

پپتید وابسته به ژن کالسی تونین و اعمال آن

دکتر سید مرتضی کریمیان، استاد دیار بخش فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Calcitonin Gene Related Peptide and its Functions ABSTRACT

Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) was first reported in 1982. This peptide contains 37 amino acids which could be found in Alpha and Beta forms. CGRP shows diversity both in its receptors and biological effects and up to now four different types of receptors have been reported. It can act like a neurotransmitter, local hormone and neuromodulator. They have a variety of effects on different organs such as a potent effect on vasodilation and smooth muscle relaxation. Ability of CGRP for induction of protein extravasation from blood vessels was uncertain. In this study intra-articular infusion of 10^{-6} M CGRP to the rat knee joint induced significant protein extravasation into the rat knee joint space. The amount of protein was detected by modified Iawata method which could detect amount of protein between 5-500mg/L. Higher and lower concentrations failed to induce protein extravasation. Failure in higher concentration was likely due to significant fall in blood pressure. In the presence of an arterial hypotension induced by an α adrenoreceptor antagonist, 10^{-6} M of CGRP failed to produce protein extravasation. This effect of CGRP was a specific active effect and not a passive effect due to its potent vasodilation effect, as similar vasodilatory response induced by a β -adrenoreceptor agonist failed to induce protein extravasation. There is more than 50% of sensory neurons which contain CGRP and they are spread in all over the body and joints, therefore CGRP induced protein extravasation can potentiate inflammation in different organs.

Key Words: Calcitonin; Gene, Peptide; Neuretransmitter; CGRP

چکیده

پروتئین نام را بین ۵۰-۵۰۰ میلی گرم در لیتر اندازه گیری نماید. غلظت بالاتر و پایین تر CGRP نتوانست باعث القاء خروج پروتئین از عروق بشود. علت عدم القاء خروج پروتئین در غلظت بالاتر CGRP، می تواند افت شدید فشار خون که جذب سیستمیک این پپتید باعث آن می شود باشد، بطوری که در افت فشار خون، به مقدار مشابه که توسط آنتاگونیستهای آلفا آدنورسپتور ایجاد شد، غلظت 10^{-6} مول CGRP نتوانست باعث القاء خروج پروتئین بشود. همچنین اثر القاء خروج پروتئین توسط CGRP یک اثر اختصاصی این پپتید بوده و تنها به دلیل اثر انبساط عروقی آن نمی باشد، چرا که انبساط عروقی مشابهی که توسط آگونیستهای بتا آدنورسپتور ایجاد شد، نتوانست باعث القاء خروج پروتئین از عروق بشود. از آنجایی که بیش از ۵۰٪ از نورونهای حسی دارای CGRP بوده که در تمامی بدن و مفاصل گستردگی دارند، لذا این اثر CGRP

پپتید وابسته به ژن کالسی تونین (CGRP) اولین بار در سال ۱۹۸۲ گزارش شد. این پپتید دارای ۳۷ اسید آمینه می باشد که در ۲ نوع آلفا و بتا یافت می شوند. CGRP دارای پراکنده گی هم در نوع عمل و هم در نوع رسپتور می باشد، بطوری که تاکنون ۴ نوع مختلف رسپتور برای این پپتید گزارش شده است. این پپتید هم می تواند مانند نوروتانسمیت، یا هورمون موضعی و یا نورومدولاتور عمل نماید که باعث بروز آثار گوناگونی بر بافت‌های مختلف می شود. از جمله انسپاک عروقی قوی و شل شدگی عضلات صاف، اما توانایی CGRP برای القاء خروج پروتئین از عروق در پرده ابهام بود، در این مطالعه تزریق مداوم داخل مفصلی 10^{-6} مول CGRP به داخل زانوی رات باعث القاء خروج پروتئین از عروق، به قضاچی مفصلی شد. مقدار پروتئین خارج شده توسط روش اصلاح شده Iawata اندازه گیری شد که می تواند مقدار

از توزیع گستردگی این پیتید می‌توان نتیجه گرفت که مقدار زیادی از این پیتید در بدن تولید و ذخیره شده است، منتها پراکنده‌گی نوع آلفا و نوع بتای آن در بدن متفاوت بوده و مقدارش نیز بصورت مستقل از هم کنترل می‌شود و همچنین اعمال جدالگاهی نیز دارد. مولدری (۶) نشان داده که غالباً همراه CGRP مواد دیگر نیز مانند استیل کولین، ماده پی (SP) و NKY ترشح می‌شود. از این همراهی با سایر مواد این نتیجه گیری را می‌توان داشت که CGRP نمی‌تواند خودش مستقل‌آماً عمل کند بلکه معمولاً پاسخ سلولهای هدف را نسبت به میانجی همراهش تنظیم می‌کند.

