

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

Biologie



**Radka Moravcová**

Antinocicepční a neurotoxické účinky opioidů  
Antinociceptive and neurotoxic effects of opioids

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Novotný, DSc

Praha 2011

**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, 6.5.2011

Podpis

## 1. Abstrakt

Léčebné vlastnosti opioidů jsou známy již více než dvě tisíciletí. Mechanismy spojené s jejich analgetickými účinky byly však z velké části dešifrovány teprve až v posledních 20 letech. Existuje několik typů opioidních receptorů, z nichž tři hlavní ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ) a peptidový systém jsou zapojeny v antinocicepčních procesech a jsou rozdílně rozšířeny v nervovém systému. Při vnímání bolesti a antinocicepci je velmi důležitá role kalcia. Změny v jeho koncentraci jsou klíčové pro výlev neurotransmiterů. Vztah mezi analgetickými účinky opioidů a dostupností  $\text{Ca}^{2+}$  v CNS je vysvětlován tak, že snížením extracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  nebo snížením jeho průchodu přes membránu se zvyšuje opioidní antinocicepce. Analgetický efekt opioidů je limitován jejich relativně vysokou schopností vyvolávat toleranci nebo závislost. Tyto efekty vznikají však až při vysokých dávkách a dlouhodobém užívání, tudíž při správném užívání opioidů by těžké komplikace vznikat neměly. Opioidy mohou mít však i účinky neurotoxické. Opioidy indukovaná toxicita nastává v případě, že tyto látky při svém odbourávání v játrech uvolňují toxické metabolity. Neurotoxicita může být vyvolána oxidací dvojnásobné vazby v chemické struktuře opioidu a na základě toho mohou vznikat volné radikály poškozující tkáň. Tato práce shrnuje současné poznatky zabývající se problematikou antinocicepčních a neurotoxických účinků opioidů.

Klíčová slova: nocicepce, neurotoxicita, opioidy, opioidní receptory, tolerance, závislost

## 2. Abstract

The curative actions of opioids have been known over two millenia. However, the mechanisms of their analgesic effects were only decoded in the last 20 years. There are 3 main types of opioid receptors ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ), that are together with the opioid peptidic system involved in antinociceptive processes and are widespread in the nervous system. Calcium plays a very important role in the pain perception and antinociception. Changes in its concentration are crucial for the neurotransmitter release. The relationship between the analgetic actions of opioids and the availability of  $\text{Ca}^{2+}$  in the CNS is explained in the way that, decreasing extracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and/or by passaging through the membrane, antinociception will increase. Opioid analgesic effects are limited by their relatively high ability to create tolerance or addiction. Since these effects only result from heavy doses and long-term usage, severe complications should not arise during the right usage of these drugs. However, opioids can also have neurotoxic effects. The opioid-induced toxicity occurs in case when opioids release toxic metabolites during the process of their degradation in the liver. The neurotoxicity can be induced by the oxidation of the double bond in the opioid's chemical structure, thus producing free radicals damaging the tissue. This work summarizes the contemporary knowledge, concerning opioid antinociceptic and neurotoxic effects.

Keywords: nociception, neurotoxicity, opioids, opioid receptor, tolerance, dependence

3.	Obsah	
1	Abstrakt	.....1
2	Abstract	.....2
3	Obsah	.....3
4	Seznam zkratek	.....5
5	Opioidy	.....6
5.1	Historie opioidů	.....6
5.2	Klasifikace opioidů	.....6
5.3	Kategorie opioidů	.....7
5.3.1	Třídy opioidů	.....7
5.3.2	Agonisté	.....7
5.3.3	Parciální agonisté	.....8
5.3.4	Agonisté/antagonisté	.....8
5.3.5	Antagonisté	.....8
5.4	Základní vlastnosti, chemické struktury	.....8
6	Opioidní receptory	.....9
6.1	$\mu$ receptor	.....10
6.2	$\kappa$ receptor	.....10
6.3	$\delta$ receptor	.....11
6.4	$\sigma$ receptor	.....11
7	Mechanismus působení opioidů na molekulární úrovni	.....11
7.1	Signalizace spojená s G-proteiny	.....11
8	Další související účinky	.....12
8.1	Závislost k opioidům	.....12
8.2	Tolerance k opioidům	.....13
9	Antinocicepce	.....13
9.1	Bolest	.....13
9.1.1	Chronická bolest	.....14
9.1.2	Vztah neuropeptidů a monoaminergních neurotransmiterů k bolesti....	14
9.2	Nervová soustava zapojená v antinocicepci	.....16
9.3	Zapojení kalcia při vnímání bolesti a antinocicepci	.....16
9.4	Opioidy a jejich analgetické účinky	.....17
10	Neurotoxická	.....20
10.1	Látky hrající roli v neurotoxicitě	.....20

10.2 Opioidy a jejich neurotoxické účinky	.....21
10.2.1 Toxické účinky metabolitů opioidů	.....26
11 Závěr	.....27
12 Literatura	.....28
13 Internetové zdroje	.....30

#### 4. Seznam zkratk

AK	aminokyselina
CAMKII	kalcium/kalmodulin závislá kináza II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNS	centrální nervový systém
CREB	cAMP response element-binding
DADLE	[D-Ala2, D-Leu5]-enkephalin
DAMGO	[D-Ala2, N-MePhe4, Gly-ol]-enkephalin
DOR	$\delta$ opioidní receptor
DPDPE	[D-Pen2, D-Pen5]-enkephalin
DRG	dorsal root ganglia
EAAC1	glutamátový transporter
GABA	kyselina gamaaminomáselná
GDP	guanosindifosfát
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny
GRKs	GPCRs kinázy
GTP	guanosintrifosfát
KOR	$\kappa$ opioidní receptor
MAPK	mitogen activated protein kinase
MOR	$\mu$ opioidní receptor
NK buňky	natural killers
NMDA receptor	N-methyl-D-aspartátový receptor
NO	oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
NS	nervový systém
OH	hydroxylová skupina
OIN	opioidy indukovaná neurotoxicity
OR	opioidní receptory
ORL 1 receptor	opioid receptor-like receptor
PDYN	prodynorphin
PENK	proenkephalin
POMC	proopiomelanocortin
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PNS	periferní nervový systém
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome Ten
RACC	receptor-activated calcium channels
ROS	reactive oxygen species
VOCC	voltage-operated calcium channels
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)

## 5. Opioidy

### 5.1 Historie opioidů

Kultivace opia z *Papaver somniferum* byla známa již v Mezopotámii 3400 př. Kr. Sumerové mák nazvali „rostlinou radosti“. Nejprve se opium používalo při náboženských rituálech pro navození euforie. Se zavedením opia do medicíny došlo k jeho rozšíření z Malé Asie do Evropy a s tím přišla i závislost. V roce 1806 Němec Friedrich Sertürner vyizoloval aktivní složku opia a nazval ji morfin, po bohu snů – Morfeu. Rok nato byl izolován kodein. Na konci 19. století byl syntetizován heroin jako látka, která měla být účinnější než morfin a méně návyková. Tento paradox byl záhy vyvrácen a pokus najít látku lepší než morfin následoval vytvořením meperidinu, první zcela syntetické látky. V 60. letech 20. století Goldstein naznačil, že by pro tento typ látek mohly existovat speciální receptory. Jeho pokus o identifikaci opioidních receptorů však selhal. V roce 1973 se podařilo tato stereospecifická vazebná místa v CNS prokázat nezávisle několika skupinami. Na základě úvahy, že receptory opioidů by mohly být cílem pro vazbu neurotransmiterů, byl učiněn objev endogenních opioidů. Později byly identifikovány tři hlavní typy opioidních receptorů (Brownstein 1993).

Důkazy o znalosti uklidňujících látek a léků pro úlevu od bolesti pro chirurgické a léčebné účely jsou uvedeny v lékařských spisech z období Římské a Byzantské říše (2. století př. Kr. až 7. století n.l.). Centrálně působící přípravky schopné navodit bezvědomí a netečnost k bolesti v období Římské říše zahrnovaly konopí, opium a výtazek z rostlin čeledi *Solanaceae*, do které patří zároveň mandragora a blín. Byzantská říše přispěla vylepšením lékařských zvyků a zavedením nových praktik a pojmů. Lékaři v těchto dobách, kteří využívali medicínské poznatky z antiky, si byli vědomi terapeutických, od bolesti osvobozujících a uklidňujících vlastností mnoha rostlin, a zvláště pak *Papaver somniferum*, *Mandragoras officinarum*, *Hyoscyamos niger* a *Atropa belladonna*. Použití opia a dalších léčebných látek vytvořilo základ pro léky, které byly byzantskými lékaři podávány ve formě prášku, kapek, léčivých obkladů nebo inhalovány. S rozvojem medicíny a lékopisectví se objevovaly nové léky používané nejen pro léčbu chirurgické bolesti, ale i pro bolest způsobenou nádory, zánětlivá onemocnění očí a uší, revma, kašel způsobený tuberkulózou, horečku a další rozmanité symptomy (Ramoutsaki 2002).

### 5.2 Klasifikace opioidů

Opioidy zahrnují jak endogenní peptidy, tak i exogenní látky, mezi které patří, jak přírodní alkaloidy z rostlin, tak syntetické analogy těchto alkaloidů a peptidů (Chen 1993).



