

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie



**Linda Mošovská**

## **Vliv morfinu na odolnost srdce k ischemii**

**Effect of morphine on the resistance of the heart to ischemia**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Neckář Ph.D.

Praha, 2011

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Neckáři Ph.D za jeho pomoc, trpělivost a pevné nervy při sepisování mé bakalářské práce.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.8.2011

Podpis

## Obsah:

<b>1. Abstrakt.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Seznam zkratek.....</b>	<b>7</b>
<b>4. Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>5. Opioidy.....</b>	<b>9</b>
5.1. Dělení opioidů.....	9
5.2. Opioidy v praktickém využití.....	10
<b>6. Opioidní receptory.....</b>	<b>11</b>
6.1. Struktura OR.....	11
6.2. Zařazení OR.....	12
6.3. Typy OR.....	14
6.4. Desensitizace OR.....	16
<b>7. Ischemie myokardu.....</b>	<b>16</b>
7.1. Vznik ischemie.....	16
7.2. Metabolizmus ischemického myokardu.....	18
<b>8. Arytmie.....</b>	<b>19</b>
8.1. Dělení arytmií.....	19
<b>9. Reperfuze.....</b>	<b>20</b>
9.1. Stunning.....	21
<b>10. Ischemická tolerance srdce.....</b>	<b>21</b>

10.1. Ischemický preconditioning.....	21
10.2. Studie s morfinem a ischemie srdce.....	24
10.3. Kardioprotektivní signální dráhy indukované opioidy.....	25
10.4. Opioidy v pozdní fázi kardioprotekce.....	26
10.5. Chronické podávání morfinu.....	27
10.6. Kardioprotekce na člověku.....	27
<b>11. Postconditioning.....</b>	<b>28</b>
<b>12. Vliv prenatálního podávání opioidů na odolnost srdce k ischemii v dospělosti.....</b>	<b>29</b>
<b>13. Závěr.....</b>	<b>31</b>
<b>14. Seznam literatury.....</b>	<b>32</b>

## 1. Abstrakt

Opioidy jsou vnímány jako nebezpečné a návykové látky, především díky polosyntetickým opioidům, jakým je například heroin. Zjistilo se ale, že tyto látky mohou hrát důležitou roli v odolnosti srdce k ischemii, a to tím, že omezují poškození tkáně, které při infarktu vzniká. Vzhledem k tomu, že infarkt myokardu je nejčastější kardiovaskulární choroba, je tento protektivní účinek nezanedbatelný. Kardioprotektivní účinek je zprostředkován hlavně přes  $\delta$  opioidní receptory, nicméně pár studií ukazuje kardioprotektivní působení i díky  $\kappa$  opioidním receptorům. Protektivní účinek vzniká pomocí aktivace opioidních receptorů jejich agonisty (např. morfin nebo TAN-67), a to buď před ischemií (opioidní preconditioning) a nebo před reperfuzí (opioidní postconditioning). V signálních drahách, zprostředkujících kardioprotekci se uplatňuje mitochondriální  $K_{ATP}$  kanál,  $G_i/o$  proteiny, protein kinázy C, tyrozin kinázy a volné kyslíkové radikály.

Klíčová slova: morfin, opioidy, opioidní receptory, ischemie myokardu, preconditioning, postconditioning.

## 2. Abstract

Opioids are considered as dangerous and addictive substances, mainly due to synthetic opioids such as heroin. It was discovered, that these substances can play an important role in myocardial ischemia because they can limit the damage of the heart tissue that occurs during a heart attack. Since that heart attack is the most common cardiovascular disease, the protective effect is significant. Cardioprotective effect is mainly mediated through  $\delta$  opioid receptors, but the few studies have shown cardioprotective effect mediated through  $\kappa$  opioid receptors. The protective effect occurs by activation of opioid receptors by their agonists (eg. morphine or TAN-67), either before ischemia (opioid preconditioning) or before reperfusion (opioid postconditioning). The signaling pathway of cardioprotection include mitochondrial  $K_{ATP}$  channel,  $G_i/o$  proteins, protein kinase C, tyrosine kinases and reactive oxygen species.

Key words: morphine, opioids, opioid receptors, myocardial ischemia, preconditioning, postconditioning.

### 3. Seznam zkratek

OR – opioidní receptor

EOPs – endogenní opioidní peptidy

POMC – pro-opiomelanokortin

GIT – gastrointestinální trakt

NOP-R – nociceptinový receptor

ORL-1 – sirotčí receptor (opioid receptor-like)

IP3 – inositol-1,4,5-trifosfát

ICHS – ischemická choroba srdeční

SR – sarkoplazmatické retikulum

ATP – adenosin trifosfát

ROS – volné kyslíkové radikály

mPTP – mitochondrial permeability transition pore

IPC – ischemický preconditioning

PC – preconditioning

ME - Met<sup>5</sup>-enkefalin

DPDPE - D-Pen<sup>2,5</sup>-enkefalin

DADLE - (D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>)-enkefalin

BNTX – 7-benzylidenenaltrexon

PKC – protein kináza C

POC – postconditioning

MA – metamfetamin

GDP/GTP – guanosindifosfát/guanosin trifosfát

## 4. Úvod

Opioidy jsou přirozeně se vyskytující nebo syntetické látky, které mají veliké analgetické účinky, díky kterým jsou po staletí využívány v lékařství k tišení bolesti nebo jako léky proti kašli. Dlouhodobé podávání těchto látek však může vyvolat závislost na opioidech, jak je například známo u narkomanů. Na opioidy se rychle vyvíjí tolerance. Z těchto důvodů se léčbě opioidy mnoho pacientů brání. Nicméně opioidy mají ještě jiný pozitivní účinek, než je jen schopnost ulevit pacientům od bolesti, a tím je schopnost zmírnit poškození srdce, které je způsobeno akutním infarktem myokardu. Ještě není zcela přesně známo, jakým mechanismem opioidy vyvolávají kardioprotektivní účinek, ale jelikož je ischemie myokardu nejčastější srdeční onemocnění, na které umírá asi 25% postižených, je budoucí výzkum na protektivní účinky opioidů velice důležitý a nadějný. Ve své bakalářské práci se tedy pokusím shrnout dosavadní poznatky o opioidech, ischemii srdce a o mechanismech, kterými na myokard působí.

## 5. Opioidy

### 5. 1. Dělení opioidů

Opioidy jsou sloučeniny, vážící se na specifické opioidní receptory (OR). OR se vyskytují hlavně v centrálním nervovém systému, ale i jiných tkáních: tenkém střevu, tlustém střevu, nadledvinách, ledvinách, plicích, slezině, varlatech, vaječnicích a děloze (Wittert et al., 1996).

Podle poměru afinity (síly vazby k receptoru) a vnitřní aktivity (efektivity – síly aktivace receptoru) se opioidy dělí na několik skupin:

- 1) Opioidní agonisté - mají silnou vnitřní aktivitu i afinitu k buněčným receptorům, čímž stimulují buňku k fyziologické odpovědi (např. morfin, kodein).
- 2) Opioidní antagonisté – mají silnou afinitu, ale žádnou vnitřní aktivitu, tj. brání v působení agonistům. Kompetitivní antagonisté se váží na stejný receptor jako agonisté a „bojují“ s nimi o vazebné místo, zatímco nekompetitivní antagonisté blokují působení agonistů jiným způsobem. Užívají se jako lék při předávkování (např. naloxon).
- 3) Částeční opioidní agonisté-antagonisté – některé druhy receptorů aktivují, jiné blokují (např. butorphanol, pentazocin).

Podle způsobu a místa jejich vzniku lze opioidy dělit na:

- 1) Endogenní opioidní peptidy (EOPs) – jsou produkovány v těle živočichů, v nervové tkáni z progenitorových molekul. Základem pro jejich vznik jsou: pro-enkefalin, pro-opiomelanokortin (POMC), pro-dynorfin a pro-nociceptin. Z POMC vzniká  $\beta$ -endorfin a jiné neopoidní peptidy, z pro-enkefalinu A vznikají pentapeptidy met-enkefalin a leu-enkefalin. Další z opioidů, pro-enkefalin B, je základem pro tvorbu dynorfinu a neo-endorfinu. Nociceptin je podobný dynorfinu a ovlivňuje spinální a supraspinální pochody bolesti. EOPs jsou po těle transportovány vnitřními nervy gastrointestinálního svalu a srdečními nervy. Mají silné analgetické účinky, způsobují útlum dýchání, vazodilataci, sníženou motilitu gastrointestinálního traktu (GIT), ovlivňují řadu psychických, vegetativních a endokrinních funkcí.

- 2) Přirozeně se vyskytující opioidy – jsou to alkaloidy získané z extraktu ze semen rostlin, např. vlčího máku (*Papaver somniferum*). Patří sem např. kodein a morfin.
- 3) Semisyntetické – jsou uměle vytvořeny z přirozeně se vyskytujících opioidů, mezi nejznámější můžeme zařadit heroin, dihydrokodein a oxykodon.
- 4) Syntetické – mezi ně můžeme zahrnout petidin, metadon nebo fentanyl. Nemají strukturu příbuznou s opioideními alkaloidy (Doyle et al., 1998).

## 5. 2. Opioidy v praktickém využití

Hlavní vlastností opioidů, díky které se v lékařství široce využívají, je analgezie (úleva od bolesti), zároveň tlumí kašel, odstraňují dušnost a působí jako antistresový faktor. V medicíně se využívají na léčbu silné akutní bolesti a také na bolesti způsobené nádorovým bujením. Obecně lze říci, že o vhodnosti užití opioidů nerozhoduje původ, ale intenzita bolesti. V souvislosti s podáváním opioidů se mohou objevit i vedlejší účinky zahrnující nevolnost, zvracení, zácpu, zmatenost, útlum dýchání.