CGRP نشان‌دار در سیستم اعصاب مرکزی در نقاط متفاوتی به گیرنده‌هایش متصل می‌شود که لزوماً همان نقاط تولید کننده CGRP نمی‌باشد. حتی در جاهایی، گیرنده‌های CGRP یافته شده که اثر کمی از نرونها ترشح کننده آن وجود دارد. از جمله اجسام زانویی، پونس و هیپوتalamوس جانبی که بیانگر این نکته است که همیشه یک همبستگی بین میزان عصب‌گیری و تعداد رسپتور در یک نقطه وجود ندارد (۷).

اعمال CGRP: تزریق به داخل سیستم اعصاب مرکزی باعث افزایش جریان خون شده که منجر به افزایش ضربان و فشار خون می‌شود (۷). همچنین می‌تواند در کاهش اشتها، کاهش ترشح اسید معده، کاهش حرکات روده‌ای نقش داشته باشد (۸). این پیتید باعث تغییر درجه حرارت رکتال می‌شود که نشان‌دهنده احتمال دخالت CGRP در تنظیم درجه حرارت می‌باشد (۸). CGRP می‌تواند باعث تشدید و تقویت اثر انبساط عروقی و کاهش احساس درد در پاسخ به تحریکات دردناک بشود.

CGRP باعث دپلاریزه شدن سلولهای عصبی همراه با تشدید تحریک‌پذیری یا مکانیسم افزایش جریان مربوط به کلسیم یا با تداخل در اثر سوماتوستاتین می‌شود (۹).

مبانی بیوشیمیایی عمل CGRP در اعصاب مرکزی کاملاً روشن نشده است، اما در محیط بنظر می‌رسد که یک فعال کننده قوی آدنیلات سیکلаз می‌باشد (۱۰). ولی راههای غیر از مسیر آدنیلات سیکلاز را نیز باید مدنظر داشت، از جمله تولید اینزوئیول (۱۱)، تریس فسفات را می‌توان نام برد (۱۲). CGRP در صفحه انتهایی حرکتی همراه با استیل کولین وجود دارد و اثرات متعددی از خود نشان می‌دهد که از جمله آنها افزایش فسفریله شدن رسپتورهای کلینرژیک می‌باشد. سلولهای عضلانی هم دارای گیرنده‌های CGRP متعلق به آدنیلات سیکلاز می‌باشند (۱۲)، اما ارزش فیزیولوژیک آنها هنوز روشن نمی‌باشد.

می‌تواند باعث تشدید التهاب در باتفاقهای گوناگون بشود.

واژه‌های کلیدی: CGRP؛ پیتید، نوروترانسミتر؛ ژن

مقدمه

در سالهای اخیر اکتشاف پیتیدها از قسمتهای مختلف بدن شتاب فزاینده‌ای پیدا کرده است. در این میان کشف پیتیدهایی که از انتهای سیستم اعصاب حسی آزاد می‌شود، جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. پیدایش این پیتیدها اصل Dale را مبنی بر این که یک نرون فقط یک میانجی ترشح می‌کند را رد کرده (۱) و امروزه معتقدند که هر نرون لاقل دو میانجی ترشح می‌کند که این دسته از ترشحات از گروه پیتیدها می‌باشد. پیتید وابسته به ژن Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) کلسی‌تونین (CGRP) یکی از این پیتیدهای عصبی می‌باشد.

