تاثیر یک آنتاگونیست پپتید روده‌ای فعال کننده رگ برریتم زیست شناختی استراحت - حرکت در موش‌صحرایی

دکتر محمدحسین نویان اشرف*
* استادیار گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

چکیده

پلی پپتید فعال کننده رگ (VIP) ترکیبی است که در سیستم های نوروترانسمیتری و مسیرهای عصبی‌مختلفی در مغز حضور دارد. نقش این ماده در اعمال فیزیولوژیک مختلفی چون تنظیم خواب و بیداری و ایجادریتم‌های زیست شناختی آشکار شده است.

در این پژوهش تاثیر تزریق دوز واحد یک آنتاگونیست صناعی برای VIP موسوم به Leu 174-CI-D-Phe/٦، به صورت داخل بطن مغزی و در زمانهای سیرکادین مختلف، بر ریتم شبانه روزی استراحت وحرکت در موش صحرایی در شرایط Free run مورد آزمایش قرار گرفته است.

نتایج این بررسی نشان داد که ساعت مغز در زمان مشخصی از فعالیت ریتمیک خود (CT6) به تزریق این ماده‌حساس است و این حساسیت را با تقدم فاز (Phase advance) در روزهای بعد از تزریق نشان می‌دهد درصورتیکه تزریق مشابه در زمانهای دیگر بر ریتم بیولوژیک استراحت و حرکت تاثیری نداشت.

با توجه به نتایج آزمایش ما و بررسی های سایرین تاثیر پذیری ریتم های لوکوموتور از سیستمVIPergic آشکار می‌شود. با توجه به اینکه قبلاً موثر بودن آنتاگونیست بکار رفته در این آزمایش برهومئوستاز خواب نیز آشکار شده است، و با در نظر گرفتن این نکته که گیرندگان درگیر در مورد این دو پدیده ازنظر نوع و انتشار متفاوتند، بنابراین آنتاگونیست صناعی بکار گرفته شده برای رسپتورهای VIP اختصاصی‌نمی‌باشد.

کلید واژه ها: **پپتید روده ای فعال کننده رگ/ خواب/ نظم شبانه روزی**

مقدمه

پپتید روده‌ای فعال کننده رگ(VIP)، پپتیدی بازی متشکل از ۲۸ اسید آمینه است که برای اولین بار ازدوازدهه جدا شده است .بعدها مشخص شد این پپتید دارای انتشار وسیعی در نورونهای دستگاه اعصاب‌مرکزی نیز بوده، در مسیرهای عصبی ویژه‌ای حضور داشته و اعمال زیست شناختی متعددی دارد (٤،٩و١٨).این مسئله به همراه وجود جایگاههای اختصاصی برای اتصال آن، نشان می‌دهد این ماده به منزله‌یک نوروترانسمیتر و نیز یک هورمون نوروراندوکرین عمل می‌کند (١٠و١٣). یکی از راههای بررسی نحوه و جایگاه‌اثر این پپتید در مغز استفاده از آنتاگونیستهای متعدد آن است (٧،٥و١٣). تا کنون حداقل دو نوع گیرنده VIPموسوم به VIP١وVIP٢ (١٤،٦،٨،٣و١٦) برای آن شناخته شده اند .با توجه به گوناگونی و انتشار افتراقی‌گیرنده‌های VIP در مغز وعدم اطلاع دقیق از میزان اختصاصی بودن آنتاگونیستهای صناعی موجود برای این گیرنده‌ها، نیاز به بررسی بیشتر در این زمینه احساس می‌شود.

VIP یکی از مهمترین نوروترانسمیترهای موجود در نورونهای بخش شکمی - جانبی ساعت زیست‌شناختی مغز موسوم به هسته سوپر اکیاسماتیک (SCN) در هیپوتالاموس قدامی نیز هست (١٠). این بخش ازهسته مزبور دریافت کننده پیامهای نوری وغیرنوری بوده به طوریکه

غلظت VIP درSCN بافوتوپریود مرتبط است به نحوی که در تاریکی بر غلظتش افزوده شده‌ولی‌درروشنایی از میزانش کاسته می‌گردد(۱۰) و چنانچه حیوان را در شرایط تاریکی مستمر یا Free-Run قرار دهیم آنگاه دیگر این ریتم وجودنخواهدداشت(۱۳و۱۰).VIP یکی از ترانسمیترهایSCN جهت ایجاد ریتم‌های شبانه روزی مانند فعالیت لوکوموتور است و در مکانیسمهای درونی و بیرون از محدوده هسته به صورت عصبی(Neural)و/یا هومورال(Humoral) شرکت می‌جوید(۲،۱۰و۱۲).