Opioidy se dělí podle toho, zda jsou přírodní složkou opia, nebo zda jsou uměle syntetizovány na:

1. přirozené opiáty: morfin, kodein, thebain
2. semi-syntetické opioidy: hydromorfon, hydrokodon, oxykodon, oxymorfon, buprenorfin, etylmorfin
3. plně syntetické opioidy: fentanyl, metadon, tramadol
4. endogenní opioidy: endorfiny, enkefaliny, dynorfin, nociceptin

První endogenní opioid (enkefalin) byl objeven v mozku roku 1975. Výskyt endogenních opioidů v CNS jim umožňuje fungovat jako neurotransmitery; mohou hrát roli v sekreci hormonů, termoregulaci a kardiovaskulárním řízení (Trescot 2008).

### 5.3 Kategorie opioidů

#### 5.3.1 Třídy opioidů

Existují 4 chemické třídy opioidů:

1. Fenanthreny – patří sem nejtypičtější opioidy

Přítomnost 6-OH skupiny v molekule těchto sloučenin by mohla být spojena s vyšším výskytem nevolností a halucinací, neboť morfin a kodein (oba tuto skupinu obsahují) jsou spojeny s většími nevolnostmi než hydromorfon a oxykodon, jež tuto skupinu nemají.

2. Benzomorfanly – agonisté/antagonisté s vysokým výskytem dysforie
3. Fenylpiperidiny (fentanyl a meperidin)

Fentanyl má velmi vysokou afinitu pro  $\mu$  receptor.

4. Difenylheptany (metadon)
5. Tramadol – toto unikátní analgetikum se neřadí mezi standardní třídy opioidů, je to analog kodeinu s částečnou  $\mu$ -agonistickou aktivitou. Primárně se používá jako analgetikum, ale je známa i jeho užitečnost při léčbě opioidních abstinčních příznaků.

#### 5.3.2 Agonisté

Většina nejběžnějších opioidů jsou agonisté a vyvolávají svůj účinek stimulací opioidních receptorů. Rozdíly v aktivitě a výkonnosti se zdají být závislé na relativní stimulaci různých opioidních receptorů, ale také na genetických rozdílech v citlivosti těchto receptorů.

### 5.3.3 Parciální agonisté

Jako parciální agonista je klasifikován buprenorfin. Má vysokou afinitu k  $\mu$  opioidnímu receptoru, ale nízkou účinnost, což způsobuje částečný efekt při navázání. Kromě toho jeho antagonistická aktivita vůči  $\kappa$  receptoru způsobuje jeho užitečnost nejen jako analgetikum, ale i například při léčbě závislosti.

### 5.3.4 Agonisté/antagonisté

Takto klasifikované opioidy mají slabý účinek na  $\mu$  opioidní receptor a mohou tedy funkčně působit jako antagonisté  $\mu$  receptoru, ale také mají  $\kappa$  agonistické vlastnosti.

### 5.3.5 Antagonisté

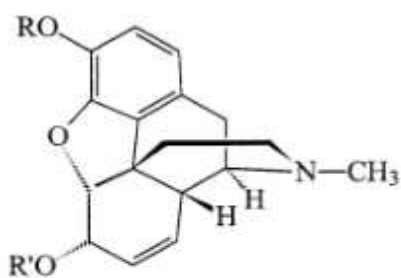
Antagonisté opioidních receptorů, jako jsou naloxon a naltrexon, jsou kompetitivní antagonisté  $\mu$ ,  $\kappa$  a  $\delta$  receptorů, kteří se s vysokou afinitou váží na  $\mu$  receptor, ale mají nízkou účinnost (Trescot 2008).

## 5.4 Základní vlastnosti, chemické struktury

Morfin a jeho deriváty kodein a heroin mají pentacyklickou strukturu s benzylochinolinovým jádrem (obr. 1). Kodein (morfin monomethyl ether) může být také izolován z máku setého. V roce 1898 byl registrován diacetylmorfin pod patentovaným názvem Heroin jako lék proti kašli pro děti (Zhang 2008).

Morfin je široce využíván v medicíně díky svým účinkům způsobujícím úlevu od bolesti. Ale také často způsobuje kruté zácpy, respirační útlum, ospalost, nevolnost, ztrátu chuti k jídlu, zmatenost, rozmazané vidění, suchost v ústech a další nepříznivé účinky (Zhang 2008). Je také vysoce návykový a při dlouhodobém podávání navozuje toleranci a závislost (Raehal a Bohn 2005).

Kodein je prototyp slabého analgetika se slabou afinitou k  $\mu$  receptoru (Trescot 2008). Heroin byl syntetizován jako látka více účinná a méně návyková než morfin, ale později se ukázalo, že svou návykovostí morfin předčí (Inturrisi 2002).



R = R' = H	Morphine
R = Me R' = H	Codeine
R = R' = Ac	Diamorphine (Heroin)

Obr. 1: Molekulární struktura morfinu, kodeinu a heroinu

## 6. Opioidní receptory

Opioidní receptory (OR) jsou členy velké rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs), která zahrnuje rhodopsin a  $\beta$ -adrenergní receptor (Terman 2004). OR stejně jako všechny GPCRs mohou být regulovány četnými mechanismy, mezi které patří desensitizace, internalizace, resensitizace a downregulace (Raehal a Bohn 2005).

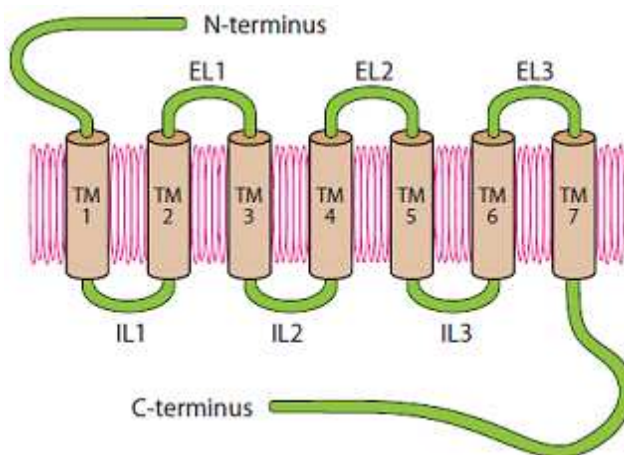
Regulační elementy GPCRs, jako jsou GRKs (GPCRs kinázy) a  $\beta$ -arrestiny, jsou důležitými mediátory těchto procesů (Raehal a Bohn 2005).

Desensitizace MOR představuje rozhodující bod regulace, který může potenciálně určovat rozsah účinků morfinu na každý fyziologický parametr, včetně návykovosti spojené s jeho užíváním (Bohn 2004).

Klasicky jsou GPCRs desensitizovány a internalizovány po prodloužené stimulaci agonisty. *In vitro* studie ukázaly, že zvláště GRK3 je velmi účinná v procesu desensitizace opioidních receptorů vyvolané agonisty. GRK3 zprostředkovaná desensitizace je důležitým mechanismem vzniku tolerance k opioidům (Terman 2004).

Klonování cDNA  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -opioidních receptorů bylo umožněno použitím molekulárně-biologických technik, které měly odhalit regulaci syntézy, biochemické a farmakologické vlastnosti a anatomické rozšíření těchto receptorů. Pomocí farmakologických studií za použití selektivních ligandů bylo odhaleno několik různých typů nebo subtypů OR (Minami 1995). Tři typy OR ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ) sdílí sekvenční a strukturální rysy (Chen 1993). Každý receptor se

skládá z extracelulárního N-konce, 7 transmembránových  $\alpha$ -helixů (TM), 3 extracelulárních (EL) a 3 intracelulárních smyček (IL) a C-konce (obr. 2) (Trescot 2008).



Obr. 2: Struktura OR (Trescot 2008)

### 6.1 $\mu$ receptor

Klonovaný  $\mu$  opioidní receptor je „morfin-like“ receptor a mezi jeho endogenní ligandy se řadí endomorfiny (Przewłocki 2001). MOR jsou exprimovány hlavně v nemyelinizovaných neuronech malých průměrů, ale také v některých neuronech o velkém průměru patřících do ganglionu zadních kořenů míšních a jsou často ko-lokalizovány spolu s bradykininovými B2 receptory. S věkem exprese MOR klesá ve velkých smyslových neuronech obsahujících neurofilamenta, zatímco v malých, nociceptivních neuronech, negativních na přítomnost neurofilament, zůstává exprese nezměněna (Berrios 2008).

### 6.2 $\kappa$ receptor

Klonovaný  $\kappa$  receptor má vysokou afinitu pro dynorfin A, což je endogenní agonista  $\kappa$  receptoru, a také pro  $\kappa$  selektivní ligandy, ale ne pro DAMGO nebo DPDPE. Jsou známy jeho dva subtypy, přičemž pro  $\kappa_2$  subtyp ještě nebyl objeven žádný selektivní ligand (Minami 1995).

### 6.3 $\delta$ receptor

Klonováním  $\delta$ -opioidního receptoru se zjistilo, že má vysokou afinitu pro DADLE a DPDPE, ale ne pro DAMGO ani pro  $\kappa$  selektivní ligandy, což potvrdilo, že jde o OR  $\delta$ -typu. Tento typ OR má také 2 subtypy ( $\delta 1$  a  $\delta 2$ ), ale kvůli nedostatku dostatečně selektivních ligandů nelze tyto podtypy jednoznačně rozlišit (Minami 1995).