اولین گزارشها مربوط به یافتن این پیتید به سالهای ۱۹۸۲ و ۱۹۸۳ بر می‌گردند. آمارا (۲) و روزنفلد (۳) (Rosenfield & Amara) گزارشی در مورد CGRP ارائه نمودند. این پیتید دارای ۳۷ اسید آمینه است که به دو صورت در انسان و رات یافت شده است، که در سیستم اعصاب مرکزی کد و تولید می‌شود (۲، ۳). پروتئین حاصل از این ترجمه دارای وزن مولکولی برابر ۱۶۰۰۰ دالتون بوده که پس از طی مراحل شکسته شدن، پیتید CGRP با وزن مولکولی ۲۹۰۰ دالتون حاصل می‌شود (۳). نوع پتاوی این پیتید توسط ژن دیگری کد می‌شود که تنها محصول ژن مزبور می‌باشد که بصورت بیولوژیک فعال می‌باشد (شکل ۱). از گروه پیتیدهای ۳۷ اسید آمینه‌ای، پیتید دیگری به نام آمیلین بدست آمده است که از نظر مشخصات حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد شبیه به CGRP می‌باشد که ژن دیگری مسؤول کد کردن و سنتز آن می‌باشد (۴).

توزیع CGRP، بطورکلی باید گفت که CGRP در بیش از ۷۵٪ از رشته‌های اعصاب حسی وجود دارد. حضور این پیتید با تکنیک واکنش ایمنی در اعصاب مرکزی و محیطی یافت شده است (۵). این پیتید، در سیستم خودکار، در عقده‌های پیش‌سیناپسی سینپاتیک و پاراسمپاتیک، در عقده‌های پس‌سیناپسی رشته‌های عصبی غیرآدرنرژیک غیرکلینرژیک یافت می‌شود (Non Adrenergic Noncolinergic) (۵). همچنین این پیتید در پوست، مر عروق خونی، قلب، دستگاه گوارش، زیان، مری، لوزالمعده، غدد بزاقی، ریه‌ها و کلیه‌ها نیز پیدا شده است (۵).

توانایی القا خروج پروتئین از عروق توسط CGRP

اثر انبساط عروقی پایدار CGRP مسؤول بسیاری از واکنشهای التهابی بعدی در عروق می‌باشد، ولی اینکه این پیشید مستقیماً پتواند باعث خروج پروتئین از عروق بشود مورد قبول نبوده اما اشاره می‌شود که می‌تواند اثرات خروج پروتئینی سایر پیشیدها را تشدید نماید(۱۷). با توجه به این اثر تقویت کننده، در این مطالعه مجددًا اثر مستقیم القای خروج پروتئینی توسط CGRP با روش حساستر مورد بررسی قرار گرفت.

روش و مواد

در این مطالعه زانوی رات به عنوان محل آزمایش انتخاب شد. راتها را پس از بیهوش کردن با اورتان (۱/۲ گرم برای یک کیلوگرم وزن زنده، داخل پریتوئن) به پشت خوابانده و پوست ناحیه زانو را برداشته و سرم فیزیولوژی را با سوزن نمره ۲۹ متصل به شلنگ به پمپ میبینی پالس که سر دیگر آن در داخل ظرف سرم فیزیولوژی بود با سرعت ۰/۲۵ میلی لیتر در دقیقه بطور دائم به کپسول پشتی مفصل زانو تزریق کرده و این مایع پس از دور زدن در کپسول مفصلی از ناحیه قدامی کپسول توسط شلنگ دیگر پمپ که سر مکنده آن به سوزن نمره ۲۹ وصل شده بود و در کپسول قدامی وارد شده بود مکیده شده در لوله‌های مختلف جمع‌آوری می‌شود. هر ۸ دقیقه، یک لوله زیر شلنگ جمع‌آوری قرار می‌گرفت و این جمع‌آوری به مدت یک ساعت ادامه یافته و سپس ظرف سرم فیزیولوژی با ظرف یکی از غلظتهاي CGRP تعویض می‌شد. در این آزمایش ۳ غلظت ۵-۶-۷ مول و ۵۰۰ میلی گرم در مطالعه قرار گرفت. شریان کاروتید چند رات در هر سری از آزمایشات جهت کنترل فشار خون کاتوله شده و به دستگاه ثبت فشار خون متصل می‌شد. مقدار پروتئین موجود در نمونه‌ها توسط روش میکروتوریدیمتری اندازه‌گیری می‌شود. این روش اولین بار توسط یاواتا (Iawata) (۱۹) معرفی شد. حساسیت این روش تعیین مقدار پروتئین بین ۵۰ تا ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بوده که با تغییراتی که در غلظتها ایجاد شد، میزان حساسیت آن به مقدار ۵ تا ۵۰۰ میلی گرم پروتئین در لیتر افزایش یافته و غلظتهاي پایین را نیز به دقت اندازه‌گیری نمود. در روش تعییر یافته یاواتا، ۴٪ میلی لیتر محلول ۰/۲٪ بنزتونیم کلرايد و ۱/۶ میلی لیتر از محلول ۱/۲۲ EDTA و ۰/۲٪ NaOH مخلوط کرده و ۰/۲ میلی لیتر از محلول نمونه به آن اضافه کرده و خوب بهم زده و به آن ۱۰ دقیقه برای انجام واکنشها فرست می‌دهیم. سپس مقدار پروتئین را با اسپکتروفتوتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده و عدد بدست آمده را با منحنی استاندارد که با غلظتهاي ۵ تا ۵۰۰ میلی گرم از سرم آلبومین گاوی تهیه شده بود سنجیدیم. روش آماری به کار رفته برای محاسبات پس از تست توزیع نرمال، از ANOVA و Paired T test می‌باشد.

