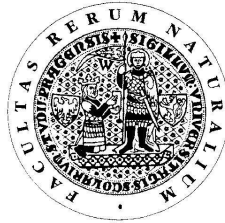


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Marek Ladislav

Opioidní receptory a jejich signální systém v myokardu

Opioid receptors and their signaling system
in the myocardium

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jiří Novotný DSc.

Praha 2011

Prohlášení

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 27. května 2011.

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho pomoc, ochotu a trpělivé vedení při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu a cenné rady.

Abstrakt

Hlavním cílem této bakalářské práce je shromáždit a systematicky seřadit poznatky o opioidních receptorech a jejich signálním systému v myokardu. Činnost srdce je však řízena především adrenergní signalizací a tato práce proto obsahuje také údaje týkající se vlastností a významu dalších důležitých receptorů. Pro lepší obecné porozumění a v rámci shrnutí lze v této práci také nalézt všeobecné základní informace o opioidním systému, především o receptorech a jejich signalizaci. O opioidních receptorech v myokardu se toho stále příliš mnoho neví, a to přesto, že především za různých patofyziologických okolností by opioidní systém mohl mít velmi důležitou úlohu. Důvodů může být několik. Možnost bližší charakterizace opioidních receptorů v myokardu je poměrně obtížná vzhledem k relativně malému množství těchto receptorů v srdeční tkáni. Situaci také poněkud komplikují určité mezidruhové rozdíly, které v modulaci funkce srdce panují. Dosud není zcela objasněn úplný mechanismus, kterým opioidní receptory působí na myokard. Především u lidí by toto poznání mohlo být klíčové, protože tyto receptory, resp. jejich ligandy, by se daly využít k lékařským účelům.

Klíčová slova: GPCR, opioidy, receptor, srdce, regulace, signalizace

Abstract

The main objective of this bachelor thesis is to systematically collect and sort information about opioid receptors and their signaling system in the myocardium. Heart activity is controlled mainly by adrenergic signaling, and this work therefore contains also some data concerning the characteristic and significance of other relevant receptors. For better understanding, general basic information about opioid system, especially about the receptors and their signaling, is also provided. Relatively little is known about opioid receptors in the myocardium even though these receptors may have an important role especially in various pathophysiological conditions. There can be several reasons for this. The possibility of further characterization of opioid receptors in the myocardium is rather difficult due to the relatively small number of these receptors in heart tissue. The situation is somewhat complicated also by some differences in the modulation of cardiac function among different species. The complete molecular mechanism by which opioid receptors act on the myocardium has not yet been fully uncovered. Especially in the case of humans this knowledge can be crucial, because these receptors and their ligands could be used for medical purposes.

Key words: GPCRs, opioids, receptors, heart, regulation, signaling

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod	9
2 Regulace srdeční činnosti	10
2.1 Adrenergní systém	10
2.1.1 β -adrenergní receptory	10
2.1.2 α -adrenergní receptory	12
2.2 Muskarinové acetylcholinové receptory	13
2.3 Desenzitizace receptorů	14
2.3.1 Homologní desenzitizace	14
2.3.2 Heterologní desenzitizace	15
2.3.3 Alternativní regulace	15
3 Opioidní receptory	16
3.1 Rozdělení	16
3.2 Zařazení	17
3.3 Struktura	17
3.4 Signalizace	21
3.5 Desenzitizace OR	26
3.6 Internalizace	28
3.7 Down-regulace	29
4 Opioidní systém v myokardu	30
4.1 MOR v myokardu	30
4.2 KOR v myokardu	31
4.3 DOR v myokardu	32
4.4 NOP-R v myokardu	32
4.5 Opioidy působící non-receptorovým způsobem	33
4.6 Oligomerizace opioidních receptorů	33
4.7 Opioidní receptory v selhávajícím myokardu	35
5 Závěr	38
Seznam použité literatury	39

Seznam použitých zkratek

AC	adenylátcykláza
AK	aminokyselina
AR	adrenergní receptor
ATP	adenosintrifosfát
ATPaza	adenosintrifosfatáza
CAMKII	kináza II závislá na Ca^{2+} /kalmodulinu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DAG	diacylglycerol
DALA	(D-Ala ²)-Met-enkefalinamid
DAMGO	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-enkefalin
DOR	δ (delta) opioidní receptor
EKG	elektrokardiogram
ERK	extracelulárně regulovaná kináza
FGGF	fenylalanin-glycin-glycin-fenylalanin
GC	guanylátcykláza
GIRK	G-proteinem řízené dovnitř usměřující K^+ kanály
GPCR	receptory spřažené s G-proteinem
GRK	kinázy receptorů spřažených s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
GTPáza	guanosintrifosfatáza
HEK293	lidská embryonální buňka ledvin 293
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
IUPHAR	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
K_{ACH}	K^+ kanál citlivý k acetylcholinu
KOR	kappa (κ) opioidní receptor
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkináza
MOR	mí (μ) opioidní receptor
MR	muskarinový acetylcholinový receptor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina

NOP-R	receptor nociceptinu
nor-BNI	norbinaltorfimin
OR	opioidní receptor
pH _i	intracelulární pH
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PLD2	fosfolipáza D2
PTX	toxin černého kašle
TM	transmembránové domény
YGGFM/L	tyrozin-glycin-glycin-fenylalanin-methionin/leucin
βARK	kináza β-adrenergických receptorů

1 Úvod

Opioidní receptory jsou jedny z mnoha receptorů vyskytujících se v organismu. Charakterizuje je jejich schopnost vázat endogenní i exogenní opioidní peptidy. Patří do velké rodiny receptorů spřažených s G-proteiny tzv. GPCR, které mají své strukturní a signalizační charakteristiky odlišujících je od ostatních receptorů.

Opioidní receptory jsou zkoumány déle než třicet let. Zkoumala se především problematika využívání (tolerance a závislost) asi nejznámějším opioidního ligandu – morfinu. Ten je pro své analgetické účinky v medicíně používán již po staletí. Pozdější studie ukázaly mnohem komplexnější úlohu opioidních receptorů v organismu. Prokázalo se, že tyto receptory jsou zapojeny do mnoha buněčných funkcí. Příkladem může být buněčný růst, reprodukce, termoregulace, imunitní odpověď, ale také otázka odměny a motivace. Ne vždy jsou známy mechanismy, jakými opioidní receptory tyto buněčné funkce ovlivňují. Z toho důvodu jsou tyto receptory stále předmětem zkoumání.

Role opioidních receptorů v regulaci srdečních funkcí nebyla dlouho známa. Klíčovým byl rok 1996, kdy se ukázalo, že morfin dokáže mít kardioprotektivní roli [1]. Cílem této práce je shromáždit poznatky o opioidních receptorech a jejich schopnosti regulovat srdeční činnost. K tomu je zapotřebí znát roli i některých dalších důležitých receptorů nalézajících se v myokardu. K pochopení je také zapotřebí poznat obecné vlastnosti opioidních receptorů jako je jejich rozdělení, struktura, signalizace a regulace receptorů.

2 Regulace srdeční činnosti

Srdeční činnost je kontrolována autonomním nervovým systémem, který zahrnuje především sympatikus a parasympatikus. Tyto systémy pracují přes transmembránové receptory. Nejrozšířenější skupinou receptorů jsou ty, které se spřahují s proteiny vázajícími guaninové nukleotidy, tzv. G-proteiny. Těmto receptorům se říká receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) nebo také 7TM podle sedmi domén, které protínají plazmatickou membránu. G-protein se skládá ze tří podjednotek – α , β a γ . Pro regulační činnost srdce jsou nejdůležitějšími adrenergní receptory a receptory acetylcholinové muskarinového typu. Dále sem patří např. receptory histaminové, serotoninové, adenosinové, opioidní, receptory angiotensinu II a další.

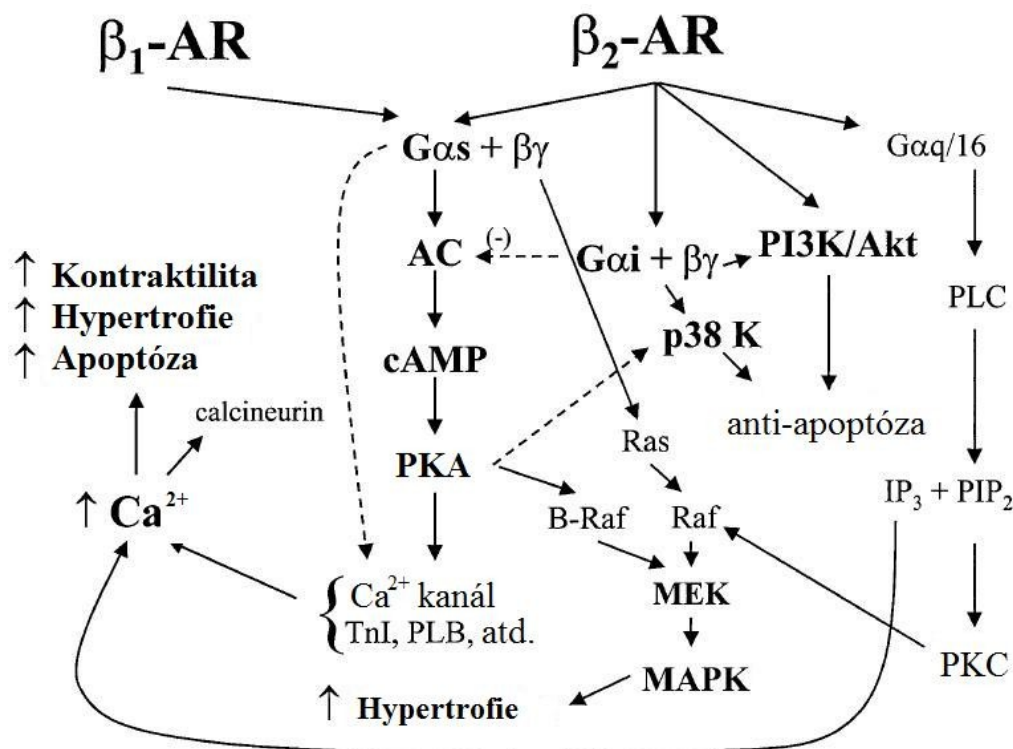
2.1 Adrenergní systém

Adrenergní receptory se dělí na α - a β -adrenergní receptory (dále jen α -AR, resp. β -AR), což bylo poprvé navrženo Ahlquistem [2]. Tyto receptory patří do skupiny GPCR se sedmi transmembránovými doménami. Dnes jsou známy tři typy α_1 -AR, tři α_2 -AR a tři β -AR, které se liší především funkcí a mechanismem regulace [3]. K tomuto rozdělení dopomohlo klonování receptorů a použití specifických agonistů resp. antagonistů.

2.1.1 β -adrenergní receptory

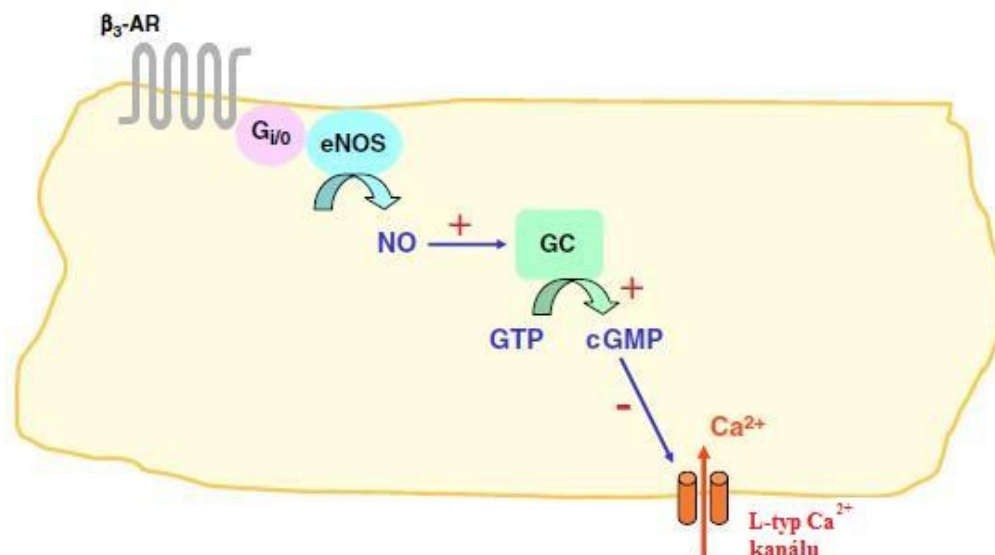
β -AR se dělí na tři podtypy: β_1 -AR, β_2 -AR a β_3 -AR [4]. Všechny tři podtypy jsou v organismu aktivovány katecholaminy – adrenalinem, noradrenalinem. V srdci jsou nejvíce zastoupeny β_1 -AR a to v poměru s β_2 -AR asi 7:3 (β_1 : β_2). Oba receptory se vážou ke stimulačnímu G-proteinu (G_s), který po aktivaci zvyšuje intracelulární koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) aktivací adenylátcyklázy (AC). Zvýšená koncentrace cAMP má za následek aktivaci proteinkinázy A (PKA). Stimulace β -AR vede k pozitivnímu inotropnímu a chronotropnímu účinku. Aktivovaná PKA fosforyluje různé proteinové struktury důležité pro funkci kardiomyocytů jako je např. L-typ Ca^{2+} kanálu [5]. Oproti β_1 -AR, se β_2 -AR mohou vázat také na inhibiční G-protein G_i [6]. Spřažení β_2 -AR s G_i vede k inhibici adenylátcyklázy, což má za následek pokles

koncentrace cAMP. Další odlišností mezi těmito dvěma typy receptorů je jejich vliv na programovanou buněčnou smrt, tzv. apoptózu [7]. Zatímco aktivace β_1 -AR může vést ke zvýšené apoptóze, účinek β_2 -AR se zdá být anti-apoptický. Schéma signalizace β_1 -AR a β_2 -AR je na obr. 1.