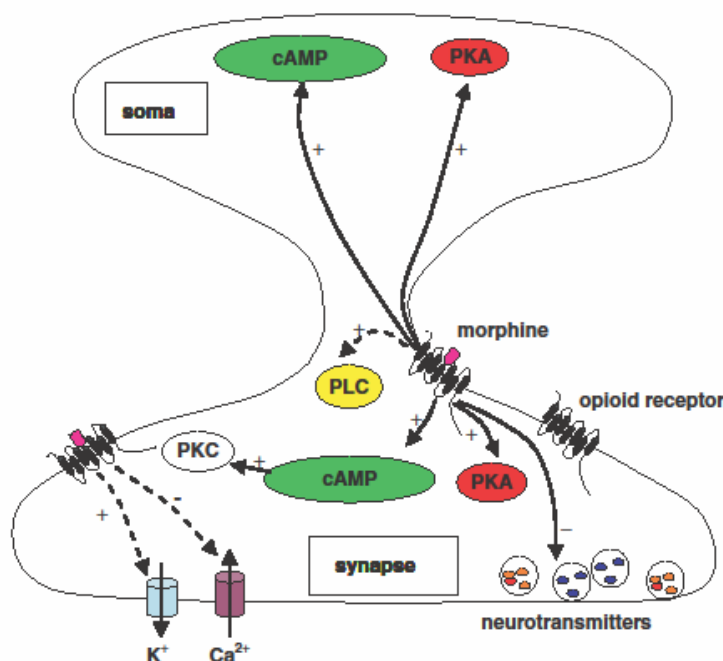
### 6.4 $\sigma$ receptor

Martin se svými kolegy v roce 1976 popsal několik rozdílných typů OR s odlišnými farmakologickými preferencemi pro rozmanité ligandy: MOR pro morfin, KOR pro ketocyclazocin a sigma pro *N*-allylnormetazocin. Později bylo zjištěno, že sigma receptor odpovídá na jiné psychoaktivní látky, jako je fencyklidin, a byl ze seznamu OR odstraněn (Zhang 2008).

## 7. Mechanismus působení opioidů na molekulární úrovni

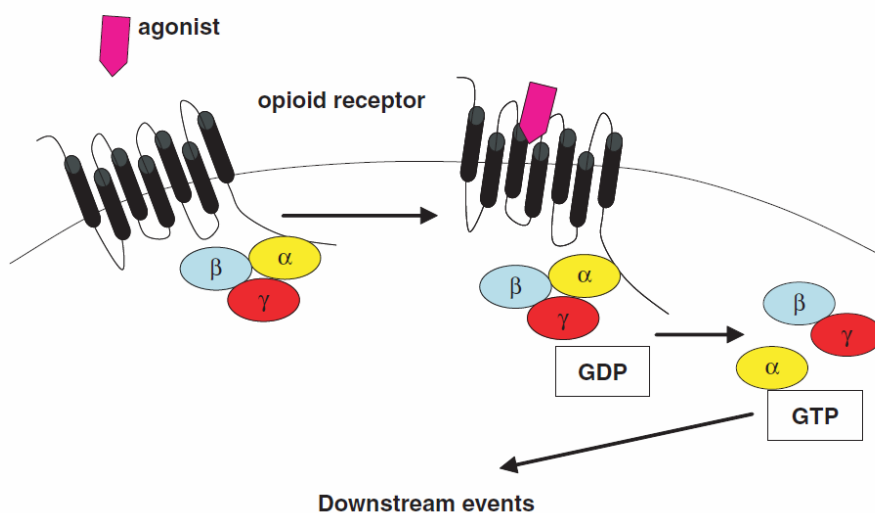
### 7.1 Signalizace spojená s G-proteiny

Aktivace heterotrimerních G-proteinů je hlavním mechanismem přenosu informace z OR a ovlivňuje mnohé buněčné signální dráhy (obr. 3). (Stimulace OR snižuje cAMP inhibicí adenylátcyklázy, aktivuje MAPK kaskádu, a OR regulují také PLC, PKC a PKA) (Zhang 2008).



Obr. 3: Intracelulární dráhy ovlivněné OR (Zhang 2008)

Navázáním agonisty na opioidní receptor se vyvolá výměna GDP za GTP na  $\alpha$  podjednotce příslušného G-proteinu. G-protein je poté uvolněn z opioidního receptoru a  $\alpha$ -podjednotka a  $\beta\gamma$ -podjednotka disociují a ovlivňují funkci různých efektorových molekul (obr. 4). Následně dojde k hydrolýze GTP GTPázovou aktivitou  $\alpha$ -podjednotky a opětovné sjednocení 3 podjednotek ukončí cyklus aktivace a deaktivace G-proteinu (Zhang 2008).



Obr. 4: Mechanismus působení G-proteinů (Zhang 2008)

## 8. Další související účinky

Rozvoj tolerance a fyzické závislosti po opakovaném podávání jsou vlastnosti mnoha chemických látek, ale žádná z nich neposkytuje tak pozoruhodný příklad těchto dvou fenoménů jako opiáty (Szara 1982).

### 8.1 Závislost k opioidům

Závislost na opioidech je vážný klinický a sociální problém. Stejně, jako je tomu i u jiných návykových drog, značný podíl jedinců, kteří zneužívají opioidy nebo je klinicky používají, se stane závislý. Opioidy jsou široce využívány k léčbě akutní a chronické bolesti. Například oxycodon patří mezi nejvíce předepisované látky k tomuto účelu. Odhady vzniku závislosti u pacientů používajících opioidy se pohybují v rozmezí 2–6 %. Mezi jedinci, kteří nezákonně používají opioidy, může být závislých 30 % z nich. Pro pacienty užívající heroin při léčbě je pravděpodobné, že heroin znovu užijí do 3 měsíců asi 60 % a do 12 měsíců asi 75–85 % (Christie 2008).

Závislost může být definována jako ztráta kontroly nad užíváním drog nebo jako nutková touha po užití drogy a jejího požití nehlédě na nepříznivé důsledky. Na závislost je také nahlíženo jako na formu neuronální plasticity indukovanou léky. Jeden z nejlépe probádaných molekulárních mechanismů vzniku závislosti je upregulace signalizace cAMP, která se odehrává v mnoha neuronálních buněčných typech při odpovědi na dlouhodobé užívání opiátů nebo jiných návykových drog. Tato upregulace a výsledná aktivace transkripčního faktoru CREB zprostředkovává změny vedoucí k toleranci a závislosti (Nestler 2001).

## 8.2 Tolerance k opioidům

Tolerance se vyvine, když daná dávka opioidu působí snížený účinek nebo když je požadována vyšší dávka k udržení původního účinku (Inturrisi 2002). Tolerance k opioidům je charakterizována sníženou vnímavostí k agonistům OR, jako je morfin a obvykle se projeví potřebou použít zvýšenou dávku k dosažení kýženého účinku (Christie 2008). Tolerance k opioidním analgetikům je známa jako komplexní proces zahrnující nejen biochemické změny v procesu signalizace opioidních receptorů, ale také kompenzační behaviorální mechanismy a fyziologické adaptace k droze (Terman 2004). Tolerance se rozvíjí na několika úrovních. Je známa receptorová tolerance, buněčná tolerance a systémová tolerance (Christie 2008).

Buněčná tolerance je fenomén, při kterém je pozorována pouze redukovaná odpověď k opioidním agonistům u neuronů exprimujících  $\mu$  receptor, které byly předtím vystaveny chronickému působení agonistů. Buněčná tolerance následující po prodloužené aktivaci opioidních receptorů by mohla mít za následek změny ve spřažení receptorů, počtu receptorů a množství efektorových proteinů nebo ve schopnosti efektoru být regulován opioidními receptory. Navzdory četným studiím zůstávají přesné buněčné mechanismy, tvořící základy opioidní tolerance a závislosti, dosud neobjasněny (Bailey 2005).

## 9. Antinocicepce

Antinocicepce je snížení citlivosti na bolestivé podněty, které může být vyvoláno navázáním endorfinů nebo jiných látek, podobných opioidům, na opioidní receptory neuronů<sup>[1]</sup>.

### 9.1 Bolest

Opioidy jsou širokospektrální analgetika s vlastnostmi pro úlevu od bolesti, ale také s potenciálem vzniku nepříznivých účinků ve vztahu jak ke krátkodobé, tak dlouhodobé terapii (Smith 2008).

Tato účinná analgetika se obvykle používají při léčbě jak akutní, tak chronické bolesti (Mao 2002).

### 9.1.1 Chronická bolest

Po poranění v periférii nastává reorganizace míšního NS. Bylo prokázáno zapojení glutamatergní dráhy a NMDA receptorů v plastických změnách (Hao 1996). Neuropatická a zánětlivá bolest indukuje neuronální plasticitu prostřednictvím NMDA receptorů, a proto antagonisti glutamátových receptorů zabraňují změnám v plasticitě NS. Tkáňové poranění a zánět indukují prodlouženou aktivaci systému excitačních aminokyselin následovanou nadměrnou aktivací intracelulární kaskády druhých posílů, proteinovou fosforylací, aktivací transkripčních faktorů a genovou expresí. Excitační AK navozují vzrůst vtoku  $\text{Ca}^{2+}$ , translokaci PKC a zvýšenou produkci NO (Hao 1996). V různých modelech chronické bolesti byly analyzovány také změny v aktivitě NOS (Hao 1996). Má se za to, že přetrvávající bolest aktivuje NMDA receptory, zvyšuje NO produkci a následně zvyšuje hladinu intracelulárního cGMP (Przewłocki 2001). NO hraje klíčovou roli v nocicepčním procesu v páteřní míše. Mechanismus zodpovědný za hyperalgezií při chronické bolesti nemusí zahrnovat NO jako takový, ale také peroxynitrit ( $\text{NOOO}^-$ ), produkt jeho reakce se superoxidovým radikálem  $\cdot\text{O}_2^-$ , který může vést ke vzniku volných radikálů  $\cdot\text{OH}$  a  $\text{NO}_2^-$  (Tal 1996). U pacientů s chronickým poraněním páteře by proto mohly být používány NOS inhibitory jako potenciální analgetika (Przewłocki 2001).

