPP, APH, APV [9] или некомпетитивни MK-801 [10], коришћени у претходним студијама, изази-

DISCUSSION

Metaphit induces a generalized, reflex epilepsy thus providing an experimental model of choice for the studies of the mechanism of epilepsy development and blockade of NMDA/PCP receptors. In our previous studies a competitive NMDA antagonist CPP [9] and a noncompetitive antagonist MK-801 [8] were used. Non-competitive, selective NMDA antagonists MK-801, PCP and ketamin expressed a partial agonist motor action (myoclonic jerks, ataxia and tremor of the whole body) in audiogenic epilepsy prone mice. DSIP produced no harmful effects even when overdosed or any effect over "normality" [4, 5]. DSIP has a capacity of suppressing various forms of convulsive activity in different animal species. It was suggested that it exerts an anticonvulsant action by influencing neurotransmitter (dopaminergic, adrenergic, GABA-ergic) and neuromodulator (peptidergic) brain systems [12, 13].

CONCLUSION

Our results, together with the fact that DSIP penetrates through the blood brain barrier after systemic administration and that overdoses of this natural peptide produce no harmful effects, strongly suggest that it could be an important therapeutic agent for the treatment of sleep disturbances. Also, our data demonstrating reduction in incidence, severity and duration of seizure components, suggest that this agent might be a suitable candidate as an antiepileptic drug.

Key words: Delta sleep-inducing peptide, epilepsy, metaphit-induced, EEG. (SRP ARH CELOK LEK).

OLIVERA STANOJLOVIĆ

Institut za fiziologiju

Medicinski fakultet

11 000 Beograd, Višegradska 26/II

Tel.: 36-11-945, 36-11-278

e-mail: maxol@eunet.yu

вају многобројне и тешка фармаколошка нежељена дејства (миоклоничке грчеве, тремор [11], као и ротирање целог тела [12]). Насупрот њима делта-пептид спавања не производи нежељене ефекте, чак и у великом дозама. Делта-пептид спавања има неуромодулационо дејство, повећава концентрацију инхибиционог неуротрансмитера (GABA) и редукује експицитацијске неуротрансмитере (глутамат и аспартат) [13, 14]. Ми претпостављамо неспецифичну активност делта-пептида спавања на рецепторском комплексу NMDA у смислу да делта-пептид спавања редукује глутамат из пресинапсичких везикула,

што има за последицу смањен инфлукс јона калцијума (Ca^{++}) и синтезу азотног оксида (NO) (ретроградни „месенци“) у постсинапсском неурону и доводи до даљег смањења глутамата и неуропротекције.

Чињеница да делта-пептид спавања лако пролази крвно-моздану баријеру после системске администрације, као и да нису опсервисани нежељени ефекти после предозирања овог пептида, намеће идеју, заједно с нашим резултатима, о могућој кандидатури ове супстанције за антисипилепсијски лек.