Opioidy mohou být pacientům podávány různými způsoby:

- 1) perorálně (ústí) – tablety, kapky, sirup
- 2) transdermálně (přes kůži) – lék se postupně uvolňuje z náplasti
- 3) rektálně (do konečníku) – čípky nebo některé tablety
- 4) injekčně

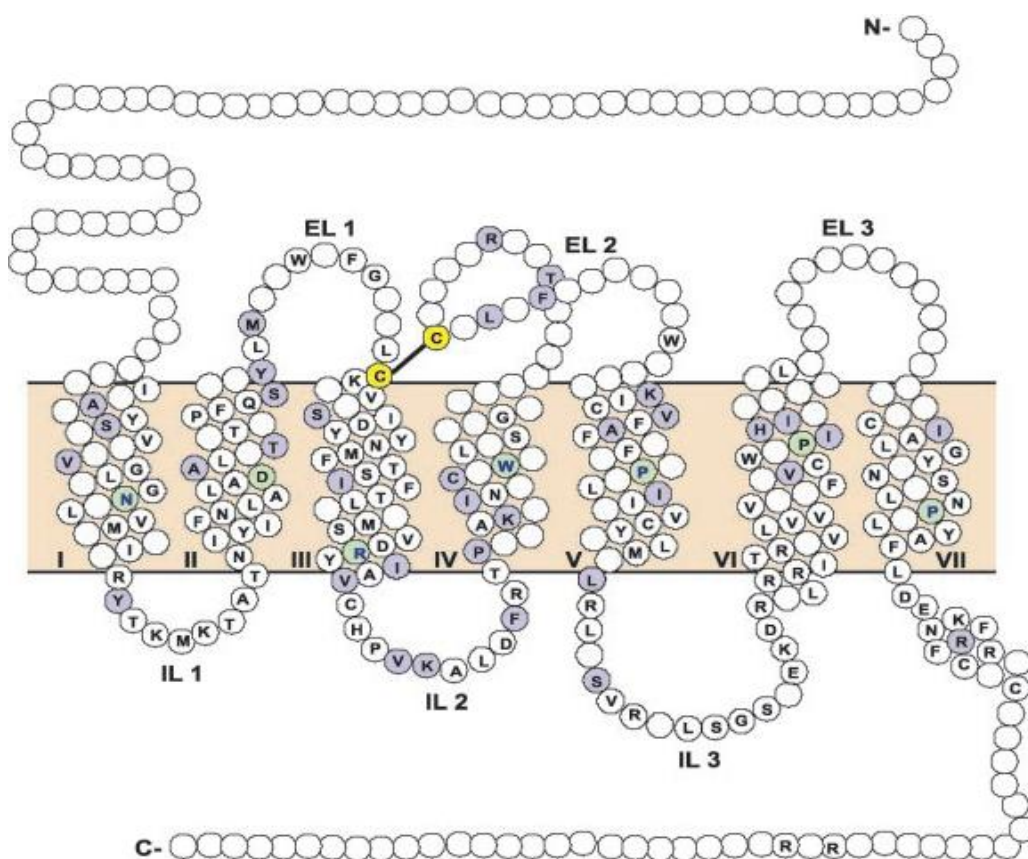
Podávání opioidů v delším časovém úseku vede k rozvoji tolerance, k návyku centrálního nervového systému na účinky léku. Snižuje se analgetický a sedativní účinek, proto je někdy třeba zvýšit dávky. U vysoce účinných opioidů se vyvíjí menší tolerance, než u méně silných, jako je např. morfin. Vysazením opioidu na delší dobu zabráníme vzniku tolerance. Nicméně chronické podávání opioidů může kromě tolerance navodit i závislost. Závislost se chápe jako absolutní potřeba dané látky, aby byly v organismu zachovány normální fyziologické funkce (Taylor a Fleming, 2001). Potom bychom náhlým vysazením léku po delší době užívání navodili abstinenční příznaky (Havránek, 2000). K jejich rozvoji dochází cca do 12 h po podání opioidů. Intenzita abstinenčních příznaků závisí na množství a délce podávání daného léku. Projevují se pocity úzkosti, nervozita, podrážděnost, pocení,

bušení srdce, později může docházet k pocitům nevolnosti, zvracení, křečím v břiše, nespavosti a dokonce k poruše vědomí. Abstinenčním příznakům se dá předejít postupným snižováním dávek opioidů. Tak lze bezpečně pod odborným vedením přerušit léčbu opioidy. V některých situacích může dojít i k rozvoji psychické závislosti, kdy pacient neužívá opioid kvůli jeho farmakologickým efektům, ale kvůli navození jiných efektů, nejčastěji stavu euforie.

## **6. Opioidní receptory**

### **6. 1. Struktura OR**

Na extracelulární straně molekula receptoru začíná N-koncem, 7 transmembránových  $\alpha$  šroubovicových domén je mezi sebou propojeno 3mi extracelulárními a 3mi intracelulárními smyčkami. Extracelulární smyčky rozpoznávají signál a váží ligand. Polypeptid je zakončen na intracelulární straně C-koncem (Waldhoer et al., 2004). Receptor může být fosforylován na 3. intracelulární smyčce, kde se na něj váže G-protein. Další 2 místa schopné fosforylace se nacházejí na C-konci. Fosforylace má důležitou úlohu v regulaci receptoru.

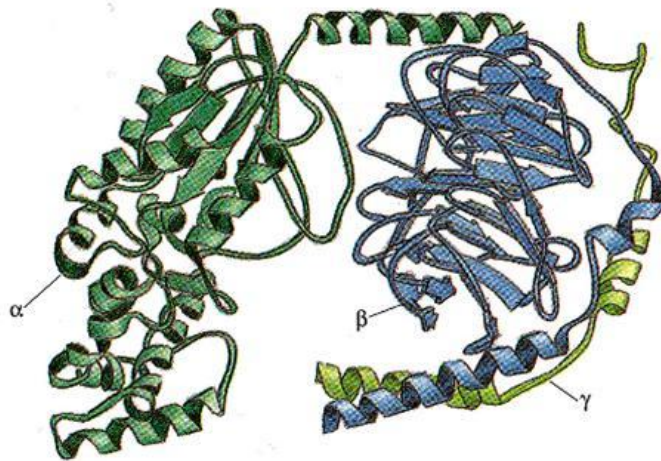


Obr. 1: Struktura opioidního receptoru. Bílá kolečka s písmenky značí aminokyseliny společně pro všechny 4 OR, fialová značí podobnost mezi  $\kappa$ ,  $\mu$  a  $\delta$  OR. Žlutě je zakreslen cysteinový disulfidický můstek. Římské číslice značí 7 transmembránových domén. IL – intracelulární smyčka, EL – extracelulární smyčka (převzato z Waldhoer et al., 2004).

## 6. 2. Zařazení OR

Opioidní receptory patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Receptory spřažené s G-proteiny tvoří největší rodinu buněčných membránových receptorů. Jejich ligandy mohou být proteiny, malé peptidy, deriváty aminokyselin nebo mastných kyselin. Ačkoliv se na receptory spřažené s G-proteiny váží různé signální molekuly, jejich struktura je podobná – jsou tvořeny jediným polypeptidovým řetězcem, který v podobě  $\alpha$  helixu 7x prochází lipidovou dvojvrstvou. Tato skupina transmembránových receptorů dále zahrnuje např. rhodopsin (světlem aktivovaný fotoreceptorový protein v sítnici oka obratlovců) nebo čichové receptory v nosní sliznici obratlovců (Palczewski et al., 2000). Receptory spřažené

s G-proteiny využívají heterotrimerní G-proteiny k přenosu signálu na různé efektory, jakým může být např. adenylátcykláza, fosfolipáza nebo různé iontové kanály (Morris a Malbon, 1999).

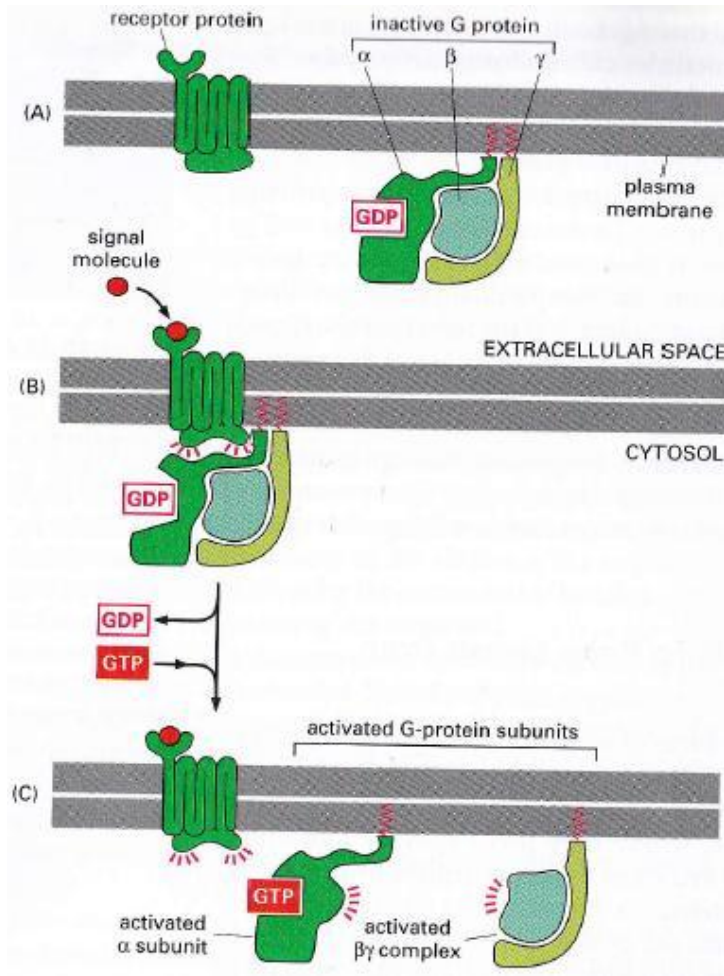


Obr. 2: Trojrozměrná struktura inaktivního G-proteinu.  $\alpha$  podjednotka obsahuje GTPázovou doménu a váže se k  $\beta$  podjednotce, což udržuje GTPázovou doménu v inaktivním stavu, vážící GDP.  $\gamma$  podjednotka se váže k opačné straně  $\beta$  podjednotky (převzato z Alberts et al., 2007).

Receptory spřažené s G-proteiny však nejsou pouze v buňkách obratlovců, vyskytují se i v jiných eukaryotních organismech, včetně kvasinek. Dokonce i v bakteriích můžeme nalézt sktrukturně příbuzné membránové proteiny, jako např. bakteriorhodopsin. Bakterie však nedisponují G-proteiny, jejich receptory jsou spřaženy s jinými signálními drahami.