اتصال متابولیک : CGRP غالباً به عنوان یک آنتاگونیست عمل انسولین عمل می‌کند، بخصوص در ارتباط با سنتز گلیکوژن، که مانع سنتز آن می‌شود و برداشت قند وابسته به انسولین نیز مهار می‌شود(۱۲). بنظر می‌رسد که ارزش فیزیولوژیک آن در کنترل متابولیسم عضلات، بویژه در موقع فعالیت عضلانی از طریق عصب باشد که مستقل از کنترل هورمونی بدن می‌باشد و باعث افزایش کاتابولیسم و مقدار ATP در عضلات می‌شود.

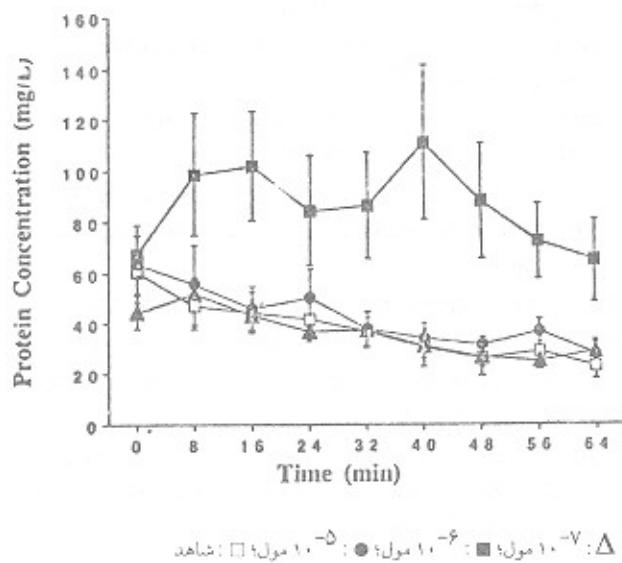
اثر بر روی گردش خون : CGRP قویترین منبسط کننده عروقی شناخته شده در بدن است(۱۴) و تزریق یک فمتومول در بین جلد باعث افزایش شدید جریان خون ناحیه به مدت چند ساعت می‌شود که ظاهرآ اثر مستقیم CGRP بوده و آزاد شدن هیچ مدیاتوری را در بر نمی‌گیرد(۱۴). رشته‌های عصبی محتوی CGRP در بسیاری از عروق پیدا شده است. غلظت پلاسمایی آن بین ۱۰-۱۰۰ پیکومول می‌باشد، اما یتنظر می‌رسد تعداد گیرنده‌ها بیش از این باشد (۱۵)، این وسعت حضور دخالت آزاد را در تونیسته عروق محتمل می‌سازد. خصوصاً وقتی که آنتاگونیست CGRP مانند ۸-37 CGRP تزریق می‌شود، انتقام عروقی خفیفی داریم که بیانگر آزاد شدن فیزیولوژیک این پیشید است. امروزه در مورد اثر مهم دخالت در تنظیم موضعی جریان خون با واسطه یا بدون واسطه آندوتلیوم عروق، تردیدی وجود ندارد(۱۴،۱۵). در سیستم واپسیتی به آندوتلیوم، حضور گاز NO دخالت دارد و موجب آزاد شدن این گاز می‌شود. رشته‌های حاوی CGRP در تمامی قسمتهای دستگاه گوارش مانند روده‌ها، غدد بزاپی، کبد و لوزالمعده پراکنده است(۱۶).