ЛИТЕРАТУРА

- Fisher RS. Animal models of the epilepsy. *Brain Res Rev* 1989;14:245-78.
- Adrian ED, Moruzzi G. Impulses in the pyramidal tract. *J Physiol (London)* 1939;97:153-199.
- Shouse MN, Siegel JM, Wu MF, Szymusiak Morrison AR. Mechanisms of seizure suppression during rapid-eye-movement (REM) sleep in cats. *Brain Res* 1989;505:271-82.
- Monnier M, Dudler J, Gachter R, Schoenenberger GA. Delta-sleep inducing peptide (DSIP): EEG and motor activity in rabbits following intravenous administration. *Neurosci Lett* 1977;6:9-13.
- Kruger JM, Karnovsky ML. Sleep as a neuroimmune phenomenon: A brief historical perspective. *Adv Neuroimmunol* 1995;5:5-12.
- Yehuda S, Mostofsky DI. Circadian effect of β -endorphin, melatonin, DSIP and amphetamine on pentylentetetrazole-induced seizures. *Peptides* 1993;14:203-5.
- Rafferty RM, Mattson M, Jacobson AE, Rice KCA. Specific acetylating agent for the [3H] phencyclidine receptors in rat brain. *FEBS Lett* 1985;181:318-22.
- Šušić V, Reith MEA, Zloković B, Lajtha A, Jacobson AE, Rice KC, Lipovac MN. Electroencephalographic characteristics of audiogenic seizures induced in metaphit-treated small rodents. *Epilepsia* 1991;32:783-9.
- Živanović D, Šušić V, Stanojlović O. CPP blocks sound-induced seizures in metaphit-treated rats. *Med Sci Res* 1999;27:701-3.
- Šušić VT, Marković O. Potentiation of metaphit-induced audiogenic seizures by REM sleep deprivation in rats. *Physiol Behav* 1993;54:331-8.
- Chapman AG, Meldrum BS. Non competitive N-methyl-D-aspartate antagonists protect against sound-induced seizures in DBA/2 mice. *Eur J Pharmacol* 1989;166, 201-211.
- Tricklebank MD, Singh L, Oles RJ, Preston C, Iversen SD. The behavioral effects of MK801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol* 1989;167, 127-135.
- Shandra AA, Godlevskii LS, Mikhaleva II, Lobenko AA, Panenko AV, Mazarati AM. DSIP and its role in the epileptic activity modulation. *Physiol J (Russian)* 1993;79:16-30.
- Mendzeritskii AM, Lisenko AB, Uskova NI, Samecki EA. The mechanism of the anticonvulsive effect of the DSIP under condition of elevated oxygen pressures. *Physiol J (Russian)* 1996;82:59-64.

Рукопис је доспеваљен Уредништву 25. VIII 2000. године

ВЕСТИ

ПОВОДОМ 21. КЊИГЕ „ПРОБЛЕМИ У ПЕДИЈАТРИЈИ“

Прва књига едиције „Проблеми у педијатрији“ представљена је нашој медицинској јавности 1980. године. Проф. др Вукан Чупић, тадашњи директор Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије, у предговору је написао: „Верујем да ће ова књига, као и оне које ће уследити, допринети унапређењу дечјег здравља у нашој земљи и одржавању и подизању стандарда медицинске научне мисли“.

Издавање монографије није била спонтана акција лекара Института, већ је подстакнута понављаним захтевима бројних лекара да се предавања с Течајева за иновацију знања педијатара, традиционалне стручне манифестације Института, саопште и уписаној форми. Тако се група лекара Института, међу којима је мали број имао претходна искуства са издавањем стручних публикација, прихватила овог сложеног и одговорног послса који траје већ 21 годину.

Већ на почетку, наше амбиције нису биле мале. Желели смо да у погледу садржаја и по изгледу достигнемо ниво у свету познатог медицинског часописа „Pediatric Clinics of North America“. Отуда, зелене корице и златним словима исписан наслов књиге „Проблеми у педијатрији“. Сећања тешко допиру до далеке 1980. године, тако да се прецизно не може утврдити ко је кумовао називу едиције, који смо заволели, мада је било сугестија, углавном из наше куће, да би га требало променити.

У почетку је можда било колебања у погледу начина писања радова, али је убрзо преовладало мишљење да је најкорисније да они буду прегледни, односно да материју треба излагати на рејијалан начин, тако да представља синтезу савремених светских достигнућа и клиничког и научног искуства аутора који су их писали. Такође, усвојен је принцип да у књизи треба да буде обрађен што шири спектар теоријских и практичних педијатријских проблема с којима се сусрећу лекари у свакодневном раду, али да истовремено стручни и научни квалитет радова буде на завидној висини. Мада смо се трудали да задржимо критички однос према едицији и стално радили на њеном побољшању, свесни смо да у нашим књигама има и радова који нису увек и у потпуности испуњавали жељена мерила.

Током 21-годишњег рада имали смо стручну и моралну подршку и старијих и млађих колега Института, а посебан подстицај за рад и истрајност дао нам је др Димитрије Вуловић, наш учитељ, човек јединственог стручног и моралног интегритета, један од главних стубова наше редакције. Челни људи Института су увек налазили могућности за издавање монографије, чак и у периодима највеће материјалне оскудице. Они су прихватили и спроводили начело проф. Чупића да је свака инвестиција у знање лекара најкориснија од свих акција које се предузимају. Тако је едиција „Проблеми у педијатрији“ постала део Института, један од знакова препознавања наше установе.

Наславак на страници 128