



# دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی افضلی پور

و

مرکز تحقیقات فیزیولوژی

پایان نامه مقطع دکترای تخصصی (PhD) فیزیولوژی

عنوان:

بررسی نقش گیرنده های اپیوئیدی کاپا و تعامل آن ها با گیرنده های اپلین در اثرات  
اینتروپیک مثبت و منفی اپلین در قلب موش صحرایی نر مبتلا به پر فشاری خون

کلیدی مزمین

توسط: فرزانه رستم زاده

استاد راهنما: دکتر حمید نجفی پور

استاد مشاور: دکتر سیاوش جوکار - دکتر سعید ماهانی

سال تحصیلی: ۱۳۹۶



**Kerman University of Medical Sciences**

**Faculty of Medicine and Physiology Research Center**

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Ph.D in Medical  
Physiology

**Title:**

**Role of kappa opioid receptors and their interaction with apelin  
receptors in positive and negative inotropic effects of apelin in the  
heart of rats with coronic renovascular hypertension**

**By**

**Farzaneh Rostamzadeh**

**Supervisor**

**Dr. Hamid Najafipour**

**Advisors**

**Dr. Syavash Joukar - Dr. Saeed Esmaili Mahani**

**Year: 2017**



## چکیده

**مقدمه:** پرفشاری خون یکی از عوامل خطر اصلی ایجاد و پیشرفت نارسایی قلب، سکنه های قلبی و مغزی می باشد. پرفشاری خون کلیوی یکی از دلایل شایع پرفشاری خون ثانویه می باشد. این بیماران مستعد مقاومت در برابر داروهای کاهنده فشار خون هستند. اپلین فشار شریانی را در پرفشاری خون از جمله پرفشاری خون کلیوی کاهش می دهد. اپلین همچنین با اثر مستقیم روی قلب و اثر غیر مستقیم روی عروق کارایی قلب را افزایش می دهد. گیرنده های اپلین (APJ) با سایر گیرنده های جفت شده با پروتئین G (GPCRs) از جمله گیرنده های کاپا اپیوئیدی (KORS) در تنظیم اعمال فیزیولوژیک گفتگوی دو طرفه دارند. اپلین از مسیرهای مختلفی از جمله پروتئین کیناز C و فسفریلاسیون ERK1/2 انقباض پذیری قلب را افزایش می دهد. هترودمیریزاسیون APJ و KORS میزان فعال شدن PKC و فسفریلاسیون ERK1/2 را افزایش می دهد. نقش تعامل گیرنده های اپیوئیدی و اپلین در اثرات قلبی و عروقی اپلین ناشناخته است. علاوه بر این نقش پروتئین کیناز C و فسفریلاسیون ERK1/2 در اثرات قلبی اپلین در این مدل از پرفشاری خون و نقش گیرنده های اپیوئیدی در این زمینه شناخته نشده است، بنابراین هدف مطالعه حاضر نقش این میانجی گر های داخل سلولی، میان گیرنده های KORS، هترودمیریزاسیون APJ و KOR، تاثیر اپلین بر مقدار هترودمیریزاسیون و تعامل بین گیرنده های اپیوئیدی و گیرنده اپلین روی اثرات قلبی و عروقی اپلین در مدل پرفشاری خون مزمن کلیوی بود.

**روش:** این مطالعه بر روی ۱۶۸ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم انجام شد. پرفشاری خون مدل هو کلیه ای یک گیره ای با گذاشتن یک کلیپ پلکسی گلاس با قطر ۰/۲ میلی متر روی شریان کلیه چپ موش صحرایی ایجاد شد. حیوانات به ۲۱ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. ۱۶ هفته پس از گذاشتن کلیپ (ایجاد پرفشاری مزمن) پس از بیهوشی با توپیتال سدیم سه کاتتر پر شده با سالین هیپارینه در شریان فمورال، بطن چپ قلب و ورید ژیگولار به ترتیب به منظور

ثبت فاکتورهای همودینامیک، شاخص های انقباض پذیری قلب و تزریق دارو گذاشته شد. کانول های شریانی و قلبی به ترانسدیوسر فشار و سپس به سیستم پاورلب ۸ کاناله متصل شدند. اپلین با دوزهای ۴۰ و ۶۰  $\mu\text{g}/\text{kg}$  از طریق ورید ژوگولار تزریق گردید. F13A (مهارکننده ی گیرنده های اپلین)، نالوکسان (مهارکننده ی عمومی گیرنده های اپیوئیدی)، nor-BNI (مهارکننده انتخابی گیرنده های کاپا) و یا Chelerythrine (مهارکننده PKC) ده دقیقه قبل از تزریق اپلین استفاده شدند. PTX (مهارکننده Gi) ۴۸ ساعت قبل از اپلین تزریق شد. اندازه گیری بیان mRNA و پروتئین گیرنده ی کاپا اپیوئیدی به ترتیب با Real Time PCR و وسترن بلات انجام شد. دیمیریزاسیون گیرنده اپلین با گیرنده کاپا با روش ایمونوپرسیپیتیشن بررسی شد. مقدار ERK 1/2 و فسفریلاسیون آن با روش الایزا ارزیابی گردید.

