

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyziologie

**Vliv morfinu na expresi a distribuci  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek  
heterotrimerních G-proteinů v myokardu potkana**

**Iveta Bartoňová**

Praha 2011

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odborné vedení a cenné rady při sepisování této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Neckářovi, Ph.D. za veškerou pomoc a ochotu při vypracování této práce.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně na základě studia literatury a konzultace se svým školitelem RNDr. Jiřím Novotným, DSc.

V Praze dne 25. 8. 2011

.....

Iveta Bartoňová

## ABSTRAKT

Morfin je klinicky velmi významná látka ze skupiny opioidů, která je pro své silné analgetické účinky používána zejména pro tlumení velkých bolestí. Opioidní receptory zprostředkující účinky morfinu interagují s G-proteiny třídy  $G_{i/o}$ . Opioidní receptory se mj. vyskytují také v srdeční tkáni, a morfin tedy může mít potenciálně vliv i na činnost tohoto orgánu. Cílem této diplomové práce bylo sledování důsledků chronického podávání morfinu na expresi a distribuci vybraných podjednotek heterotrimerních G-proteinů v myokardu potkana. Také byl zkoumán případný vliv dlouhodobého působení morfinu na odolnost myokardu vůči ischemickému poškození. Laboratorním potkanům kmene *Wistar* byl podáván morfin chronicky (1 mg/kg/den a 10 mg/kg/den) po dobu 10 nebo 28 dní. Kontrolním potkanům byl podáván fyziologický roztok. Dlouhodobé podávání morfinu neovlivnilo expresi podjednotek  $G_s\alpha$ ,  $G_i\alpha$ ,  $G_z\alpha$ ,  $G_{q/11}\alpha$  a  $G\beta$  proteinů, ale bylo zaznamenáno mírné snížení hladiny  $G_o\alpha$  proteinu. Výsledky dalších experimentů ukázaly, že dlouhodobé podávání vysokých dávek morfinu může vést ke snížení velikosti infarktu a frekvenci ischemických arytmií, v závislosti na jeho dávce a délce podávání.

Klíčová slova: morfin, myokard, opioidní receptor, podjednotky G-proteinů, infarkt.

## ABSTRACT

Morphine is a clinically very important drug from the opioid group that is used for treatment of severe pain because of its strong analgetic effect. Opioid receptors mediating the morphine effect interact with the  $G_{i/o}$  class of trimeric G-proteins. Opioid receptors also occur in heart tissue and morphine can thus potentially exercise its effect on the function of this organ. The major aim of this project was to pursue consequences of long-term treatment with morphine on expression and distribution of selected heterotrimeric G-protein subunits in the rat heart. Potential cardioprotective effects of this drug have also been studied. Laboratory rats of the *Wistar* strain were treated with morphine (1 mg/kg/day or 10 mg/kg/day) for 10 or 28 days. The control group was treated with saline solution. Prolonged treatment with morphine did not cause any effects on  $G_s\alpha$ ,  $G_i\alpha$ ,  $G_z\alpha$ ,  $G_{q/11}\alpha$ ,  $G\beta$  subunits, but the expression of  $G_o\alpha$  rather decreased. The results of subsequent experiments showed that prolonged administration of high doses of morphine may reduce the area affected by infarction and reduced the frequency of ventricle arrhythmias depending on dose and duration of morphine administration.

Key words: morphine, myocardium, opioid receptor, G-protein subunits, infarction.

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>8</b>
<b>1. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>10</b>
1.1 Receptory spřažené s G-proteiny .....	10
1.1.1 Opioidní receptory .....	11
1.1.2 Typy opioidních receptorů .....	12
1.1.3 Signalizace opioidních receptorů .....	13
1.2 Heterotrimerní G-proteiny .....	14
1.2.1 Klasifikace heterotrimerních G-proteinů .....	16
1.3 Efektory.....	19
1.3.1 Adenylylcykláza .....	19
1.3.2 Fosfolipáza C $\beta$ .....	20
1.3.3 Iontové kanály .....	20
1.4 Desenzitizace .....	21
1.5 Opioidy.....	22
1.5.1 Opioidy jako analgetika .....	23
1.5.2 Morfin.....	23
1.6 Ischemie.....	25
1.7 Kardioprotekce .....	26
1.7.1 Ischemický <i>preconditioning</i> .....	26
<b>2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>29</b>
3.1 Chemikálie a materiál .....	29
3.2 Experimentální model .....	29
3.2.1 Model srdce <i>in situ</i> .....	30
3.3 Stanovení velikosti infarktu .....	30
3.4 Homogenizace a frakcionace myokardu na Percollovém gradientu.....	31
3.5 Izolace membránové frakce a cytosolu .....	32
3.6 Stanovení proteinů (BCA) .....	32
3.7 SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) .....	33
3.8 Přenos proteinů na nitrocelulóзовou membránu a imunodetekce .....	35

3.9	Vyhodnocení a prezentace výsledků .....	37
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
4.1	Vliv chronicky podávaného morfinu na expresi a distribuci podjednotek G-proteinů v myokardu potkana.....	41
4.2	Vliv chronicky podávaného morfinu na odolnost myokardu .....	49
4.2.1	Velikost infarktu .....	49
4.2.2	Ischemické arytmie .....	49
<b>5.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>57</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	adenylylcykláza
ADP	adenozindifosfát
APS	persíran amonný
ATP	adenozintrifosfát
$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenergní receptor
BSA	hovězí sérový albumin
C	kontrolní skupina potkanů
CaM	kalmodulin dependentní kináza
cAMP	3', 5'-cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenáza
DADLE	([D-Ala <sup>2</sup> , D-Leu <sup>5</sup> ]-enkefalin)
DAG	diacylglycerol
DAMGO	([D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> , Gly-ol]-enkefalin)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOR	$\delta$ opioidní receptor
DPDPE	([D-Pen <sup>2</sup> , D-Pen <sup>5</sup> ]-enkefalin)
ECL	chemiluminiscence
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GDP	guanozindifosfát
GIRK	G-proteinem aktivovaný dovnitř usměřující K <sup>+</sup> kanál
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
G-proteiny	heterotrimerní GTP-vazebné proteiny
GRK	proteinkinázy receptorů spřažených s G-proteiny
GTP	guanozintrifosfát



G <sub>x</sub> α	α podjednotka příslušného G-proteinu
IP <sub>3</sub>	inozitol-1, 4, 5- trifosfát
IPC	ischemický preconditioning
K <sub>ATP</sub>	ATP závislý draselný kanál
KOR	κ opioidní receptor
M	morfinem ovlivněná skupina potkanů
MAPK	mitogenem aktivována proteinkináza
MOR	μ opioidní receptor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
OR	opioindní receptor
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylozitol-4, 5-bisfosfát
PI3	fosfatidylozitol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
RGS	regulátory G-proteinové signalizace
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	sodiumdodecylsulfát
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
SLB	Laemmliho vzorkový pufr
TBS	trisový pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-1,2-diaminomethan
TM	transmembránový segment receptoru
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	polyoxyethylensorbitan monolaurát

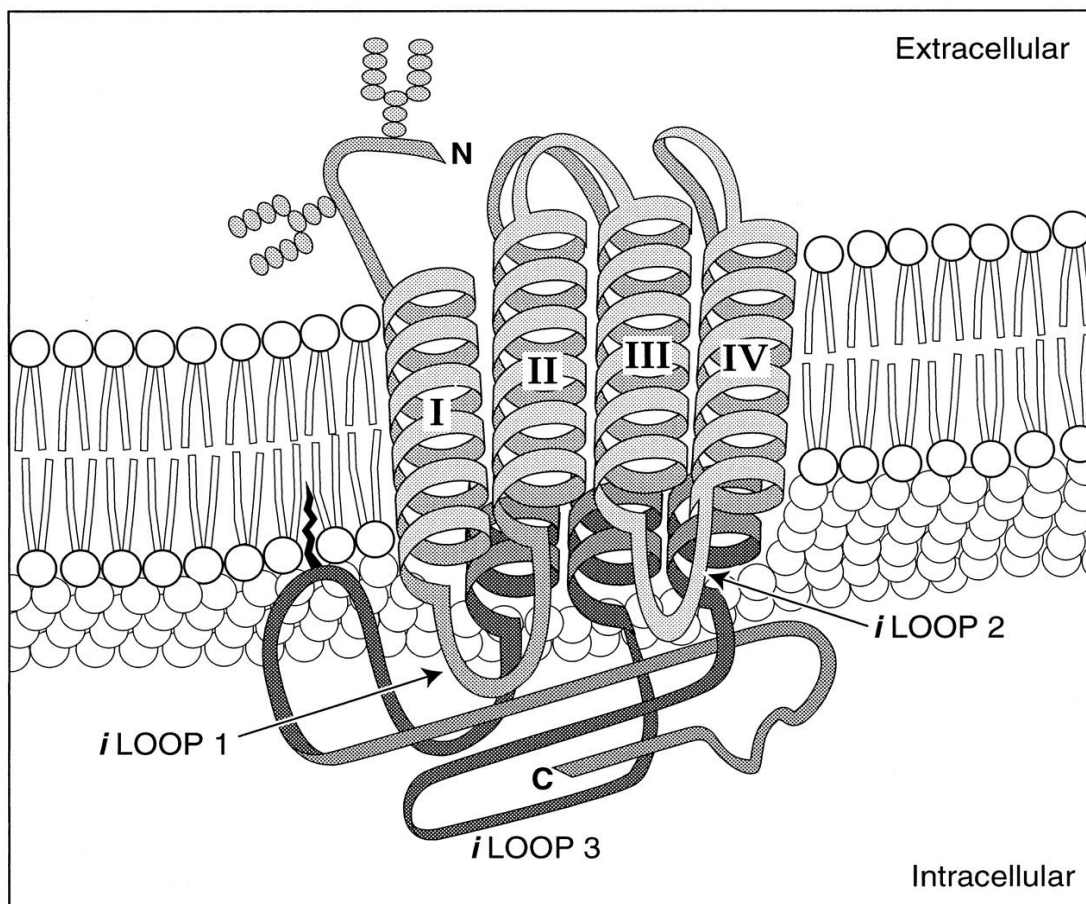
# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Receptory spřažené s G-proteiny

Receptory spřažené s heterotrimerními GTP vazebnými proteiny (angl. *G-protein coupled receptors*; GPCR) tvoří nejpočetnější skupinu membránových receptorů. Geny kódující GPCR zahrnují přibližně 1 % savčího genomu, a proto tedy představují nejrozsáhlejší skupinu bílkovin (Breitwieser, 2004). Jedná se o skupinu receptorů, které odpovídají na rozmanité signální molekuly (ligandy) v živém organismu, mezi které patří hormony, neurotransmitery, neuropeptidy, glykoproteiny. Dále sem patří i sensorické receptory pro fotony, odoranty a tastanty (Lefkowitz, 2004; Morris a Malbon, 1999). Extracelulární signály jsou z těchto receptorů přenášeny do buňky heterotrimerními G-proteiny na různé efekторы, jako např. adenylcyklázy, fosfodiesterázy, fosfolipázy a různé iontové kanály (Gilman, 1987; Morris a Malbon, 1999).