گیرنده‌های CGRP : برای دستیابی و پس بردن به ماهیت گیرنده‌ها، نیازمند آگونیستها و آنتاگونیستهای مناسب هستیم. از آنتاگونیستها می‌توان ۸-37 CGRP را نام برد که البته به تمامی ریپتورهای CGRP متصل نمی‌شود، حتی در شرایطی بصورت غیررقابتی نیز عمل می‌کند و دیگری TYP CGRP 28-37 می‌باشد که پاسخهای مختلفی با PA₂ متفاوت از خود نشان داده است. از آگونیستها در حال حاضر می‌توان ۲۷ cys(acm) را نام برد. تاکنون ۴ گونه از گیرنده‌ها پیدا شده است که احتمال پیدایش زیرگونه‌های بیشتر نیز وجود دارد. پراکنده‌گی این گیرنده‌ها در بافت‌های مختلف متفاوت می‌باشد و البته اثرات متفاوتی نیز از خود بروز می‌دهد. این گیرنده‌ها به قرار زیر هستند(۱۸) :

- A -
- CGRP1 B -
- CGRP2-CGRP3

نتایج و بحث

غودار ۱- خروج پروتئین در زانوی رات در طول زمان با غلظت‌های مختلف CGRP و شاهد



زمان صفر، زمان شروع تزریق می‌باشد، تعداد هر گروه، ۶ عدد و گروه شاهد، ۲ عدد رات.

انبساط عروقی ناشی از CGRP بصورت غیرفعال حاصل می‌شود. برای اثبات این مورد از ایزوپروترنول (بنا ۱ و ۲ آگونیست) استفاده شد. غلظت ۵- مول باعث کاهش مقاومت عروقی ۷/۱۲±۰/۴۶ میلی‌گرم در لیتر (نمودار ۲) شد که برابر مقدار کاهش مقاومت غلظت ۶- مول بود ($2/11 \pm 2/9$) اما این آنتاگونیست نتوانست باعث القای خروج پروتئین بیش از مقدار کنترل بشود ($11 \pm 2/9$ میلی‌گرم در لیتر)، در نتیجه ثابت شد که القای خروج پروتئین یک اثر فعال CGRP بوده و باعث افزایش مستقیم تقویت‌پذیری عروق می‌شود. این اثر CGRP یک پدیده پایدار و طولانی مدت بوده و می‌تواند از عوامل مؤثر در شروع التهاب و مشکلات مفصلی باشد.

خروج پروتئین از عروق از عوامل اولیه شروع التهاب موضعی می‌باشد.

CGRP در بیش از ۵۰٪ از رشته‌های اعصاب حسی وجود داشته و در شرایط مختلف به تنها یک و یا همراه دیگر نورو-ترانسمیترها آزاد می‌شود، ولی آیا اینکه بتواند موجب خروج پروتئین بشود یا نه، مشخص نشده است. حتی گزارشی مبنی بر عدم توانایی آن در القای خروج پروتئین گزارش شده است (۱۴). در این آزمایش غلظت‌های ۷- مول، ۶- مول و ۵- مول CGRP با روش تغییر یافته اندازه‌گیری، جهت بورسی توانایی خروج پروتئین باعث القای خروج پروتئین از عروق بشوند (نمودار ۱) و فقط غلظت ۶- مول توانست در طول مدت آزمایش (۱ ساعت) باعث القای خروج پروتئین از عروق بشود. در تمامی نمونه‌ها (۸ نمونه)، یک اختلاف معنی‌دار در مقدار پروتئین نسبت به کنترل وجود داشت ($111 \pm 20/2$ میلی‌گرم در لیتر و 25 ± 8 میلی‌گرم در لیتر)، چون CGRP یک منبسط کننده قوی عروقی بوده و این انبساط عروقی سیستمیک باعث افت شدید فشار خون می‌شود (نمودار ۲) در نتیجه عدم توانایی غلظت ۵- مول در القای خروج پروتئین می‌تواند به علت کاهش ۳۰٪ فشار خون باشد. برای اثبات این مدعای مقدار فشار خون توسط فنوسکی بترامین آنتاگونیست گیرنده القا و بتا، به مقدار $4 \pm 2/7$ پایین آورده شد که این کاهش فشار خون برابر با کاهش غلظت ۵- مول CGRP (تعداد ۵ رات) بود. برای این منظور از تزریق وریدی غلظت ۴- مول استفاده شد و سپس آزمایش با غلظت ۶- مول تکرار شد که این بار این غلظت نیز نتوانست باعث خروج پروتئین از عروق بشود و مقدار پروتئین اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت (27 ± 10 میلی‌گرم در لیتر). آیا خروج پروتئین یک پدیده فعل اثر CGRP می‌باشد یا بدنبال