**نتایج:** میانگین فشار شریانی سیستولی/دیاستولی در گروه شم و 2K1C به ترتیب ۱۱۰/۷۱ و ۱۷۱/۱۲۴ میلیمترجیوه بود. F13A و نالوکسان اثرات کاهندگی فشار اپلین را در هر دو دوز ۶۰ و ۴۰  $\mu\text{g}/\text{kg}$  مهار کردند. nor-BNI اثرات اپلین بر فشار شریانی را در دوز ۴۰ کاملاً مهار و در دوز ۶۰ کاهش داد. اثر اپلین ۴۰ بر فشار شریانی توسط PTX و اثر اپلین ۶۰ بر فشار شریانی توسط PTX و شلریتترین مهار گردید. اپلین در هر دو دوز ۶۰ و ۴۰ انقباض پذیری قلب را افزایش داد. اثرات اپلین در هر دو دوز روی قلب با F13A، نالوکسان، nor-BNI و شلریتترین کاهش یافت و با PTX مهار شد. nor-BNI و شلریتترین مانع از جبران افت  $+\text{dp}/\text{dtmax}$  و  $-\text{dp}/\text{dtmax}$  توسط اپلین ۶۰ شدند. مهار همزمان گیرنده های اپیوئیدی و اپلین و مهار همزمان گیرنده کاپا اپیوئیدی و اپلین فشار شریانی را کاهش و انقباض پذیری قلب را در پاسخ به اپلین ۶۰ افزایش داد. پرفشاری خون بیان پروتئین گیرنده کاپا اپیوئیدی و هترودمیریزاسیون APJ و KORs را افزایش و فسفریلاسیون ERK1/2 را کاهش داد. اپلین در هر دو دوز مقدار هترودمیریزاسیون و فسفریلاسیون ERK1/2 را به سطح طبیعی بر گرداند. مهار گیرنده کاپا اپیوئیدی فسفریلاسیون ERK1/2 در پاسخ به اپلین ۶۰ را افزایش داد. شلریتترین

فسفریلاسیون ERK1/2 در پاسخ به هر دو دوز اپلین را مهار و PTX فسفریلاسیون ERK1/2 در پاسخ به اپلین ۶۰ را کاهش داد.

**نتیجه گیری:** یافته های این مطالعه نشان داد که گیرنده های اپیوئیدی، بخصوص گیرنده کاپا اثرات اپلین بر فشار خون و اثرات اینوتروپیک و لوسی تروپیک اپلین را میانجی گری می کنند. تعامل گیرنده های اپیوئیدی و APJ باعث تشدید اثرات کاهندگی فشار و اثر اینوتروپیک مثبت اپلین می شود. پرفشاری خون 2K1C مزمن بیان گیرنده های کاپا و هترودیمیرزاسیون این دو گیرنده را افزایش می دهد. همراهی هترودیمیرزاسیون با کاهش ERK1/2 فسفریله اثرات اینوتروپیک و لوسی تروپیک اپلین را تغییر می دهد. این تغییرات ممکن است در پاتوفیزیولوژی اختلال عملکرد قلب، در پرفشاری خون کلیوی مزمن که همراه با کاهش سطح سرمی اپلین است، دخیل باشد. اثر اپلین بر بهبود مقدار ERK1/2 فسفریله و میزان هترودیمیرزاسیون APJ و KORS، می تواند اپلین را به عنوان یک هدف درمانی در این نوع از پرفشاری خون مطرح کند.