Receptory spřažené s G-proteiny mají jednotnou strukturu (Obr. 1). Tyto transmembránové proteiny obsahují sedm hydrofobních domén (TM I - TM VII), které procházejí lipidovou dvojvrstvou plazmatické membrány. Mají strukturu  $\alpha$ -helixů spojených třemi extracelulárními (EL1, EL2, EL3) a třemi intracelulárními smyčkami (IL1, IL2, IL3). Jejich N-koncová doména je orientována extracelulárně, která je obvykle glykosylována. Zatímco C-koncová doména směřuje do nitra buňky, kde může být fosforylována na zbytcích aminokyselin serinu nebo threoninu (Morris a Malbon, 1999).

Oblasti intracelulární smyčky IL2, IL3 a část C-konce molekuly receptoru jsou nezbytné pro interakci G-proteinů (Moro *et al.*, 1993). Interakce G-proteinu s receptorem může být inhibována buď pertussis toxinem nebo také mutací karboxylového konce  $G\alpha$  podjednotky (Neer, 1994).



**Obr. 1.: Struktura GPCR**

I - VII (V, VI, VII v pozadí) - transmembránové domény; C - cytoplazmatický C-konec; N - extracelulární N-konec; iLOOP 1 - 3 - intracelulární smyčky.

Upraveno podle Morris (1999).

### 1.1.1 Opioidní receptory

V savčím organismu se nacházejí tři hlavní typy opioidních receptorů (OR):  $\mu$  (*mí*),  $\kappa$  (*kappa*) a  $\delta$  (*delta*) (Mansour *et al.*, 1995). Všechny opioidní receptory si jsou z 60 % sekvenčně podobné a jejich struktura byla rozluštěna až v roce 1992 pomocí myší deoxyribonukleové kyseliny cDNA (Przewlocki a Przewlocka, 2001). Jejich cDNA byla klonována (Satoh a Minami, 1995). Všechny tři typy opioidních receptorů mají vysokou afinitu k opioidním alkaloidům, např. morfinu a také relativně vysokou afinitu pro opioidního antagonistu naloxon (Connor a Christie, 1999). Lidské  $\mu$ ,  $\kappa$  a  $\delta$  opioidní receptorové geny jsou lokalizované na chromozómech 6q24-25, 1p34.3-36.1 a 8q11.2 (Satoh a Minami, 1995).

Všechny typy opioidních receptorů se vyskytují především v centrální nervové soustavě (CNS) (Gray *et al.*, 2006), ale také v jiných tkáních, jako např. v myokardu, ledvinách, plicích, tenkém a tlustém střevu (Wittert *et al.*, 1996). Zatímco lokalizační studie pro  $\kappa$  a  $\delta$  opioidní receptory potvrdily přítomnost těchto receptorů v myokardu, exprese  $\mu$  OR nebyla v srdeční tkáni prokázána. Ačkoli  $\mu$  opioidní receptory nebyly nalezeny přímo v buňkách srdeční tkáně (myocytech), mohou být přítomny v srdečních nervech nebo na endoteliálních buňkách srdečních cév a odtud regulovat srdeční funkci (Pugsley, 2002).

Bylo zjištěno, že opioidní receptory, stejně jako GPCR mají jednotnou strukturu (Blume *et al.*, 1979). Každý receptor je složen z extracelulárního N-konce a intracelulárního C-konce, sedmi transmembránových  $\alpha$ -helixů (TM), tří extracelulárních (EL) a tří intracelulárních smyček (IL) různé délky (Trescot *et al.*, 2008).

Na základě molekulární analýzy aminokyselinových sekvencí bylo prokázáno, že opioidní receptory patří do rodiny receptorů spřažených s heterotrimerní G-proteiny (GPCR), které interagují s pertussis toxin-senzitivními  $G_i/G_o$  proteiny. Nejčastěji popisovaným působením  $G_{i/o}$  proteinů je inhibice enzymu adenylcyklázy, aktivace draselných kanálů a inhibice napěťově ovládaných vápenatých kanálů. Tímto působením dochází k redukci buněčné excitability a ke snížení uvolňování neurotransmiterů (Satoh a Minami, 1995; Williams *et al.*, 2001). Aktivace opioidního receptoru má za následek membránovou hyperpolarizaci neuronů, tedy zvýšenou propustnost draslíku přes membránu a inhibici vzniku akčního potenciálu (Knapp *et al.*, 1995).

### 1.1.2 Typy opioidních receptorů

Každý ze základních typů opioidních receptorů má několik podtypů.

#### **DOR - $\delta$ opioidní receptor**

Tento typ opioidního receptoru má vysokou afinitu pro DADLE ([D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-enkefalin) a DPDPE ([D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-enkefalin) a na základě studií byly klasifikovány dva podtypy těchto OR:  $\delta_1$  a  $\delta_2$ . Největší koncentrace tohoto typu receptoru jsou v amygdale, paracortexu a *bulbus olfactorius* (Minami a Satoh, 1995).

### **MOR - $\mu$ opioidní receptor**

$\mu$  opioidní receptor se vyznačuje vysokou afinitou k morfinu, naloxonu, enkefalinu a DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkefalin). Vyskytuje se v centrálním nervovém systému (CNS) v oblastech předního mozku, středního mozku a zadního mozku. Jsou známy dva typy  $\mu$  receptorů:  $\mu_1$  a  $\mu_2$ . Avšak  $\mu_1$  receptor má vyšší afinitu k morfinu než  $\mu_2$  a je selektivně blokován naloxonem (Koneru *et al.*, 2009).

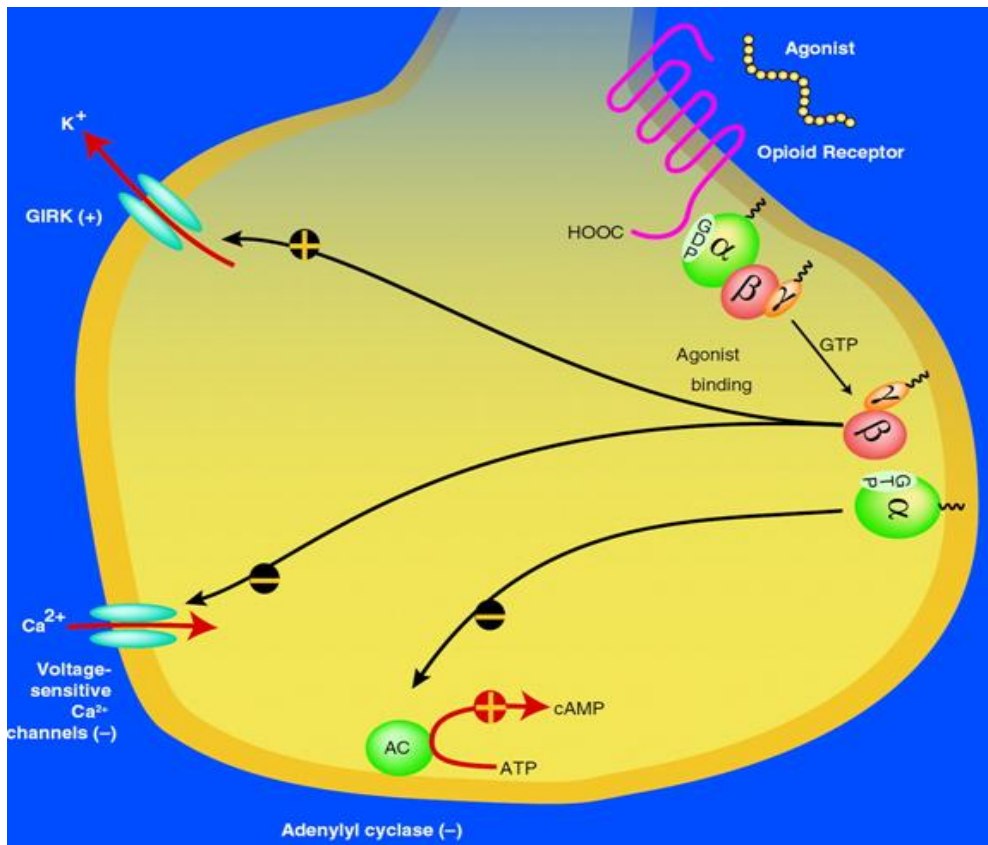
### **KOR - $\kappa$ opioidní receptor**

Kappa opioidní receptory mají vysokou afinitu pro dynorfin A, 488H, U50, U69 a 593. Tyto receptory se dělí do dvou podtříd:  $\kappa_1$  a  $\kappa_2$  (Satoh a Minami, 1995).

Byl také izolován čtvrtý opioidní receptor ORL1, který má vysokou afinitu k endogennímu agonistovi, nazývaným nociceptin (orphanin; FQ). ORL1 je geneticky úzce příbuzný k ostatním opioidním receptorům (Connor a Christie, 1999).

### **1.1.3 Signalizace opioidních receptorů**

Jak už bylo řečeno výše, opioidní receptory patří do skupiny receptorů spřažených s  $G_i/G_o$  proteiny. Vazebné místo pro nukleotidy na  $\alpha$  podjednotce G-proteinu je ve svém základním klidovém stavu obsazeno GDP. Vazba agonisty k opioidnímu receptoru má za následek konformační změnu receptoru, vedoucí k aktivaci G-proteinu třídy  $G_i/G_o$  (Obr. 2). To způsobí zvýšenou afinitu G-proteinu ke GTP a dojde k výměně GDP za GTP na vazebném místě  $G\alpha$  podjednotky. Vazba GTP mění konformaci G-proteinu a způsobuje oddělení  $G\alpha$  podjednotky od dimeru podjednotek  $G\beta\gamma$  (Bourne, 1997). Již volná  $G\alpha$  podjednotka pak interaguje např. s membránově vázanou molekulou adenylcyklázy, kterou inhibuje, čímž snižuje tvorbu cyklického 3', 5'-adenozinmonofosfátu (cAMP) v buňce. Působením  $G_i/G_o$  proteinů také dochází k aktivaci třídy  $K_{ir}^+$  selektivních iontových kanálů (dovnitř usměrňujících draselných kanálů; GIRK) nebo k inhibici napětově ovládaných vápenatých kanálů (Kreek a LaForge, 2007; Minami a Satoh, 1995). Obsazení opioidního receptoru agonistou tedy vede k řadě nitrobuněčných dějů a výsledná odezva závisí na expresi složek efektorových systémů v dané buňce.



**Obr. 2.: Mechanismus působení opioidů na buňku**

Stimulace opioidního receptoru agonistou umožňuje aktivaci G proteinů ze tříd  $G_i/G_o$ , které poté otevírají určité  $K^+$  kanály (GIRK) nebo uzavírají napěťově ovládané vápenaté kanály a inhibují aktivitu adenylylcyklázy (AC).

Upraveno podle Kreek (2007).