Opioidy jsou významné při potlačování zánětlivé bolesti. Během zánětu dochází k zvýšení účinnosti agonistů MOR. Tato zvýšená účinnost MOR agonistů je nejspíše způsobena změnami v afinitě nebo počtu MORs, které jsou ovlivněny zvýšenou genovou expresí těchto receptorů v dorzálním rohu páteřní míchy. Stejně tak při poškození míchy nebo periferních nervů, což vede k neuropatické bolesti, dochází k vzrůstu biosyntézy endogenních dynorfinů. Následné zvýšení syntézy OR a endogenních dynorfinů po poranění jsou přímé prostředky pro potlačení nocicepce (Berrios 2008).

### 9.1.2 Vztah neuropeptidů a monoaminergních neurotransmiterů k bolesti

Objevením struktur v mozku, které mají vysokou schopnost vázat morfin a další omamné látky, byl odstartován závod o nalezení mozku vlastních endogenních látek, pro které se tyto takzvané opioidní receptory vyvinuly. Hughes se svými kolegy jako první identifikoval dva podobné pentapeptidy a nazval je neutrálně met- a leu-enkefalin (Sweet 1980).



Existují přinejmenším 3 skupiny neuropeptidů, z nichž každá má zástupce souvisejícího s bolestí:

1. neuropeptidy vážící se na opioidní receptory v mozku (met-, leu- enkefalin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -endorfiny),
2. neuropeptidy popisované v souvislosti s hladkou svalovinou krevního řečiště a vnitřních orgánů (substance P, angiotenzin II a cholecystokinin) a
3. neuropeptidy identifikované v hypothalamu.

Pomocí kolchicinu, látky, která zastavuje axonální transport, a pomocí techniky radioimmunoassay byla stanovena nejvyšší koncentrace enkefalinů v substantia gelatinosa zadního rohu míšního, což je oblast přímo odpovědná za integraci přicházejících impulzů spojených s vnímáním a zahrnující i vnímání bolesti (Sweet 1980). Neurony obsahující enkefalin byly nalezeny ve všech oblastech mozku s výjimkou mozkové a mozečkové kůry. Jejich přítomnost v substantia gelatinosa v nucleus caudalis trojklaného nervu v mozkovém kmeni, v nucleus raphe magnus a raphe pallidus, na ventrolaterální straně periakveduktové šedi, v oblasti amygdaly, thalamu, locus coeruleus a v dalších oblastech potvrzuje jejich vztah k bolesti. Bylo prokázáno, že neurony obsahující enkefaliny jsou interneurony. Zatím se nepodařilo vyvinout analog enkefalinů, který by byl degradován pomalu a měl vysoký analgetický účinek. V 70. letech se předpokládalo, že endorfiny, jakožto tělu vlastní morfiny, mohou zřejmě jen slabě ovlivňovat vnímání bolesti. Další experimenty však prokázaly, že endorfiny patří mezi důležité supresory bolesti (Sweet 1980).

Enkefaliny potlačují a substance P podporuje vnímání bolestivých podnětů. V malých dávkách však může i substance P produkovat analgesii, když je podána intraperitoneálně nebo intracerebrálně. Somatostatin se také vyskytuje v oblastech spojených s bolestí (Sweet 1980).

$\beta$ -endorfin a příbuzné peptidy odvozené z POMC (proopiomelanocortin) jsou přítomny v nucleus arcuatus hypothalamu. Rozsáhlý systém nervových vláken vycházejících z obloukovitého jádra končí v mnoha oblastech mozku, zapojených v odpovědi na bolest. Neurony obsahující proenkefalin jsou rozšířeny napříč celým CNS i PNS a tyto neurony se také vyskytují v nociceptivní síti páteřní míchy. Mnoho PENK neuronů se nachází ve strukturách limbického systému, a mohou být zapojeny v emoční odpovědi na bolest. Neurony obsahující PDYN jsou široce rozšířeny v mozkových oblastech spojených s nocicepcí. Endomorfín-2 byl nalezen v CNS v oblastech asociovaných s nocicepcí a bohatých na  $\mu$ -OR, jako je páteřní mícha a thalamus. Endomorfiny inhibují přes  $\mu$ -OR nocicepční přenos v míše (Przewłocki 2001).

## 9.2 Nervová soustava zapojená v antinocicepci

Výsledky studie zabývající se vyšetřením, jak se různé části mozku účastní antinocicepce, ukázaly odlišný význam amygdaly při antinocicepci vyvolané endogenními a exogenními opioidy (Valverde 1994). Neurony, které obsahují endogenní opioidní peptidy, byly nalezeny v oblastech zapojených v nocicepční odpovědi, což je thalamus, periakveduktová šed', limbický systém, mozková kůra a páteřní mícha. Stejně tak bylo dokázáno, že centra autonomního nervového systému jsou inervována centrálními a periferními opioiderními neurony. Anatomické studie ukázaly odlišné anatomické rozložení endomorfínů, kdy endomorfín-1 je přítomný hlavně v mozku a endomorfín-2 v míše, a jejich syntéza probíhá v oddělených buněčných systémech (Przewłocki 2001).

Všechny tři typy OR a peptidický systém jsou spojeny s antinocicepčními procesy a jsou rozdílně rozšířeny v nervovém nocicepčním systému. Řídká hustota vazebných míst  $\mu$ - a  $\kappa$ -OR se nachází v periakveduktové šedi, locus coeruleus, substantia nigra, raphe nuclei a nucleus tractus solitarii, nízká vazba na  $\delta$ -OR byla pozorována v substantia nigra a nucleus tractus solitarii. Neurony obsahující OR se nacházejí v limbickém systému, kde zprostředkovávají emoční složku bolesti a v oblastech páteřní míchy zapojených v přenosu nocicepčních podnětů. OR se nacházejí i v PNS a jsou také exprimovány v mnoha buňkách imunitního systému. Hlavní exprese ORL1 receptoru je soustředěna v amygdale, hypotalamu a thalamu a v páteřní míše. Nervová vlákna obsahující nociceptin jsou s velkou hustotou rozšířena v oblastech zprostředkovávajících nocicepční informace: páteřní mícha, raphe nuclei a periakveduktová šed' (Przewłocki 2001).

## 9.3 Zapojení kalcia při vnímání bolesti a antinocicepci

$\text{Ca}^{2+}$  ionty hrají důležitou roli v regulaci mnoha biologických procesů. Dočasné změny v koncentraci vápníku v cytoplasmě jsou klíčovým krokem pro výlev neurotransmiterů a regulaci excitability buněčných membrán (Zamponi 1998). Také je znám důkaz pro zapojení  $\text{Ca}^{2+}$  v nocicepci a antinocicepci, zahrnující analgetické účinky produkované opioidy. Blízký vztah mezi analgetickými účinky opioidů a dostupností  $\text{Ca}^{2+}$  v CNS je spojován se zvýšením extracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  nebo usnadněním jeho toku přes membránu, což snižuje antinocicepci opioidů. Naopak snížení extracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  nebo snížení jeho průchodu přes membránu zvyšuje opioidní antinocicepci (Prado 2001). Vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů se uskutečňuje třemi typy kanálů (Barritt 1999):

1. VOCC (napětím otevírané  $\text{Ca}^{2+}$  kanály), které jsou otevírané membránovou depolarizací
2. ligandem řízené nespecifické  $\text{Ca}^{2+}$  kanály

3. a RACC (receptorem aktivované  $\text{Ca}^{2+}$  kanály).

VOCC kanály se dělí na několik typů, z nichž L, N a P/Q jsou zapojeny v nocicepci, ale T typ nikoliv. Antinocicepční účinky byly pozorovány při použití antagonistů kanálů typu N nebo P/Q. Zesílení opioidy přivozené antinocicepce bylo pozorováno aplikací antagonistů typu L. Tento typ antagonistů také bránil rozvoji opioidní tolerance a byl více účinný při snižování abstinenčních příznaků spojených s opioidy (Prado 2001). Inhibice napětově závislých  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů je důležitý proces, kterým opioidy snižují buněčnou excitabilitu a výlev neurotransmiterů. Aktivace  $\mu$ -,  $\kappa$ - a  $\delta$ -ORs snižuje proudění kalcia přes napětově závislé iontové kanály v rozmanitých tkáních, například v buněčné linii lidského neuroblastomu nebo v submukozních neuronech morčete. Takovéto snížení toku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů vyvolané aktivací OR je blokováno pertusis toxinem (Seward 1991, Surprenant 1990).

#### 9.4 Opioidy a jejich analgetické účinky

Opioidní látky jsou užívány v klinice jako nepřekonatelná analgetika, ale také ilegálně zneužívány na ulici, aby navodily pocit lepšího bytí a euforie. Tolerance k opioidům, definovaná jako ztráta účinku, která následuje opakované užití, stejně jako požadování vyšší dávky pro dosažení stejného účinku, limituje analgetický efekt těchto léků a přispívá k sociálním problémům (Bailey 2005).