G-proteiny jsou lokalizovány na cytosolové straně plasmatické membrány. Existuje několik různých typů G-proteinů, všechny však mají podobnou základní strukturu. Jsou to heterotrimery, složené ze 3 proteinových jednotek,  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . V neaktivním stavu je na  $\alpha$  podjednotku navázáno guanosindifosfát (GDP) a zároveň je podjednotka asociovaná s podjednotkami  $\beta$  a  $\gamma$ . Při navázání extracelulárního ligandu (hormony, lokální mediátory, nervové mediátory) na receptor se G-protein aktivuje tím, že  $\alpha$  podjednotka nahradí navázaný

GDP za guanosintrifosfát (GTP), což způsobí rozpad G-proteinu na aktivovanou  $\alpha$  podjednotku s navázaným GTP a na komplex  $\beta\gamma$  (viz obr. 3).



Obr. 3: Rozdělení G-proteinu na signální podjednotky. (A) nestimulovaný stav, receptor i G-protein jsou v neaktivním stavu. (B) navázání signální molekuly na receptor změní konformaci receptoru i G-proteinu. (C) na G-protein se místo GDP naváže GTP, což způsobí rozpad G-proteinu na dvě podjednotky,  $\alpha$  a  $\beta\gamma$  (převzato z Alberts et al., 2007).

### 6. 3. Typy OR

Opioidní receptory dělíme na 4 hlavní skupiny.  $\delta$ -OR,  $\mu$ -OR,  $\kappa$ -OR a nociceptinový receptor (NOP-R), dříve znám jako tzv. sirotčí receptor (ORL-1). První 3 základní typy OR se

dále dělí na podtypy ( $\mu_1 - \mu_3$ ,  $\kappa_1 - \kappa_3$ ,  $\delta_1 - \delta_2$ ) (Tso a Wong, 2003). Zatím ale nebylo zcela objasněno, jestli jde opravdu o různé podtypy OR s funkčními odlišnostmi nebo jednotlivé OR vznikly alternativním sestřihem mRNA, post-translačními modifikacemi nebo homo/heterodimerizací receptorů (Levac et al., 2002; Minami a Satoh, 1995).

Každá skupina OR má své prekurzory. Každý prekurzor obsahuje několik EOPs, které můžeme rozdělit do 3 skupin, a to na endorfíny, enkefaliny a dynorfíny. Endorfíny mají výrazně nižší afinitu ke  $\kappa$ -OR než k ostatním dvěma typům. Enkefaliny se nejlépe váží k  $\mu$ -OR a nejhůře ke  $\kappa$ -OR, zatímco dynorfíny mají nejvyšší afinitu ke  $\kappa$ -OR a nejnižší k  $\delta$ -OR (Raynor et al., 1994). Opioidní peptidy mají jen nízkou afinitu k NOP-R. Nedávno se izoloval nový EOP nociceptin/orphanin, který vzniká z prekurzoru pro-nociceptinu a má afinitu pouze k NOP-R (Corbett et al., 2006).

Skupiny OR se dále liší svou distribucí v tkáních.  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR byly u potkana nalezeny v myokardu a v žaludku, v játrech byla zjištěna především přítomnost  $\delta$ -OR a  $\mu$ -OR. V endotelu nebyly detekovány žádné OR (Wittert et al., 1996).

Všechny 4 skupiny OR jsou stejné asi z 60 %, nejvíc podobné si jsou v  $\alpha$ -helixových transmembránových úsecích (Chen et al., 1993). Dříve se myslelo, že se  $\mu$ -OR v dospělém srdci nenalézají. Jejich přítomnost byla dokázána pouze v raném ontogenetickém vývoji srdce (Zimlichman et al., 1996). O pár let později se zjistilo, že se tyto receptory ve velmi malém množství exprimují v srdci i dospělého potkana a člověka (McDonald et al., 2010). Nejvíce jsou v myokardu zastoupeny  $\kappa$ -OR (Zimlichman et al., 1996), které aktivují fosfatidilinositolovou dráhu, což následně způsobí uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplasmatického retikula (SR) (Ventura et al., 1992).  $\kappa$ -OR také zvyšují aktivitu PKC, která stimuluje  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pumpu (Bian et al., 2000). Zvýšená intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$  se může podílet na vzniku arytmií. Podobně jako u  $\kappa$ -OR, stimulací  $\delta$ -OR jeho agonistou dochází k zvýšené tvorbě inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP3) a vylití  $\text{Ca}^{2+}$  z retikula. NOP-R byl zjištěn v potkaním srdci. Pokusy na myších potvrdily, že selektivní aktivace tohoto receptoru vyvolává bradykardii a hypotenzi (Burmeister et al., 2008).

## **6. 4. Desensitizace OR**

Jak již bylo řečeno, dlouhodobé podávání opioidů může vést ke snížené odpovědi jedince na navázání agonisty na OR a tedy k znečitlivění, vzniku tolerance. Desensitizací se buňky chrání před nadměrnou stimulací ligandem, aby nedošlo k případnému poškození buňky. Děje se tak internalizací nebo tzv. down-regulací receptorů. Základním krokem v desensitizaci je fosforylace receptoru, který se tímto funkčně oddělí od G-proteinu. Internalizací jsou receptory odstraněny z buněčné membrány a přeneseny do cytosolu. Celý proces trvá jen několik minut. Down-regulace se uplatňuje při opakovaném nebo dlouhodobém dráždění receptoru. Receptorový protein je degradován pomocí lipozómů, což sníží celkový počet receptorů na plazmatické membráně buňky (Svoboda et al., 2004).

## **7. Ischemie myokardu**

Choroby srdce a cév představují nejzávažnější onemocnění současné doby. Jsou příčinou více než 50 % všech úmrtí, nejčastější z nich je právě ischemická choroba srdeční a její akutní forma, infarkt myokardu. Infarkt myokardu postihuje více muže než ženy. Nejvíce ohroženi jsou muži nad 50 let a ženy nad 60 let. Toto onemocnění se však týká i mladších lidí, kteří mají nadměrně srážlivou krev, špatnou životosprávu nebo genetické predispozice. Velmi často se vyskytuje spolu s jinými onemocněními. K nejčastějším rizikovým faktorům vzniku infarktu myokardu patří zvýšený arteriální tlak, hyperlipidémie, ateroskleróza, cukrovka, stárnutí a sekundární onemocnění srdce.

### **7. 1. Vznik ischemie**

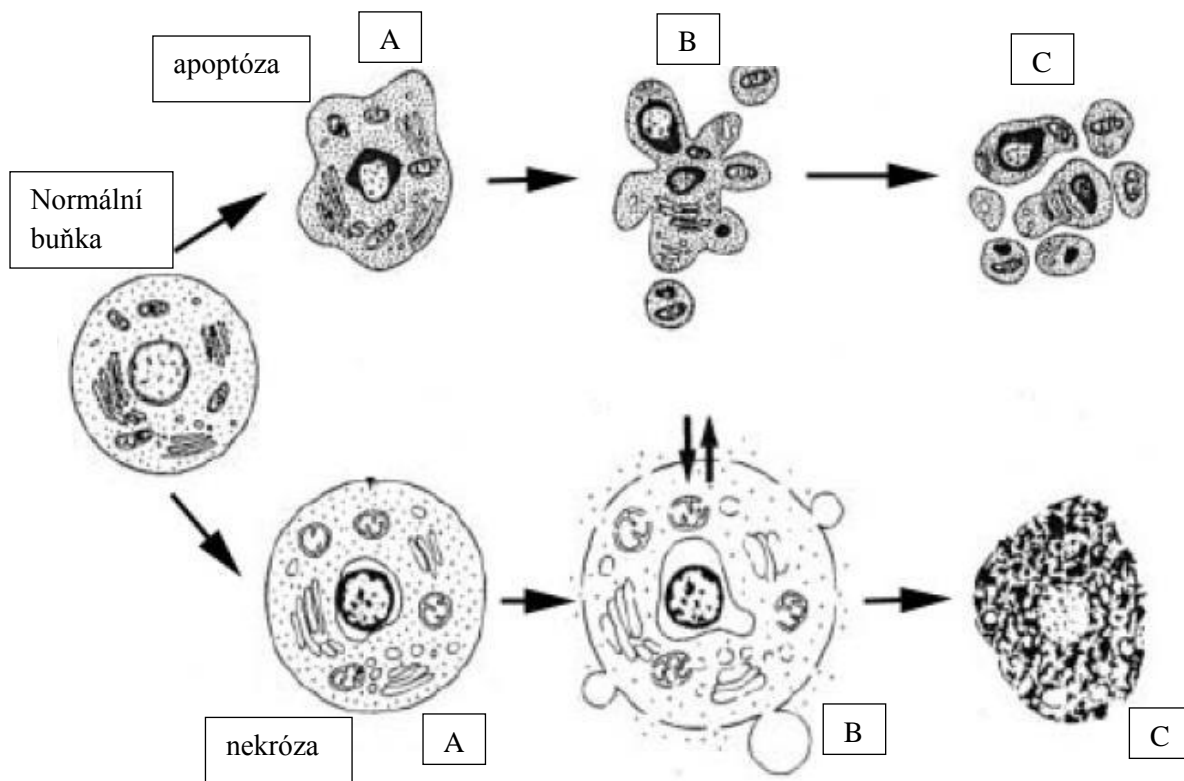
Ischemie srdečního svalu vzniká nejčastěji kvůli náhlému přerušení krevního zásobování do části srdce, a tedy i k přerušení dodávky kyslíku do mitochondrií pro oxidativní fosforylaci, jež syntetizuje adenosindifosfát (ATP). Nejčastější příčinou je uzavření koronární tepny trombem, krevní sraženinou vznikající často na podkladě

aterosklerotického plátu, který vzniká dlouhodobým ukládáním tukových látek (cholesterolu) do stěny cévy. Tím, jak se plát poruší, dochází k agregaci krevních destiček. Tzv. murální (nástěnný) trombus lumen cévy zužuje, na rozdíl od okluzivního, který může cévu zcela uzavřít. Dochází-li k těmto změnám pomaleji – tzv. stabilní angina pectoris nebo chronická ischemická choroba srdeční (ICHS, postupné narůstání plátu bez jeho porušení), mohou cévy vytvořit postranní, kolaterální oběh. Vlivem nedostatku kyslíku se okolní cévy začnou spojovat a nebo se rozšíří již vzniklé cévy. Tímto způsobem se dostane okysličená krev i do míst za postiženou cévou.