## 1.2 Heterotrimerní G-proteiny

Za objev G-proteinů a jejich úlohy v signálním buněčném procesu obdrželi v roce 1994 Alfred G. Gilman a Martin Rodbell Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu (<http://nobelprize.org>). G-proteiny nesou jméno podle toho, že mohou vázat guaninové nukleotidy, resp. GDP a GTP. Heterotrimerní G-proteiny fungují jako molekulární spínače a umožňují výrazné zesílení signálu (Novotny, 2006). Jediný komplex agonista - receptor může katalyzovat aktivaci i několika G-proteinů najednou a ty mohou v aktivovaném stavu stimulovat i několik efektorů. Mezi tyto efektory patří většinou enzymy, které produkují

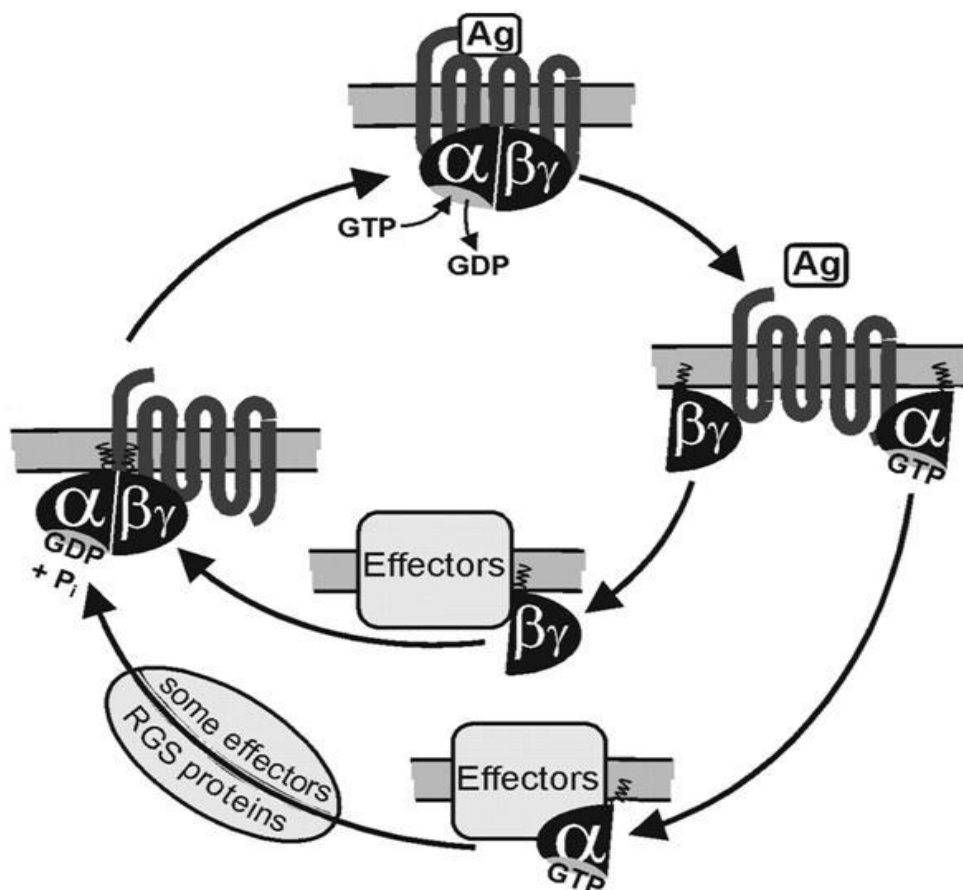
ve velkém množství nízkomolekulární látky tzv. druhé posly, jako např. cAMP, DAG, IP<sub>3</sub>. Úlohou těchto látek je zesílení přijatého informačního signálu a jeho rozšíření dále do nitra buňky.

Molekula G-proteinu je složena ze tří polypeptidových podjednotek označovaných jako  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Alfa podjednotka je největší (molekulová hmotnost asi 39 - 52 kDa) a charakterizuje celý G-protein. Pouze tato podjednotka je schopna vázat v závislosti na své konformaci GTP či GDP a zároveň vykazuje endogenní GTPázovou aktivitu (Hamm a Gilchrist, 1996; Neer, 1995).

G-proteiny cyklují mezi aktivním a inaktivním stavem právě díky molekule GTP (Obr. 3). Vazba GTP na G $\alpha$  podjednotku výměnou za GDP vede k její disociaci z trimeru, a tím k uvolnění dimeru G $\beta\gamma$ . Volná  $\alpha$  a  $\beta\gamma$  podjednotka G-proteinu může regulovat aktivitu cílových efektorů. Následující hydrolýza GTP zpět na GDP a anorganický fosfát navrátí G $\alpha$  podjednotku do základního stavu, který umožní reasociaci trimeru a systém je připraven k opakování cyklu iniciovaného stimulací příslušného receptoru (Wettschreck a Offermanns, 2005). Doba aktivity G-proteinů vyvolaná vytvořením jednoho komplexu ligandu s receptorem je přibližně 10 sekund.

Přestože jsou G-proteiny strukturálně heterotrimery (složené ze tří odlišných podjednotek), fungují v podstatě jako disociovatelné dimery, protože signál je přenášen buď G $\alpha$  podjednotkou a nebo G $\beta\gamma$  komplexem. Podjednotky G $\beta$  a G $\gamma$  existují jako pevně spojený komplex, který vystupuje jako funkční jednotka. Alfa podjednotky některých G-proteinů jsou modifikovány připojením myristové nebo palmitové kyseliny k N-konci jejich molekul, což přispívá k jejich vazbě k plazmatické membráně a usnadnění interakce s komplexem G $\beta\gamma$  podjednotek (Hamm a Gilchrist, 1996).

Dále byla prokázána existence tzv. RGS proteinů (regulátorů G-proteinové signalizace). Tyto proteiny mohou regulovat GTPázovou aktivitu G $\alpha$  podjednotky tak, že se na ni navážou a urychlují hydrolýzu navázaného GTP. Bylo zjištěno, že RGS proteiny mají podstatnou roli při ukončení buněčné signalizace vyvolané G-proteiny. Fungují tedy jako negativní regulátory GPCR signalizace (Hollinger a Hepler, 2002).



**Obr. 3.: Cyklus heterotrimerních G-proteinů**

Ag - agonista (ligand) GPCR;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  - podjednotky heterotrimerního G-proteinu; GDP - guanozindifosfát; GTP - guanozintrifosfát; effector - efektor; RGS - regulátory G-proteinové signalizace.

Upraveno podle Wettschureck (2005).

### 1.2.1 Klasifikace heterotrimerních G-proteinů

Pro identifikaci a charakterizaci G-proteinu je důležitá především jeho  $\alpha$  podjednotka. U savců kódují  $\alpha$  podjednotky 16 různých genů, vzniká dvacet nebo i více proteinů včetně těch, které jsou syntetizovány v důsledku alternativního sestřihu mRNA. Na základě sekvenční podobnosti  $\alpha$  podjednotek G-proteinů byly identifikovány čtyři třídy:  $G_{s/olf}$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  a  $G_{12/13}$  (Birnbauer *et al.*, 1990; Neves *et al.*, 2002).



### Třída $G_s/G_{olf}$

Tato třída G-proteinů obsahuje dva členy a to  $G_s\alpha$  a  $G_{olf}\alpha$ , jejich aminokyselinová sekvence se shoduje z 88 %. Tyto proteiny stimulují enzymovou aktivitu adenylcyklázy, a tím zvyšují produkci cAMP z ATP, který následně aktivuje specifickou proteinkinázu. Jsou citlivé vůči cholera toxinu (produkovaný bakterií *Vibrio cholerae*) (Morris a Malbon, 1999). Cholera toxin způsobuje ADP-ribozylaci  $\alpha$  podjednotky G-proteinu. Donorem ADP-ribozylové skupiny je  $NAD^+$  (nikotinamid adenin dinukleotid), který je připojen k aktivnímu místu argininového zbytku na substrátu. Tato modifikace inhibuje GTPázovou aktivitu  $G_s\alpha$  podjednotky, což způsobuje její trvalou aktivaci a v důsledku toho i zvýšenou aktivaci adenylcyklázy (Jones a Reed, 1989). Trvalá stimulace  $\alpha$  podjednotky G-proteinu střevního epitelu je například klíčovou reakcí v patogenezi cholery.

V důsledku alternativního štěpení jediného genu pro  $G_s\alpha$ , existují čtyři izoformy tohoto proteinu:  $G_{s1}\alpha$ ,  $G_{s2}\alpha$ ,  $G_{s3}\alpha$  a  $G_{s4}\alpha$  (Bray *et al.*, 1986). Isoformy  $G_{s1}\alpha$  a  $G_{s2}\alpha$  mají molekulovou hmotnost 52 kDa a označují se jako dlouhé izoformy ( $G_sL$ ). Isoformy  $G_{s3}\alpha$  a  $G_{s4}\alpha$  se nazývají krátké izoformy ( $G_sS$ ) a jejich molekulová hmotnost je 45 kDa (Bray *et al.*, 1986; Neer, 1995). Podjednotka  $\alpha$  z  $G_{olf}$  je exprimována výhradně v čichovém epitelu.

### Třída $G_i/G_o$

Tato třída G-proteinů zahrnuje tři izoformy  $G_i\alpha$  proteinů:  $G_{i1}\alpha$ ,  $G_{i2}\alpha$  a  $G_{i3}\alpha$ ; dvě izoformy  $G_o\alpha$ :  $G_{o1}\alpha$  a  $G_{o2}\alpha$ ; transduciny  $G_{t1}\alpha$  a  $G_{t2}\alpha$ , které jsou specificky exprimovány v tyčinkách a čípcích sítnice oka; G-protein chuťového epitelu gustducin  $G_{gust}\alpha$ ; a protein  $G_z\alpha$ . G-proteiny této třídy  $G_i/G_o$  interagují s  $\alpha_2$ -adrenergními, acetylcholinovými, opioidními ( $\mu$ ,  $\kappa$  a  $\delta$ ) a dalšími receptory. Jejich stimulace způsobuje inhibici enzymu adenylcyklázy a modulaci aktivity některých iontových kanálů (Minami a Satoh, 1995; Williams *et al.*, 2001).

Tyto proteiny s výjimkou  $G_z\alpha$  jsou substráty pro toxin dávivého kašle (pertussis toxin produkovaný bakterií *Bordetella pertussis*). Přitom dochází k ADP-ribozylaci cysteinového zbytku v blízkosti karboxylového konce  $G_i\alpha$  podjednotky, rozpřažení G-proteinu od aktivovaného receptoru a brání tak přenosu signálu (Homburger *et al.*, 1987).

$G_{i1}\alpha$ ,  $G_{i2}\alpha$  a  $G_{i3}\alpha$  proteiny jsou kódovány třemi příbuznými geny a jejich molekulová hmotnost je 40 - 41 kDa. Isoformy  $G_o\alpha$  jsou proteiny o velikosti 39 kDa, vyskytující se ve

velkém množství v mozku (tvoří až 1 – 2 % mozkových membránových bílkovin) (Morris a Malbon, 1999).

### **Třída $G_q/G_{11}$**

Do této třídy patří pět členů:  $G_q\alpha$ ,  $G_{11}\alpha$ ,  $G_{14}\alpha$ ,  $G_{15}\alpha$  a  $G_{16}\alpha$ , jehož hlavním efektem je fosfolipáza  $C\beta$ , která po aktivaci vytváří druhé posly inozitol-1, 4, 5-trifosfát ( $IP_3$ ) a diacylglycerol (DAG). Obecně jsou tyto receptory považovány za aktivační. Purifikací příslušných proteinů se ukázalo, že interakce proteinů z  $G_q/11$  třídy s fosfolipázami je přímá a pravděpodobně účastní se jí domény blízko karboxylového konce enzymů. G-proteiny této třídy nejsou citlivé k pertussis toxinu ani k cholera toxinu (Morris a Malbon, 1999).