تاثیرعوامل مختلف چون رژیمهای نوری، نوروترانسمیترها، نورومودولاتورها و بعضی ترکیبات دیگر(۱۰،۱و۱۷) بر تغییر فاز (Phase Shift) ریتم‌های شبانه روزی آشکار گردیده است. با در نظر گرفتن این‌موضوع که اختصاصی بودن بسیاری از آنتاگونیست‌های صناعی VIP برای گیرندهای شناخته شده‌آن‌آشکارنشده وبا توجه به فراوانی‌گیرنده‌هایVIP۲درهسته سوپراکیاسماتیک، همچنین وجود گزارشهایی در مورد امکان تأثیرگذاشتن آنتاگونیست بکار گرفته شده در این پژوهش بر ریتمهای بیولوژیک (۱۳)، در این آزمایش تلاش شده است تادر شرایط Free-run تأثیر تزریق داخل بطنی یک آنتاگونیستVIP موسوم به4CL-D-Phe 6/Leu 17، بر چرخه استراحت ـ حرکت در موش صحرایی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۳۰ سر موش صحرایی نر جوان نژاد Wistar به وزن ۲۳۰ـ۲۰۰ گرم استفاده شد.

جراحی استریوتاکسیک و کانول‌گذاری: متعاقب بیهوشی با پنتوباربیتال سدیم (۵۰mg/Kg) موی‌سر حیوان از بین چشمها تا بین دو گوش آن تراشیده شده و بعد از آن توسط تیغ جراحی یک برش ساجیتال درسر ایجاد گردید. پس از نمایان شدن درزهای جمجمه و نواحی برگما و لامبدا، با استفاده‌ازاطلس‌پاکسینوس‌مناسبترین‌محل در سمت چپ جهت کانول گذاری و تزریق داخل بطنی (DV=3/5 mm ML=1/5mm,AP=0/92mm) انتخاب شد. سپس یک راهنمای کانول(Cannula Guide,23gauge) که در مجرای درونی آن جهت اجتناب از انسداد و ورود گرد و غبار توسط‌یک کلاهک‌کانول (Cannula cap,27gauge) مسدود شده بود به درون فضای بطن چپ مغز هدایت گردید. پس زدن مایع مغزی ـنخاعی نشانه خوبی برای تأیید قرار داشتن کانول در محل بطن است.محل‌راهنمای‌کانول‌توسط سیمان دندانپزشکی تثبیت گردید.

بهبودپس‌ازجراحی‌والقایFree-Run:پس‌ازجراحی هر حیوان به صورت مجزا در قفسهای تمیز پلاستیکی به مدت ۱۰ تا ۱٤ روز جهت بهبود نگهداری شد. از سوی دیگر آنها به طور همزمان تحت رژیم‌تاریکی مطلق قرار داشته تا با القای پدیده Free-Run ریتم زیست شناختی متأثر از فوتوپریود VIP قطع‌شده و حیوان بر اساس ساعت درونی خود به فعالیت ادامه دهد . تحت چنین شرایطی می‌توان مستقل از تأثیرسایر عوامل موثر بر فعالیت ساعت ریتم ساز مغز به بررسی اختصاصی عامل مورد نظر پرداخت.

ثبت نمودار فعالیت لوکوموتور و تجزیه و تحلیل داده‌ها: توسط یک سیستم مونیتورینگ مادون قرمز، فعالیت لوکوموتور(ریتم استرحت /حرکت) بصورت اکتوگرام (Double Plotted actogram)، تحت شرایط تاریکی مستمر(Constant Condition(darkness=DD ثبت گردید. با توجه به نمودارهای ثبت شده(Double-plotted

diagrams) و محاسبات انجام شده آشکار گردید که تحت شرایط free-run مدت فعالیت و استراحت کمی از ٢٤ ساعت‌بیشتر می‌شودو تحت چنین شرایطی هر زمان مورد نظر به عنوان زمان سیرکادین(Circadian time) یا به اختصار CT شناخته می‌شود. زمان شروع فعالیت حیوان (معادل شروع شب، Subjective night) به عنوان CT=١٢ در نظر گرفته شد. هر گونه تغییر در فاز متعارف با توجه به مقایسه نمودارها قبل و بعد از تزریق، محاسبه و به صورت تقدم فاز (شروع فعالیت زودتر از زمان متعارف Phase advance یا تأخیر فاز (شروع فعالیت دیرتر از زمان متعارف، Phase delayگزارش گردید .