منابع

- 1- Paton HD, Fuchs AF, Hille B, Scher AM, Steiner R. Text book of physiology. Sounders int. second ed. 1989 p 242.
- 2- Amara S.G., Jones V., Rosenfield M.G., Evans R.M. (1982) Alternative RNA processing in Calcitonin gene expression generates mRNA encoding different polypeptide products. Nature (Lond) 298: 240-244.
- 3- Rosenfield M.G., Mermod J, Amara S.J., Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Wale W.W. and Evans R.M. (1983) Production of a novel neuropeptide encoding by calcitonin gene related peptide via tissue specific RNA processing. Nature (Lond) 304: 129-135.
- 4- Nishi M., Chan S.J., Nagaatsu S.Bell G.L., Steiner D.F. (1982). Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five

mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. Proc Nat Acad Sci U.S.A. 86: 5738-5742.

- 5- Yaato A.I. and Tohyama M. (1989) Calcitonin gene related peptide in the nervous system. Prog Neurobiol. 33: 335-386.
- 6- Muldery P.K., Chatel M.A., Rodrigo J., Allen J.M., Rosenfield M.G., Polak J.M. and Bloom S.R. (1985) Calcitonin gene related peptide in the cardiovascular tissue of the rat. Neuroscience 14: 947-954.
- 7- Dennis T., Fournier A., Guard S., St Peir S. and Quirion R. (1991). Calcitonin gene related peptide (hCGRP a) binding site in the nucleus accumbens. A typical structural requirement and marked phylogenetic differences. Brain Res. 539: 59-66.
- 8- Tannenbaum G.S. and Goltzman D. (1985). Calcitonin gene

- related peptide mimic calcitonin action in brainom growth hormon release and feeding. *Endocrinology*. 116: 2685-3688.
- 9- Wiesenfeld Hallen Z. (1986). Somatostatin and CGRP synergically modulate spinal sensory and reflex mechanism in the rat: behavioral and electrophysiological study. *Neuroscience letter*. 67: 319-323.
- 10- Van Valen F., Piechot G. and Jurgens S. (1990). Calcitonin gene related peptide receptor are linked to cyclic adenosine monophosphate production in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neuroscience letter* 119: 195-198.
- 11- Kim D. (1991). Calcitonin gene related peptide activates the muscarinic gated K current in atrial cell. *Pflugers Arch* 418: 338-345.
- 12- Kreutter D., Orena S.G. and Andrew K.M. (1989). Suppression of insulin stimulated glucose transport in L6 myocytes by Calcitonin gene related peptide. *Biochem - Biophys Res Comm*. 325: 294-298.
- 13- Leighton B., Foot E.A., Cooper G. J.S. and King G.M. (1989). Calcitonin gene related peptide, a potent regulator of glycogen metabolism in rat skeletal muscle . *FEBS Lett.* 249: 357-361.
- 14- Brain S.D. Williams T.J., Tippens G.R., Morris S.G. and Macintyre I. (1985) Calcitonin gene related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 313 : 54-56.
- 15- Pernow J. (1989). Action of constrictor (NPY and endothelin) and dilator (SP, CGRP and VIP) peptides on big spelenic and human skeletal muscle arteries: involvement of endothelium. *Br. J. Pharmac* 97: 983-989.
- 16- Holzer P. (1994). Calcitonin gene related peptide. *Gut peptide: Biochemistry and Physiology*, 493-523.
- 17- Kidd b. L., Mapp P., L., Blake D.R., Gibson S.J. and Polak J.M. (1990). Neurogenic influence in arthritis. *Annals Rheumatic Disease*. 49: 649.
- 18- Dennis T.B., Fournier A., St Peirre S. and Quirion R. (1989) Structure activity profile of Calcitonin gene related peptide in peripheral and brain tissue, evidence for multiplicity. *J. Pharm. Exp. Ther.* 251: 718-725.
- 19- Iawata J. and Nishikasa A. (1979) New microturbidimetric method for determination of protein in cerebro spinal fluid and urine. *Clinical Chemistry*, 2(P) pp 1317-1319.