Další možností vzniku ischemie srdce je lokální spasmus hladkého svalstva koronárních artérií, vznikající buď drážděním okrajem aterosklerotického plátu, nebo nervovým reflexem.

Strukturální změny v myokardu probíhají od začátku ischemie. Pokud dojde včas k reperfuzi (znovuobnovení krevního toku), jsou tyto změny reverzibilní. Bez kolaterálního oběhu nebo obnovení průtoku koronárními cévami se začínají po 20 až 30 min ischemie objevovat ireverzibilní změny a dochází k nekróze buněk (Herdson et al., 1965). Množství nevratně poškozených buněk závisí na velikosti zasažené části srdce, velikosti kolaterálního nebo zbytkového proudění krve, na délce trvání ischemie (Reimer a Jennings, 1979) a na teplotě myokardu (Miki et al., 1998b).

K zániku srdeční buňky dochází buď nekrózou a nebo apoptózou. Nekróza je energeticky nezávislý proces. Dochází k aktivaci lyzozomálních hydrolytických enzymů a k nekontrolovatelnému autolytickému rozkladu buňky. Obsah buňky se vylévá do mezibuněčného prostoru a v důsledku uvolnění hydrolytických enzymů může dojít i k poškození okolních buněk, případně i k tvorbě zánětu. Apoptóza je charakterizována řízeným rozkladem organel a makromolekul. Hlavní roli zde hrají kaspázy, proteolytické enzymy aktivované poškozenou buňkou. Nedochozí zde k nekontrolovatelnému vylití buněčného obsahu, včetně lytických enzymů. Vědci se domnívali, že většina srdečních buněk odumírá apoptózou (Kajstura et al., 1996), ale pravdou je, že v důsledku infarktu myokardu hraje nekróza větší roli. Zatím nebyl zcela objasněn vztah mezi oběma procesy a jejich podíl na celkovém poškození srdce.



Obr. 4: Při apoptóze se buňka smrskává (A), chromatin kondenzuje, přemísťuje se na okraj jádra, tvoří se apoptotická tělíska (B,C), která obsahují organely, cytosol a jaderné fragmenty. Tělíska jsou poté fagocytována. Při nekróze buňka bobtná (A), stává se propustnou (B) a nakonec se roztrhne a její obsah je uvolněn do okolí (C) (upraveno podle Van Cruchten a Van den Broeck, 2002).

## 7. 2. Metabolismus ischemického myokardu

Díky přerušení dodávky kyslíku do myokardu se mění aerobní metabolismus na anaerobní. Místo původních 38 molekul ATP se z glukózy vytvoří jen 2 molekuly, což je nedostatečné množství, pokud srdce za klidových podmínek potřebuje 10 mmol ATP/min jen k udržení iontové homeostázy. Dochází tedy k akumulaci laktátu a jiných kyselých produktů metabolismu a tedy k acidóze buňky. Brzy se vyčerpají energetické rezervy a hromadí se ionty vodíku vytěsňují vápník z vazby na myofibrily. Ionty sodíku se hromadí uvnitř buňky,

vytváří se hypertonické prostředí, voda proniká do buňky a ta začíná bobtnat, což vede k prasknutí sarkolemy a nekróze.

Ihned po začátku ischemie se zvyšuje intracelulární koncentrace vápníku, hlavně díky vyplavování  $\text{Ca}^{2+}$  z SR, snížení vychytávání cytozolického vápníku, selhání ATP dependentní sarkolemální vápníkové pumpy a řízenému vyplavování vápníku z mitochondrií, v důsledku poklesu pH. Výsledkem je aktivace lysozomálních proteáz a fosfolipáz, čímž se poškodí myocyty, tvoří se volné kyslíkové radikály (ROS), aktivují se ATP dependentní vápníkové pumpy, které napomáhají k vyčerpání zásob ATP. Velká intracelulární koncentrace vápníku zvyšuje klidové napětí v diastole (Ošťádal et al., 2003).

## **8. Arytmie**

Normální srdeční rytmus člověka v klidu se pohybuje mezi 60 a 80 tepy za minutu. Arytmie jsou poruchy srdečního rytmu. Na jedné straně nemusí způsobovat závažné potíže a neohrožují pacienta na životě, na druhé straně mohou vést k selhání činnosti srdce a bez léčby mohou vést ke smrti. Obecně platí, že výskyt arytmií se zvyšuje s věkem a také s pokročilostí srdečních onemocnění (např. postižení koronárních tepen, hypertrofie myokardu nebo degenerativní změny myokardu). Příčiny arytmií jsou různé, vyvolávacím faktorem může být právě ischemie, ale i hypoxie, záněť, anatomické změny v myokardu a i některé léky.

### **8. 1. Dělení arytmií**

Poruchy rytmu s frekvencí vyšší než 100/minutu se u lidí označují jako tachyarytmie, které jsou nepravidelné, nebo tachykardie, které jsou poměrně pravidelné. Neúměrná tachykardie snižuje účinnost čerpání srdečním svalem, který se při tak velké tepové frekvenci nestihne dostatečně plnit krví. Při zvýšené práci se zvyšuje spotřeba kyslíku v samotném srdečním svaly, to může u člověka trpícího postižením koronárních cév vést k akutní ischemii myokardu.

Arytmie s frekvencí nižší než 60/minutu se označují jako bradyarytmie či bradykardie. Bradykardie je normální ve spánku nebo u trénovaných sportovců, jejichž tep může klesnout až na 40/minutu. Patologické formy bradykardie jsou způsobeny např. infarktem myokardu, nitrolebečním poraněním nebo vlivem některých léků. To vše způsobuje pokles srdečního výdeje, do těla se dostane málo krve a pacient může upadnout do bezvědomí.

## 9. Reperfuze

Při reperfuzi dochází k znovuobnovení krevního oběhu postiženou oblastí srdce a tím i přívodu kyslíku a živin. Brzké obnovení krevního oběhu je zásadní krok pro zachování funkce srdce, a tedy i záchraně života pacienta. Během minut až desítek minut trvající ischemie se spouští řada dějů, které po obnovení cirkulace způsobují další poškození srdeční tkáně. Na poškození buněk v reperfuzi se podílejí především ROS, iontová dysbalance, aktivace proteáz, indukce apoptózy a aktivace zánětlivých procesů. Zároveň jsou ze srdce odplavovány metabolity vzniklé v důsledku ischemie. Reperfuze vede k otevření nesespecifického póru ve vnitřní i vnější mitochondriální membráně, známého jako mPTP (Halestrap a Brenner, 2003). Přesné složení póru zatím není známo a je předmětem intenzivních debat. mPTP slouží jako neselektivní napěťově ovládaný kanál, který je za normálních podmínek uzavřen; vnitřní mitochondriální membrána je pro většinu látek nepropustná. Když je buňka ve stresu, mPTP se otevře (vnitřní mitochondriální membrána se stane propustnou) a buňka ztratí svůj mitochondriální membránový potenciál. Faktory ovlivňující zda a kdy se během ischemie nebo reperfuze mPTP otevře, se stále studují. Mitochondrie raději hydrolyzuje, než syntetizuje ATP, to vede ke ztrátě iontové rovnováhy a k nekrotické buněčné smrti. Podmínky v časně fázi reperfuze, nikoliv během ischemie, ovlivňují možnost otevření mPTP. Inhibicí mPTP se dá zabránit reperfuznímu poškození myokardu. To může být zajištěno přímou inhibicí mPTP pomocí cyklosporinu A nebo sangliferinu A nebo nepřímo snížením  $Ca^{2+}$ , ROS a intracelulárního pH, které se podílí na otevření mPTP. mPTP hraje roli v nekróze, jeho otevření může vést k uvolnění cytochromu c a jiných proapoptotických molekul, které zahájí apoptotickou kaskádu (Halestrap a Brenner, 2003). Ačkoliv se v některých studiích dokázalo, že otevření mPTP způsobí buněčnou smrt procesem nekrózy (Di Lisa et al., 2001), spekulovalo se i o tom, že by zde mohla hrát roli i apoptóza (Halestrap et al., 2004).

## 9. 1. Stunning

Pokud ischemie přetrvává pouze několik minut (maximálně desítky) nedojde k rozvoji ireverzibilního poškození srdce, nekróze, a proběhne reperfúze, je možná kompletní obnova srdeční kontraktility. To může trvat několik hodin až dní. Tomuto jevu, snížení srdeční kontraktility po ischemii, říkáme „myocardial stunning – omráčený myokard“ (Kloner a Jennings, 2001). Takzvaný postischemický stunning je definován jako reverzibilní kontraktilní dysfunkce, která přetrvává několik hodin až dnů po reperfúzi ischemického myokardu. Tento jev byl pozorován v řadě pokusů, kde ischemie byla pouze krátkodobá a nevedla ke vzniku nekrózy. Na vzniku stunningu se podílí především porucha vápníkové homeostázy a tvorba ROS (jejich zvýšená koncentrace podporuje nárůst intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ ). Návrat kontrakcí myokardu do normálního stavu lze zvýšit podáváním antagonistů vápníku a antioxidanty (např. oxypurinol, N-acetylcystein) (Ošťádal et al., 2003).

## 10. Ischemická tolerance srdce

Každé srdce má svou přirozenou toleranci k ischemii, která se s věkem mění. Toleranci je možno uměle zvýšit lidským zásahem, a to buď ischemickým preconditioningem (IPC), opioidním preconditioningem nebo hypoxií.