تزریق آنتاگونیست: پس از بهبودی حیوانات به دو گروه‌شاهد(n=10)وآزمایش(n=20)تقسیم گردیدند سپس در ساعات سیرکادین ٦و١٨ از یک آنتاگونیست VIP موسوم به P-(porcine) 17 Leu/6Chloro-D-Phe، با وزن مولکولی ٣٣٤٢/٢٨ محصول Bachem استفاده شد .از مایع مغزی نخاعی‌مصنوعی (aCSF) با ترکیب زیر به عنوان حلال آنتاگونیست بهره بردیم.

لازم به ذکر است که مقادیر بر حسب میلی مولار ذکرشده‌اند. (PH=7/4, NaH2PO4=1/3 NaHCO3=20, MgCl2=0/9, CaC12=3/1, KCl=2/6 NaCl=128)

جهت تزریق (٥nM از آنتاگونیست محلول در aCSF) از یک سرنگ هامیلتون که توسط یک لوله لاستیکی به‌یک کانول دست ساز وصل شده بود استفاده گردید.

گروه شاهد در ساعتهای مورد نظر تنها مایع مغزی -نخاعی مصنوعی را دریافت کردند تا عدم تاثیر آن بر ریتم فعالیت‌حیوان تایید شود.

نتایج

هفت تا ده روز پس از بهبودی هر حیوان ریتم Free-Run خود را آغاز نمود.این ریتم کمی بیش از ٢٤ساعت و به طور متوسط ٢٤/٣ ساعت بوده است. همانطور که در شکل شماره١ مشاهده می‌شود تزریق داخل‌بطنی مایع مغزی-نخاعی مصنوعی در ساعتهای سیرکادین ٦ و ١٨ (گروه شاهد) تاثیری بر فاز ریتم سیرکادین‌فعالیت لوکوموتور ندارد و تغییر فاز ایجاد نمی کند . با مراجعه به شکل شماره ٢ درمی‌یابیم که تزریق ٥ نانومول‌از آنتاگونیستVIP محلول در CSF مصنوعی در CT=٦ سبب تغییر فاز طی روزهای بعد به صورت‌تقدم فاز(Phase Advance)می‌گردد در حالیکه تزریق در CT=١٨ تاثیری بر فاز نداشته و یا منجر به تاخیر فاز غیر معنی داری می‌گردد. بررسی منحنی پاسخ فاز(Phase response curve) در مورد تزریق آنتاگونیست نشان می‌دهد که نتیجه‌این تزریق ها شبیه به نتایج حاصل از القای پالسهای‌تاریکی(Drak pulses) دردیگر پژوهش‌ها است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد تزریق آنتاگونیست ٤-CI-D-Phe 6/Leu 17، قادر است در زمان خاصی از دوره‌فعالیت ریتمیک استراحت و حرکت موش صحرایی در شرایط Free-run سبب تغییر فاز فعالیت شود. به‌عبارت دیگر آنتاگونیست به کار رفته قادر است بر فاز ریتم سیرکادین استراحت و حرکت (Rest- activity cycle) در موش صحرایی تاثیر گذاشته و ساعت مغز در زمان مشخصی از فعالیت درون نهاد خود (Endogenous pacemaking activity)، به این ماده کاملاً حساس می‌باشد. این تاثیر می‌تواند حاصل اثر مستقیم (یا غیر مستقیم) این ماده بر