Obr. 1: Schéma signalizace β_1 -AR a β_2 -AR. $G_{\alpha s}$: stimulační α -podjednotka G-proteinu; $\beta\gamma$: $\beta\gamma$ -podjednotky G-proteinu; AC: adenylátcykláza; cAMP: cyklický adenosin trifosfát; PKA: proteinkináza A; TnI: troponin I; PLB: fosfolipáza B; Raf: proto-onkogen serin/treoninových proteinkináz; MEK: mitogeny aktivovaná proteinkináza kináz; MAPK: mitogeny aktivovaná proteinkináza; $G_{\alpha i}$ inhibiční α -podjednotka G-proteinu; p38 K: p38 mitogeny aktivovaná proteinkináza; PI3K/Akt: kináza fosfatidylinositolu 3/serin/treoninová proteinkináza; $G_{\alpha q/16}$: typ α -podjednotky G-proteinu; PLC: fosfolipáza C; IP3: inositol trifosfát; PIP2: fosfoinositol bisfosfát; PKC: proteinkináza C. Upraveno podle [8].

Výskyt a funkce β_3 -AR v srdci nebyla zatím jednoznačně objasněna. Některé vědecké skupiny našly příznaky existence těchto receptorů na transkripční nebo také na funkční úrovni [4]. Další skupina na vzorku transplantovaného srdce zjistila, že β_3 -AR interagují s G_i [9]. Později bylo zjištěno, že signalizace β_3 -AR je přes G_i napojena na syntézu oxidu dusnatého (Obr. 2) [10].



Obr. 2: Signalizace β_3 -AR v kardiomyocytech. β_3 -AR: β_3 -adrenergní receptor; $G_{i/o}$: $G_{\alpha_{i/o}}$ protein; eNOS: endoteliální syntáza NO; NO: oxid dusnatý; GC: guanylát cykláza; GTP: guanosintrifosfát; cGMP: cyklický guanosinmonofosfát; +: stimulation; -: inhibition. Upraveno podle [11].

Jak už bylo řečeno, β -AR jsou proteiny, které se skládají ze sedmi transmembránových domén. Doména 3, 4, 5 a 6 je důležitá pro navázání ligandu [12]. Dále mají tři intracelulární a tři extracelulární smyčky [13]. První a druhá extracelulární smyčka je spojena cysteinovým disulfidickým můstkem, který je důležitý pro navázání ligandu a aktivitu receptoru. Třetí intracelulární smyčka obsahuje fosforylační místa pro PKA [14]. N-konec receptoru je extracelulární a je glykosylován. C-konec je tedy intracelulární a obsahuje místa pro proteinkinázy a kinázy receptorů spřažených s G-proteiny (GRK). β_3 -AR se oproti ostatním β -AR v tomto směru odlišují. Chybí jim totiž fosforylační místa pro PKA a počet serin/treoninových zbytků na C-konci je nižší [11].

2.1.2 α -adrenergní receptory

U α -AR se rozlišují dvě skupiny – α_1 -AR a α_2 -AR, které se mohou dále dělit [4]. Skupina α_1 -AR má tři podtypy - α_{1a} -AR, α_{1b} -AR a α_{1d} -AR, které se liší primární strukturou a signalizací. Všechny tři podtypy jsou aktivovány katecholaminy – noradrenalinem a adrenalinem. Další společnou vlastností je to, že se váží na G_q , který aktivuje fosfolipázu C β_1 [15]. Fosfolipáza štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2)

na dvě části - 1,2-diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) [16]. Nárůstem DAG se aktivuje proteinkináza C (PKC). IP3 podporuje uvolňování iontů Ca^{2+} z intracelulárních zásobáren (sarkoplazmatického retikula) a tato signalizace zřejmě může mít úlohu při vzniku hypertrofie kardiocytů [17]. Bylo zjištěno, že α_{1b} -AR také mohou interagovat s G_i [18]. Následně může dojít k aktivaci rozličných signálních kaskád. Stimulací α -AR může být kontrolováno několik srdečních procesů včetně pozitivní inotropie, genové transkripce, syntézy proteinů a inhibice apoptózy.

Kardiomyocyty u hlodavčího srdce exprimují pouze α_{1a} -AR a α_{1b} -AR, přičemž α_{1b} -AR má vyšší zastoupení než α_{1a} -AR [19]. α_{1d} -AR se nalézají ve věnčitých tepnách [20]. Zajímavostí je, že existují poměrně velmi rozporné výsledky týkající se buněčné distribuce α_1 -AR v kardiomyocytech. Někteří autoři zjistili přítomnost těchto receptorů v plazmatické membráně [17] a jejich specializovaných útvarech kaveolách [21], jiní však tuto lokalizaci nepotvrdili, a naopak pozorovali výskyt α_{1a} -AR a α_{1b} -AR na jaderné membráně [22].

Rozdělení α_1 -AR v lidském srdci je podobné jako u hlodavců (přehledně na [23]). V myokardu jsou nejvíce zastoupeny podtypy α_{1a} -AR a α_{1b} -AR. α_{1d} -AR je převládajícím a funkčním podtypem věnčitých tepen. Ukazuje se, že α_1 -AR u lidí mají ochranou a přizpůsobivou roli. Dokážou při srdeční nedostatečnosti nahradit hlavní funkci β -AR, které u neselhávajícího srdce ovlivňují inotropii [24]. Jsou také stabilizačním prvkem proti ischemickému poškození [25].

Jsou známy tři podtypy α_2 -AR – α_{2a} -AR α_{2b} -AR a α_{2c} -AR [4]. Jejich přítomnost na lidském srdci není příliš dobře charakterizována, protože důkazy byly poskytnuty pouze metodami molekulární biologie, ale ne na úrovni proteinů. Nicméně některé vědecké skupiny zjistily jejich regulační funkci na presynaptické membráně. Inhibují totiž mechanismy uvolňující noradrenalin do synaptické štěrbině [26]. Stále však není jisté, zda za tento presynaptický efekt může podtyp α_{2a} nebo α_{2c} .

2.2 Muskarinové acetylcholinové receptory

Je známo pět podtypů muskarinových acetylcholinových receptorů (dále jen MR). Jsou to M_1R , M_2R , M_3R , M_4R a M_5R [4]. Všechny typy patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny a v organismu jsou aktivovány acetylcholinem. Strukturou jsou

si podobné s ostatními GPCR. Podle signalizace (i struktury třetí intracelulární smyčky) je lze rozdělit na dvě skupiny. M_1R , M_3R , a M_5R preferují spřažení s $G_{i/11}$, který ovlivňuje aktivitu PLC (viz kapitola G-protein). M_2R a M_4R se vážou na $G_{i/o}$, který inhibuje AC a tím snižuje koncentraci cAMP. Druhá zmiňovaná skupina interakcí s G_i může aktivovat syntézu oxidu dusnatého, který po zvýšení své koncentrace dále aktivuje guanylátcyklázu (GC) [27]. Zvýšením cyklického guanosinmonofosfátu se stimuluje fosfodiesteráza, která snižuje koncentraci cAMP. Jsou zapojeny i další signální dráhy ovlivňující K^+ a Ca^{2+} kanály, aktivaci fosfolipázy A_2 , fosfolipázy D a proteinové tyrozin kinázy [28].

Na srdci převládají M_2R , jehož stimulace vede k negativnímu inotropnímu a chronotropnímu účinku, tedy zastávají opačnou funkci než β -AR [28]. Další důsledkem aktivace těchto receptorů je ovlivnění toku iontů inhibicí nebo stimulací iontových kanálů. M_2R nepřímo inhibují Ca^{2+} kanály snížením produkce cAMP, resp. snížením aktivity PKA. Dále aktivují dovnitř usměřující draslíkové kanály (K_{ACh}), což vede k hyperpolarizaci a negativnímu inotropnímu a chronotropnímu účinku.

Kromě M_2R lze na srdci nalézt i ostatní typy MR [29], ale problém s jejich identifikací a kvantifikací zatím brání bližšímu prozkoumání. Na potkaním srdci byl popsán pozitivní inotropický efekt způsobený M_3R [30].

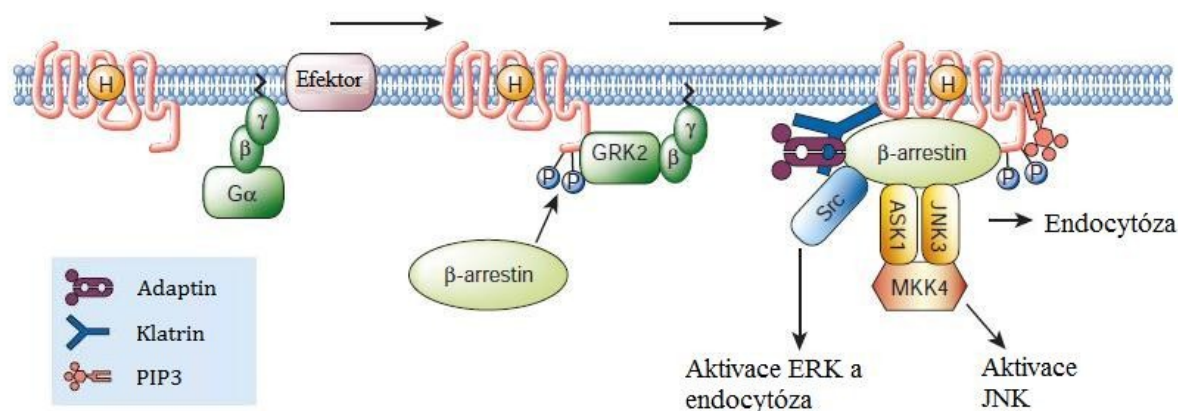
2.3 Desensitizace receptorů

K desensitizaci receptorů dochází po chronickém nebo masivním působením příslušných agonistů [31]. Rozlišují se dva typy regulací – homologní a heterologní, které se liší v tom, která kináza je zapojena. Toto rozdělení lze uplatnit u všech typů GPCR.

2.3.1 Homologní desensitizace

Po masivní aktivaci receptoru agonistou dochází k útlumu odpovědí, které jsou vyvolány. Důvodem této desensitizace je fosforylace buď C-konce receptoru, nebo jeho třetí intracelulární smyčky [31]. To, která část je fosforylována, záleží na typu GPCR. K fosforylaci v tomto případě dochází pomocí kináz receptorů spřažených s G-proteiny (GRK) [32]. Poté na receptor může nasedat arrestin, který brání interakci

s G-proteinem. Dalším krokem je endocytóza receptoru pomocí váčků. Tomuto procesu se říká internalizace. Receptor pak může být defosforylován a recyklován [33]. Proces homologní desensitizace je zobrazen na Obr 3.



Obr. 3: Homologní desensitizace receptorů. G α , β , γ : podjednotky G- proteinu; GRK2: kináza receptorů spřažených s G-proteiny typ 2; Src: rodina non-receptorových tyrozin kináz; ERK: extracelulárně regulovaná kináza; ASK1: apoptózou regulovaná kináza 1; JNK3: c-Jun kináza N-konce 3; MKK4: mitogeny aktivovaná proteinkináza kináz 4; PIP3: fosfatidylinositol trifosfát. Upraveno podle [34].

2.3.2 Heterologní desensitizace

Heterologní regulace se liší od homologní v tom, že místo fosforylace pomocí GRK je využito proteinkinázy PKA a PKC [31]. Ty jsou závislé na koncentraci cAMP resp. DAG, která je navýšena po aktivaci příslušných G-proteinů. Tato regulace působí na receptor bez ohledu na to, zda je navázaný na G-protein nebo je volný. To znamená, že přitom dochází k desensitizaci receptorů, které nebyly stimulovány.

2.3.3 Alternativní regulace

Kromě homologní a heterologní desensitizace ještě existují jiné mechanismy regulace funkce receptorů [35]. Jsou to posttranslační regulace (fosforylace proteinů) vedoucí k znečitlivění a posttranskripční regulace založené na destabilizaci mRNA, jejichž výsledkem může být down-regulace, tedy snížení celkového počtu daného typu receptoru. Existuje také transkripční regulace, kde je zapojena regulace genů, která vede ke zvýšené nebo snížené expresi receptorů.

3 Opioidní receptory

Opioidní ligandy endogenního i exogenního původu hrají důležitou roli v modulaci endokrinní, imunitní, kardiovaskulární a gastrointestinální funkce. Různé druhy ligandů pracují přes příslušné opioidní receptory (OR), které patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Nejznámějším, ale zároveň nejvíce zneužívaným exogenním ligandem je morfin, který je znám pro své analgetické účinky.

3.1 Rozdělení

Opioidní receptory se dělí do čtyř hlavních skupin – δ -OR (DOR, pojmenován podle chámovodu - deferens), μ -OR (MOR, pojmenován podle morfinu), κ -OR (KOR, pojmenován podle ketocyklazocinu) a NOP-R, dříve znám např. jako ORL-1 nebo nociceptin/orphanin FQ receptor (více informací v databázi IUPHAR [36]). Všechny tyto receptory byly již naklonovány [37, 38]. Jelikož jsou zaznamenány i další fenotypové odlišnosti jednotlivých skupin opioidních receptorů, je nutné je rozdělit na podtypy. Dnes jsou známy tři podtypy KOR, dva DOR a také dva MOR [39]. Není dosud zcela jisté, zda rozdělení na podtypy není pouze následek alternativního mRNA sestřihu, post-translačních modifikací nebo homo/heterodimerizace receptorů [37, 40]. Kromě klasického rozdělení OR jsou dnes známy i některé další OR, které nejsou zatím příliš dobře charakterizovány. Je to například ϵ -receptor, který je specifický pro β -endorfiny a λ -receptor [41].