Analgetické opioidy se odlišují svými farmakologickými vlastnostmi, které jsou odvozeny z jejich komplexních interakcí s třemi typy opioidních receptorů. Na buněčné úrovni opioidy snižují vstup  $\text{Ca}^{2+}$  iontu do neuronů, což má za následek pokles v presynaptickém výlevu neurotransmiterů (substance P z primárních aferentací zadního rohu prodloužené míchy). Zvyšují také výtok  $\text{K}^+$  iontů, což způsobuje hyperpolarizaci postsynaptických neuronů a potlačení synaptického přenosu. Třetím mechanismem působení opioidů je inhibice GABAergního přenosu v místním okruhu (v mozkovém kmeni, kde GABA inhibuje bolest-inhibující neurony) (Inturrisi 2002).

Analgetické působení opioidů se realizuje prostřednictvím aktivace MORs. MORs jsou s  $\text{G}_{i/o}$ - spřažené receptory a jako mnoho dalších GPCRs mohou podstoupit rychlou desensitizaci a internalizaci po expozici agonistům. Všeobecně akceptovaný mechanismus tvořící základ MOR desensitizace a internalizace začíná fosforylací receptorů GRKs a navázáním arrestinu. V tomto bodě je receptor v desensitizovaném stavu na plasmatické membráně. Receptory s navázaným arrestinem pak mohou být internalizovány na klatrínu závislou cestou a buď recyklovány na buněčný povrch nebo downregulovány. Desensitizace OR také může být modulována proteinkinázami aktivovanými příslušnými druhými posly

(PKC, PKA a CAMKII). Detailní význam různých kináz v regulaci opioidní aktivity v neuronech není dosud zcela objasněn. Kinázami zprostředkovaná receptorová desensitizace je pravděpodobně událost předcházející rozvoji buněčné tolerance (Bailey 2005). Morfin a další opioidy jsou používány a zneužívány pro své analgetické a euforické vlastnosti. Tolerance k těmto účinkům se rozvíjí během hodin/dní až týdnů, stejně jako fyzická a psychická závislost (Bailey 2005).

V dnešní době morfin nemusí způsobovat problémové vedlejší účinky, když je vhodně používán v klinice. Těžká závislost je pozorována pouze při jeho zneužívání (Ueda 2003). Proloužená a opakovaná expozice opioidním agonistům snižuje citlivost OR. Takováto redukce v receptorové funkci nejspíše přispívá k toleranci, závislosti a návyku u lidí (Nestler 1992). Snížení antinocicepční účinnosti morfinu může vyplývat ze zranění nervu redukující aktivitu míšních OR nebo opioidní signální transdukce (Berrios 2008). Hlavním nedostatkem používání přirozeně působících opioidních peptidů jako analgetik je jejich relativně nízká receptorová selektivita (Liu, Wang 2011).

V loňském roce proběhl výzkum zabývající se zapojením periferních a centrálních OR v antinocicepci. Účast periferních a centrálních OR v indukcii bolesti byla zkoumána na žvýkacím svalu (nervus trigeminus), lýtkovém svalu a tricepsu (míšní nervy). Při studiu byl použit morfin a loperamid. Jak morfin, tak loperamid ve žvýkacím svalu potkana snižovaly nocicepci a byly blokovány antagonisty (naloxon, naloxon methiodid). Zajímavé bylo zjištění, že u svalů lýtkového a tricepsu morfin snížil nocicepci, ale loperamid nikoli. Zdá se, že OR na periférii se podílejí na tlumení bolesti u žvýkacího svalů a pouze OR v CNS redukují nocicepci u svalů lýtkového a tricepsu. Došlo se k závěru, že výhodnější pro léčbu orofaciální svalové bolesti je použití spíše opioidů působících na periferní OR, než opioidů působících centrálně (Sanchez 2010).

Hydromorfon je účinnější antinocicepční látka než morfin. Jeho účinnost je 5x větší. Vyšší analgetická účinnost hydromorfonu ve srovnání s morfinem je klinicky důležitá. Zheng a kol. provedli v roce 2004 srovnávací studii antinocicepčních účinků morfinových alkaloidů. Srovnávali účinky morfinu, hydromorfonu, dihydromorfinu a dihydroisomorfinu pomocí formalinového testu (tab. 1). Jejich výsledky ukázaly, že morfin, hydromorfon, dihydromorfin a dihydroisomorfin jsou stejně účinné. Ale hydromorfon byl 5x silnější než morfin, zatímco dihydromorfin měl stejnou sílu jako morfin a dihydroisomorfin tvořil pouze 36 % síly morfinu. Hydromorfon-3-glukuronid, dihydromorfin-3-glukuronid a dihydroisomorfin-3-glukuronid neprokázaly žádné antinocicepční účinky. Jejich výsledky také potvrzují

důležitost volné C3-OH skupiny v souvislosti s analgetickými účinky morfinových alkaloidů (Ming, McErlane 2004).

Opioid	Poměr účinností
Hydromorfon	5,0
Morfin	1,0
Dihydromorfin	0,94
Dihydroizomorfin	0,36

Tab. 1: Srovnání antinocicepčního působení morfinu a jeho derivátů (Zheng 2004)

Opioidy jsou klíčové látky používané pro léčbu bolesti, která je spojená s nádory. Vývoj optimálních analgetik pro léčbu nádorové bolesti je omezen kvůli nedostatku znalostí o základním mechanismu, kterým nádorová bolest vzniká. V roce 2007 byla vytvořena studie, jejímž cílem bylo zjistit, zda chronicky podávaný fentanyl a morfin mohou ovlivňovat bolest a nádorem indukované léze. Bylo dokázáno, že opakované podávání analgetických dávek fentanylu a morfinu signifikantně snížilo symptomatické chování svědčící o bolesti. Také fentanyl a v menší míře morfin snížily progresi kostních lézí. Nádorové léze byly také inhibovány kombinací fentanylu a naloxonu, avšak samotný naloxon nevykazoval významný analgetický účinek. Chronická vysoká dávka fentanylu v kombinaci s nízkou dávkou naloxonu by mohla být terapeutickým přístupem, který zajišťuje jak příznivou redukci kostních lézí, tak snížení nežádoucích účinků, například neuronální toxicity (Mouedden a Meert 2007).

Bylo zjištěno, že oxidativní stres, který přispívá ke stárnutí, může také způsobovat změny ve vnímání bolesti a analgezi. Poznatky o účincích oxidativního stresu na opioidní systém nejsou příliš obsáhlé. Existuje souvislost mezi věkově závislým oxidativním poškozením a opioidy zprostředkovanou antinocicepcí. Nocicepční práh a antinocicepční účinky opioidů s postupujícím věkem výrazně klesají (Raut 2009).

V tab. 2 je uveden pro ilustraci seznam léků na bázi opioidů často používaných k tišení bolesti.

Tab. 2: Seznam používaných opioidních analgetik<sup>[2] [3]</sup>

	Obchodní název
Kodein	Kodein
	Alnagon
Oxykodon	OxyContin
	Percodan
	Percocet
	Roxiprin
	Roxicet
	Endodan
	Endocet
Hydrokodon	Anexsia
	Dicodid
	Hycodan
	Hycomine
	Lorcet
	Lortab
	Norco
	Tussionex
	Vicodin
Meperidin	Demerol
Hydromorfon	Dilandid
Morfin	MST Cont
	Vendal
Fentanyl	Durogesic
	Matrifen
Buprenorfin	Temgesic
	Transtec

## 10. Neurotoxicita

Neurotoxicita nastává po působení neurotoxinů, ať už přírodních nebo umělých, které mění normální aktivitu NS, což vede k poškození nervové tkáně<sup>[4]</sup>.

### 10.1 Látky hrající roli v neurotoxicitě

Je známo, že  $\beta$ -amyloid, glutamát a ROS mohou působit neurotoxicky na CNS.

$\beta$ -amyloid destabilizuje neuronální  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázu a tím činí neurony více náchylné k excitotoxickému poškození (Mattson 1992).

Glutamát hraje v CNS dvě odlišné role. Na jednu stranu je to excitační neurotransmitter zapojený v komplexní regulaci plasticity mozku a na druhou stranu je to excitotoxin (Takada-Takatori 2006).

Oxidativní stres je zapojený ve stárnutí a neurodegenerativních chorobách (Floyd 1999). Proces stárnutí je spojen s buněčným poškozením, které způsobují reaktivní kyslíkové radikály (Raut 2009).

## 10.2 Opioidy a jejich neurotoxické účinky

Srovnáním neurotoxických účinků etorpinu, dihydroetorpinu, NB-etorpinu a heroínu, látek s velmi podobnou strukturou, se došlo k zajímavým závěrům. Zatímco etorpin a NB-etorpin vykazovaly silnou neurotoxicitu, dihydroetorpin a heroin byly bez zjevného účinku. Zajímavé však je, že „etorpinové opioidy“ s největší podobností v chemické struktuře vykazovaly signifikantně odlišné neurotoxické účinky. Jediný rozdíl mezi etorpinem a dihydroetorpinem spočívá ve vazbě mezi C<sub>17</sub>-C<sub>18</sub>, etorpin má tuto vazbu dvojnou, zatímco dihydroetorpin jednoduchou. Molekulární mechanismus příkládající význam dvojně vazbě v molekule ligandu v neurotoxicitě není znám. Pravděpodobně to souvisí s možností oxidace dvojně vazby a následnou produkcí volných radikálů. Tato práce také ukazuje, že schopnost „etorpin-like“ opioidů indukovat neurotoxicitu nekorelovala s jejich schopností aktivovat G-proteiny. Například etorpin a dihydroetorpin aktivují G-proteiny podobným způsobem, ale mají různé neurotoxické účinky. Z toho by mohlo plynout, že dvojná vazba nehraje důležitou roli v aktivaci OR, ale může velkou měrou přispět k indukci neurotoxicity (Ren 1998).