### **Třída $G_{12}/G_{13}$**

Poslední třída G-proteinů obsahuje dva členy:  $G_{12}\alpha$  a  $G_{13}\alpha$ , které jsou rezistentní vůči pertussis a cholera toxinu. Tyto G-proteiny se účastní regulace antiportu  $Na^+/H^+$  a ovlivňují regulaci GTPázové aktivity malých G-proteinů z rodiny Rho, a to tím, že interagují s výměnným faktorem guaninových nukleotidů RhoGEF proteinem (Kurose, 2003; Simon *et al.*, 1991).

### **$G\beta\gamma$ komplex**

Logothetis a spol. podali první přesvědčivý důkaz o interakci  $G\beta\gamma$  komplexu s efektem a to tak, že detekovali pomocí  $G\beta\gamma$  dimeru aktivaci  $K^+$  kanálů v srdečních síňových myocytech. Přitom dochází k hyperpolarizaci kardiomyocytů a zpomalení srdeční frekvence (Logothetis *et al.*, 1987). Podjednotky  $G\beta\gamma$  tvoří stabilní heterodimer, který přímo reguluje aktivitu různých efektorů: fosfolipázy  $C\beta$ , adenylcyklázy, draselných kanálů a PI3 kinázy. Efektory nepřímo regulované prostřednictvím  $G\beta\gamma$  komplexu jsou G-proteiny patřící do rodiny Ras malých GTPáz (Neves *et al.*, 2002).

$G\beta$  podjednotky mají molekulovou hmotnost 36 kDa, zatímco  $G\gamma$  podjednotky jsou mnohem menší proteiny o velikosti 6 - 9 kDa.  $G\gamma$  podjednotka obsahuje ve své molekule rozpoznávací motiv pro prenylací, tj. navázání lipidů izoprenoidů, které umožňují interakci komplexu  $G\beta\gamma$  s  $G\alpha$  podjednotkami nebo s receptorem (Hamm a Gilchrist, 1996).

## 1.3 Efektory

$G\alpha$  a  $G\beta\gamma$  podjednotky heterotrimerních G-proteinů regulují aktivitu různých skupin efektorů. Mezi nejdůležitější efektory G-proteinů patří enzym adenylylcykláza, fosfolipáza  $C\beta$ , fosfolipáza  $A_2$ , cGMP fosfodiesteráza a iontové kanály (Morris a Malbon, 1999).

### 1.3.1 Adenylylcykláza

V současné době je známo devět membránově vázaných savčích izoform adenylylcykláz (AC I - IX) (Hurley, 1999). V myokardu je dominantní izoformou typ V a VI, pouze minoritně se může vyskytovat také typ IV a VII (Salazar *et al.*, 2007). Adenylylcyklázy se vyskytují i v jiných tkáních, jako např. v tkáni ledvin (AC IV, V, VII), jater (AC IV, VII), plic (AC II a VII) (Simonds, 1999).

Všechny zmíněné izoformy adenylylcykláz jsou stimulovány prostřednictvím  $G_s\alpha$  podjednotky. Také bylo zjištěno, že některé mohou být aktivovány  $G\beta\gamma$  dimerem, proteinkinázou C (PKC) nebo proteinem kalmodulinem. Naproti tomu G-proteiny třídy  $G_i/G_o$  inhibují enzym adenylylcyklázu typu I, III, V a VI, a tím snižují intracelulární hladinu cAMP a stupeň fosforylace cílových proteinů (Iyengar, 1993; Simonds, 1999).

$\beta$ -adrenergní receptory ( $\beta$ -AR) patří do rodiny GPCR a jsou klíčové pro regulaci srdeční činnosti (Morris a Malbon, 1999). Tyto receptory jsou spřaženy se stimulačními G-proteiny třídy  $G_s$ , je-li aktivovaná  $G_s\alpha$  podjednotka dochází ke stimulaci AC. Aktivovaný efektorový protein adenylylcykláza za přítomnosti  $Mg^{2+}$ -ATP katalyzuje přeměnu ATP na cyklický 3', 5'-adenozinmonofosfát (cAMP). Tento nitrobuněčný druhý posel je aktivátorem vysoce specifické cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA), což je serin/threonin kináza fosforující v myocytech řadu substrátů, čímž dochází ke zvýšení kontraktility srdce (Freedman a Lefkowitz, 2004; Morris a Malbon, 1999). Cyklický AMP je štěpen cAMP-fosfodiesterázou na AMP. Regulátorem aktivity AC je intracelulární vápník, jeho vysoká koncentrace inhibuje některé typy adenylylcykláz.

Některé studie naznačují, že u adenylylcyklázy typu V a VI při dlouhodobém podávání morfinu dochází ke zvýšení produkce intracelulárního cAMP, tzv. superaktivaci enzymové aktivity (Schallmach *et al.*, 2006; Watts, 2002), avšak na potkaním srdci nebyl tento fenomén

dosud sledován. Není ovšem vyloučeno, že k podobným jevům může docházet i v signálním systému AC v myokardu. Tato zvýšená aktivita adenyllycyklázy je pravděpodobně součástí odpovědi buňky na prodlouženou aktivaci inhibičních G-proteinů třídy  $G_i/G_o$  (Johnston a Watts, 2003). Zatímco dlouhodobé (chronické) působení morfinu zřejmě zvyšuje fosforylaci adenyllycyklázy, akutní působení opioidů je charakteristické poklesem hladiny cyklického AMP (vlivem  $G_i/G_o$  proteinů) (Watts, 2002).

### 1.3.2 Fosfolipáza $C\beta$

V savčích tkáních byly identifikovány tři typy fosfolipáz C (PLC):  $PLC\beta$ ,  $PLC\gamma$  a  $PLC\delta$ . Prostřednictvím heterotrimerních G-proteinů jsou aktivovány pouze PLC typu  $\beta$  (Toker, 1998). Receptory spřažené s G-proteiny třídy  $G_q$  aktivují izoformy  $PLC\beta$  pomocí nejen  $G\alpha$  podjednotky, ale také  $G\beta\gamma$  dimeru (Fukami, 2002).

Působením fosfolipáz  $C\beta$  v plazmatické membráně dochází k hydrolytickému štěpení fosfatidylinozitolu - 4, 5 - bisfosfátu ( $PIP_2$ ) na inozitol - 1, 4, 5 - trifosfát ( $IP_3$ ) a diacylglycerol (DAG). Solubilní molekula  $IP_3$  se váže na membránu endoplazmatického retikula, kde otvírá  $IP_3$  řízené vápenaté kanály. Otevření způsobí uvolnění  $Ca^{2+}$  do cytosolu a zvýšení nitrobuněčné koncentrace volných vápenatých iontů. Ty se váží na protein kalmodulin a tento komplex aktivuje specifické proteinkinázy, např. CaM (kalmodulin dependentní kináza). DAG zůstává vázaný v membráně, kde může aktivovat serin/threonin proteinkinázu C (PKC). Pro účinnou aktivaci PKC musí být také přítomny ionty  $Ca^{2+}$ , a PKC fosforyluje řadu cytoplazmatických i jaderných proteinů (Rebecchi a Pentyala, 2000; Toker, 1998).

### 1.3.3 Iontové kanály

Regulace iontových kanálů heterotrimerními G-proteiny se uskutečňuje jak nepřímo s pomocí druhých poslů, tak přímo, tj. interakcí s volnou  $G\alpha$  podjednotkou nebo  $G\beta\gamma$  dimerem. Některé G proteiny přímo, tedy bez účasti druhých poslů, regulují a mění činnost iontových kanálů v důsledku hormonální nebo neuropřenašečové aktivace receptorů. (Birnbaumer *et al.*, 1990; Morris a Malbon, 1999). Přímý účinek byl příkladně pozorován u některých  $Ca^{2+}$  a  $K^+$  kanálů v srdci a hladké svalovině.

## 1.4 Desenzitizace

Při opakované či dlouhodobé stimulaci GPCR hormonem dochází ke snížení buněčné odpovědi, tzv. desenzitizaci odpovědi na vyvolávající podnět. Tento mechanismus chrání buňky před nadměrným drážděním a případným poškozením (Freedman a Lefkowitz, 1996). Bylo prokázáno, že při dlouhodobější aktivaci transmembránových signálních kaskád může docházet i k buněčné redistribuci a případně celkovému úbytku (*down-regulaci*) heterotrimerních G-proteinů, které jsou v příslušném přenosu signálu zapojeny (Svoboda a Novotny, 2002). Studium G-proteinů bylo však v těchto souvislostech dosud věnováno málo pozornosti.

Proces desenzitizace se odehrává především na úrovni receptorů a také na úrovni G-proteinů (Pierce *et al.*, 2002). Lze rozlišit homologní a heterologní desenzitizaci. Homologní desenzitizace představuje mechanismus, kdy pouze agonistou okupovaný receptor je fosforylován a poté internalizován, což vede ke snížení odpovědi na následnou stimulaci agonisty tohoto receptoru. Při heterologní desenzitizaci dochází ke snížení odpovědi i u některých jiných receptorů (Pierce *et al.*, 2002).

Desenzitizace je iniciována fosforylací receptorů GRK (kinázami receptorů spřažených s G-proteiny) a následující vazbou arrestinů. Směřování všech GRK k buněčné membráně je zprostředkováno jejich C-terminální koncovou doménou. Nejvýznamnější srdeční GRK je GRK2, známý jako beta-adrenergní receptorová kináza 1 ( $\beta$ -ARK1) (Madamanchi, 2007). Úloha GRK fosforylace spočívá především ve zvýšení afinity receptoru pro arrestiny (Luttrell a Lefkowitz, 2002).

Arrestiny jsou významné intracelulární proteiny regulující signalizaci receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Tvoří komplexy s většinou GPCR (po jejich aktivaci navázáním agonisty a fosforylací) a hrají klíčovou roli v procesech receptorové desenzitizace, internalizace a *down-regulace*, které brání aktivaci příslušných G-proteinů (Buchanan a DuBois, 2006; Shenoy a Lefkowitz, 2003).

Déletrvající působení agonisty na GPCR vede postupně k zeslabení jeho účinku a úbytku přenosu buněčných signálů. Ačkoliv je vazebné místo receptoru obsazeno ligandem, signál přestane být přenášen dále. Je to důsledek sérií událostí, které můžeme rozdělit do třech procesů. Nejdříve nastává receptorová desenzitizace, dalším dějem v časové posloupnosti je internalizace receptoru, kdy jsou receptory odstraněny

z plazmatické membrány a endocytovány, což může nakonec vyústit v celkové snížení počtu receptorů (*down-regulaci*). Receptorový protein je nakonec degradován v lysozómech (Svoboda *et al.*, 2004).

## 1.5 Opioidy

Opioidy jsou látky se schopností aktivovat specifické opioidní receptory. Odvozují se od morfinu, který pochází z pryskyřice máku setého (*Papaver somniferum*) a byl používán už od pradávna pro navození euforických účinků a především jako silné analgetikum (Pugsley, 2002). Bylo prokázáno, že endogenní opioidní peptidy vznikají ze čtyř prohormonových prekurzorů: proenkefalinu, prodynorfinu, proopiomelanokortinu a pronociceptinu (Hughes *et al.*, 1975).