Skupiny OR se liší afinitou k opioidním ligandům, distribucí v tkáních a z části také signalizací. Pro každou skupinu OR existují prekurzory opioidních peptidů. Jsou to prekurzory pro-opiomelanokortin, proenkefalin, prodynorfin a pronociceptin/orfanin FQ. Každý prekurzor obsahuje několik peptidů. Opioidní peptidy se dělí do tří skupin – enkefaliny, dynorfiny a endorfiny. Enkefaliny mírně preferují vazbu s MOR před vazbou s DOR a mají nízkou afinitu ke KOR [42]. Endorfiny mají přibližně stejnou afinitu k MOR a DOR, zatímco ke KOR ji mají podstatně nižší. Nakonec dynorfiny mají vysokou afinitu ke KOR, nižší k MOR a jen velmi nepatrnou k DOR. Nociceptin/orfanin FQ se téměř neváží k ostatním OR a naopak ostatní opioidní peptidy mají pouze nízkou afinitu k NOP-R. Opioidní peptidy, kromě nociceptin/orfanin FQ, mají na N-konci podobou sekvenci pěti aminokyselin – YGGFM/L. Nociceptin/orfanin

FQ má sekvenci prvních čtyř aminokyselin na N-konci stejnou jako dynorfin A – FGGF [43, 44].

Distribuce v tkáních je závislá na sledovaném druhu. Například u potkana byly MOR, KOR a DOR nalezeny v mozku, varlatech, vaječnicích, děloze, ledvinách, nadledvinách, plicích a slezině [45]. Na srdci a v žaludku byly nalezeny pouze DOR a KOR, zatímco v játrech pouze MOR a DOR.

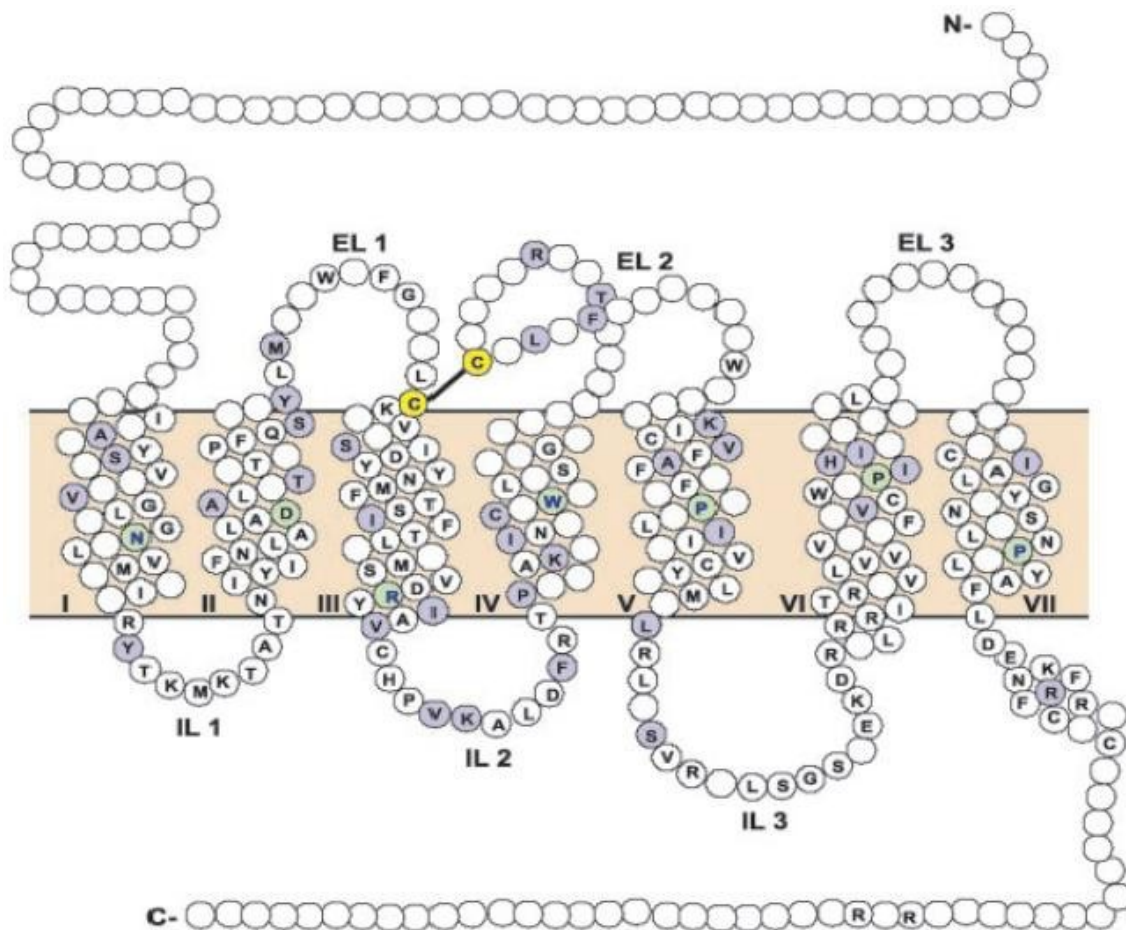
3.2 Zařazení

Opioidní receptory, jak již bylo řečeno, patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Je to velká rodina transmembránových proteinů charakterizovaná obdobnou strukturou. Všechny receptory mají sedm α -šroubovicových domén protínající membránu. Z toho důvodu se jim také někdy říká 7TM. GPCR jsou řazeny do několika rodin. OR patří do největší rodiny A, kde modelovým příkladem je rodopsin, a proto se jí také někdy říká rodina rodopsinu podobná [46]. Ta se dále dělí na podrodiny, přičemž OR patří do čtvrté podrodiny, kde také lze nalézt např. somatostatinové receptory.

3.3 Struktura

Jelikož opioidní receptory patří do rodiny GPCR, sdílí s nimi základní strukturní charakteristiky. Polypeptid začíná extracelulárním N-koncem (NH_2), který pokračuje napříč fosfolipidovou dvojrůstvou, a tvoří sedm transmembránových α -šroubovicových domén, které jsou propojeny třemi intracelulárními a třemi extracelulárními smyčkami (Obr. 4) [41]. Mezi první a druhou extracelulární smyčkou se nalézá disulfidický můstek, který tvoří dva cysteiny. Molekula receptoru je zakončena intracelulárním C-koncem (COOH). Transmembránové α -šroubovicové domén jsou uspořádány a číslovány postupně proti směru hodinových ručiček a tvoří těsný šroubovicový celek. Sedmá doména je prodloužena osmou α -šroubovicí, která se vine rovnoběžně s lipidovou dvojrůstvou [47]. Extracelulární smyčky spolu s tvarem šroubovicového celku a disulfidickým můstkem dávají dynamické rozhraní pro navázání různých ligandů. N-konec receptoru může být posttranslačně modifikován glykosylací na asparaginových aminokyselinách [48]. Existují tři místa, kde může být receptor

fosforylován. Jedno je na třetí intracelulární smyčce, které se také nazývá G-proteinová smyčka, protože právě zde se váže tento protein. Zbývající dvě místa se nalézají na C-konci, který může být i palmitován. Fosforylace hrají velmi důležitou roli při regulaci receptorů (viz níže).



Obr. 4: Struktura opioidních receptorů. Římské číslice značí číslo transmembránové domény. Bílá kolečka značí aminokyseliny, které jednotlivé typy OR nemají společné. Bílá kolečka s písmenky značí aminokyseliny, které mají všechny čtyři OR stejné. Fialová kolečka značí podobnost aminokyselin mezi KOR, DOR a MOR. Žlutě je vyznačen cysteinový disulfidický můstek. IL1-3: intracelulární smyčka 1-3; EL1-3: extracelulární smyčka 1-3. [41]

Všechny čtyři typy OR jsou identické z 60%, přičemž největší podobnost mají na α -helixových transmembránových doménách [48, 49]. Mezi klasickými receptory (KOR, DOR, MOR) se nejvíce shoduje TM3 a to z 91%, a naopak nejméně TM4 (Tab. 1). V porovnání NOP-R s ostatními OR se TM2, TM3 a TM7 shodují z více jak 70%, zato TM4 pouze z 24%. Nejméně podobnou strukturu u klasických OR mají palmitované C-konce a N-konce. Naopak nepalmitované C-konce jsou identické

z 92 %. NOP-R v porovnání s ostatními OR má podobnou sekvenci u intracelulárních smyček, přičemž největší homologii má třetí smyčka. Odlišnost konců OR není jen v aminokyselinovém pořadí, ale i v délce těchto konců. Nejdelší konce mají MOR. Nejkratší N-konec má DOR a nejkratší C-konec KOR.

Při srovnání extracelulárních smyček klasických OR má nejvíce podobnou sekvenci první v pořadí. To hraje roli u vazebných vlastností, pokud se některé ligandy vážou na všechny typy těchto příbuzných receptorů. U NOP-R je podobnost aminokyselinových sekvencí extracelulárních smyček nízká (7-46 %), což vysvětluje, proč k nim mají opioidní peptidy tak nízkou afinitu (Tab. 2). Druhé a třetí intracelulární smyčky všech OR si jsou velice podobné. To nasvědčuje tomu, že mají možnost interagovat se stejnými G-proteiny, a tedy mohou ovlivňovat podobné signální dráhy. Další zajímavostí je, že druhá extracelulární smyčka KOR obsahuje 29 aminokyselin (AK) na rozdíl od 26 AK u ostatních typu OR. DOR se také liší v délce třetí extracelulární smyčky (16 AK) o jednu AK od ostatní tří OR, které mají pouze 15 AK.

Tab. 1: Podobnost aminokyselinové sekvence mezi jednotlivými typy OR.

Strukturní oblast	Podobnost aminokyselin	
	KOR/MOR	KOR/DOR
<u>Extracelulární oblast</u>		
N-konec	6/63 (10 %)	5/53 (9 %)
První smyčka	12/18 (67 %)	13/18 (72 %)
Druhá smyčka	12/28 (43 %)	11/28 (39 %)
Třetí smyčka	5/14 (36 %)	2/14 (14 %)
<u>Transmembránové domény</u>		
TM1	14/22 (64 %)	13/22 (59 %)
TM2	19/22 (86 %)	19/22 (86 %)
TM3	20/22 (91 %)	20/22 (91 %)
TM4	7/22 (32 %)	12/22 (55 %)
TM5	16/22 (73 %)	16/22 (73 %)
TM6	16/22 (73 %)	14/22 (64 %)
TM7	19/22 (86 %)	18/22 (82 %)
<u>Intracelulární oblast</u>		
První smyčka	7/7 (100 %)	6/7 (86 %)
Druhá smyčka	20/22 (91 %)	21/22 (95 %)
Třetí smyčka	21/24 (88 %)	20/24 (83 %)
C-konec (před palmitoylaci)	11/12 (92 %)	11/12 (92 %)
C-konec (po palmitoylaci)	7/35 (20 %)	5/35 (14 %)

Upraveno podle [48].

Tab. 2: Podobnost aminokyselinové sekvence NOP-R s ostatními typy OR.

Strukturní oblast	Podobnost aminokyselin
<u>Extracelulární oblast</u>	
První smyčka	5/11 (46 %)
Druhá smyčka	2/26* (8 %)
Třetí smyčka	1/14** (7 %)
<u>Transmembránové domény</u>	
TM1	12/27 (44 %)
TM2	20/27 (74 %)
TM3	26/35 (74 %)
TM4	6/25 (24 %)
TM5	16/30 (53 %)
TM6	16/30 (53 %)
TM7	17/24 (71 %)
<u>Intracelulární oblast</u>	
První smyčka	3/4 (75 %)
Druhá smyčka	5/9 (56 %)
Třetí smyčka	8/10 (80 %)
C-konec	6/9 (67 %)

*U KOR druhá extracelulární smyčka obsahuje 29 aminokyselin.

**DOR ve třetí extracelulární smyčce obsahují 16 aminokyselin, zbylé typy OR mají v této oblasti 15 aminokyselin. Upraveno podle [49].

3.4 Signalizace

Opioidní receptory patří do skupiny GPCR, jejichž signalizace je zprostředkována navázanými G-proteiny. Tento způsob signalizace převažuje, ale jsou zjištěny i případy, kdy vedení informace není závislé na G-proteinu. Příkladem může být inhibice T-typu Ca^{2+} kanálu nociceptinem [50].

G-proteiny se skládají ze tří rozdílných podjednotek – α , β a γ . Proto se také nazývají heterotrimerní G-proteiny. Patří do nadrodiny GTPáz, tedy enzymů katalyzujících hydrolýzu GTP [51]. Existuje několik druhů G-proteinů, které jsou tříděny především podle struktury a vlastností α -podjednotek (Tab. 3). Ty se mohou dělit podle citlivosti

resp. necitlivosti k určitým toxinům a podle funkce. Existuje i několik typů β - a γ -podjednotek.

Tab. 3: Typy α -podjednotek G-proteinu a efekторы, na které se nejčastěji vážou.

Typy G α	Citlivost k PTX	Váží se efektor
<u>G_s</u>		
G α_s	Ne	AC
G α_{olf}	Ne	AC
<u>G_i</u>		
G α_{i-1}	Ano	AC/K ⁺ kanál
G α_{i-2}	Ano	AC/K ⁺ kanál
G α_{i-3}	Ano	AC/K ⁺ kanál
G α_{oA}	Ano	K ⁺ kanál
G α_{oB}	Ano	K ⁺ kanál
G α_{t1}	Ano	PDE
G α_{t2}	Ano	PDE
G α_z	Ne	
<u>G_q</u>		
G α_{15}	Ne	PLC- β
G α_{16}	Ne	PLC- β
G α_{14}	Ne	PLC- β
G α_{11}	Ne	PLC- β
G α_q	Ne	PLC- β
<u>G₁₂</u>		
G α_{12}	Ne	Cl ⁻ kanál
G α_{13}	Ne	

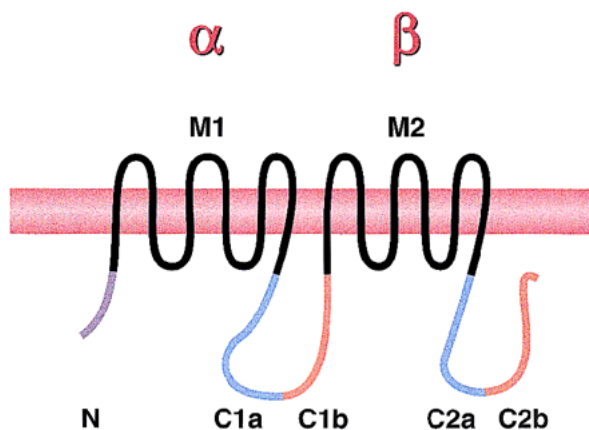
PTX: toxin černého kašle; AC: adenylátcykláza; PDE: fosfodiesteráza; PLC- β : fosfolipáza C- β .
Upraveno podle [35].