### 10. 1. Ischemický preconditioning

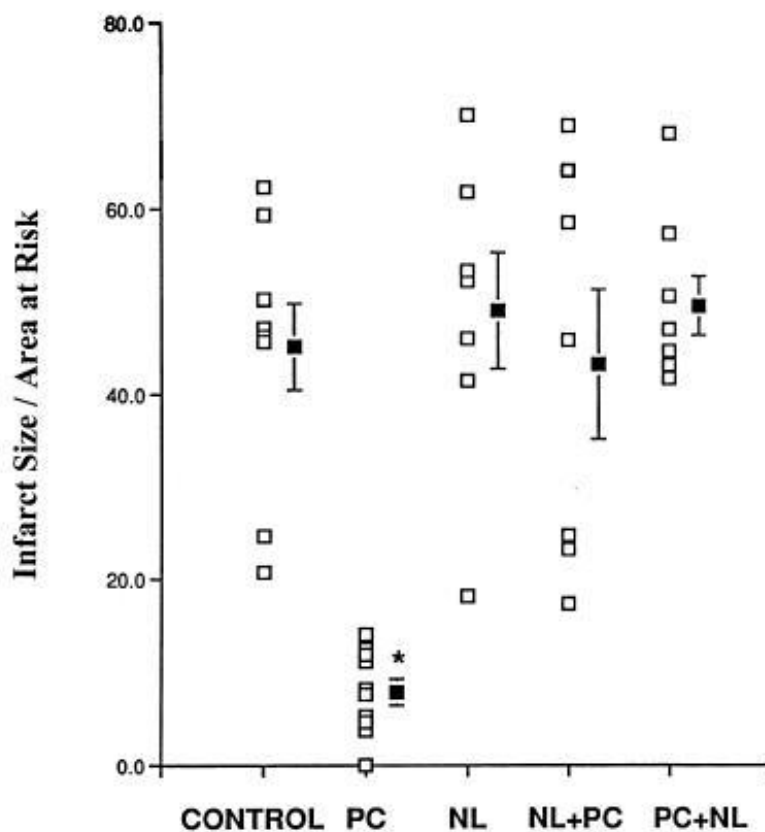
Murry et al. (1986) ve svých pokusech popsali IPC jako protektivní jev, schopný zmenšit poškození srdce infarktem. V této studii prováděli pokusy na psech, kterým 4x po sobě uzavřeli koronární artérie na 5 min, střídavě s 5 min úseky reperfúze. Těchto několik krátkých okluzí koronárních tepen nebylo natolik závažných, aby způsobily ireverzibilní poškození srdce, nicméně zvýšily ischemickou toleranci srdce, omezily letální buněčné

poškození a zpomalily rychlost vyčerpávání ATP v důsledku následné 40 min okluze té samé artérie.

Mnoho vědců zjistilo, že kardioprotektivní účinek IPC je pouze krátkodobý. Např. Vanwinkle et al. (1991) ve svých pokusech na králičím srdci ukázali, že protekce proti infarktu navozená jednou 5 min periodou vymizí, pokud interval mezi stimulačními ischemiemi a dlouhodobou ischemií byl delší než 60 min. Naproti tomu byla na králičím (Marber et al., 1993) a psím myokardu (Kuzuya et al., 1993) zjištěna kardioprotekce opět po 24 h po stimulaci preconditioningem (PC). Následně se ukázalo, že kardioprotekce přetrvávala až 72 h po IPC. Této pozdní fázi kardioprotekce (která se poprvé objevuje cca 24 h po stimulaci a trvá i několik dní) se začalo říkat „opožděný preconditioning“ nebo „pozdní fáze preconditioningu“ oproti „klasickému“ nebo „brzkému“ preconditioningu (popsaným Murrým ve svých experimentech), který se dostavuje okamžitě a trvá maximálně desítky minut.

V posledních letech se tedy mnoho výzkumů zaměřuje na efekt PC a na mechanismus, kterým se kardioprotektivní účinek děje. Liu et al. (1991) ukázali, že tento efekt je v myokardu králíka způsoben adenosinovým receptorem typu 1. Gross a Auchampach (1992) jako první přišli s tím, že IPC je zprostředkován přes  $K_{ATP}$  kanály. Od té doby bylo objeveno mnoho dalších mediátorů a buněčných struktur, které se podílí na kardioprotektivním účinku IPC, např. oxid dusnatý (Yao a Gross, 1993), tyrozin kináza (Ytrehus et al., 1994), G-proteiny (Lasley a Mentzer, 1993), mitochondriální  $K_{ATP}$  kanály (Garlid et al., 1997) a opioidy (Schultz et al., 1995).

Bylo dokázáno, že opioidy navozují protektivní efekt PC v srdci a jiných orgánech pomocí aktivace specifických OR, což jako první publikoval Schultz et al. (1995). Na potkanech demonstrovali, že kardioprotektivní účinek IPC byl blokován podáním neselektivního antagonisty opioidních receptorů, naloxonu (viz obr. 5). Kardioprotektivní účinek byl zrušen, ať byl naloxon podán před a nebo po IPC, což ukazuje, že opioidní receptory neslouží pouze jako spouštěče protekce, ale i jako zprostředkovatelé paměťové fáze PC v potkaním srdci. Podobných výsledků pak dosáhli např. Chien a VanWinkle (1996), kteří podáním aktivního stereoizomeru naloxonu také blokovali protekci.



Obr. 5: Velikost infarktu normalizovaná na velikost ohrožené oblasti u kontrol (control), IPC (PC), po podání naloxonu bez IPC (NL), naloxonu před IPC (NL+PC) a naloxonu po IPC (PC+NL). Černé čtverce jsou průměry z každé skupiny, bílé čtverce jsou jednotlivá srdce (podle Schultz et al., 1995).

Opioidní receptory byly nalezeny v centrálním nervovém systému (May et al., 1989) i v periférii (Zhang et al., 1996). Nabízela se tedy otázka, jestli efekt PC aktivovaný opioidy je zprostředkován centrálními nebo periferními mechanismy. Proto Schultz et al. (1997) udělali pokus s naloxonem (opioidní antagonist, který přechází bariéru krev-mozek) a jeho derivátem naloxonem methiodidem (který skrz bariéru neprochází). Obě látky podali potkanům s IPC a bez IPC. Výsledky ukázaly, že malá dávka derivátu naloxonu částečně blokuje IPC a velká dávka ho zablokuje zcela. Stejně výsledky dostali pro naloxon. Později Chien et al. (1999) dostali podobné výsledky pro derivát naloxonu a dokázali, že v intaktním králičím srdci je kardioprotektivní efekt způsoben periferními opioidními receptory.

Všechny 3 rodiny EOPs (enkefaliny, endorfíny, dynorfíny) mohou být produkovány v GIT a v izolovaných myocytech (Ventura et al., 1994) a 2 ze 3 hlavních opioidních receptorů ( $\kappa$  a  $\delta$ ) jsou ve velké míře přítomny v dospělém hlodavčím srdci. Na základě těchto

zjištění Takasaki et al. (1999) podrobili studii izolované králičí myocyty, aby zjistili, které EOPs jsou zodpovědné za protektivní účinek PC. Studovali vliv IPC a kardioprotekce indukované opioidy na snížení počtu poškozených buněk králičího srdce, které vystavili ischemii a reperfuzi. Zjistili, že kardioprotekci způsobuje jak IPC, tak i morfin, a že účinky obou jsou blokovány naloxonem. Exogenní agonista Met<sup>5</sup>-enkefalin (ME) měl protektivní účinky, zatímco  $\beta$ -endorfin byl bez ochranného účinku. Další dva produkty proenkefalinu, Leu<sup>5</sup>-enkefalin a ME-Arg-Phe byly také protektivní. Z tohoto výzkumu tedy vyplynulo, že endogenní mediátory IPC jsou pravděpodobně produkty proenkefalinu. Zjištění, že enkefalin je tím EOP, který je zodpovědný za snížení poškození myokardu nebylo překvapující, protože dříve už bylo známo, že velké množství endogenního enkafalinu je uvolňováno ze srdce v průběhu ischemie (Oldroyd et al., 1992).

## 10. 2. Studie s morfinem a ischemie srdce

První studie byla provedena Markiewiczem et al. (1982), kdy podali potkanům 3 mg/kg morfinu 10 min před dlouhodobou okluzí. Množství poškozené tkáně bylo zkoumáno 48 h po okluzi a ukázalo se, že morfin toto poškození zvýšil.

Naproti tomu studie Schultz et al. (1996) ukázala, že intravenózní podání morfinu má podobný efekt jako IPC. Pokus byl prováděn na anestezovaném potkanovi, který byl vystaven 30 min okluzi a 2 h reperfuzi. Morfin byl podán ve třech 5 min dávkách 100  $\mu$ g/kg. Dále tato studie prokázala, že tento ochranný efekt byl způsoben otevřením ATP senzitivních K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) kanálů.

Příčiny rozdílů ve dvou výše zmíněných studiích jsou nejasné, ale mohou být způsobeny odlišným způsobem podání morfinu, velikostí dávky nebo stanovením infarktu. Narozdíl od studie Markiewicze et al. (1982), Schultz et al. (1996) provedli pouze 30 min okluzi s reperfuzí.

Morfin má vysokou afinitu hlavně k  $\mu$  opioidním receptorům, i když je pár zmínek o jeho interakci i s  $\delta$  a  $\kappa$  OR (Martin, 1983). Jsou i studie naznačující propojení signálních drah aktivovaných  $\delta$  a  $\mu$  OR (Sheldon et al., 1989). Schultz et al. (1997) se pokusili pomocí selektivního antagonisty  $\delta$  OR prokázat, že kardioprotektivní efekt IPC a morfinu je

v potkaním srdci zprostředkován tímto typem receptorů, což se jim také podařilo. Úlohu  $\delta$  OR v preconditioningu prokázali i Sigg et al. (2002) pomocí agonisty  $\delta$  OR DPDPE (D-Pen<sup>2,5</sup>-enkefalin) a deltorfanu-D, selektivního  $\delta_2$  agonisty. Podáním obou agonistů se redukovalo ischemické poškození myokardu u prasat. Zajímavé je, že další agonista  $\delta$  OR (D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>)-enkefalin (DADLE) neměl v tomto výzkumu na poškození žádný vliv.