Rozlišujeme čtyři skupiny opioidů podle jejich původu a struktury:

1. *Endogenní opioidní peptidy* produkované tělem (endorfiny, enkefaliny, dynorfiny a endomorfiny)
2. *opioidní alkaloidy* (morfin, kodein a tebain)
3. *polosyntetické opioidy* (heroin, hydromorfin a oxycodon)
4. *syntetické opioidy*, látky plně vytvořené v laboratoři (methadon, fentanyl, penthidin a tramadol)

Opioidy jsou klíčové látky používané pro léčbu bolesti. Hlavní indikace opioidů jsou infarkt myokardu, bolesti při frakturách, při operaci a rovněž bolesti u nádorových onemocnění (El Mouedden a Meert, 2007).

Opioidy mohou být podávány různým způsobem: orálně, rektálně, transdermálně, intravenózně, intramuskulárně, intranasálně atd. (Inturrisi, 2002). Opioidní látky vyvolávají své účinky ovlivněním specifických opioidních receptorů. K jejím nejčastějším nežádoucím účinkům patří především zácpa, stavy zmatenosti, zvracení, tachykardie, útlum dechového centra a multifokální svalové záškuby (Inturrisi, 2002). Útlum a spavost se objevuje nejčastěji v prvních dnech po podání opioidů. V průběhu následujících 3 - 5 dní obvykle při konstantním dávkování spontánně tyto příznaky ustupují.

Všechny silně analgeticky působící opioidy jsou při předávkování nebezpečné útlumem dechového centra. Paralýza tohoto centra je nejčastější příčinou úmrtí.

### 1.5.1 Opioidy jako analgetika

Analgetika dělíme do dvou skupin: neopioidní a opioidní. Do neopioidních analgetik patří nesteroidní antirevmatika-antiflogistika (př. Paracetamol), které účinkují převážně blokadou enzymů cyklooxygenázy (COX), jež převádí kyselinu arachidonovou na prostaglandiny. Tyto analgetika snižují tvorbu prostaglandinů, které zvyšují vnímání bolesti, a tím tlumí bolest. Opioidní analgetika tlumí bolest aktivací opioidních receptorů především v centrálním nervovém systému (Rokyta *et al.*, 2009).

### 1.5.2 Morfin

V roce 1806 německý lékárník Sertürner poprvé vyizoloval z opia bílý prášek a pojmenoval jej morfin podle boha snů Morfea (Brownstein, 1993). Díky neustále se rozvíjející farmakologii bylo vytvořeno a objeveno velké množství jeho derivátů. Mezi nejrozšířenější deriváty patří polosyntetický hydrokodon, plně syntetický meperidin a nebo antagonisty opioidních receptorů naloxon. Morfin je hlavní alkaloid (tj. organická dusíkatá báze přírodního původu) obsažený v opiu, který se získává výlučně z rostliny *Papaver Somniferum* (Pugsley, 2002). Výhodou morfinu je jeho dostatečně silný a dlouhodobý analgetický efekt, stabilita a také to, že se řadí mezi nejvíce prozkoumané opioidy.

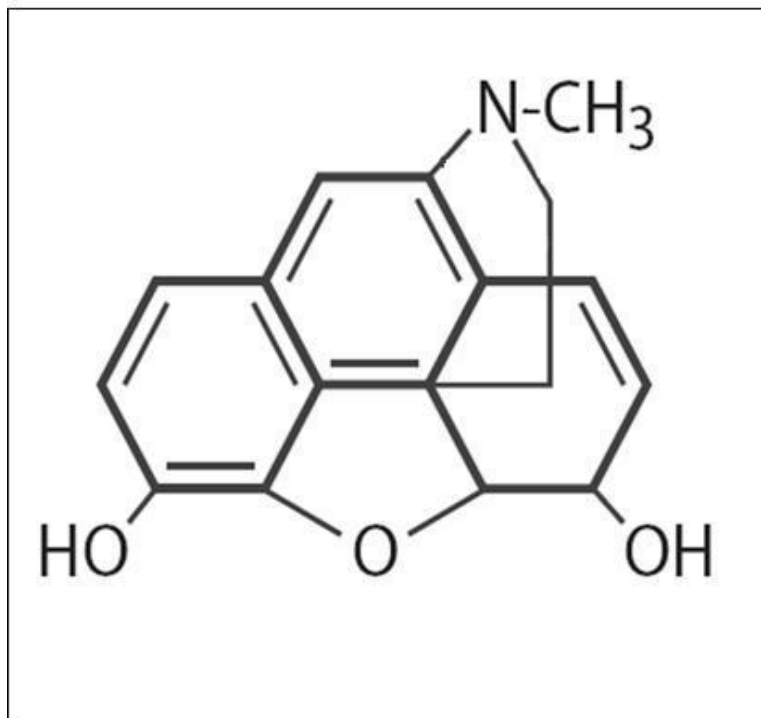
Chemický vzorec morfinu je znázorněn na obrázku č. 4 - tento alkaloid má pentacyklickou strukturu s benzylochinolinovým jádrem (Trescot *et al.*, 2008). Morfin se váže na opioidní receptory typu  $\mu$ ,  $\kappa$  a  $\delta$  a zprostředkovává jejich stimulaci. Vazebné studie myokardu potvrdily přítomnost  $\delta$  a  $\kappa$  OR ve ventrikulárních myocytech potkana (Schultz a Gross, 2001; Zimlichman *et al.*, 1996).

Morfin patří mezi nejúčinnější látky často používané k tlumení velkých bolestí, avšak dlouhodobé podávání zvýšených dávek této látky může být spojeno s rizikem vzniku závislosti (Adriaensen *et al.*, 2003). Vznik závislosti zahrnuje adaptivní změny na úrovni opioidních receptorů a s nimi asociovaných signálních systémů, které mají význam pro neuronální plasticitu v mozku (Law *et al.*, 2000).

Ke změnám může docházet i v jiných tkáních a buňkách exprimujících opioidní receptory, jako např. v srdci a kardiovaskulárním systému (Pugsley, 2002).

Některé studie ukázaly, že chronické podávání morfinu má vliv na míru exprese podjednotek  $G_{s\alpha}$ ,  $G_{i\alpha}$  a  $G_o\alpha$  proteinů. Studiu G-proteinů bylo však v těchto souvislostech dosud věnováno málo pozornosti. Napier a spol. zjistili, že dlouhodobé podávání morfinu zvyšuje expresi  $G_{i\alpha}$  a  $G_{s\alpha}$  proteinů v psím srdci (Napier *et al.*, 1999). Zatímco při pokusu v hippokampálních oblastech u myší byla exprese  $G_{s\alpha}$  snížena a naopak  $G_o\alpha$  zvýšena (Przewlocki a Przewlocka, 2001). Na modelu potkaního srdce však vliv morfinu na expresi G-proteinů nebyl dosud sledován.

Obecně se ví, že podávání této látky je doprovázeno snížením kardiovaskulární funkce a vzrůstající parasympatickou aktivitou (Napier *et al.*, 1999; Randich *et al.*, 1991). V nedávné době byly rozpoznány také možné cytoprotektivní účinky morfinu (Peart a Gross, 2004).



**Obr. 4.:** Strukturní vzorec morfinu

(5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ ) - 7, 8 - didehydro - 4, 5 - epoxy - 17 - methylmorfinan - 3, 6 - diol.

Upraveno podle Trescot (2008).



## 1.6 Ischemie

Pro srdeční svalovinu je důležitý neustálý přísun kyslíku a živin k udržení její funkce. Jestliže tomu tak není, dochází k náhlému poklesu průtoku krve v koronárních cévách, tzv. ischemii myokardu. Mezi projevy tohoto onemocnění patří *angina pectoris* (bolest na hrudníku), odumření srdeční svaloviny (infarkt myokardu), což může vést až k srdečnímu selhání a smrti. Změny vyvolané akutním infarktem myokardu lze rozdělit na ischemické poškození, vzniklé v průběhu uzavření koronárního řečiště části myokardu a reperfuční poškození, vyvolané obnovením koronárního průtoku po dlouhodobé ischemii. Při reperfuzi nastává náhlé navrácení kyslíku a živin (Ferdinandy *et al.*, 2007).

Ihned po začátku ischemie dochází ke strukturálním a metabolickým změnám. Prvním důsledkem okluze koronární tepny je rapidní úbytek kyslíku v buňkách a prudce klesá aerobní metabolismus. Schopnost kardiomyocytů vytvářet energii ve formě adenosintrifosfátu (ATP) klesá. Dochází k aktivaci glykolýzy a glykogenolýzy. Vznikající pyruvát je po vstupu do mitochondrie oxidován a konvertován na laktát. Tento konečný produkt anaerobní glykolýzy je v ischemickém myokardu akumulován. Zvýšená koncentrace laktátu má za následek zkrácení doby trvání akčního potenciálu a následný vznik poruch srdečního rytmu tzv. arytmie. Ischemie má také vliv na iontovou homeostázu, během ischemie dochází k poruše iontové rovnováhy. Plazmatická membrána se stává více propustná pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$ . Díky nedostatku ATP dochází k inhibici schopnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy transportovat  $\text{Na}^+$  pryč z buňky a zvyšuje se intracelulární koncentrace sodných iontů. Dále je přerušena funkce ATP závislé vápenaté pumpy a  $\text{Ca}^{2+}$  se snadněji dostává ze svých buněčných zásobáren do cytosolu, kde způsobí aktivaci lysozómálních proteáz a fosfolipáz vedoucí k buněčnému poškození. Jestliže nedojde k obnovení krevního zásobení, tak následuje nekróza buněk (Ferdinandy *et al.*, 2007).