Na α -podjednotce se nalézá GTPasová aktivita, která hraje roli při procesu inaktivace celého G-proteinu [35]. Ten je před aktivací receptoru tvořen komplexem tří zmiňovaných podjednotek. Po navázání ligandu na receptor se odehraje několik za sebou jdoucích událostí. GDP navázaný na α -podjednotce se disociuje a místo něj se váže GTP, který G-protein aktivuje. Celý G-protein se poté odděluje od receptoru a následuje disociace α -podjednotky s navázaným GTP od β - a γ -podjednotek. Poslední dvě zmiňované podjednotky tvoří komplex $\beta\gamma$ a spolu s α -podjednotkou ovlivňují aktivitu efektorů. Různé typy podjednotek mohou ovlivňovat různé efekторы.

Klasické OR se přednostně, ale ne striktně, spřahují s rodinou G-proteinů citlivých k toxinu černého kašle (PTX). Tam patří inhibiční G-proteiny G_i a G_o. Kromě těchto

inhibičních G-proteinů mohou OR interagovat s rodinu $G_{q/11}$ a s G-proteinem necitlivým k PTX - G_z [52, 53]. Prostřednictvím těchto proteinů mohou OR modulovat mnoho efektorových systémů. Již delší dobu se ví, že ovlivňují adenylátcyklázu [54], N-typ Ca^{2+} kanálu [55], L-typ Ca^{2+} kanálu [56], fosfolipázu C [57] a dovnitř usměřující K^+ kanály [58]. NOP-R, také díky své podobné struktuře k ostatním OR, se váží na G-proteiny G_i a G_o , stejně jako k PTX necitlivému G_z i k rodině $G_{q/11}$. Ovlivňují tedy adenylátcyklázu, Ca^{2+} kanály, fosfolipázu C i dovnitř usměřující K^+ kanály [59].

Adenylátcykláza (AC) je enzym navázaný na membránu, který katalyzuje syntézu cAMP z molekuly ATP. To, že cAMP jako druhý posel ovlivňuje proteinkinázy, je známo již delší dobu [60]. Dnes víme, že je to proteinkináza A (PKA), která se aktivuje disociací regulačního podjednotky z katalytické podjednotky [61]. Je známo alespoň devět druhů savčích (izoforem) AC, které se liší distribucí v tkáních, aminokyselinovým uspořádáním a druhem (citlivostí) aktivátoru (Tab. 4), protože ne všechny izoformy jsou aktivovány přímo některým z G-proteinů. Aktivace některých izoforem AC může proběhnout i pomocí proteinkináz nebo ionty Ca^{2+} . G-protein může enzym aktivovat α -podjednotkou, ale i komplexem $\beta\gamma$. Struktura AC je spíše podobná nějakému přenašeči nebo iontovému kanálu než typickému enzymu vázanému na membránu. Celá struktura začíná intracelulárním N-koncem, pokračuje dvěma jednotkami a zakončena je dlouhým C-koncem (obr. 5). Obě jednotky obsahují šest transmembránových domén. Jednotky jsou spojeny cytoplasmatickou doménou, která je rozdělena na katalytickou a nekatalytickou část. C-konec je rozdělen stejným způsobem. AC neobsahuje žádné motivy pro navázání ATP, a aby se dosáhlo enzymové aktivity, je většinou nutné dosáhnout určité konformace dvou jednotek enzymu [61].



Obr. 5: Struktura molekuly AC. N: N-konec; M1: prvních šest transmembránových domén; C1a: první katalytická intracelulární doména; C1b: první intracelulární nekatalytická doména;

M2: druhých šest transmembránových domén; C2a: druhá katalytická intracelulární doména; C2b: druhá intracelulární nekatalytická doména. α označuje přední polovinu molekuly, β druhou zádň polovinu [61].

Tab. 4: Typy AC a jejich regulace.

Izoformy AC	Účinky G-proteinů
Typ I	$G\alpha_s$ stimuluje; $\beta\gamma$ inhibuje; α_i , α_o , α_z inhibují, ale méně než $\beta\gamma$; PKC stimuluje
Typ II	$G\alpha_s$ stimuluje; $\beta\gamma$ stimuluje stejně jako v přítomnosti $G\alpha_s$; PKC stimuluje
Typ III	$G\alpha_s$ stimuluje
Typ IV	$G\alpha_s$ stimuluje; $\beta\gamma$ stimuluje v přítomnosti $G\alpha_s$; PKC stimuluje
Typ V	$G\alpha_s$ stimuluje; $\beta\gamma$ inhibuje; α_i , α_o , α_z inhibují; PKC stimuluje
Typ VI	$G\alpha_s$ stimuluje; α_i , α_o , α_z inhibují
Typ VII	$G\alpha_s$ stimuluje
Typ VIII	$G\alpha_s$ stimuluje

PKC: proteinkináza C. Upraveno podle [62].

Protože se OR většinou váží na inhibiční G-proteiny, mohlo by se zdát, že jednoduše inhibují aktivitu AC, což vede k poklesu koncentrace cAMP a ta ke snížení aktivity PKA. Tato představa ve skutečnosti nemusí platit stoprocentně. Studie se specifickými protilátkami proti α -podjednotce ukázaly, že inhibice AC aktivity u DOR je zprostředkovaná G_{i2} [63]. U KOR bylo prokázáno, že za tuto inhibici odpovídá G_o [64]. Účinky aktivace klasických OR zprostředkované interakcí s různými G-proteiny jsou uvedeny v tab. 5.

Tab. 5: Podtypy OR a jejich interakce s α -podjednotkou G-proteinu.

Skupiny OR	Typy α -podjednotek G-proteinu				
	$G\alpha_{i-1}$	$G\alpha_{i-2}$	$G\alpha_{i-3}$	$G\alpha_0$	$G\alpha_z$
MOR	aktivace AC*	aktivace AC*	aktivace AC*; inhibující cAMP	aktivace AC*; inhibující cAMP	aktivace AC*
DOR	aktivace PLC; inhibující cAMP	inhibující cAMP; Aktivující GTPázy; navýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+}	inhibující cAMP	inhibice Ca^{2+} kanálu; aktivující GTPázy; inhibující cAMP	akumulace cAMP; tvorba IP3
KOR (κ_1 -OR)	inhibice PLC; Inhibice GTPázové aktivity	inhibice GTPázové aktivity			inhibující cAMP

*Aktivaci adenylátcyklázy (AC) zohledňuje interakci komplexu $\beta\gamma$. Upraveno podle [62].

Stimulace receptorů navázaných na $G_{q/11}$ vede k aktivaci fosfolipázy C. PLC štěpí fosfatidylinositol bifosfát na diacylglycerol a inositol trifosfát. Diacylglycerol aktivuje proteinkinázu C. Inositol trifosfát má regulační vliv na zásobníky s vápenatými ionty. Fosfolipázu kromě α -podjednotky může také samostatně aktivovat komplex $\beta\gamma$ [59]. Tento komplex má za následek i stimulaci některých typů izoform AC. Za určitých okolností může tedy interakce receptoru s inhibičním G_α proteinem vést ke zvýšení koncentrace cAMP.

Opioidní receptory ovlivňují celou řadu iontových kanálů. Protože jsou iontové kanály tvořeny z podjednotek a počet jejich kombinací je veliký, každý receptor může ovlivňovat jiný typ kanálu. Důležitou roli hrají i různé typy G-proteinů a jejich podjednotek. Tak například KOR i MOR inhibují N-, P- a Q-typy vápenatých kanálů. Nejdříve se usuzovalo, že tato inhibice je modulována α -podjednotkou, ale později se ukázalo, že je zprostředkována komplexem $\beta\gamma$ -podjednotek [65]. $\beta\gamma$ komplexem jsou aktivovány také G-proteinem řízené dovnitř usměřující K^+ kanály (GIRK) [66]. MOR a DOR inhibují L-typ Ca^{2+} kanálu a to prostřednictvím G_i/G_o [56]. NOP-R má schopnost

částečně nebo zcela inhibovat L-*typ*, N-*typ* a P/G-*typ* Ca²⁺ kanálu [59]. Dále je schopen aktivovat GIRK kanály.

3.5 Desensitizace OR

Opioidy jsou široce používaná analgetika, ale jejich klinické využití je omezeno výskytem a rozvojem tolerance a fyzickou závislostí. Molekulární mechanismus vzniku těchto fenoménů není zatím zcela objasněn. Je zřejmé a potvrzené několika studiemi *in vivo* i *in vitro*, že dlouhodobá léčba opioidy vede ke snížení odpovědi zprostředkované navázáním agonisty na receptor, tzn. k desensitizaci (tolerance). Tento jev může být doprovázen internalizací nebo down-regulací receptorů, přičemž druhý zmíněný proces má dlouhodobější charakter.

Jsou popsány dva druhy znečitlivění receptorů, které se liší mechanismem. První druh je homologní desensitizace, ke které dochází po dlouhodobé aktivaci agonistou. Tím druhým je heterologní desensitizace, která se může projevit v aktivním i neaktivním stavu receptoru [31]. Dříve se předpokládalo, že desensitizace je základním mechanismem ochrany buňky před nadměrnou stimulací receptoru. Později se ukázalo, že problematika může být mnohem složitější. Například se zjistilo, že tolerance k morfinu je dána absencí desensitizace MOR [67]. Ale i toto tvrzení bylo vyvráceno, a dnes je potvrzeno, že morfin mírnou desensitizací MOR způsobovat může [68]. Způsob desensitizace závisí na druhu agonisty, druhu receptoru a návaznosti na typ buněčné signalizace.

Základním krokem v procesu desensitizace je fosforylace receptoru. U homologní desensitizace působí kináza vážící se na receptor spřažený s G-proteinem tzv. GRK. U heterologní desensitizace je receptor fosforylován proteinkinázami PKA nebo PKC.

GRK patří do rodiny serin/treoninových kináz. Je známo 7 izoforem, které se liší odlišnou distribucí v tkáních a aminokyselinovými sekvencemi (pro více informací [69]). Mají velice variabilní C- a N-konce, kam se navazují různé buněčné komponenty. Například izofromy GRK2 a GRK3 (β ARK) jsou cytosolické proteiny, které interagují s volným dimerem G $\beta\gamma$ přes C-konec. Díky této interakci se dostávají do blízkosti membrány a receptoru, který mohou poté fosforylovat na serin/treoninových zbytcích.

Zapojení GRK do regulace OR bylo pozorováno na několika modelech. Příkladem mohou být buňky HEK293, kde zvýšená exprese GRK2 vede ke zvýšení schopnosti morfinu vyvolat fosforylaci MOR [70]. V buňkách lidského neuroblastomu SK-N-BE byl po aplikaci heparinu (inhibitor GRK) pozorován pokles efektivní fosforylace a desensitizace DOR vyvolaná morfinem [71].

PKA je na cAMP závislá kináza, která se skládá ze čtyř různých podjednotek, jedná se tedy o heterotetramer (pro více informací [72]). V neaktivní formě obsahuje dvě regulační podjednotky (existují čtyři různé podjednotky) a dvě katalytické podjednotky (existují čtyři různé podjednotky). Po navázání cAMP na regulační části se uvolní katalytická část, která fosforyluje receptor na serin/treoninových zbytcích. Po zjištění inhibičního vlivu OR na adenylátcyklázu, se role PKA v procesu desensitizace zdála být nemožná. Působením některých agonistů však k desensitizaci došlo (např. morfin, levorfanol) [73]. V pozdějších studiích se potvrdilo, že cAMP a kináza na něm závislá nejsou zapojeny do desensitizace způsobené opioidními agonisty [74].

Další proteinkinázou fosforylující receptor je PKC. PKC také patří do rodiny serin/treoninových kináz a existuje alespoň dvanáct zástupců, kteří se dělí do tří skupin [75]. Skupiny jsou rozděleny podle primární struktury N-konce, kde se nacházejí vazebná místa pro modulatory – Ca^{2+} a DAG. Vliv PKC na desensitizaci OR je prokázán [76].

Ca^{2+} /kalmodulin závislá proteinkináza II (CAMKII) je další kinázou, která může ovlivňovat desensitizaci receptorů. Na základě funkčních analýz alelických variant lidského genu pro MOR bylo zjištěno, že receptor obsahuje, i když změněné, fosforylační místa pro tuto kinázu [77]. Nicméně důkaz, který by dokazoval, že OR jsou fosforylovány CAMKII, není dosud znám.

U mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAPK) existuje důkaz o zapojení v desensitizaci OR. První známky interakce MAPK s OR byly pozorovány na fibroblastech potkanů [78]. Později bylo zjištěno i zapojení MAPK přímo do regulace OR resp. MOR, kde inhibitory ERK1/2 (typy MAPK) skutečně blokovaly desensitizaci MOR vyvolané DAMGO (agonista MOR) [79]. Jelikož docházelo k desensitizaci i při použití silného inhibitoru MAPK (PD98059), došlo se k závěru, že tyto kinázy ovlivňují spíše ostatní druhy kináz. Tento nepřímý vliv na desensitizaci byl

potvrzen ve studii s buňkami SH-SY5Y, kde se ukázalo, že ERK1/2 působí na GRK (GRK2/3) [80].

3.6 Internalizace

Internalizace je založená na navázání β -arrestinu k receptoru. Fosforylace OR způsobená agonistou vede ke změně konformace receptoru. Tato změna zvyšuje afinitu pro cytosolický protein β -arrestin a umožňuje jeho interakci s receptorem. Tato interakce blokuje G-proteinovou signalizaci a vede k navázání dalších cytosolických molekul, které společně utvoří aparát způsobující internalizaci (endocytózu) receptoru. Existuje několik mechanismů internalizace, jenž se liší typem váčku zapojených do popsaného procesu. Jsou to klatrinové váčky, kaveoly a neobalené váčky (více informací na [81]). Nejlépe je popsán mechanismus s klatrinovými váčky. K celému procesu dochází během několika minut po aktivaci receptoru. Nejlépe prozkoumaným OR ve vztahu k internalizaci je MOR, který je zde uveden jako příklad.