Liang a Gross (1999) prokázali, že kardioprotektivní efekt je možný i u izolovaných kuřecích myocytů, čímž dokázali, že kardioprotektivní signál je přenášen i na úrovni jednotlivých buněk. Zjistili, že 5 min vystavení různým koncentracím morfinu (0,1 - 10  $\mu$ M) je protektivní, nicméně jeho efekt je koncentračně závislý. Nejvyšší protekce bylo dosaženo po podání 1  $\mu$ M morfinu. Dále použitím selektivních antagonistů mitochondriálního  $K_{ATP}$  kanálu potvrdili předpoklad, že ke kardioprotekci dochází v důsledku aktivace mitochondriálních  $K_{ATP}$  kanálů. Zároveň ještě objevili, že  $\delta_1$  selektivní antagonist 7-benzylidenenaltrexon (BNTX) zablokoval vliv morfinu, čímž potvrdili klíčovou roli  $\delta_1$  OR v IPC v potkaním srdci. Ke stejným výsledkům došel i Schultz et al. (1998a).

Ačkoliv se předpokládalo, že zvýšení ischemické tolerance aktivací OR probíhá skrz  $\delta$  OR, zjistilo se, že v některých druzích organismů se na tom podílí i  $\kappa$  OR (Ventura et al., 1989), ačkoliv např. Schultzovi et al. (1998b) se toto prokázat nepodařilo.

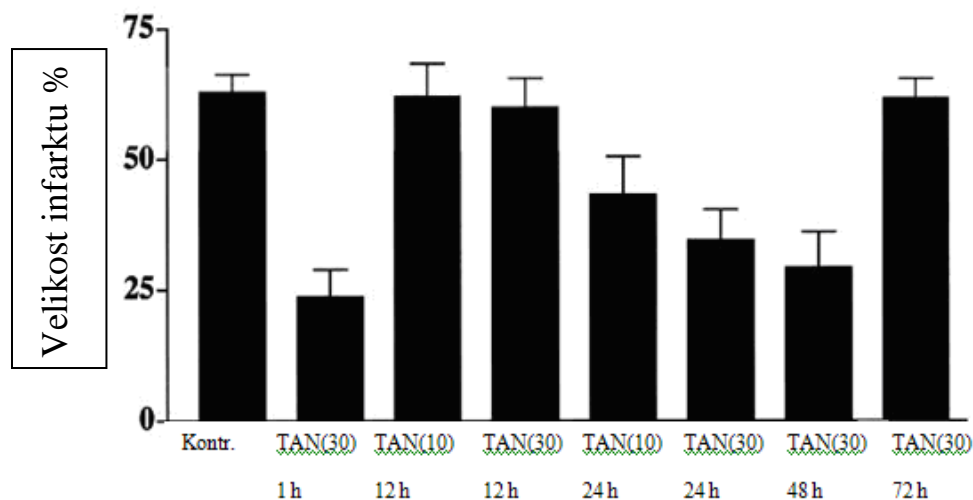
### 10. 3. Kardioprotektivní signální dráhy indukované opioidy

Kardioprotekce indukovaná opioidy má pravděpodobně stejný nebo podobný způsob aktivace intracelulárních signálních drah jako IPC, který zahrnuje  $\delta$  OR a  $K_{ATP}$  kanály, lokalizované na mitochondriích. Nicméně intracelulární signální dráhy, které přenesou signál od  $\delta_1$  OR k mitochondriálnímu  $K_{ATP}$  kanálu nebo jinému efektoru, jsou méně známé. Schultz et al. (1998a) prokázali, že  $\delta_1$  OR vyvolává kardioprotektivní efekt aktivací Gi/o proteinů. Protein kináza C (PKC) byla také prokázána jako součást signální dráhy IPC, alespoň na malých živočišných typu králíka a potkana (Fryer et al., 1999b). V této studii nejen PKC, ale i tyrosin kinázy (TKs) byly objeveny jako důležití intracelulární posli v kardioprotekci navozené opioidy u potkanů a králíků (Fryer et al., 1998). Miki et al. (1998a) jako další potvrdili zrušení kardioprotekce podáním inhibitoru PKC a také snížení množství poškozených buněk při infarktu vlivem morfinu. Ukázalo se, že aktivace OR zmírňuje arytmogenezi v potkaním srdci, nezávislém na aktivaci PKC (Kita et al., 1996). Krátce po nich Wu et al. (1999) prokázali, že  $\kappa$  OR způsobuje protektivní účinky pomocí PKC a

intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ . Přesto, že ROS v reperfuzi přispívají k ještě většímu poškození myokardu a jsou tedy považovány za škodlivé, McPherson a Yao (2001) poukázali na jejich důležitou roli ve spouštění protektivního účinku opioidů.

#### 10. 4. Opioidy v pozdní fázi kardioprotekce

Jak bylo zmíněno výše, pozdní fáze kardioprotekce se objevuje 24 – 48 h po stimulu. V pokusu Fryer et al. (1999a) bylo zjištěno, že TAN-67, selektivní  $\delta_1$  opioidní agonista, nemá po 12 h po podání žádný protektivní účinek. Jeho kardioprotektivní účinek se objevil zase až 24 – 48 h po aplikaci a vymizel za 72 h (viz obr. 6). Účinek TAN-67 byl blokován podáním BNTX, selektivním  $\delta_1$  antagonistou. Dále zjistili, že kardioprotektivní efekt TAN-67 blokuje glibenclamid, neselektivní antagonistu  $\text{K}_{\text{ATP}}$  kanálu, a 5-HD, který selektivně blokuje mitochondriální  $\text{K}_{\text{ATP}}$  kanály. Tyto výsledky nám ukazují, že stimulace  $\delta_1$  OR 24 – 48 h před ischemií má za následek aktivaci pozdní fáze PC, která je pravděpodobně zprostředkována mitochondriálními  $\text{K}_{\text{ATP}}$  kanály.



Obr. 6: *Potkanům bylo podáno 10 nebo 30 mg/kg TAN-67 a to buď 1, 12, 24, 48 nebo 72 h před 30 min ischemií, následovanou reperfuzí v délce 2 h. Podání TAN-67 1 h před ischemií významně snížilo poškození myokardu. Podání TAN-67 v obou dávkách 12 h před ischemií, i podání TAN-67 v malé dávce 24 h před, nemělo na velikost infarktu žádný nebo jen malý vliv. Nicméně podání větších dávek TAN-67 24 – 48 h před okluzí mělo výrazně kardioprotektivní účinek, který vymizel po 72 h od podání TAN-67 (upraveno podle Fryer et al., 1999a).*

Další poznatky ohledně  $\kappa$  OR přinesli Wu et al. (1999) na izolovaných potkaních myocytech. Kardioprotekce pomocí  $\kappa$  OR probíhá ve dvou fázích: časná fáze se objevuje okolo jedné hodiny po aktivaci receptoru, naproti tomu pozdní fáze vzniká 16 – 20 h po podání drogy. Tato opožděná fáze byla zeslabená inhibitory PKC.

## **10. 5. Chronické podávání morfinu**

Peart a Gross (2004) se začali zabývat otázkou, jestli kardioprotektivní účinky způsobuje i chronické podávání morfinu. Potkaním mláďatům a dospělým jedincům podávali morfin po dobu 5 dnů. Výsledky ukázaly protektivní účinky u obou věkových skupin, zatímco akutní podání morfinu mělo kardioprotektivní účinek pouze u mladých potkanů.

Prozatím nepublikované výsledky spolupráce Přírodovědecké fakulty Karlovy Univerzity v Praze a Fyziologického ústavu AV ukazují, že podávání morfinu po dobu 10 dnů má pozitivní vliv na výskyt ischemických arytmií, ale žádný vliv na velikost infarktu. Pozitivní vliv na velikost infarktu se objevil až po 28 dnech podávání morfinu, kdy už ale vymizel vliv na snížení počtu arytmií (Bartoňová, 2011).

## **10. 6. Kardioprotekce na člověku**

Kardioprotektivní účinek aktivací OR neprobíhá jen na izolovaných buňkách nebo zvířatech, tento jev je možné pozorovat i na člověku a lze předpokládat jeho možné uplatnění v klinické praxi. Výsledky výzkumu Tomai et al. (1999) podporují teorii, že IPC v člověku je alespoň zčásti výsledkem aktivace OR. V jejich pokusu neselektivní opioidní antagonist

naloxon snížil odolnost srdce k ischemii u lidí, kteří opakovaně podstoupili balónkovou angioplastiku (chirurgický zákrok, při kterém je do postiženého místa zúžené cévy zaveden balóněk, jež má za cíl odstranit nebo porušit blokuující aterosklerotické pláty). Toto potvrdili i Xenopoulos et al. (1998), kteří ukázali, že intrakoronárně podaný morfin (15 µg/kg) napodobuje IPC u lidí, kteří podstupují perkutánní transluminální koronární angioplastiku.

Podobně Bell et al. (1998) ukázali, že kardioprotekce opioidy je způsobena stimulací  $\delta$  OR a aktivací  $K_{ATP}$  kanálu na izolovaných trabekulách z pravé síně u pacientů podstupujících kardiochirurgický výkon. Navíc dokázali přítomnost  $\delta$  OR v tkáni lidských síní i komor. Tyto výsledky nám ukazují možné klinické využití opioidů v terapii akutní nebo chronické ischemie.

## 11. Postconditioning

Ačkoliv máme důkazy, že ischemický a opioidy indukovaný preconditioning zmírňuje následky ischemie, v klinické praxi se však jejich kardioprotektivní efekt využít téměř nedá, jelikož předem těžko předpovíme počátek ischemie. Naproti tomu v průběhu reperfuze lze efektivně využít protektivní potenciál myokardu (Zhao et al., 2003). Tato forma protekce nazývaná jako ischemický postconditioning (POC) je definována jako opakované krátké okluze koronární artérie po uvolnění dlouhodobé koronární okluze a snižuje míru poškození srdce (Cohen a Downey, 2011).

První výzkumy na toto téma provedl Zhao et al. (2003). Zaznamenali, že tři 30 sekundové okluze koronární artérie u psa, prováděné na počátku reperfuze, po 60 min okluzi, vyústily v značné snížení poškození srdce infarktem. Pro tento jev tedy zavedli termín POC. Ochrana vzniklá díky POC byla srovnatelná s tou, která vznikla díky IPC pomocí jedné 5 min koronární okluze, před dlouhodobou ischemií v délce 60 min. Tato studie vzbudila široký zájem v možnosti spolehlivě zacílit farmakologickou terapii v reperfuzi, na základě porozumění mechanismům protekce.