## 1.7 Kardioprotekce

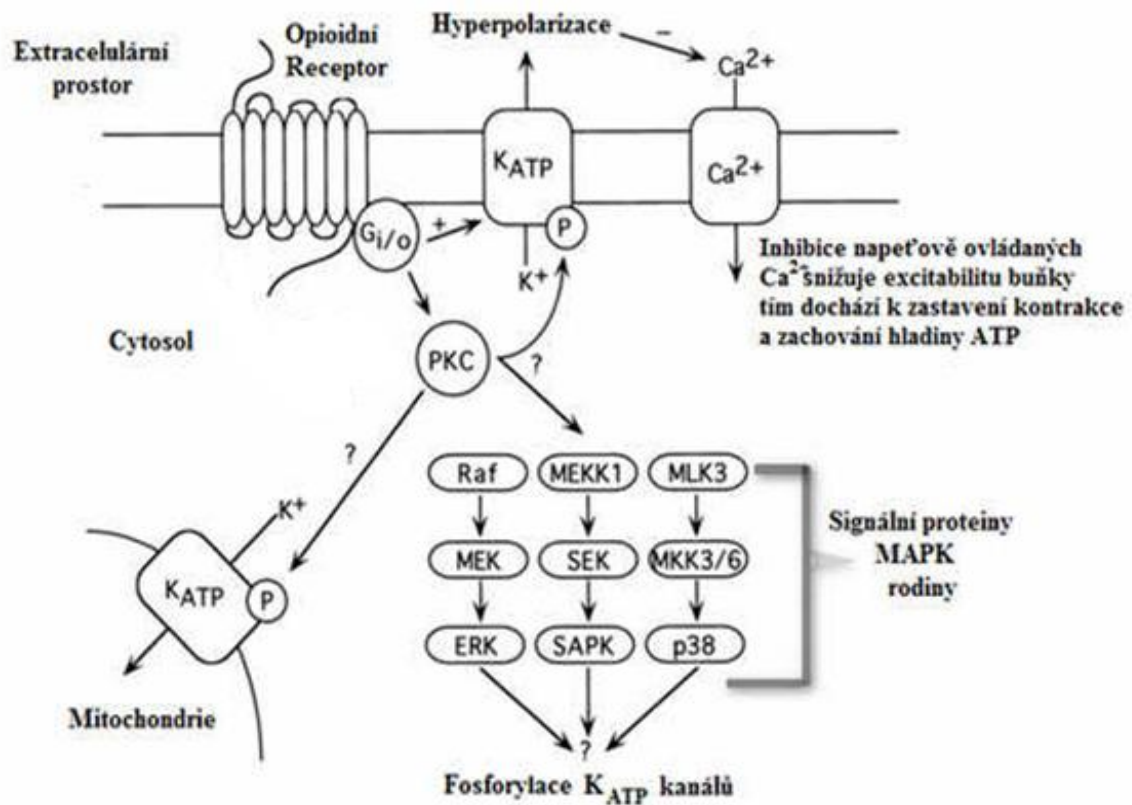
Kromě důležitých analgetických a potenciálně nežádoucích návykových účinků morfinu bylo zjištěno, že tato látka může vykazovat i jisté kardioprotektivní účinky. Vlivem opioidů může být zmenšeno poškození myokardu, ke kterému dochází v důsledku škodlivého působení ischemie (Peart a Gross, 2004). Molekulární mechanismy působení morfinu na srdce však nejsou dosud zcela objasněny.

### 1.7.1 Ischemický *preconditioning*

Současný experimentální výzkum, jenž se zabývá kardioprotektivními vlivy, se zaměřuje na fenomén nazývaný ischemický předtrénovaný myokard (angl. *Ischemic preconditioning*; IPC) (Murry *et al.*, 1986). Jedná se o termín vyjadřující určitou míru adaptace buněk myokardu na opakované ataky ischemie. Během IPC jsou buňky po nějaký čas více odolné k efektům způsobených nedostatkem živin a kyslíku a vykazují pak nižší poškození.

Z dosud známých poznatků vyplývá, že klíčové postavení v mechanismu IPC mají ATP závislé draselné kanály ( $K_{ATP}$  kanály), proteinkináza C (PKC), G-proteiny, reaktivní formy kyslíku (ROS) a také opioidy (McPherson a Yao, 2001; Schultz a Gross, 2001). Při pokusech prováděných na potkanech bylo zjištěno, že kardioprotektivní účinek morfinu je zprostředkován  $\delta$  a  $\kappa$  opioidními receptory a účastní se ho také  $K_{ATP}$  a PKC (Valtchanova-Matchouganska a Ojewole, 2003; Wu *et al.*, 2004).

Stimulací opioidního receptoru morfinem při indukci IPC dochází k aktivaci proteinkinázy C (PKC) a  $K_{ATP}$  kanálů (McPherson a Yao, 2001; Schultz *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004). PKC může zřejmě aktivovat  $K_{ATP}$  kanály a další signální dráhy, např. MAPK kinázovou kaskádu (Obr. 5) (Light *et al.*, 1996; Schultz a Gross, 2001). Otevřením  $K_{ATP}$  kanálů dochází k hyperpolarizaci membrány a buňka proto tak snadno nepodlehne ischemické depolarizaci a vtoku vápníku do cytosolu (Schultz a Gross, 2001). Můžeme tedy říci, že tyto mechanismy působí kardioprotektivně. Avšak detailní analýza protektivních intracelulárních mechanismů zatím chybí.



**Obr. 5.: Signální dráhy opioidy vyvolané kardioprotekce**

PKC - proteinkináza C; K<sub>ATP</sub> - ATP závislé draselné kanály; Ca<sup>2+</sup> - napětově ovládaný vápenatý kanál; MAPK - mitogenem aktivovaná proteinkináza.

Upraveno podle Schultz (2001)

## 2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

V této diplomové práci jsem usilovala o dosažení následujících cílů:

1. Porovnat hladiny vybraných podjednotek G-proteinů v plazmatických membránách myokardu kontrolní a morfinem ovlivněné skupiny potkanů.
2. Určit vliv chronického podávání morfinu na distribuci vybraných podjednotek G-proteinů mezi plazmatickými membránami a cytosolem.
3. Ověřit potenciální kardioprotektivní účinek chronického působení morfinu po okluzi sestupné větve levé koronární arterie.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Chemikálie a materiál

Morfin (ve formě morfin sulfátu) byl získán od společnosti Zentiva. Anestetikum Pentobarbital sodný byl od firmy Sigma - Aldrich. Inhibitor proteáz Complete<sup>TM</sup> dodala firma Roche. Percoll<sup>TM</sup> byl od Amersham Biosciences. Primární protilátky proti  $G_{2\alpha}$ ,  $G\beta$  a  $G_{s\alpha}$  podjednotkám heterotrimerních G-proteinů byly zakoupeny u firmy Santa Cruz Biotechnology. Primární protilátky proti  $G_{q/11\alpha}$ ,  $G_i\alpha$  a  $G_o\alpha$  podjednotkám byly připraveny imunizací králíků dekaeptidy odvozenými z C-konce příslušné  $G\alpha$  podjednotky (Novotny *et al.*, 2001). Sekundární protilátky dodala firma Amersham Biosciences. Nitrocelulózoová membrána byla zakoupena u firmy Schleicher and Schuell. K vizualizaci specificky navázaných protilátek na membráně byl použit substrát Super Signal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate od firmy Pierce. K expozici byl použit Kodak medical X-ray film. Ostatní běžné chemikálie a soli pro přípravu pufrů a roztoků byly zakoupeny u firmy Sigma a Serva.

#### 3.2 Experimentální model

Pro experiment byli použiti dospělí potkani kmene *Wistar* (samci) o hmotnosti 250 - 340 g. Potkani byli chováni na Fyziologickém ústavu AV ČR v klecích po 4 - 5 zvířatech, kde měli volný přístup k standardní dietě a pitné vodě. Pokusní potkani byli rozděleni na dvě skupiny: kontrolní a morfinem ovlivněná. Experimentální skupině byl intramuskulárně podáván po dobu 10 a 28 dní morfin o dávkách 1 mg/kg/den a 10 mg/kg/den. Kontrolní skupině byl podáván fyziologický roztok (0,9 % NaCl). Po aplikaci poslední dávky morfinu byli potkani následující den utraceni a po vyjmutí srdce byla oddělena jeho levá a pravá komora. Srdeční tkáň byla zmrazena v tekutém dusíku. Jednotlivé vzorky byly zváženy na analytických vahách, označeny a zabaleny do alobalu a uchovávány v mrazáku při teplotě - 80 °C. V doplňujících experimentech byla rovněž sledována doba přetrvávání možných důsledků působení morfinu na myokard - v tom případě byla zvířata po aplikaci poslední dávky morfinu ponechána následujících 2 - 7 dní za standardních podmínek (tj. bez morfinu). Část potkanů z každé skupiny byla použita pro fyziologické experimenty na modelu srdce *in situ* a ostatní zvířata z každé skupiny byla použita na biochemické experimenty,

keré zahrnovaly imunodetekci vybraných podjednotek heterotrimerních G-proteinů ( $G_s\alpha$ ,  $G_i\alpha(1,2)$ ,  $G_i\alpha(3)$ ,  $G_o\alpha$ ,  $G_z\alpha$ ,  $G_{q/11}\alpha$  a  $G\beta$ ) v myokardu. Veškeré biochemické analýzy byly prováděny především na materiálu získaném z levé srdeční komory.

### 3.2.1 Model srdce *in situ*

Model srdce *in situ* je standardní metoda používaná pro studium citlivosti myokardu k letálnímu buněčnému poškození - vzniku infarktu myokardu u experimentálních zvířat. Podstatou metody je akutní okluze koronární arterie, která způsobí rozvoj ischemie myokardu. Dále je na vyjmutém srdci histochemicky hodnocena velikost infarktu.

Potkani byli anestetizováni pentobarbitalem sodným (60 mg/kg; Sigma-Aldrich) intraperitoneálně. Hloubka anestezie byla testována korneálním reflexem a štípnutím chirurgickou pinzetou do ocasu. Po 10 minutové stabilizační fázi na srdci byla provedena okluze sestupné větve levé koronární arterie (LAD). Podvaz byl uskutečněn šicím vláknem a chirurgickou jehlou s hedvábnou nití (Chirmax) 1 - 2 mm distálně od místa odstupu LAD od levé koronární arterie (LCA). Oba konce vlákna byly provlečeny polyethylenovou kanylou a upevněny chirurgickou svorkou. Utažením byl zastaven průtok tkání stěny levé komory srdeční, zásobované okludovanou arterií. Potkan byl napojen na přístroj měření tlaku a EKG.

Po 20 minutové ischemii byla okluze uvolněna odstraněním svorky. Kanyla byla vyjmuta z vlákna a následovala 5 minutová reperfuze. Po uplynutí reperfuze bylo potkanovi vyjmuto srdce z těla a použito pro stanovení velikosti infarktu.

### 3.3 Stanovení velikosti infarktu

Srdce bylo co nejrychleji vystřiženo z hrudi a poté bylo důkladně propláchnuto fyziologickým roztokem. Opět byla provedena okluze LAD (Obr. 6). Následně bylo pomocí injekční stříkačky perfundováno srdce 5 % roztokem manganistanu draselného ( $KMnO_4$ ; Lachema), aby byla barevně odlišena okludovaná oblast od normálně perfundované. Oxidační reakcí manganistanu došlo k obarvení normálně perfundované oblasti srdeční tkáně do hněda. Poté byl  $KMnO_4$  vypláchnut z koronárního řečiště a z dutin srdečních komor fyziologickým roztokem. Srdce bylo vyjmuto z kanyly a odstupující cévy a srdeční síně byly z něj odstřiženy. Následně bylo osušeno filtračním papírem, zabaleno

do potravinové fólie a dáno do mrazáku. Když byla tkáň dostatečně tuhá, tak byla nakrájena na 6 - 8 příčných řezů. Řezy byly po dobu 30 minut při teplotě 37 °C inkubovány ve fosfátovém pufru (pH 7,4), který obsahoval 1 % 2, 3, 5-trifenylnitrotetrazolium chlorid (TTC; Sigma - Aldrich; 0,1 g TTC + 10 ml pufru).

K přípravě fosfátového pufru o pH 7,4 bylo použito:

0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Tetrazolium se používá jako indikátor k rozlišení oblasti myokardu, které odolaly ischemickému poškození. Po 30 minutách byl roztok TTC vyměněn za 10 % vodný roztok formaldehydu. Po třech dnech byla z řezů odstraněna pravá komora. Následně byly řezy poskládány na Petriho misku (Obr. 7) a vyfotografovány z obou stran digitálním fotoaparátem (Nikon). Pomocí počítačového programu Ellipse byla vyhodnocena velikost infarktového ložiska (IS), velikost ohrožené oblasti (AR) a velikost levé komory (LV).