مکانیزمهای وابسته به VIP در SCN باشد. این یافته تایید بیشتری بر سهم VIP در بروز ویژگی های ریتمیک فعالیتهای شبانه روزی پستانداران است. باید دانست، درشرایط متعارف یعنی برقرار بودن چرخه روشنایی و تاریکی، نور به عنوان یک عامل خارجی زمان ده(Zeitgeber)، عمل می‌کند و بدین طریق بر بسیاری از اعمال ریتمیک در مغز از جمله غلظت VIP در هستهSCN تاثیر می‌گذارد. اما در شرایط Free-run تاثیر عامل خارجی حذف شده در نتیجه نوسانی در غلظت VIP در SCN دیده نمی‌شود و از سوی دیگر پس از مدت کوتاهی، ساعت مغز مستقل از فتوپریود اعمال‌رفتاری ریتمیک را در بدن رهبری می‌کند. آنتاگونیست به کار رفته در این آزمایش در پژوهشهای دیگر سبب‌بلوک خواب REM نیز شده است (۱۳). این پدیده ، سهم VIP در پدیده القای خواب REM (تاثیر برهومئوستاز خواب) را نیز آشکار می‌سازد (۱۲،۱۱،۲و۱۳) با توجه به اینکه در پژوهش حاضر مشخص شدهآنتاگونیست ٤-CI-D-Phe-Leu بر فازسیرکادین استراحت و فعالیت و یا به عبارت دیگر به نحوی بر خصوصیات سیرکادین خواب و بیداری نیز موثر است، در نتیجه این آنتاگونیست با توجه به اینکه گیرنده‌های‌درگیر در هومئوستاز (گیرنده VIP1) و ویژگی‌سیرکادین‌خواب(گیرنده VIP2)، از نظر نوع وانتشارباهم‌متفاوتند(۱٦،۱٤،۹،۸،٦،٥،٤،۳و۱۸)، پس یک آنتاگونیست اختصاصی برای یکی از گیرنده‌های VIPنمی‌باشد. البته گزارشی در مورد اختصاصی بودن این آنتاگونیست منتشر نشده است.

VIP دارای اعمال متنوعی در مغز است و این کار را توسط حداقل دو گیرنده VIP1 و VIP2 انجام می‌دهد.انتشار آناتومیک این گیرنده‌ها در مغز جز مختصر همپوشانی، متفاوت است. باید توجه داشت که گیرنده‌هایVIP1 موجود بر نورونهای ساقه مغز در پدیده هومئوستاز خواب REM نقش دارند (۲،۱۲،۱۱و۱۳). درصورتیکه این گیرنده‌های VIP2 در هسته سوپراکیاسماتیک (و ساختارهای نوروآندوکرینی وابسته به سیستم‌سیر کادین) هستند که در تنظیم ریتمهای شبانه روزی از جمله چرخه استراحت و حرکت، در پستانداران نقش‌دارند (۳،۱۰و۱۵). بنابراین، با در نظر گرفتن مطالب فوق و نتایج آزمایش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که‌آنتاگونیست مورد استفاده برای گیرنده‌های VIP اختصاصی نمی‌باشد.

تاثیر آنتاگونیست به کار رفته در این آزمایش نشان داد بعضی ترکیبات که بر هومئوستاز خواب مؤثرندقادرند بر بخش سیرکادین آن نیز تاثیر بگذارند. این مسئله از نظر کرونوفارماکولوژی حایز اهمیت است. کاربرددارووهای ضد VIP باید از نظر تاثیر آن بر ریتمهای شبانه‌روزی مورد توجه قرار گیرد.

منابع

1. Bina K G , Rusak B.Nerve Growth Factor Phase Shift Circadian Activity Rhythms in Syrian Hamsters.Neurosci Lett 1996: 206: 97-100.

2. Bourgin P, Ahnaou A , Laporte AM , et al. Rapid Eye Movement Sleep Induction by Vasoactive Intestinal Peoptide Infuse to info the oral Pontine Tegmentum of the Rat may Involve Muscarinic Receptors. Neurosci 1999: 29: 291-302.

3. Cagampang F.R Sheward W J , Harmar A J , et al.Circadian Changes in the Expression of Vasoactive Intestinal Peptide 2 Receptorm RNA in the Rat Suprachiasmatic Nuclei.Brain Res 1998: 54: 108-120.

4. Chow B K , Yuen T T , Chan K W.Molecular Evolution of Vertebrate VIP Receptors and Functional Characterization of a VIP Receptor from Goldfish Carassius Auratus.Gen Comp Endocrinol 1997: 105: 176-85.

5. Gozes I, Mc Cune S K , Jacobson L, et al. An Antagonist to Vasoactive Intestinal Peptide Affects Cellular Functions in the Central Nervous System.J Pharmacol Exp Ther 1991: 257:959-66.