Někteří vědci se začali zabývat otázkou, jestli podání morfinu vyvolá POC stejně tak, jako vyvolává IPC. Brzy se dokázalo, že tomu tak skutečně je (Gross et al., 2004). V nedávné studii Chen et al. (2008) zjistili, že POC vyvolaný morfinem chrání izolovaná potkaní srdce aktivací mitochondriálního  $K_{ATP}$  kanálu a  $\kappa$  OR, nikoliv  $\delta$  OR. Naproti tomu Gross et al. (2004) ukázal, že BW373U86, selektivní ligand  $\delta$  OR, snižuje velikost infarktu, pokud je myokardu podán těsně před reperfuzí.

Ačkoliv se pořád objevuje spousta debat a konfliktů ohledně mechanismu, kterým morfin aktivuje ochranný účinek POC, lze předpokládat, že tento efekt je zprostředkovan oběma,  $\kappa$  i  $\delta$  OR, a že tato signální dráha zahrnuje i PKC dependentní cestu.

## **12. Vliv prenatálního podávání opioidů na odolnost srdce k ischemii v dospělosti**

Ve svém dalším výzkumu bych se ráda zabírala otázkou vlivu prenatálního podávání opioidů na odolnost srdce v dospělosti. Na toto téma ještě není téměř nic známo, nicméně pár studií zabývající se podobnými otázkami již existuje. Xiao et al. (2007) testoval hypotézu, že prenatální expozice nikotinem zvyšuje v dospělosti ischemicko-reperfuční poškození. Výsledky této studie ukázaly, že nikotin signifikantně snížil systolický krevní tlak, který vyvine levá srdeční komora, tepovou frekvenci a koronární průtok, ale pouze u samic, nikoliv u samců. U obou se zvýšila míra ischemického poškození srdce a doba obnovy funkce levé srdeční komory po ischemii a také se snížila exprese některých izoform PKC.

Meyer et al. (2009) zjistili, že prenatální podávání kokainu u potkanů vedlo k poklesu exprese PKC $\epsilon$  v myokardu dospělých samčích, ale ne samičích potomků. Jelikož je PKC součástí signální dráhy IPC, ukázalo se, že prenatální podání kokainu zrušilo jeho kardioprotektivní efekt, ale pouze v myokardu dospělých samčích potomků. U samičích potomků byl protektivní mechanismus zcela zachován. Tyto výsledky nám ukazují, že prenatální expozice kokainu způsobuje na pohlaví závislou ztrátu kardioprotektivních účinků IPC.

Schutová (2010) ve své disertační práci testovala vliv prenatální expozice metamfetaminu (MA) na citlivost ke stejné droze v dospělosti. Její výsledky ukázaly, že prenatální podávání MA zvyšuje citlivost k účinkům akutního i chronického MA v dospělosti. Naznačují, že prenatální expozice MA způsobuje změny ve vývoji několika neurotransmitterových systémů, které se projeví při opětovném setkání s drogou v dospělosti, což může znamenat, že jedinci budou náchylnější k opakovanému podávání MA nebo k jeho neurotoxickým účinkům.

Netuka et al. (2006) se zaměřili na vliv prenatální hypoxie na srdeční toleranci k ischemii v dospělosti. Březí samice a posléze potkaní mláďata byla vystavena hypoxii 5 dní před a 10 dní po narození. V dospělosti byla testována citlivost srdcí k ischemii. Perinatální

expozice hypoxii významně snížila poškození myokardu u dospělých samic, zatímco u samců byly výsledky opačné. Opět se zde projevily pohlavní rozdíly v citlivosti srdce k akutní ischemii.

Prenatální podávání opioidů a jiných látek ještě není dobře známo, provedené studie nám ale dávají zajímavé výsledky, a proto by se mělo pokračovat ve výzkumech na toto téma a odhalit, jakými mechanismy kardioprotekce probíhá.

## 13. Závěr

Opioidy se využívají v lékařství jako látky tišící bolest. V posledních letech se hovoří i o jejich druhém pozitivním účinku. Několik studií potvrdilo jejich schopnost zmírnit poškození srdeční tkáně při infarktu. Největší roli v kardioprotekci hraje  $\delta$  opioidní receptor, jehož aktivace před ischemií nebo před reperfuzí pomáhá zmírnit negativní dopady infarktu na srdce. V posledních pár letech se objevují studie, které dokazují, že prenatální podávání některých látek (např. metamfetaminu nebo nikotinu) také způsobuje kardioprotektivní účinky. Pro lepší pochopení působení signálních drah bude nutné další studium.

## 14. Seznam literatury

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., *Molecular biology of the cell*, 2007

Bartoňová, H. (2011). Diplomová práce

Bell, S. P., Sack, M. N., Patel, A., Opie, L. H., and Yellon, D. M. (1998). Delta opioid receptor stimulation mimics ischemic preconditioning in human heart muscle. *Circulation* 98, 486-486.

Bian, J. S., Pei, J. M., Cheung, C. S., Zhang, W. M., and Wong, T. M. (2000). kappa-Opioid receptor stimulation induces arrhythmia in the isolated rat heart via the protein kinase C/Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32, 1415-1427.

Burmeister, M. A., Ansonoff, M. A., Pintar, J. E., and Kapusta, D. R. (2008). Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ)-evoked bradycardia, hypotension, and diuresis are absent in N/OFQ peptide (NOP) receptor knockout mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326, 897-904.

Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., and Yu, L. (1993). MOLECULAR-CLONING OF A RAT KAPPA-OPIOID RECEPTOR REVEALS SEQUENCE SIMILARITIES TO THE MU-OPIOID AND DELTA-OPIOID RECEPTORS. *Biochemical Journal* 295, 625-628.

Chen, Z. L., Li, T. Z., and Zhang, B. X. (2008). Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts. *Journal of Surgical Research* 145, 287-294.

Chien, G. L., Mohtadi, K., Wolff, R. A., and Van Winkle, D. M. (1999). Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning does not require central nervous system participation. *Basic Research in Cardiology* 94, 136-143.

Chien, G. L., and VanWinkle, D. M. (1996). Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning is stereoselective. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28, 1895-1900.

Cohen, M. V., and Downey, J. M. (2011). Ischemic Postconditioning: From Receptor to End-Effector. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 821-+.

Corbett, A. D., Henderson, G., McKnight, A. T., and Paterson, S. J. (2006). 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *British Journal of Pharmacology* 147, S153-S162.

Di Lisa, F., Menabo, R., Canton, M., Barile, M., and Bernardi, P. (2001). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD(+) and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2571-2575.

Doyle, D., Hanks, G., MacDonald, N., *Oxford Textbook of Palliative Medicine*, 1998

Fryer, R. M., Hsu, A. K., Eells, J. T., Nagase, H., and Gross, G. J. (1999a). Opioid-induced second window of cardioprotection - Potential role of mitochondrial K-ATP channels. *Circulation Research* 84, 846-851.

Fryer, R. M., Schultz, J. E., Hsu, A. K., and Gross, G. J. (1999b). Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 276, H1229-H1235.

- Fryer, R. M., Schultz, J. E. J., Hsu, A. K., and Gross, G. J. (1998). Pretreatment with tyrosine kinase inhibitors partially attenuates ischemic preconditioning in rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 275, H2009-H2015.
- Garlid, K. D., Paucek, P., YarovYarovoy, V., Murray, H. N., Darbenzio, R. B., Dalonzo, A. J., Lodge, N. J., Smith, M. A., and Grover, G. J. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> channels - Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation Research* 81, 1072-1082.
- Gross, E. R., Hsu, A. K., and Gross, G. J. (2004). Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circulation Research* 94, 960-966.
- Gross, G. J., and Auchampach, J. A. (1992). BLOCKADE OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS PREVENTS MYOCARDIAL PRECONDITIONING IN DOGS. *Circulation Research* 70, 223-233.
- Halestrap, A. P., and Brenner, C. (2003). The adenine nucleotide translocase: A central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Current Medicinal Chemistry* 10, 1507-1525.
- Halestrap, A. P., Clarke, S. J., and Javadov, S. A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection. *Cardiovascular Research* 61, 372-385.
- Havránek, J., *Farmakologie v intenzivní péči*, 2000
- Herdson, P. B., Sommers, H. M., and Jennings, R. B. (1965). A COMPARATIVE STUDY OF FINE STRUCTURE OF NORMAL AND ISCHEMIC DOG MYOCARDIUM WITH SPECIAL REFERENCE TO EARLY CHANGES FOLLOWING TEMPORARY OCCLUSION OF A CORONARY ARTERY. *American Journal of Pathology* 46, 367-&.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., and Anversa, P. (1996). Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Laboratory Investigation* 74, 86-107.
- Kita, H., Miura, T., Sakamoto, J., and Tsuchida, A. (1996). Roles of opioid receptor and protein kinase C in suppression of reperfusion arrhythmia by preconditioning. *Circulation* 94, 1787-1787.
- Kloner, R. A., and Jennings, R. B. (2001). Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications - Part 1. *Circulation* 104, 2981-2989.
- Kuzuya, T., Hoshida, S., Yamashita, N., Fuji, H., Oe, H., Hori, M., Kamada, T., and Tada, M. (1993). DELAYED-EFFECTS OF SUBLETHAL ISCHEMIA ON THE ACQUISITION OF TOLERANCE TO ISCHEMIA. *Circulation Research* 72, 1293-1299.
- Lasley, R. D., and Mentzer, R. M. (1993). PERTUSSIS TOXIN BLOCKS ADENOSINE-A1-RECEPTOR MEDIATED PROTECTION OF THE ISCHEMIC RAT-HEART. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 25, 815-821.
- Levac, B. A. R., O'Dowd, B. F., and George, S. R. (2002). Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Current Opinion in Pharmacology* 2, 76-81.
- Liang, B. T., and Gross, G. J. (1999). Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and K-ATP channels. *Circulation Research* 84, 1396-1400.