Studie in vitro ukázaly rozdíly v internalizaci MOR mezi různými agonisty [76, 82]. Zjistilo se, že účinnost endocytózy OR negativně koreluje s rozvojem desensitizace receptoru. Agonisté s nižší účinností internalizace (buprenorfin, morfin a pethidin) vyvolávají rychlejší desensitizaci receptoru. A naopak agonisté s vyšší potencií internalizace potlačují desensitizaci. Tyto fakta vedou k závěru, že internalizace je důležitým procesem pro recyklaci a reaktivaci a nikoliv pro blokování signalizace receptoru. DAMGO, syntetický agonista MOR, vyvolává rychlou endocytózu, zatímco morfin, který je vysoce návykový, nepodporuje internalizaci receptoru ani ve vysokých koncentracích [83]. Pozdější studie neuronů ukázaly, že v některých oblastech mozku je schopnost morfinu vyvolat internalizaci stejná jako DAMGO [84]. Dalším zjištěním bylo, že morfinem vyvolanou internalizaci MOR lze dosáhnout zvýšenou expresí GRK a β -arrestinu [85]. Tyto výsledky vedou k závěru, že internalizace vyvolaná morfinem je podmíněna úrovní exprese nebo celulární lokalizací GRK popř. β -arrestinu.

Při hledání dalších proteinů, které by mohly způsobovat internalizaci MOR, se zjistilo, že k dosažení tohoto procesu je nutná aktivace fosfolipázy D2 (PLD2) [86], kterou ale aktivují pouze někteří agonisté (DAMGO), což může vysvětlit rozdíly v internalizaci receptoru způsobenou různými agonisty [87]. Na základě tohoto

poznatku se usuzuje, že k vyvolání internalizace morfinem je nutná přítomnost aktivní fosfolipázy PLD2 tj., že záleží na lokalizaci a úrovni exprese této lipázy.

Jak bylo zmíněno výše, internalizace neslouží k desenzitizaci receptoru. Internalizovaný receptor není degradován, ale většinou defosforylován, recyklován a navrácen na povrch buňky v reaktivovaném stavu [88]. Dokonce bylo prokázáno, že internalizace vyvolaná agonistou má funkci v potlačování vzniku tolerance k opioidům po dlouhodobé léčbě těmito látkami [89].

3.7 Down-regulace

Down-regulace je proces, který má dlouhodobější charakter. Dochází k němu po chronickém podávání ligandů, tedy agonistů. Je zjištěno, že tento proces může zprostředkovat plný agonista, u částečného agonisty popř. antagonisty efekt nebyl pozorován [90]. Down-regulace je obecně proces, při kterém dochází ke snižování celkového počtu receptorů na membráně. Může k němu dojít dvěma způsoby. Buď degradací internalizovaných receptorů, nebo snížením počtu nově syntetizovaných receptorů.

Down-regulace byla prokázána pouze při testech in vitro [90]. Studie in vivo vykazují výsledky, které se liší [91]. Záleží totiž na druhu použitého opioidu a na oblasti, která je zkoumána. Příkladem může být studie MOR, ve které byl zkoumán vliv morfinu a etorfinu na zastoupení GRK a dynorfinu, což jsou enzymy ovlivňující internalizaci a tedy i down-regulaci [92]. U etorfinu byla down-regulace spjata s nárůstem míšního dynorfinu na proteinové úrovni, ale zároveň docházelo ke snížení na mRNA úrovni. Etorfin neměl vliv na proteinovou ani mRNA úroveň GRK. U morfinu nebyl pozorován žádný vliv na tyto enzymy.

Nebyl nalezen žádný vztah mezi vznikem down-regulace a internalizace OR. Internalizace vyvolaná etorfinem výrazně snižuje hustotu MOR v buňce, ale tolerance je nižší než u morfinu, který internalizaci a down-regulaci příliš neovlivňuje [83, 93]. Ani vztah mezi vznikem desenzitizace a down-regulace nebyl zjištěn. Dokonce bylo prokázáno, že k vyvolání down-regulace je zapotřebí vyšších dávek ligandu a delšího expozičního času než je tomu u desenzitizace, a že tyto mechanismy jsou dva samostatné buněčné adaptační procesy [94, 95].

4 Opioidní systém v myokardu

Je známo, že opioidní systém, tedy opioidní receptory a příslušné endogenní peptidy, se nacházejí také v srdci. Byl pozorován vliv opioidů na základní srdeční funkce, které mohou být ovlivněny několika různými cestami. Méně známé je, jak stres či některá srdeční onemocnění působí na opioidní systém a jak tento systém poté ovlivňuje právě funkci myokardu.

Přítomnost OR na srdci lze dokázat podáním nespecifického antagonisty OR naloxonu. Po podání této látky byla pozorována zvýšená kontraktilita, zvýšená koncentrace vápníku v cytosolu a alkalóza [96]. Změna intracelulárního pH (pH_i) je závislá na PTX, kde toxin má inhibiční charakter. Alkalózu lze potlačit inhibicí PKC nebo Na^+/H^+ pumpy.

Rozdíly v působení opioidního systému na myokard existují, a to mezidruhové i individuální.

4.1 MOR v myokardu

Podáním morfinu se zvýší koncentrace vápníku v cytosolu, ale vliv na alkalózu a kontrakci nebyl pozorován [96]. Experimenty s použitím selektivního agonisty MOR DAMGO vedly k závěru, že MOR nemají vliv na zvýšení koncentrace vápníku v cytosolu [97], což naznačuje, že myokard postrádá tento typ OR. DAMGO sice způsobuje snížení kontraktility síní, ale dochází k ní zřejmě non-receptorovým mechanismem [98]. Studie zabývající se expresí OR na srdci v průběhu ontogeneze prokázaly, že MOR se v dospělém srdci nenalézají, a že se zde vyskytují pouze v raném období ontogeneze srdce [99].

O několik let novější studie tato tvrzení vyvrátily. Skupina vědců na základě čtyř různých technik (PCR – polymerázová řetězová reakce, Western blotting, imunofluorescenční mikroskopie a stanovení cAMP) totiž zjistila, že MOR na kardiomyocytech dospělého potkana se opravdu nalézají [100]. Nejnovější studie na srdečních síních u lidí tento objev potvrdila [101]. Byla zkoumána mRNA NOP-R a MOR na základě PCR, kde byla zjištěna velmi nízká exprese MOR (34 krát nižší než

NOP-R). Z tohoto nízkého zastoupení MOR na srdci se předpokládá, že aktivace tohoto receptoru neovlivňuje žádné hlavní srdeční funkce.

4.2 KOR v myokardu

Zastoupení KOR v rostoucím i dospělém srdci převládá nad ostatními typy OR [99]. KOR v myocytech komor dospělého potkaního srdce aktivuje fosfatidylinositolový systém, což vede k uvolnění Ca^{2+} ze zásobáren sarkoplasmatického retikula a tedy ke zvýšení intracelulární koncentrace a snížení příjmu kalcia (calcium transient) [97, 102]. Studie myocytů levé komory ukázaly, že po aplikaci U50488H (agonista KOR) dochází k přechodnému zvýšení amplitudy svalového záškubu a amplitudy uvolnění vápníku. Toto přechodné zvýšení nakonec vede k poklesu amplitud navzdory výraznému nárůstu citlivosti myofilament k vápníku pod základní úroveň. Tento efekt je zprostředkován OR pomocí zvýšené tvorby IP₃. U50488H dále potlačuje aktivitu AC (AC I a AC IV) v kardiomyocytech komor zprostředkovanou forskolinem a to prostřednictvím intracelulárního Ca^{2+} [103]. U50488H je tedy zprostředkovatel phosphoinositol/ Ca^{2+} signální dráhy, která potlačuje AC/cAMP signální dráhu. Dále aktivace KOR v kardiomyocytech mláďat potkanů vede ke zvýšení toku kalcia do buňky, zvýšení amplitudy přechodného kalcia a zvýšení kontraktility [96].

Signalizace KOR na srdci také zvyšuje aktivitu PKC, což má stimulační vliv na Na^+/H^+ pumpu [104]. Výsledkem působení U50488H je tedy zvýšená intracelulární koncentrace Na^+ a Ca^{2+} . Zvýšené intracelulární koncentrace zmiňovaných iontů mohou vést k arytmiím. Tento stav lze blokovat PTX, selektivním antagonistou KOR (např. nor-BNI) nebo inhibicí PLC. Tato pozorování naznačují, že tyto účinky jsou zprostředkovány PTX-citlivými G-proteiny a KOR, které aktivují PLC nejspíše prostřednictvím $\beta\gamma$ komplexu.

Jak již bylo řečeno, U50488H ovlivňuje Na^+/H^+ pumpu. Může proto dojít ke zvýšení intracelulárního pH, což bylo prokázáno na kardiomyocytech z potkaních komor [104]. Alkalóza je nejspíše příčinou zvýšené citlivosti k vápenatým iontům. Další zajímavostí je, že po podání nízké koncentrace U50488H, která sama o sobě nemá žádný vliv, dochází k inhibici arytmie způsobené noradrenalinem [102, 105]. V tomto případě dochází po aktivaci KOR k inhibici AC resp. snížení koncentrace cAMP. Mechanismy

modulující srdeční činnost prostřednictvím KOR mohou tedy být rozdílné. Zatímco při iniciaci vzniku arytmií je použita PLC/IP3 cesta, při inhibici arytmií se zřejmě využívá AC/cAMP cesta. Není zatím známo, zda a jak se tyto mechanismy uplatňují za normálních okolností a jestli hrají nějakou roli u srdečních chorob.

4.3 DOR v myokardu

DOR se nalézají jak v mladistvém, tak i v dospělém srdci [99]. DOR interagující s PTX-citlivými G-proteiny snižují kontraktilitu kardiomyocytů novorozených potkanů [96]. Kontraktilita se snižuje navozením acidózy, která způsobí sníženou citlivost myofilament na vápenaté ionty. Podobně jako u KOR, met-enkefalin, agonista DOR, snižuje amplitudu svalového záškubu a úroveň přechodného zvýšení kalcia v myocytech levé komory (negativní inotropní efekt) [97]. Tento mechanismus je také zprostředkován zvýšenou tvorbou IP3 a vylitím Ca^{2+} ze zásobáren. Stimulace DOR leu-enkefalinem vede k redukci toku Ca^{2+} přes L-typ Ca^{2+} kanálu, snížení intracelulárního Ca^{2+} a zeslabení kontrakce [106]. Bylo zjištěno, že leu-enkefalin v izolovaném srdci potkana dokáže zvrátit pozitivní inotropní účinek β_1 -AR specifickým post-synaptickým způsobem prostřednictvím PTX-citlivého G-proteinu, který je zapojen do regulace hladiny cAMP [107]. Tento fakt je očividným důkazem, že při uvolnění katecholaminů a opioidů dochází k potlačení efektu způsobeného aktivací β -AR katecholaminy, jako je např. stimulace AC. Dalším DOR agonistou je deltorfin, který v izolovaném srdce morčete snižuje systolický intracelulární obsah Ca^{2+} , aniž by měl vliv na jeho hladinu v diastole [108]. Zvyšuje i citlivost myofilament k vápenatým iontům. Starší studie prokázala stimulační vliv DALA, což je další agonista DOR, na AC na kardiomyocytech komor kuřečích embryí [109]. DALA také zvyšuje vtok kalcia do buňky přes vápenaté kanály závislé na napětí.

4.4 NOP-R v myokardu

NOP-R v myokardu není zatím zcela prozkoumán, existují však důkazy o jeho přítomnosti na potkaním srdci. Studie Dumonta a kol. [110] založená na sledování interakce radioligandu s receptorem, zjistila přítomnost vysokoafinitních vazebných

míst pro nociceptin. Dalším důkazem byl nález těchto receptorů v novorozeneckých potkaních kardiomyocytech [111]. Nejnovější studie založené na PCR taktéž dokazují přítomnost NOP-R na srdci, a to v lidských síních [101]. Zajímavostí je, že zde nebyl nalezen prekursor nociceptinu/orfaninu FQ, a tak vyvstává otázka, jak tento endogenní opioid je do srdce dopravován. Tato studie předkládá dva možné způsoby transportu. Prvním je, že aktivní nociceptin/orfanin FQ se dostává z mozku, kde je ligand produkován, přes hematoencefalickou membránu do krve a následně do srdce. Druhou možností je, že nociceptin/orfanin FQ je uvolňován z neuronů, které inervují srdce.

Funkce tohoto typu receptoru na srdci není zcela objasněna. V některých studiích byl zkoumán krevní tlak a tepová frekvence. U morčat bylo zjištěno, že aktivace NOP-R vede ke snížení tepové frekvenci i krevního tlaku [112]. Zkoumáním vlivu NOP-R na bradykardii a hypotenzi u myší se potvrdilo, že selektivní aktivací tohoto receptoru lze bradykardie a hypotenze dosáhnout [113]. I když zvířecí modely dokazují vliv NOP-R na tyto srdeční charakteristiky, u lidí tento jev nebyl potvrzen [114].