**کلمات کلیدی:** هترودیمیرزاسیون، پرفشاری خون کلیوی، گیرنده اپلین، گیرنده های اپیوئیدی، گیرنده کاپا اپیوئیدی،

اپلین، انقباض پذیری قلب، ERK1/2 فسفریله، پروتئین کیناز C



## Abstracts

**Introduction:** Hypertension is one of the main risk factors for the development and progression of heart failure, myocardial infarction (MI) and Stroke. Renovascular hypertension is one of the major types of secondary hypertension. These patients are prone to resistance to blood pressure reducing drugs. Apelin decreased the arterial pressure in hypertension including renovascular hypertension. As apelin/APJ system involves in the regulation of blood pressure/myocardial contractility, it is not surprising that the apelin/APJ system plays direct and indirect roles on the function of the heart. Apelin receptors (APJ) cross-talk with other G-protein-coupled receptors such as kappa opioid receptors (KORs) on physiologic functions. Apelin has positive cardiac inotropic effects through protein kinase C (PKC) activation and phosphorylation of ERK1/2 and the heterodimerization of APJ and KORs increases PKC activation and phosphorylation of ERK1/2 in response to apelin. The role of interaction between opioid and apelin receptors on cardiovascular effects of apelin was not known. Therefore, the present study aimed at evaluating the heterodimerization between KOR and APJ and assessing the impact of low and high doses of apelin on the level of heterodimerization in the myocardium in renovascular hypertension. In addition, as the role of ERK1/2 phosphorylation and PKC in mediating the cardiac impacts of apelin in rats with renovascular hypertension and the role of opioid receptors (OPRs) in this regard is unclear, the role of these intracellular mediators, the expression of KORs, and the role of interaction between OPRs and APJ on the cardiovascular impacts of apelin in a chronic renovascular model of hypertension was also investigated.

**Methods:** Experiments were carried out on 168 Wistar rats weighing 170- 200 grams. For induction of chronic 2K1C hypertension, after anesthesia with ketamine and xylazine a 0.2-mm diameter plexiglas clip was placed on the left kidney artery. The animals were divided into twenty one groups with 8 rats in each. At the end of week 16, after anesthesia with sodium thiopental,

three catheters filled with heparin saline were placed in right femoral artery, left ventricle (LV) and the jugular vein for recording hemodynamic and cardiac contractility incidences and injection of the drugs respectively. The artery and ventricular cannulas were connected to pressure transducers and then to an 8-channel Powerlab system.

F13A (an APJ antagonist), naloxone (a general OPR inhibitor), nor-BNI (a selective inhibitor of KOR) and chelerythrine (PKC inhibitor) were given IV 10 min prior to injections of apelin at doses of 40 and 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . PTX (G $\alpha$ i inhibitor) was injected intra-peritoneally 48 hours prior to the hemodynamic experiments. The heterodimerization of KOR and APJ, the expression of KOR mRNA and protein in the left ventricle of 2K1C rats were measured by immunoprecipitation, western blot and, real time PCR respectively. The levels of ERK1/2 phosphorylation were evaluated by ELISA.

**Results:** The arterial systolic/diastolic blood pressure in sham and 2K1C rats was 110/71 mmHg and 171/124 mmHg, respectively. The hypotensive effects of apelin at both doses were inhibited by F13A and naloxone. Nor-BNI completely inhibited the effects of apelin 40 on arterial pressure, and decreased the effects at 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Apelin 40 and 60 decreased blood pressure through Gi pathway. Apelin 60 also reduced blood pressure through PKC pathway. Apelin in both doses increased cardiac contractility. The cardiac impacts in both doses were reduced by F13A, naloxone, nor-BNI and chelerythrine and blocked by PTX. KORs inhibition and chelerythrine also prevented the compensation for the decrease in the left ventricle  $+\text{dp}/\text{dt}$  max and  $-\text{dp}/\text{dt}$  max caused by apelin 60. The simultaneous inhibition of OPR and APJ and KORs and APJ reduced arterial pressure and increased cardiac contractility in response to apelin 60. Hypertension increased the expression of KORs and heterodimerization of APJ and KOR, and reduced ERK1/2 in the left ventricle. Apelin, in both doses reduced the level of heterodimerization in 2K1C animals and recovered the reduction in pERK1/2. Inhibition of KORs significantly increased ERK1/2

phosphorylation in response to apelin 60 $\mu$ g/kg. Chelerythrine inhibited apelin 40 and 60- induced increase in ERK1/2 phosphorylation. PTX inhibited apelin 60- induced increase in ERK1/2 phosphorylation.

**Conclusions:** Findings showed that the OPR, particularly KOR, mediate the inotropic, lusitropic, and depressor effects of apelin. The interaction of the OPR and APJ augments the inotropic and vasodepressor effects of apelin. 2K1C hypertension increased the expression of KORs and heterodimerization of APJ and KORs. The heterodimerization was associated by reduction of ERK phosphorylation and altered the cardiac inotropic and lusitropic effects of apelin. These changes may participate in pathophysiology of cardiac dysfunction in renovascular hypertension that is associated with subnormal level of serum apelin. Apelin- induced recovery of ERK1/2 phosphorylation and KOR-APJ dimerization may nominate apelin as a therapeutic goal in treatment of this kind of hypertension.