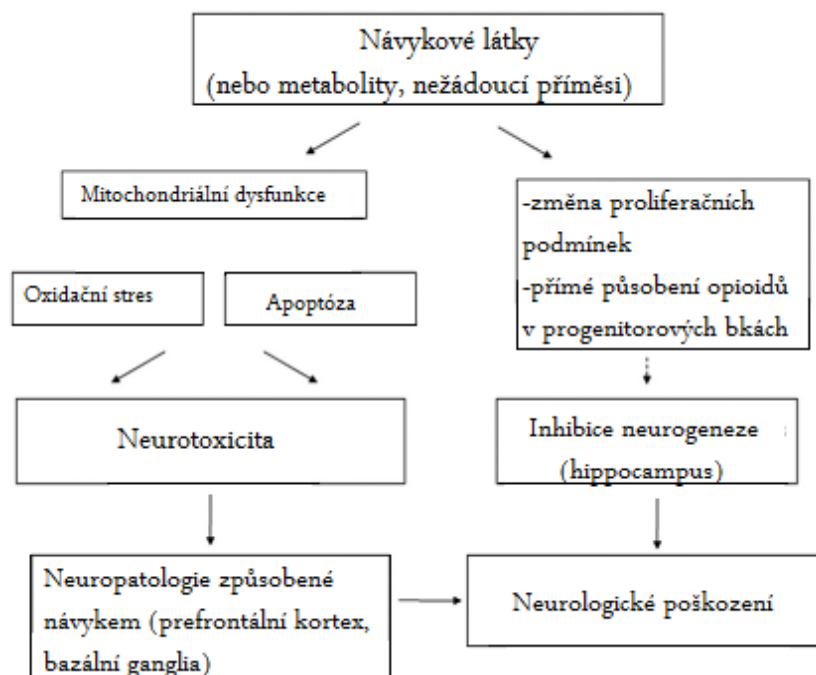
V roce 1999 byla naznačena existence vysokoafinního vazebného místa pro dynorfin A na NMDA receptoru (NMDAR). Pro prokázání vazby dynorfinu A na tento receptorový komplex byla dostačující exprese NR1a a NR2A podjednotek. Z modulačních účinků různých NMDAR-selektivních ligandů na vazbu dynorfinu A bylo odvozeno, že tento peptid se preferenčně váže na NMDAR, když je ve stavu zavřeném a nebo desenzitizovaném. Možná fyziologická nebo patofyziologická důležitost přímé interakce dynorfinu s NMDAR je zatím nejasná. S ohledem na excitotoxicitu dynorfinu *in vivo* je možné, že toto vysoce afinní vazebné místo pro dynorfin A na NMDAR by mohlo být za určitých podmínek excitační nebo, že by za excitotoxicitu mohlo být zodpovědné nějaké neopioidní, non-NMDAR místo pro vazbu dynorfinu (Tang 1999).

Jak opioidy, tak Tat protein mohou porušit buněčné funkce nebo indukovat toxicitu v neuronech a astroglích. Gurwell a kol. zkoumali, zda mohou opioidy (morfin) interagovat s HIV Tat proteinem a měnit tak životaschopnost striatálních neuronů. Jejich výsledky podávají

důkaz o tom, že opioidy a HIV-1 Tat protein působí součinně toxicky na striatální neurony. Není však jasné, zda opioidy a Tat ovlivňují přímo neurony, nebo působí prostřednictvím glií. Je totiž známo, že subpopulace striatálních astrocytů, oligodendroglíí a mikroglíí mohou exprimovat OR a potenciálně tak zprostředkovávat účinky morfinu a Tat proteinu na neurony. Tato studie také poskytuje vysvětlení, proč užívání opioidů vede k vzrůstu demence a motorické dysfunkce u velkého množství jedinců infikovaných HIV. Je důležité poznamenat, že samotný morfin není pro striatální neurony toxický, zatímco expozice Tat proteinu skutečně neurotoxická je. Výsledky, naznačující, že zneužívání opioidů může přispět k progresi demence asociované s HIV přímým neurotoxickým mechanismem, jsou důležitým krokem kupředu ve zkoumání tohoto problému (Gurwell 2001).

Tramadol je syntetický, centrálně působící opioid. Má nízkou afinitu, ale preferenční vazbu na  $\mu$ -OR. Tato látka inhibuje vychytávání noradrenalinu a 5-HT neurony, a také usnadňuje uvolňování 5-HT (Eggers 1995). Její analgetická účinnost je 5-10x menší než morfinu a je používána k léčbě středně těžké až těžké bolesti. Uvažuje se o tom, že zvýšená exprese Fas a syntéza Bax může přispět ke zvýšené apoptóze neuronů následkem trvalého užívání morfinu a tramadolu (Atici 2004).

Mechanismy zapojené v neurotoxicitě návykových látek zahrnují oxidativní stres, apoptózu, mitochondriální dysfunkci a inhibici neurogeneze (obr. 5) (Cunha-Oliveira 2008).

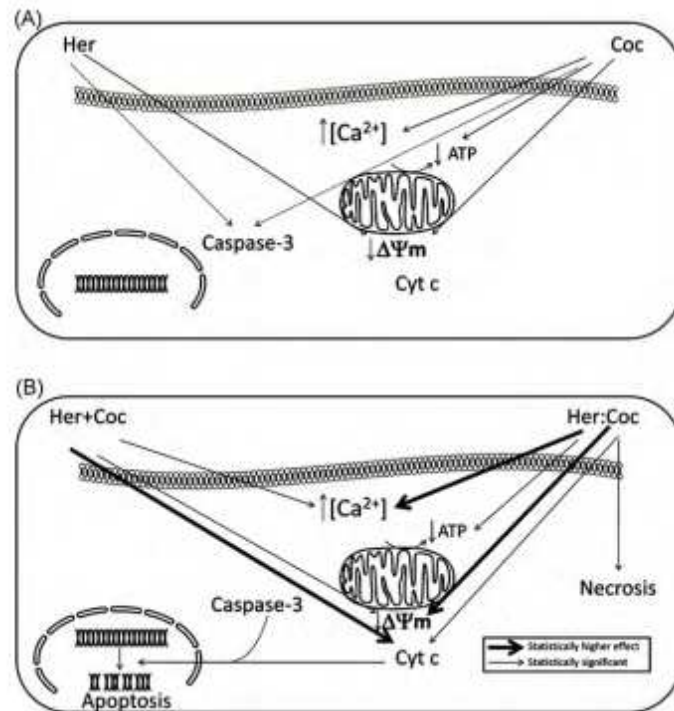


Obr. 5: Molekulární a buněčné mechanismy zapojené v neurotoxicitě (Cunha-Oliveira 2008)



Je důležité rozeznat akutní bolest od chronické nádorové bolesti a zahájit přiměřenou terapii. Je znám případ 64 letého muže, který byl léčen morfinem za účelem úlevy od nádorové bolesti. Po obdržení účinného utišujícího protinádorového ošetření se u něho rozvinula chronická neurotoxicita způsobená opioidy. Broadbent předpokládá, že postupné snižování bolesti zvyšováním dávky opioidu urychlilo rozvoj toxicity, která se projevila jako kognitivní porucha. Zpožděná opioidní toxicita je možným důsledkem nesprávně zvolené léčby a je jí potřeba rozpoznat a vhodným způsobem léčit (Broadbent 2005).

Jedna z nejnovějších studií zabývající se neurotoxicitou popisuje účinky heroinu, kokainu a jejich kombinace na korové neurony, neboť tyto dvě vysoce návykové drogy jsou velmi často užívány dohromady (Cunha-Oliveira 2010). Obliba ve společném užívání těchto drog může pramenit z jejich doplňkových vlastností; zatímco kokain má psychostimulační účinky, heroin působí jako sedativum. Chemické interakce mezi kokainem a heroinem nebo jejich metabolity mohou hrát roli v účincích při kombinování těchto dvou drog. Bylo prokázáno, že použití kombinace kokainu a heroinu působí více neurotoxicky, než když je užitá každá droga zvlášť. Také byly prokázány rozdíly v neurotoxických mechanismech vyvolaných postupným (heroin+kokain) nebo současným (heroin:kokain) vystavením těmto dvěma látkám (Cunha-Oliveira 2010). Obr. 6 (A) ukazuje účinky heroinu a kokainu na buňku při použití těchto látek samostatně (Cunha-Oliveira 2010). Heroin+kokain vyvolaly významnější pokles v životaschopnosti buněk a zároveň vzestup výlevu cytochromu c a kaspázové aktivity, což vedlo k apoptóze. Heroin:kokain způsobil nekrotickou smrt buněk zřejmě následkem vzrůstu intracelulární koncentrace kalcia, snížení potenciálu mitochondriální membrány a snížení množství ATP (Orrenius 2003). Tyto mechanismy jsou patrné z obr. 6 (B).