4.5 Opioidy působící non-receptorovým způsobem

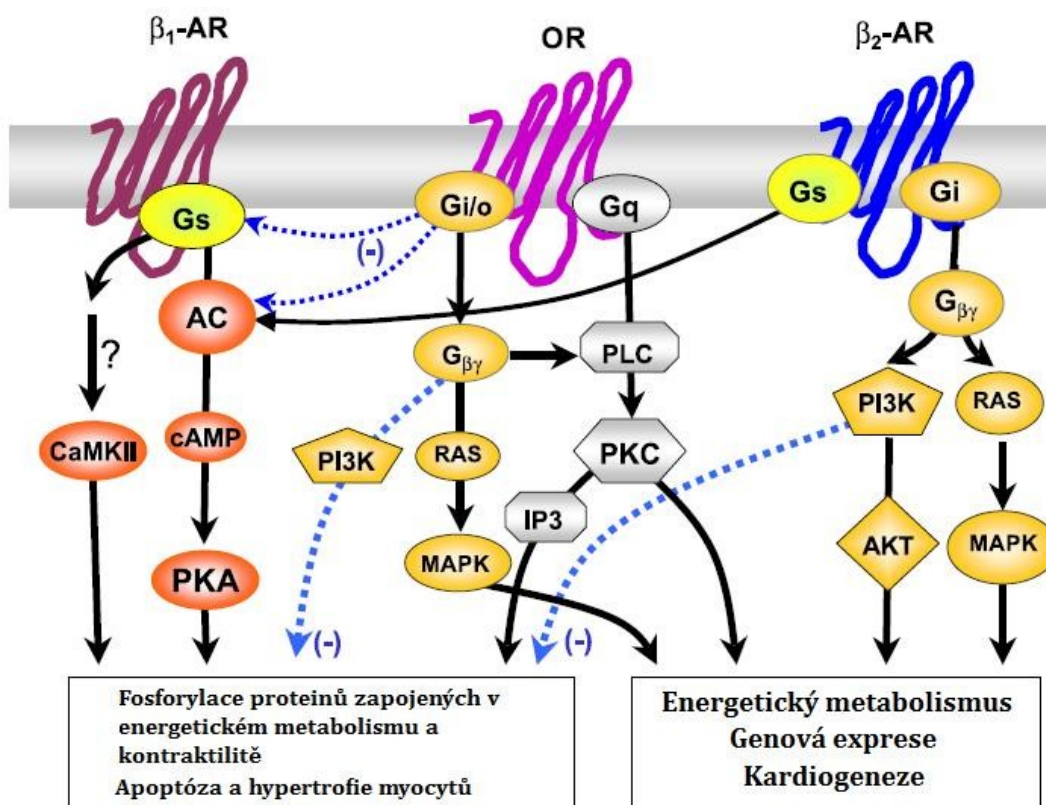
Objevily se i důkazy působení některých endogenních opioidů způsobem nevyužívajícím OR. Příkladem může být dynorfin A, endogenní ligand KOR, který se v sarkolemě potkaního srdce váže na ouabainová vazebná místa Na^+/K^+ ATPázy [115]. Ouabain je srdeční glykosid inhibující tuto ATPázu. Dynorfin A ji tedy inhibuje, což má také blokující účinek na vychytávání noradrenalinu. Dalším příkladem působení ligandu nezávisle na OR je U50488H, který inhibuje některé pumpy a ATPázy [116].

4.6 Oligomerizace opioidních receptorů

GPCR tvoří homooligomery i heterooligomery [40]. Oligomerizace mají vliv na signalizační vlastnosti a možná jsou zodpovědné za dělení receptorů do podtypů (viz rozdělení OR). U OR tomu není jinak. Tvoří heterooligomery s dalšími typy OR, ale i s jinými receptory např. β -AR. Homooligomerizace je nejspíše důležitá k amplifikaci signálu.

Heterooligomerizace OR má vliv na afinitu jednotlivých ligandů [40]. Příkladem může být dimer MOR-DOR, kde se afinita selektivních agonistů pro jednotlivé receptory snížila, ale zvýšila se pro leu-enkefalin. Rozdíly lze najít i u internalizace [40]. Podáním DPDPE (agonista DOR) k internalizaci nedochází, ale při aktivaci dimeru agonistou DAMGO dochází ke zvýšení internalizace. Ovlivněna je také signalizace [40]. Dimer MOR-DOR inhibuje AC G-proteiny necitlivé k PTX.

Heterooligomerizace s β -AR je mnohem zajímavější, a to především vzhledem k faktu, že jejich primární funkce jsou opačné. Jak už bylo řečeno, β -AR se převážně spřahují s G_s , zato OR s G_i , popř. s ostatními inhibičními G-proteiny. Agonisty aktivované srdeční OR inhibují stimulační vliv β -AR, a to při takové koncentraci ligandu, která by sama o sobě neměla žádný vliv [107]. Tento jev byl již zmíněn a naznačuje, že tyto dvě rodiny receptorů spolu opravdu mohou interagovat. Dalším důkazem může být také již zmiňovaný efekt U50488H u myocytů potkaních komor, který snížil příjem kalcia a kontrakci [105]. Koncentrace ligandu byla v tomto případě opět taková, která by normálně základní buněčné funkce neovlivnila. Dále bylo zjištěno, že presynaptická aktivace OR vede k inhibici uvolnění katecholaminů ze sympatických neuronů [107]. Opioidní agonisté leu-enkefalin a U50488H také inhibují noradrenalinem navýšený tok v L-typu Ca^{2+} kanálu, zvýšenou kontraktilitu a intracelulární koncentraci Ca^{2+} [107]. Tyto jevy byly zkoumány na izolovaných kardiomyocytech potkanů. Bylo zjištěno, že tyto výsledky jsou zprostředkovány PTX citlivými G-proteiny a jsou zcela nezávislé na aktivaci PLC. V téže studii bylo také zjištěno, že Leu-enkefalin snižuje akumulaci cAMP. Tomuto efektu lze zabránit podáním PTX, popř. naloxonu. Provázanost signalizace OR a AR je zřejmá a naznačuje ji i starší studie provedená na potkaní sarkolemě, ve které byl po aktivaci α - i β -AR pozorován nárůst opioidních vazebných míst [117]. Pozoruhodné je, že provázanost OR s AR je u jednotlivých podtypů β -AR rozdílná [107]. Inhibiční efekt leu-enkefalinu na pozitivní inotropní účinek vyvolaný β -AR byl prokázán jen tam, kde tento účinek vyvolaly β_1 -AR. Aktivace DOR tedy neměla žádný vliv na pozitivní inotropní účinek vyvolaný β_2 -AR. Přesný mechanismus těchto rozdílů není znám a dokonce se spekuluje, zda to není ovlivněno tkáňovou a membránovou distribucí jednotlivých podtypů β -AR.



Obr. 6: Signalizace OR, β -AR, a jejich vzájemné ovlivnění. Gs: stimulační α -podjednotka G-proteinu; CaMKII: proteinkináza závislá na kalmodulinu; AC: adenylátcykláza; cAMP: cyklický adenosin trifosfát; PKA: proteinkináza A; PLC: fosfolipáza C; Gi/o inhibiční α -podjednotka G-proteinu; $\beta\gamma$: $\beta\gamma$ -podjednotky G-proteinu; PI3K: kináza fosfatidylinositolu 3; MAPK: mitogeny aktivovaná proteinkináza; Gq: typ α -podjednotky G-proteinu; PLC: fosfolipáza C; PKC: proteinkináza C; IP3: inositol trifosfát; PIP2: fosfoinositol bifosfát; PKC: proteinkináza C; Akt: serin/treoninová proteinkináza. Upraveno podle [118].

4.7 Opioidní receptory v selhávajícím myokardu

První důkazy o roli opioidního systému v srdeční patologii se objevily v roce 1976, kdy u pacienta předávkovaného heroinem (diacetylmorfin) se později vyvinula akutní kardiomyopatie [119].

Role OR v selhávajícím myokardu je úzce spjata s AR. Srdeční selhání vyvolané různými příčinami je spojeno se zvýšenou hladinou katecholaminů. Roli hraje i snížená hustota a desensitizace receptoru, která vede k oslabení kontraktálních odpovědí AR [120]. Dnes je známo, že podtypy β -AR po aktivaci mohou modulovat rozdílné signální dráhy a mají opačnou funkční roli v patogenezi srdečního selhání. Jak už bylo zmíněno

v první kapitole, β_1 -AR mají apoptický účinek, zatímco β_2 -AR mají vliv na apoptózu opačný [7]. Z toho lze usuzovat, že snížení celkového počtu β_1 -AR, popř. navýšení celkového počtu β_2 -AR, může představovat doplňkový kardioprotektivní mechanismus.

Jak bylo řečeno výše, DOR blokují účinek β_1 -AR, ale ne β_2 -AR [107]. Z dostupných informací o podtypech β -AR, se dá předpokládat, že by OR mohly také zastávat úlohu v kardioprotekci. Tento předpoklad podporuje přímý nervově nezávislý negativní inotropní účinek DOR a KOR [97]. Dále bylo zjištěno, že naloxon je schopen zlepšit systémovou hemodynamiku a kontraktlní funkci myokardu při selhání psího srdce vyvolaném stimulací [121]. Efekt naloxonu může být zprostředkován činností v rámci centrálního nervového systému, stejně jako přímým inotropním účinkem [122, 123].

Lidským modelem na zkoumání vlivu OR na patogenezi srdce jsou především drogově závislí. Příkladem může být studie, která sledovala jednotlivce závislé na opioidech v souvislosti s onemocněním koronárních tepen [124]. U drogově závislých byl výskyt závažných onemocnění koronárních tepen téměř o třetinu nižší než u běžné populace. Existuje také 33letá studie na mužích žijících v USA, kteří jsou závislí na heroinu [125]. Tato studie ukázala, že pouze 11,7 % studovaných zemřelo na kardiovaskulární poruchu, tedy pouze necelá třetina oproti obecné americké populaci [126]. Nicméně závislost na heroinu doprovází abnormální hodnoty EKG, snížený srdeční výdej a mj. i plicní edém [127]. Tyto výsledky naznačují, že vliv OR na patologii srdce je složitější a může zde hrát roli více faktorů.

Některé studie zkoumají vliv opioidního systému na ischemii. Studie prováděné na lidech i potkanech zjistily, že působením naloxonu nebo naltrindolu (antagonisté OR) na tkáň lze potlačit resistenční efekt, který lze vyvolat tzv. ischemickým preconditioningem (IPC) [128, 129]. IPC je technika, pomocí které lze tkáň určitým dávkami ligandu učinit více odolnými vůči následné ischemii. Z toho lze odvodit, že DOR stimulované enkefaliny mohou hrát důležitou roli v IPC, a tak mohou mít významný vliv v ochraně srdce, což bylo dalšími výzkumy potvrzeno [130]. Ochranný efekt je zprostředkován PTX-citlivými G-proteiny [131]. Studie zaměřené na KOR ukázaly, stejně jako u DOR, že tyto receptory mohou také hrát určitou roli v protekci srdce zprostředkované IPC [132]. KOR jsou zapojeny v kardioprotektivních účincích vlivem IPC. Na rozdíl od DOR, které zmírňují pouze výskyt arytmií, KOR zmírňují výskyt komorových arytmií i infarktu. Signálizace KOR zmírňující výskyt infarktu je

vedena přes aktivaci PKC a ATP závislých K^+ kanálů umístěných na sarkolemě nebo na mitochondriích. PKC se neúčastní anti-arytmického působení aktivovaných KOR. Kardioprotektivní účinek DOR je spojen s aktivací PKC a ATP závislých K^+ kanálů [133].

Dlouhodobější kardiovaskulární změny zahrnují souhru mezi expresí OR a srdeční funkcí. Je zjištěno, že opioidní systém na srdci je ovlivněn hypertenzí. Například studie samovolně hypertenzních potkanů ukázaly nárůst srdečních KOR [99]. U hypertenzních potkanů byla také pozorována snížená schopnost KOR inhibovat β -AR zprostředkovaný příjem kalcia [134]. Jelikož jsou OR zapojeny do modulace srdečního tlaku, naskytuje se zde možnost jejich využití.

5 Závěr

Opioidní receptory mají významnou roli v normálním i selhávajícím srdci. Na srdci mohou být exprimovány všechny čtyři typy OR, přičemž MOR mají pouze velmi nízké zastoupení a nezastávají tedy zřejmě žádné důležité funkce v regulaci srdce. Hlavní funkcí DOR a KOR v neselhávajícím srdci je podnícení negativního inotropního účinku, tedy opačného účinku než mají β -AR. Funkce srdečních NOP-R není zatím známa a zajímavostí je, že prekurzor ligandů pro tento typ receptoru není na srdci tvořen. Role OR v selhávajícím srdci je spjata s AR, resp. s β_1 -AR, kde OR blokují efekt těchto receptorů. Výsledkem je anti-apoptický efekt OR. Prozkoumaný je vliv OR na ischemii, kde tyto receptory zastávají ochrannou roli pomocí tzv. ischemického preconditioningu. Byl pozorován i určitý vliv hypertrofie na OR, kde se naskytuje možnost jejich využití.

Obecně lze říci, že funkce OR na srdci není zatím zcela prozkoumána a je známa pouze malá část. Důvodem může být nízká hustota OR v myokardu, resp. nedostatečná citlivost dostupných metod. V opioidním systému se objevují mezidruhové i individuální rozdíly, což celý výzkum sťažuje. Přesto je zřejmé, že OR mohou hrát důležitou roli v patologii srdečního onemocnění. Podrobná znalost funkcí a vlastností opioidního systému je významná nejen z hlediska používání opioidů v tlumení bolesti, ale v budoucnosti může být užitečná také v oblasti kardiologie vzhledem k potenciálnímu zapojení tohoto systému v kardiprotektivních mechanismech.