6. Gozes I, Lilling G, Glazer R , et al. Superactive Lipophilic Peptides Discriminate Multiple Vasoactive Intestinal Receptors.J Pharmacol Exp Ther 1995: 273: 161-67.

7. Gozes I, Fridkin M, Brennman D E.A VIP Hybrid Antagonist: from developmental neurobiology to Clinical Applications. Cell Mol Neurobiol 1995: 15: 675-87.

8. Grimaldi M , Cavallaro S.Functional and Molecular Diversity of PACAP/VIP Receptors in Cortical Neuronsand Type I Astrocytes.Eur J Neurosci 1999:11:2767-72.

9. Hill J M, Lee S J, Dibbern D A , et al.

Pharmacologically Distinct Vasoactive Intestinal Peptide Binding sites: CNS Localization and Role in Embryonic growth. Neuroscience 1999: 93: 783-91.

10. Inouye , S-I.T., Circadian rhythms of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus prog. Brain Res., 1996; 111:75-90.

11. Jimenez - Anguiano A, Garcia - Garcia F, Mendosa - rairez J L , et al.Brain Distribution of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors Following R E M Sleep Deprivation.Brain Res 1996: 728: 37-46.

12. Kohlmeier K A , Reiner P B.Vasoactive Intestinal Polypeptide Excites Medial Pontine Reticular Formation Neurons in the Brain Stem Rapid Eye Movement Sleep-Induction Zone.J Neurosci 1999:19:4073-81.

13. Mirmiran M, Kruisbrink J , Bos N P A , et al. Decrease of Rapid-Eye- Movement Sleep in the Light by Intraventricular Application of a VIP-Antagonist in the Rat. Brain Res 1988: 192-4.

14. Sheward W J , Lutz EM , Harmar A J. The Distribution of Vasoactive in Testinal Peptide ll Receptor Messenger RNA in the Rat Brain and Pituitary Gland as Assessed by in Situ Hybridization.Neuroscience 1995: 67: 409-18.

15. Shinohara K, Funabashi T, Kimura F. Temporal Profiles of Vasoactive Intestinal Polypeptide Precursor mRNA and its Receptor mRNA in the Rat Suprachiasmatic Nucleus.Brain Res Mol Brain Res 1999: 63: 262-67.

16. Simonneaux V , Kienlen - Campard P , Loeffle JP, et al.Pharmacological, Molecular and Functional Characterization of Vasoactive Intestinal Polypeptide/Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide Receptors in the Rat Pineal Gland. Neuroscience 1998:25:887-96.

17. Takeuchi Y , Takahashi K.Circadian Variations of Aminoacids Content of Suprachiasmatic Uncleus in Rats.Neurosci Lett 1994:178:275-8.

18. Vertongen P, Schiffmann S N, Gourlet, Robberecht P.Antoradiographic Visualization of the Receptor Subclasses for Vasoactive Intestinal Polypeptide(VIP) in Rat brain.Peptides 1997:18:1547-54.

Effect of an Antagonist of Vasoactive Intestinal Polypeptide on Biological Rhythm of Rest-Activity in the Rat

Noian Ashraf MH .

Abstract

Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP), has been found in different neurotransmitter systems and exists in various nerve tracts in the brain. Potential role of this peptide in physiological processes such as regulation of sleep and wakefulness, and biological rhythms has been confirmed in several reports.

In the present research effects of intracerebroventricular (ICV) injection of a VIP antagonist, 4-CI-D- Phe6/leu 17, at different circadian time on rest-activity cycle of rats during free- run, has been investigated. Results of this study showed that brain clock in definite time of its endogenous rhythmic activity is sensitive to the antagonist and presents this sensivity through phase advance following ICV injection at CT 6. While injection of same drug at other circadian time and also injection of artificial cerebrospinal fluid has no effect on this rhythm.

According to our experiment and considering the results of others, the sensitivity of locomotor, rhythms to VIP ergic system is revealed. In previous studies, effect of this antagonist on sleep homeostasis has also been demonstrated. Regarding difference in type and distribution of known VIP receptors in sleep homeostasis and biological rhythm of locomotor, activity, it is clear that above mentioned synthetic antagonist has no specificity for known VIP receptors.

Keywords: Circadian Rhythm/ Sleep/ Vasoactive Intestind Peptide