### **3.4 Homogenizace a frakcionace myokardu na Percollovém gradientu**

Po vyjmutí srdce z hrudi potkana byla oddělena jeho levá komora, která byla následně zmrazena v tekutém dusíku a uložena při teplotě - 80 °C až do zpracování homogenizací.

K homogenizaci byl použit homogenizační pufr obsahující:

20 mM Tris-HCl (pH = 7,4)

3 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM EDTA

250 mM sacharóza

Před homogenizací srdeční tkáň byla do homogenizačního pufru přidána směs inhibitorů proteáz Complete Protein Inhibitor Mixture<sup>TM</sup> (Roche). Srdeční tkáň získaná z kontrolních a morfinem ovlivněných zvířat byla mechanicky zhomogenizována pomocí Ultra-Turraxu (1 x 15 s) a Potter-Elvehjemova sklo-teflonového homogenizátoru (10 x nahoru-dolů). Získaný homogenát byl poté zcentrifugován při 2100 otáčkách za minutu po dobu 10 minut na stolní centrifuze (Hettich Universal R30). Do každé z osmi označených

kyvet bylo nejprve napipetováno 20 ml 18 % Percollu, na které byly následně velmi opatrně naneseny 3 ml postnukleárního supernatantu. Dále probíhala centrifugace při 26000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut na ultracentrifuze (Beckman Coulter Optima™ XL-100K). Po centrifugaci byla membránová frakce opatrně odebrána pipetou a naředěna v přiměřeném množství homogenizačního pufru (25 ml rozpuštěných membrán na jednu kyvetu). Následovalo další stočení na ultracentrifuze při 40000 otáčkách za minutu po dobu 60 minut. Jakmile centrifugace skončila, tak z kyvety byla odebrána tekutina a usazený pelet membrán byl resuspendován v pufru následujícího složení:

20 mM Tris-HCl (pH = 7, 4)

3 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM EDTA

Získaný membránový pelet byl následně zhomogenizován a zmražen v alikvotech při teplotě - 80 °C.

### **3.5 Izolace membránové frakce a cytosolu**

Postnukleární supernatant, který byl získaný centrifugací homogenátu, byl dále stočen při 300000 x g po dobu 60 minut na ultracentrifuze. Získaný supernatant (cytosol) byl odebrán a uchován v mrazáku při teplotě - 80 °C. Pelet membrán byl resuspendován v homogenizačním pufru. Objem naředěných membrán byl doplněn do původního objemu vzorku a zmražen v dusíku a uchován při teplotě - 80 °C.

### **3.6 Stanovení proteinů (BCA)**

Stanovení koncentrace proteinů v experimentálních vzorcích bylo provedeno v destičce o objemu jamky 300 µl s rovným dnem. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Do jednotlivých jamek bylo nepipetováno 100 µl vzorku, dané množství destilované vody a standardu podle následující tabulky:



Standard	Blank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	0, 2	0, 5	1, 0	1, 5	2, 5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

Poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku A + B + C. Použité roztoky obsahovaly:

A: 8 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1, 6 mg vínan sodný (pH = 11, 25)

B: 4 mg BCA

C: 0, 4 mg CuSO<sub>4</sub> . 5 H<sub>2</sub>O

Následovala inkubace 30 minut při teplotě 60 °C. Po skončení inkubace byla změřena absorpance vzorků při 562 nm na přístroji Synergy, počítačový program Gen 5. Naměřená data byla vyhodnocena programem GraphPad Prism 5. Koncentrace proteinů jednotlivých vzorků byla odečtena z kalibrační křivky, vynesené podle rovnice:  $y = ax^2 + bx + c$ .

### 3.7 SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Pro rozdělení proteinů ve vzorcích Percollových membrán byla použita metoda standardní SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE). Za vhodných podmínek sodiumdodecylsulfát (SDS) disociuje oligomerní proteiny na jednotlivé polypeptidové řetězce a zároveň je obaluje záporným nábojem tak, že zcela překrývá jejich náboj. Proteiny se za těchto podmínek rozdělí téměř výlučně na základě jejich relativních molekulových hmotností. Menší peptidy se v gelu pohybují rychleji.

K provedení elektroforézy byla použita aparatura Mini-Protean II (Bio-Rad). Pro dělení proteinů byl použit 10 % standardní SDS-polyakrylamidový gel (výška 5, 5 cm) (Novotny *et al.*, 2001).

Složení 10 % dělicího gelu (uvedeno množství pro nalití 2 gelů) bylo následující:

8 ml H<sub>2</sub>O

5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)

6,7 ml 30 % akrylamid – 0,8 % N, N'-methylen bisakrylamid

200 μl 10 % SDS

90 μl 10 % APS

8 μl TEMED

Tento gel byl opatrně převrstven asi 300 μl nasyceného vodného roztoku buthanolu a ponechán 1 hodinu polymerovat při laboratorní teplotě. Po polymeraci byl gel promyt od buthanolu a převrstven zaostřovacím gelem do výšky cca 2 cm od dělicího gelu.

Složení zaostřovacího gelu:

6 ml H<sub>2</sub>O

2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8)

1,3 ml 30 % akrylamid - 0,8 % N, N'-metylen bisakrylamid

100 μl 10 % SDS

90 μl 10 % APS

8 μl TEMED

Uvedené množství odpovídá přípravě dvou gelů pro aparaturu Mini-Protean II (Bio-Rad). Ihned po nalití gelu byl do něj vsunut hřebínek (*spacer*) pro vytvoření jamek pro vzorky a standardu molekulových hmotností. Zaostřovací gel byl poté ponechán 30 minut polymerovat při laboratorní teplotě. Vzorky byly naředěny 4x konc. Laemmliho vzorkovým pufrům (SLB; pH = 6,8), který byl připraven následujícím způsobem:

2,6 ml 1 M Tris-HCl (pH = 6,8)

4 ml glycerol

0,8 g SDS

0,8 g DTT

1 mg bromfenolová modř

H<sub>2</sub>O ad 10 ml

Před nanesením na gel byly vzorky 2 minuty povařeny při teplotě 100 °C. Jako pozitivní kontrola pro stanovení podjednotek G-proteinů byl použit postnukleární supernatant z mozkové tkáně, která je na tyto proteiny velmi bohatá. Pro orientaci byl na gel nanášen předznačený standard molekulových hmotností v rozmezí 26, 6 až 180 kDa (Sigma). Elektroforéza byla provedena v předem vychlazeném elektroforetickém pufru (*running buffer*) o složení:

25 mM Tris-HCl (pH neupravováno)

188 mM glycin

0, 1 % SDS

Aparatura byla zapojena ke zdroji konstantního napětí při 200 V po dobu přibližně 45 minut. Počáteční proud činil asi 100 mA. Elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy čelo (bromfenolová modř) téměř dosáhlo dolního okraje gelu. Rozdělené proteiny byly následně přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu.

### **3.8 Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu a imunodetekce**

Pro detekci elektroforeticky rozdělených proteinů byla použita technika imunoblotu (tzv. *Western blotting*). Přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu byl proveden v blotovacím pufru.

Složení blotovacího pufru:

25 mM Tris-HCl

192 mM glycin

20 % methanol

Přenos proteinů probíhal v aparatuře při konstantním napětí 100 V (počáteční proud cca 250 mA) po dobu 1 hodiny. Po přenesení proteinů na nitrocelulózovou membránu byla tato membrána propláchnuta v destilované vodě a inkubována jednu hodinu při laboratorní teplotě v tzv. blokovacím pufru. Tento pufr obsahoval 5 % sušené nízkotučné mléko rozpuštěné v TBS/Tween pufru:

10 mM Tris-HCl (pH = 8, 0)

150 mM NaCl

0, 5 % Tween

Po zablokování vazebných míst na membráně s přenesenými proteiny z mléka, byla tato membrána opláchnuta v destilované vodě. Následně byla membrána inkubována s primárními protilátkami přes noc v chladové místnosti (teplota místnosti 4 °C). Primární protilátky byly naředěny v TBS/Tween pufru s 1 % sušeným nízkotučným mlékem. Pro jednotlivé primární protilátky bylo použito následující ředění:

Anti G <sub>s</sub> α	1 : 5000
Anti G <sub>i</sub> α(1,2)	1 : 5000
Anti G <sub>i</sub> α(3)	1 : 5000
Anti G <sub>o</sub> α	1 : 5000
Anti G <sub>z</sub> α	1 : 3000
Anti G <sub>q/11</sub> α	1 : 5000
Anti Gβ	1 : 10000

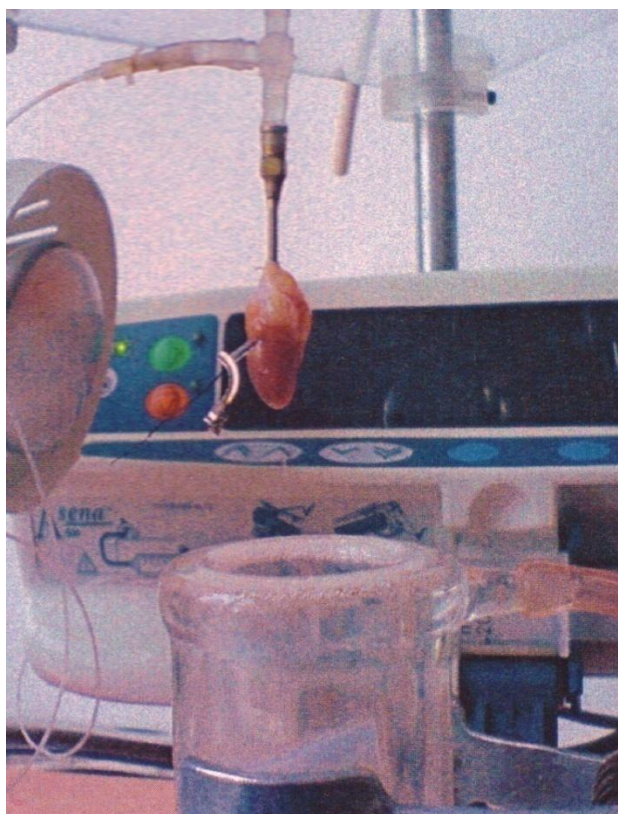
Následující den byla membrána 3krát promyta po dobu 10 minut v promývacím pufru (3 % Tween 20 v TBS pufru) a inkubována 1 hodinu se sekundárními protilátkami. Poté byla membrána opět promyta 3 x 10 minut v promývacím pufru. K detekci proteinů metodou chemiluminiscence (ECL) byly použity sekundární protilátky anti-králičí IgG značené křenovou peroxidázou, které byly ředěny 1:40000 v TBS/Tween pufru s 1 % nízkotučným mlékem. Po posledním promytí v promývacím pufru byla membrána vysušena pomocí filtračního papíru a pokryta cca 250 μl roztokem substrátu pro křenovou peroxidázu (substrát Super Signal; Pierce). Přebývající substrát byl po jedné minutě důkladně osušen filtračním papírem. Poté byla membrána zabalena do potravinové fólie a v temné komoře byl k membráně přiložen film (Kodak: X-OMAT K film), který byl vyvolán na vyvolávacím přístroji Optimax (Fomei). Doba expozice závisela na použitých protilátkách.