Seznam použité literatury

- [1] J.E. Schultz, A.K. Hsu, G.J. Gross, Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart, *Circ Res*, 78 (1996) 1100-1104.
- [2] R.P. Ahlquist, A study of the adrenergic receptors, *Am J Physiol*, 153 (1948) 586-600.
- [3] O.E. Brodde, H. Bruck, K. Leineweber, Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance, *J Pharmacol Sci*, 100 (2006) 323-337.
- [4] O.E. Brodde, M.C. Michel, Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart, *Pharmacol Rev*, 51 (1999) 651-690.
- [5] B.L. Gerhardstein, T.S. Puri, A.J. Chien, M.M. Hosey, Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels, *Biochemistry*, 38 (1999) 10361-10370.
- [6] M. Kuschel, Y.Y. Zhou, H. Cheng, S.J. Zhang, Y. Chen, E.G. Lakatta, R.P. Xiao, G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling, *J Biol Chem*, 274 (1999) 22048-22052.
- [7] C. Communal, K. Singh, D.B. Sawyer, W.S. Colucci, Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein, *Circulation*, 100 (1999) 2210-2212.
- [8] J.D. Port, M.R. Bristow, Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure, *J Mol Cell Cardiol*, 33 (2001) 887-905.
- [9] C. Gauthier, G. Tavernier, F. Charpentier, D. Langin, H. Le Marec, Functional beta3-adrenoceptor in the human heart, *J Clin Invest*, 98 (1996) 556-562.
- [10] C. Gauthier, V. Leblais, L. Kobzik, J.N. Trochu, N. Khandoudi, A. Bril, J.L. Balligand, H. Le Marec, The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle, *J Clin Invest*, 102 (1998) 1377-1384.
- [11] B. Rozec, C. Gauthier, beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies, *Pharmacol Ther*, 111 (2006) 652-673.
- [12] A.D. Strosberg, F. Pietri-Rouxel, Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor, *Trends Pharmacol Sci*, 17 (1996) 373-381.

- [13] G. Wallukat, The beta-adrenergic receptors, *Herz*, 27 (2002) 683-690.
- [14] J.L. Benovic, L.J. Pike, R.A. Cerione, C. Staniszewski, T. Yoshimasa, J. Codina, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein, *J Biol Chem*, 260 (1985) 7094-7101.
- [15] D. Wu, A. Katz, C.H. Lee, M.I. Simon, Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family, *J Biol Chem*, 267 (1992) 25798-25802.
- [16] K.B. Hubbard, J.R. Hepler, Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins, *Cell Signal*, 18 (2006) 135-150.
- [17] D.L. Luo, J. Gao, X.M. Lan, G. Wang, S. Wei, R.P. Xiao, Q.D. Han, Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in alpha1-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy, *Acta Pharmacol Sin*, 27 (2006) 895-900.
- [18] K. Hu, S. Nattel, Mechanisms of ischemic preconditioning in rat hearts. Involvement of alpha 1B-adrenoceptors, pertussis toxin-sensitive G proteins, and protein kinase C, *Circulation*, 92 (1995) 2259-2265.
- [19] T.D. O'Connell, S. Ishizaka, A. Nakamura, P.M. Swigart, M.C. Rodrigo, G.L. Simpson, S. Cotecchia, D.G. Rokosh, W. Grossman, E. Foster, P.C. Simpson, The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse, *J Clin Invest*, 111 (2003) 1783-1791.
- [20] L. Turnbull, D.T. McCloskey, T.D. O'Connell, P.C. Simpson, A.J. Baker, Alpha 1-adrenergic receptor responses in alpha 1AB-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284 (2003) H1104-1109.
- [21] J.B. Morris, H. Huynh, O. Vasilevski, E.A. Woodcock, Alpha1-adrenergic receptor signaling is localized to caveolae in neonatal rat cardiomyocytes, *J Mol Cell Cardiol*, 41 (2006) 17-25.
- [22] C.D. Wright, Q. Chen, N.L. Baye, Y. Huang, C.L. Healy, S. Kasinathan, T.D. O'Connell, Nuclear alpha1-adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes, *Circ Res*, 103 (2008) 992-1000.

- [23] B.C. Jensen, P.M. Swigart, M.E. Laden, T. DeMarco, C. Hoopes, P.C. Simpson, The alpha-1D Is the predominant alpha-1-adrenergic receptor subtype in human epicardial coronary arteries, *J Am Coll Cardiol*, 54 (2009) 1137-1145.
- [24] T. Skomedal, K. Borthne, H. Aass, O. Geiran, J.B. Osnes, Comparison between alpha-1 adrenoceptor-mediated and beta adrenoceptor-mediated inotropic components elicited by norepinephrine in failing human ventricular muscle, *J Pharmacol Exp Ther*, 280 (1997) 721-729.
- [25] M. Loubani, M. Galinanes, alpha1-Adrenoceptors during simulated ischemia and reoxygenation of the human myocardium: effect of the dose and time of administration, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 122 (2001) 103-112.
- [26] L.C. Rump, G. Riera-Knorrenschild, E. Schwertfeger, C. Bohmann, G. Spillner, P. Schollmeyer, Dopaminergic and alpha-adrenergic control of neurotransmission in human right atrium, *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 (1995) 462-470.
- [27] X. Han, L. Kobzik, D. Severson, Y. Shimoni, Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node, *J Physiol*, 509 (Pt 3) (1998) 741-754.
- [28] S. Dhein, C.J. van Koppen, O.E. Brodde, Muscarinic receptors in the mammalian heart, *Pharmacol Res*, 44 (2001) 161-182.
- [29] H. Wang, H. Han, L. Zhang, H. Shi, G. Schram, S. Nattel, Z. Wang, Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart, *Mol Pharmacol*, 59 (2001) 1029-1036.
- [30] L.S. Sun, F. Huber, R.B. Robinson, J.P. Bilezikian, S.F. Steinberg, Y. Vulliemoz, Muscarinic receptor heterogeneity in neonatal rat ventricular myocytes in culture, *J Cardiovasc Pharmacol*, 27 (1996) 455-461.
- [31] M. Bunemann, K.B. Lee, R. Pals-Rylaarsdam, A.G. Roseberry, M.M. Hosey, Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system, *Annu Rev Physiol*, 61 (1999) 169-192.
- [32] R.J. Lefkowitz, G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization, *J Biol Chem*, 273 (1998) 18677-18680.

- [33] L. Kallal, A.W. Gagnon, R.B. Penn, J.L. Benovic, Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor, *J Biol Chem*, 273 (1998) 322-328.
- [34] H.A. Rockman, W.J. Koch, R.J. Lefkowitz, Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function, *Nature*, 415 (2002) 206-212.
- [35] A.J. Morris, C.C. Malbon, Physiological regulation of G protein-linked signaling, *Physiol Rev*, 79 (1999) 1373-1430.
- [36] A.B. Brian M. Cox, Girolamo Caló, Charles Chavkin, MacDonald J. Christie, Olivier Civelli, Lakshmi A. Devi, Christopher Evans, Volker Höllt, Graeme Henderson, Brigitte Kieffer, Ian Kitchen, Mary-Jeanne Kreek, Lee-Yuan Liu-Chen, Jean-Claude Meunier, Philip S. Portoghese, Toni S. Shippenberg, Eric J. Simon, Lawrence Toll, John R. Traynor, Hiroshi Ueda, Yung H. Wong., Opioid receptors, in: IUPHAR database (IUPHAR-DB), Vol. 2011(IUPHAR database (IUPHAR-DB)).
- [37] M. Satoh, M. Minami, Molecular pharmacology of the opioid receptors, *Pharmacol Ther*, 68 (1995) 343-364.
- [38] C. Mollereau, M. Parmentier, P. Mailleux, J.L. Butour, C. Moisand, P. Chalon, D. Caput, G. Vassart, J.C. Meunier, ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization, *FEBS Lett*, 341 (1994) 33-38.
- [39] A.D. Corbett, G. Henderson, A.T. McKnight, S.J. Paterson, 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail, *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1 (2006) S153-162.
- [40] B.A. Levac, B.F. O'Dowd, S.R. George, Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units, *Curr Opin Pharmacol*, 2 (2002) 76-81.
- [41] M. Waldhoer, S.E. Bartlett, J.L. Whistler, Opioid receptors, *Annu Rev Biochem*, 73 (2004) 953-990.
- [42] K. Raynor, H. Kong, Y. Chen, K. Yasuda, L. Yu, G.I. Bell, T. Reisine, Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors, *Mol Pharmacol*, 45 (1994) 330-334.
- [43] E. Podstawka-Proniewicz, M. Kosior, Y. Kim, K. Rolka, L.M. Proniewicz, Nociceptin and its natural and specifically-modified fragments: Structural studies, *Biopolymers*, 93 (2010) 1039-1054.

- [44] R. Guerrini, G. Calo, A. Rizzi, R. Bigoni, D. Rizzi, D. Regoli, S. Salvadori, Structure-activity relationships of nociceptin and related peptides: comparison with dynorphin A, *Peptides*, 21 (2000) 923-933.
- [45] G. Wittert, P. Hope, D. Pyle, Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat, *Biochem Biophys Res Commun*, 218 (1996) 877-881.
- [46] P. Joost, A. Methner, Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands, *Genome Biol*, 3 (2002) RESEARCH0063.
- [47] C.K. Surratt, W.R. Adams, G protein-coupled receptor structural motifs: relevance to the opioid receptors, *Curr Top Med Chem*, 5 (2005) 315-324.
- [48] Y. Chen, A. Mestek, J. Liu, L. Yu, Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors, *Biochem J*, 295 (Pt 3) (1993) 625-628.
- [49] J. Meunier, L. Mouldous, C.M. Topham, The nociceptin (ORL1) receptor: molecular cloning and functional architecture, *Peptides*, 21 (2000) 893-900.
- [50] F.A. Abdulla, P.A. Smith, Nociceptin inhibits T-type Ca²⁺ channel current in rat sensory neurons by a G-protein-independent mechanism, *J Neurosci*, 17 (1997) 8721-8728.
- [51] K. Scheffzek, M.R. Ahmadian, GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery, *Cell Mol Life Sci*, 62 (2005) 3014-3038.
- [52] K.M. Standifer, G.C. Rossi, G.W. Pasternak, Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits, *Mol Pharmacol*, 50 (1996) 293-298.
- [53] P. Sanchez-Blazquez, M. Rodriguez-Diaz, I. DeAntonio, J. Garzon, Endomorphin-1 and endomorphin-2 show differences in their activation of mu opioid receptor-regulated G proteins in supraspinal antinociception in mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 291 (1999) 12-18.
- [54] K. Yasuda, K. Raynor, H. Kong, C.D. Breder, J. Takeda, T. Reisine, G.I. Bell, Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993) 6736-6740.

- [55] M. Tallent, M.A. Dichter, G.I. Bell, T. Reisine, The cloned kappa opioid receptor couples to an N-type calcium current in undifferentiated PC-12 cells, *Neuroscience*, 63 (1994) 1033-1040.
- [56] E.T. Piros, P.L. Prather, P.Y. Law, C.J. Evans, T.G. Hales, Voltage-dependent inhibition of Ca²⁺ channels in GH3 cells by cloned mu- and delta-opioid receptors, *Mol Pharmacol*, 50 (1996) 947-956.
- [57] R.J. Spencer, W. Jin, S.A. Thayer, S. Chakrabarti, P.Y. Law, H.H. Loh, Mobilization of Ca²⁺ from intracellular stores in transfected neuro2a cells by activation of multiple opioid receptor subtypes, *Biochem Pharmacol*, 54 (1997) 809-818.
- [58] D.J. Henry, D.K. Grandy, H.A. Lester, N. Davidson, C. Chavkin, Kappa-opioid receptors couple to inwardly rectifying potassium channels when coexpressed by *Xenopus oocytes*, *Mol Pharmacol*, 47 (1995) 551-557.
- [59] D.C. New, Y.H. Wong, The ORL1 receptor: molecular pharmacology and signalling mechanisms, *Neurosignals*, 11 (2002) 197-212.
- [60] J.F. Kuo, P. Greengard, Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. 8. An assay method for the measurement of adenosine 3',5'-monophosphate in various tissues and a study of agents influencing its level in adipose cells, *J Biol Chem*, 245 (1970) 4067-4073.
- [61] Y. Ishikawa, C.J. Homcy, The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction, *Circ Res*, 80 (1997) 297-304.
- [62] K.M. Standifer, G.W. Pasternak, G proteins and opioid receptor-mediated signalling, *Cell Signal*, 9 (1997) 237-248.
- [63] F.R. McKenzie, G. Milligan, Delta-opioid-receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase is transduced specifically by the guanine-nucleotide-binding protein Gi2, *Biochem J*, 267 (1990) 391-398.
- [64] B.D. Carter, F. Medzihradsky, Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993) 4062-4066.
- [65] P. Minoia, R.L. Sciorsci, Metabolic control through L calcium channel, PKC and opioid receptors modulation by an association of naloxone and calcium salts, *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 1 (2001) 131-137.

- [66] A. Kovoov, V. Nappey, B.L. Kieffer, C. Chavkin, Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes, *J Biol Chem*, 272 (1997) 27605-27611.
- [67] A.K. Finn, J.L. Whistler, Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal, *Neuron*, 32 (2001) 829-839.
- [68] V.C. Dang, J.T. Williams, Morphine-Induced mu-opioid receptor desensitization, *Mol Pharmacol*, 68 (2005) 1127-1132.
- [69] P. Penela, C. Ribas, F. Mayor, Jr., Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases, *Cell Signal*, 15 (2003) 973-981.
- [70] J. Zhang, S.S. Ferguson, L.S. Barak, S.R. Bodduluri, S.A. Laporte, P.Y. Law, M.G. Caron, Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 7157-7162.
- [71] A. Hasbi, J. Polastron, S. Allouche, L. Stanasila, D. Massotte, P. Jauzac, Desensitization of the delta-opioid receptor correlates with its phosphorylation in SK-N-BE cells: involvement of a G protein-coupled receptor kinase, *J Neurochem*, 70 (1998) 2129-2138.
- [72] S.S. Taylor, J. Yang, J. Wu, N.M. Haste, E. Radzio-Andzelm, G. Anand, PKA: a portrait of protein kinase dynamics, *Biochim Biophys Acta*, 1697 (2004) 259-269.
- [73] S. Chakrabarti, P.Y. Law, H.H. Loh, Distinct differences between morphine- and [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]-enkephalin-mu-opioid receptor complexes demonstrated by cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation, *J Neurochem*, 71 (1998) 231-239.
- [74] Z. Wang, W. Sadee, Tolerance to morphine at the mu-opioid receptor differentially induced by cAMP-dependent protein kinase activation and morphine, *Eur J Pharmacol*, 389 (2000) 165-171.
- [75] A.W. Poole, G. Pula, I. Hers, D. Crosby, M.L. Jones, PKC-interacting proteins: from function to pharmacology, *Trends Pharmacol Sci*, 25 (2004) 528-535.
- [76] E.A. Johnson, S. Oldfield, E. Braksator, A. Gonzalez-Cuello, D. Couch, K.J. Hall, S.J. Mundell, C.P. Bailey, E. Kelly, G. Henderson, Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells, *Mol Pharmacol*, 70 (2006) 676-685.