Obr. 6: Účinky heroinu, kokainu a jejich kombinace v poměru 1:1 na intracelulární mechanismy neurotoxicity (Cunha-Oliveira 2010)

Další rozdíl mezi postupným nebo současným užíváním heroinu a kokainu je v tom, že při postupné expozici heroin nebo jeho metabolity vstoupí do buňky dříve než kokain a mohou ovlivňovat mechanismus, jakým buňky potom odpovídají na kokain. Cunha-Oliveira a kol. ukázali, že kokain a heroin ve stejném množství vykazují různé účinky v závislosti na způsobu ko-expozice a dále, že jedinci zneužívající více drog najednou mají vyšší sklon k neurotoxickému poškození než jedinci užívající jednu drogu (Cunha-Oliveira 2010).

Funkční imunitní systém je důležitý v boji proti neurotoxicitě při neurodegenerativních chorobách. Od pozdního 19. století byl používán morfin k imunosupresi (Berrios 2008). Zatímco exogenní opioidy zprostředkovávají imunosupresi, endogenní opioidy působí opak. Je známo, že podání opioidů má inhibiční účinek na humorální a buněčné imunitní odpovědi, jako je produkce protilátek, aktivita NK buněk, exprese cytokinů a aktivita fagocytů. Opioidy, například enkefalin (Ruzicka 1996) se chovají jako cytokiny, regulují imunitní odpověď interakcí s receptory v CNS a PNS. Mechanismus, kterým opioidy CNS regulují periferní imunitní funkce, může zahrnovat jak osu hypotalamo-hypofyzárně-adrenární, tak autonomní nervový systém (Vallejo 2004). Imunosuprese zprostředkovaná opioidy může vysvětlit zvýšený výskyt infekcí u jedinců závislých na heroinu. Opioidy se také mohou podílet na

vyvolání syndromu získané imunodeficiencie při virové infekci HIV snížením sekrece  $\alpha$  a  $\beta$  chemokinů (což jsou důležité inhibiční cytokiny pro expresi HIV) a zároveň zvýšením exprese virových koreceptorů, chemoreceptorů CCR5 a CCR3 (Mahajan 2005). Skutečnost, že periferní imunoprese je zprostředkována částečně OR lokalizovanými v CNS, a že intratekálně podávané opioidy nevyvolávají stejné imunopresivní účinky, může mít důležitý klinický význam pro pacienty podstupující dlouhodobou terapii opioidy kvůli bolesti (Vallejo 2004).

Aktivace NMDA receptoru (NMDAR) je zapojena v buněčném mechanismu tolerance k opioidům. Tato aktivace však může vést za mnoha okolností k neurotoxicitě. Mao a kol. prokázali indukci apoptózy v míšních neuronech u potkanů tolerantních k morfinu. Mnoho apoptotických buněk exprimovalo dekarboxylázu kyseliny glutamové, což je klíčový enzym pro syntézu inhibičního neurotransmiteru GABA. Současně u těchto potkanů byla pozorována i zvýšená nocicepční citlivost k teplotnímu stimulu. Na intrabuněčné úrovni má prodloužené vystavení morfinu za následek upregulaci proapoptotické kaspázy-3 a Bax proteinů, ale downregulaci antiapoptotického Bcl-2 proteinu v dorsálním rohu páteřní míchy. Zablokování míšní „caspase-like“ aktivity částečně brání vzniku tolerance k morfinu a s tím spojenému zvýšení v nocicepční citlivosti. Tyto výsledky naznačují neurotoxicitu indukovanou opioidy, regulovanou NMDAR-kaspázovou cestou, což je mechanismus, který by mohl mít klinické uplatnění v opioidní terapii a při jejich zneužívání (Mao 2002).

Glutamátový transporter hraje velmi důležitou roli v regulaci fyziologické homeostázy glutamátu (Li 2002), v neurotoxicitě a glutamátergí regulaci opioidní tolerance (Mao 2002). Chronické vystavení morfinu vyvolává posttranskripční downregulaci glutamátového transporteru EAAC1 v C6 buňkách gliomu a současně pokles v glutamátovém vychytávání a vzrůst v proteasomové aktivitě. Na buněčné úrovni chronicky podávaný morfin způsobuje PTEN-zprostředkovanou upregulaci ubiquitin E3 ligázy Nedd4 přes signalizaci cAMP/proteinkinázy A, což vede k EAAC1 ubiquitinaci a proteasomové degradaci. Buď Nedd4 nebo PTEN knockdown pomocí siRNA zabraňuje morfinem indukované EAAC1 degradaci a poklesu vychytávání glutamátu (Yang 2008).

Mao a kol provedli v roce 2002 pokus, ve kterém docházelo k apoptóze *in vivo* v oblastech páteřní míchy spjatých s analgesií při podávání analgetických, klinicky relevantních dávek morfinu. A protože velká část apoptotických buněk dorsálního rohu páteřní míchy patří pravděpodobně mezi GABAergní neurony, tento morfinem indukovaný excitotoxický proces mohl vést ke změnám (abnormální bolest - hyperalgesie) v míšních neuronálních obvodech zapojených v bolesti a v tlumení bolesti. Data také ukazovala funkční souvislost mezi

morfinem indukovanou apoptózou, tolerancí k morfinu a s tolerancí související abnormální nocicepční citlivostí, protože inhibice morfinem indukované apoptózy inhibitorem kaspázy 3 částečně zabránila toleranci k morfinu a vzrůstu v nocicepční citlivosti (Mao 2002).

### 10.2.1 Toxické účinky metabolitů opioidů

Léky na bázi opioidů jsou základem pro léčbu bolesti. Jejich dávka však musí být taková, aby vyhovovala všem jedincům takto léčeným, protože symptomy se u různých jedinců liší. Situace, za kterých opioidy způsobují komplikace i přes jejich správné užití, nastávají jen zřídka. Opioidy indukovaná neurotoxicita (OIN) nastává proto, že některé opioidy vytváří aktivní metabolity, které vznikají při jejich zpracování v játrech. Metabolity jsou vylučovány ledvinami při dehydrataci a nebo snížené funkci ledvin. Nejčastěji k tomu dochází při prudkém zvyšování dávky léku proti bolesti. Léčba probíhá buď intravenózně, nebo snížením dávky opioidu, či jeho výměnou za jiný (Bower 2008).

OIN je multifaktoriální syndrom, jehož příčinou je velké množství příznaků, od lehčích vyčerpaností a ospalostí k halucinacím, stavům mentální narušenosti a záchvatům. S největší pravděpodobností nastává OIN, pokud jsou užívány opioidy s aktivními metabolity, jakými jsou meperidin, kodein, morfin a v menší míře i hydromorfon. Oxykodon má také aktivní metabolity, ale je sporné, zda jsou klinicky významné. Ani fentanyl, ani metadon netvoří aktivní metabolity (Gallagher 2007).

Mezi hlavní metabolity morfinu patří M3G (morphine-3-glucuronid) a M6G (morphine-6-glucuronid). 60 % morfinu se přemění na M3G, který se neváže na OR a nemá analgetické účinky. 6 – 10 % je přeměněno na M6G, který se váže na  $\mu$ -OR a zdá se být silnějším analgetikem, než je sám morfin. V malém množství se morfin metabolizuje na normorfin, kodein a hydromorfon<sup>[5]</sup>.

## 11. Závěr

O analgetických účincích opioidů není pochyb. Nejpoužívanější látkou pro léčbu bolesti je morfin. Jeho analgetické vlastnosti ještě nebyly překonány. Vědci vynakládají úsilí do hledání látky, která by měla stejný léčebný potenciál, ale nebyla tolik návyková jako morfin. Neboť při dlouhodobém užívání morfinu, hlavně při léčbě bolesti spojené s rakovinou, dochází ke vzniku tolerance nebo závislosti. Tyto nepříznivé účinky se objevují i při zneužívání opioidů, ke kterému dochází stále častěji. Zneužívání opioidů však nepřináší jen euforii, ale v mnoha případech může být spojeno s ohrožením života, neboť tyto látky přináší dobré efekty jen při správném užívání, což je většinou spojeno s nízkými dávkami látky. Mezi jedinci závislími na opioidech však dochází v důsledku závislosti a tolerance ke zvyšování dávky a tedy i k velkému riziku.

Velký problém také nastává tehdy, pokud je zneužíváno více drog najednou, což mezi závislími není nic neobvyklého. Například ko-expozicí kokainu a heroinu dochází ke zvýšení pravděpodobnosti vzniku neurotoxického poškození. Opioidy se stejně jako řada dalších chemických látek odbourávají v játrech. Vznikají tak škodlivé metabolity, které mohou také působit neurotoxicky.

V souvislosti s léčebnými a toxickými účinky opioidů bude ještě třeba provést mnoho studií ohledně mechanismů, jakými opioidy tyto účinky zprostředkovávají. Některé látky totiž i přes svou podobnost v chemické struktuře mohou navázáním na tentýž receptor způsobit antagonistické reakce. Příkladem může být porovnání etorpinových opioidů, kdy látky s nejpodobnější strukturou vykazují odlišné neurotoxické účinky.

Chemická struktura hodně vypovídá i o analgetických vlastnostech látky, jak je zřejmé ze srovnávacích pokusů morfinových opioidů. Při tlumení bolesti opioidy má velký význam rozložení opioidních receptorů v různých částech NS. Každá část NS proto odpovídá na opioidy poněkud odlišným způsobem. Bylo by užitečné v budoucnosti vyvinout takové léky, které by působily přímo pouze v určitých oblastech nervové tkáně.