- Liu, G. S., Thornton, J., Vanwinkle, D. M., Stanley, A. W. H., Olsson, R. A., and Downey, J. M. (1991). PROTECTION AGAINST INFARCTION AFFORDED BY PRECONDITIONING IS MEDIATED BY A1 ADENOSINE RECEPTORS IN RABBIT HEART. *Circulation* 84, 350-356.
- Marber, M. S., Latchman, D. S., Walker, J. M., and Yellon, D. M. (1993). CARDIAC STRESS PROTEIN ELEVATION 24 HOURS AFTER BRIEF ISCHEMIA OR HEAT-STRESS IS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO MYOCARDIAL-INFARCTION. *Circulation* 88, 1264-1272.
- Markiewicz, W., Finberg, J. P. M., and Lichtig, C. (1982). MORPHINE INCREASES MYOCARDIAL-INFARCTION SIZE IN RATS. *Anesthesia and Analgesia* 61, 843-846.
- Martin, W. R. (1983). PHARMACOLOGY OF OPIOIDS .4. *Pharmacological Reviews* 35, 283-323.
- May, C. N., Dashwood, M. R., Whitehead, C. J., and Mathias, C. J. (1989). DIFFERENTIAL CARDIOVASCULAR AND RESPIRATORY RESPONSES TO CENTRAL ADMINISTRATION OF SELECTIVE OPIOID AGONISTS IN CONSCIOUS RABBITS - CORRELATION WITH RECEPTOR DISTRIBUTION. *British Journal of Pharmacology* 98, 903-913.
- McDonald, J., Leonard, A. D., Serrano-Gomez, A., Young, S. P., Swanevelder, J., Thompson, J. P., and Lambert, D. G. (2010). Assessment of nociceptin/orphanin FQ and mu-opioid receptor mRNA in the human right atrium. *British Journal of Anaesthesia* 104, 698-704.
- McPherson, B. C., and Yao, Z. H. (2001). Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K-ATP channels in myocytes. *Circulation* 103, 290-295.
- Meyer, K. D., Zhang, H. T., and Zhang, L. B. (2009). Prenatal cocaine exposure abolished ischemic preconditioning-induced protection in adult male rat hearts: role of PKC epsilon. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 296, H1566-H1576.
- Miki, T., Cohen, M. V., and Downey, J. M. (1998a). Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Molecular and Cellular Biochemistry* 186, 3-12.
- Miki, T., Liu, G. S., Cohen, M. V., and Downey, J. M. (1998b). Mild Hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: A practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic Research in Cardiology* 93, 372-383.
- Minami, M., and Satoh, M. (1995). MOLECULAR-BIOLOGY OF THE OPIOID RECEPTORS - STRUCTURES, FUNCTIONS AND DISTRIBUTIONS. *Neuroscience Research* 23, 121-145.
- Morris, A. J., and Malbon, C. C. (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological Reviews* 79, 1373-1430.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., and Reimer, K. A. (1986). PRECONDITIONING WITH ISCHEMIA - A DELAY OF LETHAL CELL INJURY IN ISCHEMIC MYOCARDIUM. *Circulation* 74, 1124-1136.
- Netuka, I., Szarszoi, O., Maly, J., Besik, J., Neckar, J., Kolar, F., Ostadalova, I., Pirk, J., and Ostadal, B. (2006). Effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to acute ischaemia in adult male and female rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33, 714-719.

Oldroyd, K. G., Harvey, K., Gray, C. E., Beastall, G. H., and Cobbe, S. M. (1992). BETA-ENDORPHIN RELEASE IN PATIENTS AFTER SPONTANEOUS AND PROVOKED ACUTE MYOCARDIAL-ISCHEMIA. *British Heart Journal* 67, 230-235.

Ošťádal, B., Vízek, M., *Patologická fyziologie srdce a cév*, 2003

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.

Peart, J. N., and Gross, G. J. (2004). Chronic exposure to morphine produces a marked cardioprotective phenotype in aged mouse hearts. *Experimental Gerontology* 39, 1021-1026.

Raynor, K., Kong, H. Y., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G. I., and Reisine, T. (1994). PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE CLONED KAPPA-OPIOID, DELTA-OPIOID, AND MU-OPIOID RECEPTORS. *Molecular Pharmacology* 45, 330-334.

Reimer, K. A., and Jennings, R. B. (1979). WAVEFRONT PHENOMENON OF MYOCARDIAL ISCHEMIC CELL-DEATH .2. TRANSMURAL PROGRESSION OF NECROSIS WITHIN THE FRAMEWORK OF ISCHEMIC BED SIZE (MYOCARDIUM AT RISK) AND COLLATERAL FLOW. *Laboratory Investigation* 40, 633-644.

Schultz, J. E., Hsu, A. K., Barbieri, J. T., Li, P. L., and Gross, G. J. (1998a). Pertussis toxin abolishes the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in intact rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 275, H495-H500.

Schultz, J. E., Hsu, A. K., and Gross, G. J. (1998b). Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta(1)- but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation* 97, 1282-1289.

Schultz, J. E. J., Hsu, A. K., and Gross, G. J. (1996). Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation Research* 78, 1100-1104.

Schultz, J. E. J., Rose, E., Yao, Z. H., and Gross, G. J. (1995). EVIDENCE FOR INVOLVEMENT OF OPIOID RECEPTORS IN ISCHEMIC PRECONDITIONING IN RAT HEARTS. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 268, H2157-H2161.

Schultz, J. J., Hsu, A. K., and Gross, G. J. (1997). Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29, 1355-1362.

Schutová, B. (2010). Drogová senzitivace u potkanů prenatálně exponovaných metamfetaminu. Disertační práce.

Sheldon, R. J., Nunan, L., and Porreca, F. (1989). DIFFERENTIAL MODULATION BY D-PEN2, D-PEN5 ENKEPHALIN AND DYNORPHIN A-(1-17) OF THE INHIBITORY BLADDER MOTILITY EFFECTS OF SELECTED MU-AGONISTS INVIVO. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 249, 462-469.

Sigg, D. C., Coles, J. A., Oeltgen, P. R., and Iaizzo, P. A. (2002). Role of delta-opioid receptor agonists on infarct size reduction in swine. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 282, H1953-H1960.

- Svoboda, P., Teisinger, J., Novotny, J., Bourova, L., Drmota, T., Hejnova, L., Moravcova, Z., Lisy, V., Rudajev, V., Stohr, J., *et al.* (2004). Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiological Research* 53, S141-S152.
- Takasaki, Y., Wolff, R. A., Chien, G. L., and Van Winkle, D. M. (1999). Met(5)-enkephalin protects isolated adult rabbit cardiomyocytes via delta-opioid receptors. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 277, H2442-H2450.
- Taylor, D. A., and Fleming, W. W. (2001). Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297, 11-18.
- Tomai, F., Crea, F., Gaspardone, A., Versaci, F., Ghini, A. S., Ferri, C., Desideri, G., Chiariello, L., and Gioffre, P. A. (1999). Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 33, 1863-1869.
- Tso, P. H., and Wong, Y. H. (2003). Molecular basis of opioid dependence: Role of signal regulation by G-proteins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30, 307-316.
- Van Cruchten, S., and Van den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia Histologia Embryologia* 31, 214-223.
- Vanwinkle, D. M., Thornton, J. D., Downey, D. M., and Downey, J. M. (1991). THE NATURAL-HISTORY OF PRECONDITIONING - CARDIOPROTECTION DEPENDS ON DURATION OF TRANSIENT ISCHEMIA AND TIME TO SUBSEQUENT ISCHEMIA. *Coronary Artery Disease* 2, 613-619.
- Ventura, C., Bastagli, L., Bernardi, P., Caldarera, C. M., and Guarnieri, C. (1989). OPIOID RECEPTORS IN RAT CARDIAC SARCOLEMMA - EFFECT OF PHENYLEPHRINE AND ISOPROTERENOL. *Biochimica Et Biophysica Acta* 987, 69-74.
- Ventura, C., Guarnieri, C., Vaona, I., Campana, G., Pintus, G., and Spampinato, S. (1994). DYNORPHIN GENE-EXPRESSION AND RELEASE IN THE MYOCARDIAL-CELL. *Journal of Biological Chemistry* 269, 5384-5386.
- Ventura, C., Spurgeon, H., Lakatta, E. G., Guarnieri, C., and Capogrossi, M. C. (1992). KAPPA-OPIOID AND DELTA-OPIOID RECEPTOR STIMULATION AFFECTS CARDIAC MYOCYTE FUNCTION AND CA<sup>2+</sup> RELEASE FROM AN INTRACELLULAR POOL IN MYOCYTES AND NEURONS. *Circulation Research* 70, 66-81.
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., and Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry* 73, 953-990.
- Wittert, G., Hope, P., and Pyle, D. (1996). Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218, 877-881.
- Wu, S., Li, H. Y., and Wong, T. M. (1999). Cardioprotection of preconditioning by metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte - Involvement of kappa-opioid receptor. *Circulation Research* 84, 1388-1395.
- Xenopoulos, N. P., Leeser, M., and Bolli, R. (1998). Morphine mimics ischemic preconditioning in human myocardium during PTCA. *Journal of the American College of Cardiology* 31, 65A-66A.

Xiao, D. L., Lawrence, J., Yang, S. M., and Zhang, L. B. (2007). Effect of prenatal nicotine exposure on heart susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult male and female offspring. *FASEB Journal* 21, A1225-A1225.

Yao, Z. H., and Gross, G. J. (1993). ROLE OF NITRIC-OXIDE, MUSCARINIC RECEPTORS, AND THE ATP-SENSITIVE K<sup>+</sup> CHANNEL IN MEDIATING THE EFFECTS OF ACETYLCHOLINE TO MIMIC PRECONDITIONING IN DOGS. *Circulation Research* 73, 1193-1201.

Ytrehus, K., Liu, Y. G., and Downey, J. M. (1994). PRECONDITIONING PROTECTS ISCHEMIC RABBIT HEART BY PROTEIN-KINASE-C ACTIVATION. *American Journal of Physiology* 266, H1145-H1152.

Zhang, W. M., Jin, W. Q., and Wong, T. M. (1996). Multiplicity of kappa opioid receptor binding in the rat cardiac sarcolemma. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28, 1547-1554.

Zhao, Z. Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N. P., Guyton, R. A., and Vinter-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285, H579-H588.

Zimlichman, R., Gefel, D., Eliahou, H., Matas, Z., Rosen, B., Gass, S., Ela, C., Eilam, Y., Vogel, Z., and Barg, J. (1996). Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 93, 1020-1025.