- [77] T. Koch, T. Krosiak, M. Averbeck, P. Mayer, H. Schroder, E. Raulf, V. Holtt, Allelic variation S268P of the human mu-opioid receptor affects both desensitization and G protein coupling, *Mol Pharmacol*, 58 (2000) 328-334.
- [78] A.R. Burt, I.C. Carr, I. Mullaney, N.G. Anderson, G. Milligan, Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse delta opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation, *Biochem J*, 320 (Pt 1) (1996) 227-235.
- [79] H. Schmidt, S. Schulz, M. Klutzny, T. Koch, M. Handel, V. Holtt, Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the mu-opioid receptor in HEK 293 cells, *J Neurochem*, 74 (2000) 414-422.
- [80] D.R. Thakker, K.M. Standifer, Induction of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3 contributes to the cross-talk between mu and ORL1 receptors following prolonged agonist exposure, *Neuropharmacology*, 43 (2002) 979-990.
- [81] A. Claing, S.A. Laporte, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins, *Prog Neurobiol*, 66 (2002) 61-79.
- [82] T. Koch, A. Widera, K. Bartsch, S. Schulz, L.O. Brandenburg, N. Wundrack, A. Beyer, G. Grecksch, V. Holtt, Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance, *Mol Pharmacol*, 67 (2005) 280-287.
- [83] D.E. Keith, S.R. Murray, P.A. Zaki, P.C. Chu, D.V. Lissin, L. Kang, C.J. Evans, M. von Zastrow, Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization, *J Biol Chem*, 271 (1996) 19021-19024.
- [84] H. Haberstock-Debic, K.A. Kim, Y.J. Yu, M. von Zastrow, Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons, *J Neurosci*, 25 (2005) 7847-7857.
- [85] S. Schulz, D. Mayer, M. Pfeiffer, R. Stumm, T. Koch, V. Holtt, Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375, *EMBO J*, 23 (2004) 3282-3289.
- [86] T. Koch, D.F. Wu, L.Q. Yang, L.O. Brandenburg, V. Holtt, Role of phospholipase D2 in the agonist-induced and constitutive endocytosis of G-protein coupled receptors, *J Neurochem*, 97 (2006) 365-372.

- [87] T. Koch, L.O. Brandenburg, S. Schulz, Y. Liang, J. Klein, V. Holtt, ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D2 activation is required for agonist-induced mu-opioid receptor endocytosis, *J Biol Chem*, 278 (2003) 9979-9985.
- [88] M. Tanowitz, M. von Zastrow, A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors, *J Biol Chem*, 278 (2003) 45978-45986.
- [89] L. He, J.L. Whistler, An opiate cocktail that reduces morphine tolerance and dependence, *Curr Biol*, 15 (2005) 1028-1033.
- [90] N. Yabaluri, F. Medzihradsky, Down-regulation of mu-opioid receptor by full but not partial agonists is independent of G protein coupling, *Mol Pharmacol*, 52 (1997) 896-902.
- [91] J.E. Zadina, A.J. Kastin, L.M. Harrison, L.J. Ge, S.L. Chang, Opiate receptor changes after chronic exposure to agonists and antagonists, *Ann N Y Acad Sci*, 757 (1995) 353-361.
- [92] M.B. Patel, C.N. Patel, V. Rajashekara, B.C. Yoburn, Opioid agonists differentially regulate mu-opioid receptors and trafficking proteins in vivo, *Mol Pharmacol*, 62 (2002) 1464-1470.
- [93] A. Duttaroy, B.C. Yoburn, The effect of intrinsic efficacy on opioid tolerance, *Anesthesiology*, 82 (1995) 1226-1236.
- [94] P.S. Puttfarcken, B.M. Cox, Morphine-induced desensitization and down-regulation at mu-receptors in 7315C pituitary tumor cells, *Life Sci*, 45 (1989) 1937-1942.
- [95] B.A. Gomes, J. Shen, K. Stafford, M. Patel, B.C. Yoburn, Mu-opioid receptor down-regulation and tolerance are not equally dependent upon G-protein signaling, *Pharmacol Biochem Behav*, 72 (2002) 273-278.
- [96] C. Ela, Y. Hasin, Y. Eilam, Opioid effects on contractility, Ca(2+)-transients and intracellular pH in cultured cardiac myocytes, *J Mol Cell Cardiol*, 25 (1993) 599-613.
- [97] C. Ventura, H. Spurgeon, E.G. Lakatta, C. Guarnieri, M.C. Capogrossi, Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca²⁺ release from an intracellular pool in myocytes and neurons, *Circ Res*, 70 (1992) 66-81.

- [98] F. Llobell, M.L. Laorden, Characterization of the opioid receptor subtypes mediating the negative inotropic effects of DAMGO, DPDPE and U-50, 488H in isolated human right atria strips, *Neuropeptides*, 29 (1995) 115-119.
- [99] R. Zimlichman, D. Gefel, H. Eliahou, Z. Matas, B. Rosen, S. Gass, C. Ela, Y. Eilam, Z. Vogel, J. Barg, Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats, *Circulation*, 93 (1996) 1020-1025.
- [100] B.P. Head, H.H. Patel, D.M. Roth, N.C. Lai, I.R. Niesman, M.G. Farquhar, P.A. Insel, G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes, *J Biol Chem*, 280 (2005) 31036-31044.
- [101] J. McDonald, A.D. Leonard, A. Serrano-Gomez, S.P. Young, J. Swanevelder, J.P. Thompson, D.G. Lambert, Assessment of nociceptin/orphanin FQ and micro-opioid receptor mRNA in the human right atrium, *Br J Anaesth*, 104 (2010) 698-704.
- [102] X. Yu, W. Zhang, J. Bian, T.M. Wong, Pro- and anti-arrhythmic effects of a kappa opioid receptor agonist: a model for the biphasic action of a local hormone in the heart, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26 (1999) 842-844.
- [103] W.M. Zhang, T.M. Wong, Suppression of cAMP by phosphoinositol/Ca²⁺ pathway in the cardiac kappa-opioid receptor, *Am J Physiol*, 274 (1998) C82-87.
- [104] J.S. Bian, J.M. Pei, C.S. Cheung, W.M. Zhang, T.M. Wong, kappa -opioid receptor stimulation induces arrhythmia in the isolated rat heart via the protein kinase C/Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾exchange pathway, *J Mol Cell Cardiol*, 32 (2000) 1415-1427.
- [105] X.C. Yu, H.Y. Li, H.X. Wang, T.M. Wong, U50,488H inhibits effects of norepinephrine in rat cardiomyocytes-cross-talk between kappa-opioid and beta-adrenergic receptors, *J Mol Cell Cardiol*, 30 (1998) 405-413.
- [106] R.P. Xiao, H.A. Spurgeon, M.C. Capogrossi, E.G. Lakatta, Stimulation of opioid receptors on cardiac ventricular myocytes reduces L type Ca²⁺ channel current, *J Mol Cell Cardiol*, 25 (1993) 661-666.
- [107] S. Pepe, R.P. Xiao, C. Hohl, R. Altschuld, E.G. Lakatta, 'Cross talk' between opioid peptide and adrenergic receptor signaling in isolated rat heart, *Circulation*, 95 (1997) 2122-2129.

- [108] S. Fujita, S.C. Smart, D.F. Stowe, Enhanced contractile responsiveness to cytosolic Ca(2+) by delta-2 opioid agonist deltorphin in intact guinea pig hearts, *J Mol Cell Cardiol*, 32 (2000) 1647-1659.
- [109] S. Laurent, J.D. Marsh, T.W. Smith, Enkephalins increase cyclic adenosine monophosphate content, calcium uptake, and contractile state in cultured chick embryo heart cells, *J Clin Invest*, 77 (1986) 1436-1440.
- [110] M. Dumont, S. Lemaire, Characterization of the high affinity [3H]nociceptin binding site in membrane preparations of rat heart: correlations with the non-opioid dynorphin binding site, *J Mol Cell Cardiol*, 30 (1998) 2751-2760.
- [111] H. Berger, E. Albrecht, G. Wallukat, M. Bienert, Antagonism by acetyl-RYYRIK-NH₂ of G protein activation in rat brain preparations and of chronotropic effect on rat cardiomyocytes evoked by nociceptin/orphanin FQ, *Br J Pharmacol*, 126 (1999) 555-558.
- [112] E. Hashiba, K. Hirota, T. Kudo, G. Calo, R. Guerrini, A. Matsuki, Effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands on blood pressure, heart rate, and plasma catecholamine concentrations in guinea pigs, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 367 (2003) 342-347.
- [113] M.A. Burmeister, M.A. Ansonoff, J.E. Pintar, D.R. Kapusta, Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ)-evoked bradycardia, hypotension, and diuresis are absent in N/OFQ peptide (NOP) receptor knockout mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 326 (2008) 897-904.
- [114] F. Fontana, P. Bernardi, C. Pizzi, S. Spampinato, A. Bedini, E.M. Pich, Plasma nociceptin/orphanin FQ levels rise after spontaneous episodes of angina, but not during induced myocardial ischemia, *Peptides*, 30 (2009) 1705-1709.
- [115] M. Dumont, S. Lemaire, Interactions of dynorphin A and related peptides with cardiac ouabain binding sites, *J Mol Cell Cardiol*, 28 (1996) 615-621.
- [116] S.M. Periyasamy, Inhibition of cardiac sarcolemmal Na⁺/H⁺ antiporter by opioids, *Can J Physiol Pharmacol*, 70 (1992) 1048-1056.
- [117] C. Ventura, L. Bastagli, P. Bernardi, C.M. Caldarera, C. Guarnieri, Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol, *Biochim Biophys Acta*, 987 (1989) 69-74.

- [118] S. Pepe, O.W. van den Brink, E.G. Lakatta, R.P. Xiao, Cross-talk of opioid peptide receptor and beta-adrenergic receptor signalling in the heart, *Cardiovasc Res*, 63 (2004) 414-422.
- [119] S.K. Paranthaman, F. Khan, Acute cardiomyopathy with recurrent pulmonary edema and hypotension following heroin overdose, *Chest*, 69 (1976) 117-119.
- [120] H.K. Hammond, Mechanisms for myocardial beta-adrenergic receptor desensitization in heart failure, *Circulation*, 87 (1993) 652-654.
- [121] Y. Himura, C.S. Liang, N. Imai, J.M. Delehanty, P.D. Woolf, W.B. Hood, Jr., Short-term effects of naloxone on hemodynamics and baroreflex function in conscious dogs with pacing-induced congestive heart failure, *J Am Coll Cardiol*, 23 (1994) 194-200.
- [122] S. Sakamoto, C.K. Stone, P.D. Woolf, C.S. Liang, Opiate receptor antagonism in right-sided congestive heart failure. Naloxone exerts salutary hemodynamic effects through its action on the central nervous system, *Circ Res*, 65 (1989) 103-114.
- [123] F. Llobel, M.L. Laorden, Effects of mu-, delta- and kappa-opioid antagonists in atrial preparations from nonfailing and failing human hearts, *Gen Pharmacol*, 28 (1997) 371-374.
- [124] M. Marmor, A. Penn, K. Widmer, R.I. Levin, R. Maslansky, Coronary artery disease and opioid use, *Am J Cardiol*, 93 (2004) 1295-1297.
- [125] Y.I. Hser, V. Hoffman, C.E. Grella, M.D. Anglin, A 33-year follow-up of narcotics addicts, *Arch Gen Psychiatry*, 58 (2001) 503-508.
- [126] D. Lloyd-Jones, R. Adams, M. Carnethon, G. De Simone, T.B. Ferguson, K. Flegal, E. Ford, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, G. Nichol, C. O'Donnell, V. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, R. Stafford, J. Steinberger, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. Wong, J. Wylie-Rosett, Y. Hong, Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation*, 119 (2009) 480-486.
- [127] W.H. Frishman, A. Del Vecchio, S. Sanal, A. Ismail, Cardiovascular manifestations of substance abuse: part 2: alcohol, amphetamines, heroin, cannabis, and caffeine, *Heart Dis*, 5 (2003) 253-271.

- [128] F. Tomai, F. Crea, A. Gaspardone, F. Versaci, A.S. Ghini, C. Ferri, G. Desideri, L. Chiariello, P.A. Gioffre, Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans, *J Am Coll Cardiol*, 33 (1999) 1863-1869.
- [129] J. Huh, G.J. Gross, H. Nagase, B.T. Liang, Protection of cardiac myocytes via delta(1)-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial K(ATP) channels, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280 (2001) H377-383.
- [130] S.F. Bolling, V. Badhwar, C.F. Schwartz, P.R. Oeltgen, K. Kilgore, T.P. Su, Opioids confer myocardial tolerance to ischemia: interaction of delta opioid agonists and antagonists, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 122 (2001) 476-481.
- [131] J.E. Schultz, A.K. Hsu, J.T. Barbieri, P.L. Li, G.J. Gross, Pertussis toxin abolishes the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in intact rat heart, *Am J Physiol*, 275 (1998) H495-500.
- [132] G.Y. Wang, S. Wu, J.M. Pei, X.C. Yu, T.M. Wong, Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280 (2001) H384-391.
- [133] A. Valtchanova-Matchouganska, J.A. Ojewole, Mechanisms of opioid delta (delta) and kappa (kappa) receptors' cardioprotection in ischaemic preconditioning in a rat model of myocardial infarction, *Cardiovasc J S Afr*, 14 (2003) 73-80.
- [134] X.C. Yu, H.X. Wang, W.M. Zhang, T.M. Wong, Cross-talk between cardiac kappa-opioid and beta-adrenergic receptors in developing hypertensive rats, *J Mol Cell Cardiol*, 31 (1999) 597-605.