## 12. Literatura

- ATICI, S., CINEL, L., CINEL, I., DORUK, N., AKTEKIN, M., AKCA, A., CAMDEVIREN, H. & ORAL, U. 2004. Opioid neurotoxicity: Comparison of morphine and tramadol in an experimental rat model. *International Journal of Neuroscience*, 114, 1001-+.
- BAILEY, C. P. & CONNOR, M. 2005. Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Current Opinion in Pharmacology*, 5, 60-68.
- BARRITT, G. J. 1999. Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling requirements. *Biochemical Journal*, 337, 153-169.
- BERRIOS, I., CASTRO, C. & KUFFLER, D. P. 2008. Morphine: axon regeneration, neuroprotection, neurotoxicity, tolerance, and neuropathic pain. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 27, 119-128.
- BOHN, L. M., GAINETDINOV, R. R. & CARON, M. G. 2004. G protein-coupled receptor kinase/beta-arrestin systems and drugs of abuse - Psychostimulant and opiate studies in knockout mice. *Neuromolecular Medicine*, 5, 41-50.
- BOWER, D. K. 2008. Opioid-induced neurotoxicity: Too much of a good thing. *Journal of Palliative Medicine*, 11, 947-948.
- BROADBENT, A. & GLARE, P. 2005. Neurotoxicity from chronic opioid therapy after successful palliative treatment for painful bone metastases. *Journal of Pain and Symptom Management*, 29, 520-524.
- BROWNSTEIN, M. J. 1993. A brief-history of opiates, opioid-peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 5391-5393.
- CHEN, Y., MESTEK, A., LIU, J. & 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.
- CHRISTIE, M. J. 2008. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *British Journal of Pharmacology*, 154, 384-396.
- CUNHA-OLIVEIRA, T., REGO, A. C., GARRIDO, J., BORGES, F., MACEDO, T. & OLIVEIRA, C. R. 2010. Neurotoxicity of heroin-cocaine combinations in rat cortical neurons. *Toxicology*, 276, 11-17.
- CUNHA-OLIVEIRA, T., REGO, A. C. & OLIVEIRA, C. R. 2008. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Research Reviews*, 58, 192-208.
- EGGERS, K. A. & POWER, I. 1995. TRAMADOL. *British Journal of Anaesthesia*, 74, 247-249.
- EL MOUEDDEN, M. & MEERT, T. F. 2007. The impact of the opioids fentanyl and morphine on nociception and bone destruction in a murine model of bone cancer pain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 87, 30-40.
- FLOYD, R. A. 1999. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222, 236-245.
- GALLAGHER, R. 2007. Opioid-induced neurotoxicity. *Canadian Family Physician*, 53, 426-427.
- GURWELL, J. A., NATH, A., SUN, Q., ZHANG, J., MARTIN, K. M., CHEN, Y. & HAUSER, K. F. 2001. Synergistic neurotoxicity of opioids and human immunodeficiency virus-1 Tat protein in striatal neurons in vitro. *Neuroscience*, 102, 555-563.
- HAO, J. X. & XU, X. J. 1996. Treatment of a chronic allodynia-like response in spinally injured rats: Effects of systemically administered nitric oxide synthase inhibitors. *Pain*, 66, 313-319.

- INTURRISI, C. E. 2002. Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clinical Journal of Pain*, 18, S3-S13.
- LI, Q. & PURO, D. G. 2002. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 3109-3116.
- LIU, W. X., WANG, R. 2011. Endomorphins: Potential roles and therapeutic indications in the development of opioid peptide analgesic drugs. *Wiley Periodicals*.
- MAHAJAN, S. D., AALINKEEL, R., REYNOLDS, J. L., NAIR, B. B., FERNANDEZ, S. F., SCHWARTZ, S. A. & NAIR, M. P. N. 2005. Morphine exacerbates HIV-1 viral protein gp120 induced modulation of chemokine gene expression in U373 astrocytoma cells. *Current Hiv Research*, 3, 277-288.
- MAO, J. R., SUNG, B. K., JI, R. R. & LIM, G. 2002. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *Journal of Neuroscience*, 22, 7650-7661.
- MATTSON, M. P., CHENG, B., DAVIS, D., BRYANT, K., LIEBERBURG, I. & RYDEL, R. E. 1992. Beta-amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical-neurons vulnerable to excitotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 12, 376-389.
- MINAMI, M. & SATOH, M. 1995. Molecular-biology of the opioid receptors - structures, functions and distributions. *Neuroscience Research*, 23, 121-145.
- MING, Z., MCERLANE, K. M. & ONG, M. C. 2004. Identification and synthesis of norhydromorphone, and determination of antinociceptive activities in the rat formalin test. *Life Sciences*, 75, 3129-3146.
- NESTLER, E. J. 2001. Molecular neurobiology of addiction. *American Journal on Addictions*, 10, 201-217.
- ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. & NICOTERA, P. 2003. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 552-565.
- PRADO, W. A. 2001. Involvement of calcium in pain and antinociception. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 449-461.
- PRZEWLOCKI, R. & PRZEWLOCKA, B. 2001. Opioids in chronic pain. *European Journal of Pharmacology*, 429, 79-91.
- RAEHAL, K. M. & BOHN, L. M. 2005. Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *Aaps Journal*, 7, E587-E591.
- RAMOUTSAKI, I. A., ASKITOPOULOU, H. & KONSOLAKI, E. 2002. Pain relief and sedation in Roman Byzantine texts: Mandragoras officinarum, Hyoscyamos niger and Atropa belladonna. In: DIZ, J. C., FRANCO, A., BACON, D. R., RUPREHT, J. & ALVAREZ, J. (eds.) *History of Anesthesia*.
- RAUT, A. & RATKA, A. 2009. Oxidative damage and sensitivity to nociceptive stimulus and opioids in aging rats. *Neurobiology of Aging*, 30, 910-919.
- REN, X. H., ZHAO, J., PU, L., LING, K., YIN, D. L. & PEI, G. 1998. Differential neurotoxicity of etorphine-like opiates: Lack of correlation with their ability to activate opiate receptors. *Toxicon*, 36, 735-743.
- RUZICKA, B. B., THOMPSON, R. C., WATSON, S. J. & AKIL, H. 1996. Interleukin-1 beta-mediated regulation of mu-opioid receptor mRNA in primary astrocyte-enriched cultures. *Journal of Neurochemistry*, 66, 425-428.
- SANCHEZ, E. M., BAGUES, A. & MARTIN, M. I. 2010. Contributions of peripheral and central opioid receptors to antinociception in rat muscle pain models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 96, 488-495.
- SEWARD, E., HAMMOND, C. & HENDERSON, G. 1991. Mu-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-type calcium-channel current. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 244, 129-135.
- SMITH, H. S. 2008. Peripherally-acting opioids. *Pain Physician* 2008, 11, S121-S132.

- SURPRENANT, A., SHEN, K. Z., NORTH, R. A. & TATSUMI, H. 1990. Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurons. *Journal of Physiology-London*, 431, 585-608.
- SWEET, W. H. 1980. Neuropeptides and mono-aminergic neurotransmitters - their relation to pain. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 73, 482-491.
- SZARA, S. 1982. Opiate receptors and endogenous opiates - panorama of opiate research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology*, 6, 3-15.
- TAKADA-TAKATORI, Y., KUME, T., SUGIMOTO, M., KATSUKI, H., SUGIMOTO, H. & AKAIKE, A. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology*, 51, 474-486.
- TAL, M. 1996. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neuroreport*, 7, 1382-1384.
- TANG, Q. B., GANDHOKE, R., BURRITT, A., HRUBY, V. J., PORRECA, F. & LAI, J. 1999. High-affinity interaction of (des-tyrosyl) dynorphin A(2-17) with NMDA receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291, 760-765.
- TERMAN, G. W., JIN, W. Z., CHEONG, Y. P., LOWE, J., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. & CHAVKIN, C. 2004. G-protein receptor kinase 3 (GRK3) influences opioid analgesic tolerance but not opioid withdrawal. *British Journal of Pharmacology*, 141, 55-64.
- TRESCOT, A. M., DATTA, S., LEE, M., HANSEN, H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 2008, 11, S133-S153.
- UEDA, H., INOUE, M. & MIZUNO, K. 2003. New approaches to study the development of morphine tolerance and dependence. *Life Sciences*, 74, 313-320.
- VALLEJO, R., DE LEON-CASASOLA, O., BENYAMIN, R. 2004. Opioid therapy and immunosuppression: A review. *American Journal of Therapeutics*, 11, 354-365.
- VALVERDE, O., CORIC, P., ROQUES, B. P. & MALDONADO, R. 1994. Antinociception induced by exogenous and endogenous opioids - role of different brain structures. *Regulatory Peptides*, 54, 309-310.
- YANG, L. L., WANG, S. X., SUNG, B., LIM, G. & MAO, J. R. 2008. Morphine induces ubiquitin-proteasome activity and glutamate transporter degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 21703-21713.
- ZAMPONI, G. W. & SNUTCH, T. P. 1998. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 351-356.
- ZHANG, Y., CHEN, Q. Y. & YU, L. C. 2008. Morphine: A Protective or Destructive Role in Neurons? *Neuroscientist*, 14, 561-570.

13. Internetové zdroje

- [1] <http://www.science-dictionary.com/definition/antinociception.html>
- [2] <http://www.drogy.cz/utisujici-leky/kap-co-jsou-leky-proti-bolesti.html>  
<http://www.drogy.cz/utisujici-leky/kap-slangove-nazvy-leku-proti-bolesti.html>
- [3] <http://www.solen.cz/pdfs/lek/2009/04/05.pdf>
- [4] <http://en.wikipedia.org/wiki/Neurotoxicity>
- [5] <http://en.wikipedia.org/wiki/Morphine>