### 3.9 Vyhodnocení a prezentace výsledků

Velikost infarktového ložiska byla stanovena z fotografií jednotlivých řezů (Obr. 7). Tyto snímky řezů vyfotografované jak z apikální, tak z bazální strany byly nejdříve vloženy z fotoaparátu do počítače, kde byly doostřeny v programu Adobe Photoshop 6.0. Dále se pracovalo pouze s obrázkem každého řezu. Ke kvantitativnímu stanovení velikosti infarktového ložiska byl použit program Ellipse. Pomocí programu Ellipse byla u jednotlivého řezu stanovena velikost tkáně poškozené ischemií (IA), tkáně celé levé komory (LV) a tkáně vystavené ischemii (AR), která po podvázání koronární arterie perfundovaná nebyla. Na obrázku č. 8 je znázorněn řez levou komorou srdeční, kde perfuze manganistanem draselným způsobila barevné rozlišení jednotlivých oblastí řezu myokardu. Normálně perfundovaná oblast byla zbarvena do hněda, tkáň která přežila ischemii, byla zbarvena do červená a bílá barva pak představuje nekrotické ložisko.

Výsledné obrázky získané imunodetekcí byly snímány z filmu pomocí skeneru. Kvantitativní stanovení bylo provedeno denzitometricky v počítačovém programu ImageQuant. K dalšímu grafickému zpracování obrázků byl použit program Adobe Photoshop 6.0.

Výsledky jsou uvedeny jako průměry  $\pm$  střední chyba průměru (SEM). Pro statistické zpracování výsledků byl použit program GraphPad Prism 5. Statistické rozdíly byly hodnoceny pomocí nepárového Studentova t-testu a ANOVA. Za statisticky významné byly považovány rozdíly na úrovni  $P < 0,05$  (tzn. změna středních hodnot obou testovaných souborů je signifikantní a je značena \*).



**Obr. 6: Okluze sestupné větve levé koronární arterie upevněním svorky**



**Obr. 7: Fotografie obarvených řezů myokardu**



**Obr. 8: Příčný řez levou komorou srdeční**

Hnědá barva - tkáň normálně perfundovaná (obarvena  $\text{KMnO}_4$ ); červená barva - tkáň, která odolala ischemickému poškození v ohrožené oblasti (tetrazolium pozitivní); bílá barva - tkáň nenávratně poškozena (tetrazolium negativní).



## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Vliv chronicky podávaného morfinu na expresi a distribuci podjednotek G-proteinů v myokardu potkana

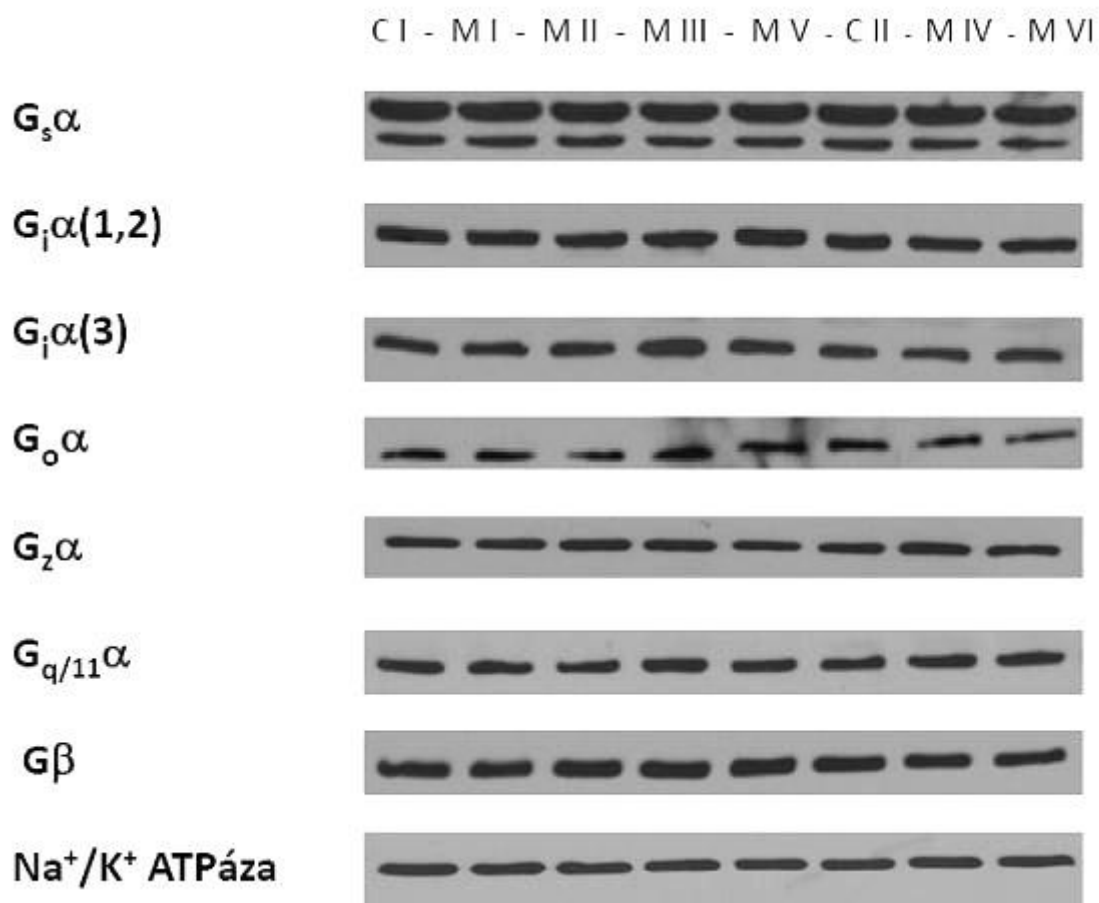
Ve vzorcích plazmatických membrán získaných z levé srdeční komory morfinové skupiny potkanů, které byl po dobu 10 a 28 dní podáván intramuskulárně morfin o dávkách 1 mg/kg a 10 mg/kg (Tab. 1) a kontrolní skupiny, které byl místo morfinu podáván fyziologický roztok, byly pomocí gelové elektroforézy a techniky imunoblot s použitím specifických protilátek detekovány vybrané podjednotky heterotrimerních G-proteinů:  $G_s\alpha$ ,  $G_i\alpha(1,2)$ ,  $G_i\alpha(3)$ ,  $G_o\alpha$ ,  $G_z\alpha$ ,  $G_{q/11}\alpha$  a  $G\beta$  (Obr. 9).

V plazmatických membránách morfinové skupiny potkanů, které byl po dobu 10 a 28 dní podáván morfin o dávce 10 mg/kg, byl zjištěn signifikantní rozdíl (ověřený Studentovým t-testem) v množství  $G_o\alpha$  proteinů. Hladina  $G_o\alpha$  proteinu byla u morfinové skupiny (10 mg/kg morfinu po dobu 10 dní) nižší asi o 9 % oproti skupině kontrol (Graf 1) a hladina  $G_o\alpha$  byla u morfinové skupiny (10 mg/kg morfinu po dobu 28 dní) nižší asi o 13 % oproti kontrolám (Graf 2). U morfinové skupiny potkanů, které dostávaly nízké dávky morfinu (1 mg/kg) po dobu 10 a 28 dní, nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v množství G-proteinů (Graf 3 a 4).

Ve vzorcích plazmatických membrán a cytosolu kontrolní a morfinové skupiny potkanů (10 mg/kg morfinu po dobu 10 dní) byly stejným způsobem detekovány  $G_i\alpha(1,2)$ ,  $G_i\alpha(3)$ ,  $G_s\alpha$  a  $G_z\alpha$  podjednotky (Obr. 10). V cytosolární frakci na rozdíl od membránové bylo zjištěno minimální množství  $G_i\alpha(1,2)$  a  $G_i\alpha(3)$  proteinů. Výskyt  $G_s\alpha$  a  $G_z\alpha$  podjednotky v cytosolární frakci nebyl zaznamenán (Obr. 10).

**Tab. 1: Rozpis jednotlivých dávek morfinu podávaných experimentální (M) skupině potkanů**

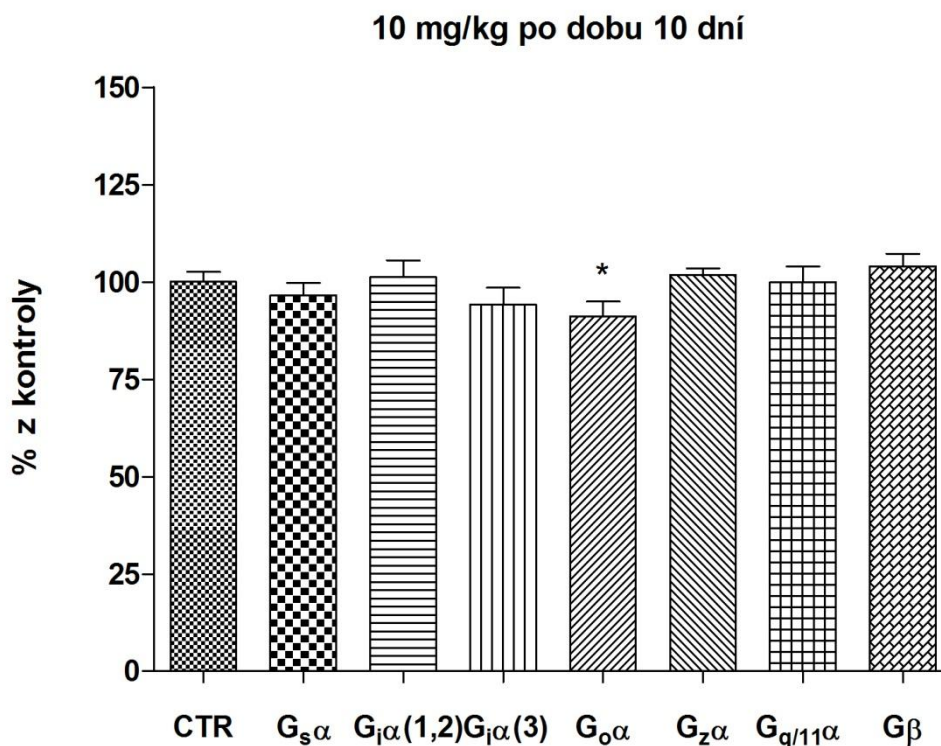
<b>vzorek</b>	<b>dávka morfinu (mg/kg/den)</b>	<b>doba podávání (dny)</b>
C I (kontrola)		10
M I	10	10
M II	10	10
M III	10	10
M V	1	10
C II (kontrola)		28
M IV	10	28
M VI	1	28



**Obr. 9: Reprezentativní imunoblotty detekovaných podjednotek G-proteinů a  $Na^+/K^+$  ATPázy v plazmatických membránách kontrolní (C) a morfinové (M) skupiny potkanů**

Na standardní 10 % polyakrylamidový gel bylo vždy naneseno 20  $\mu$ g proteinu plazmatických membrán na jednu jamku. Proteiny plazmatické membrány byly rozděleny pomocí SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a detekovány specifickými protilátkami jednotlivých zkoumaných podjednotek G-proteinů.

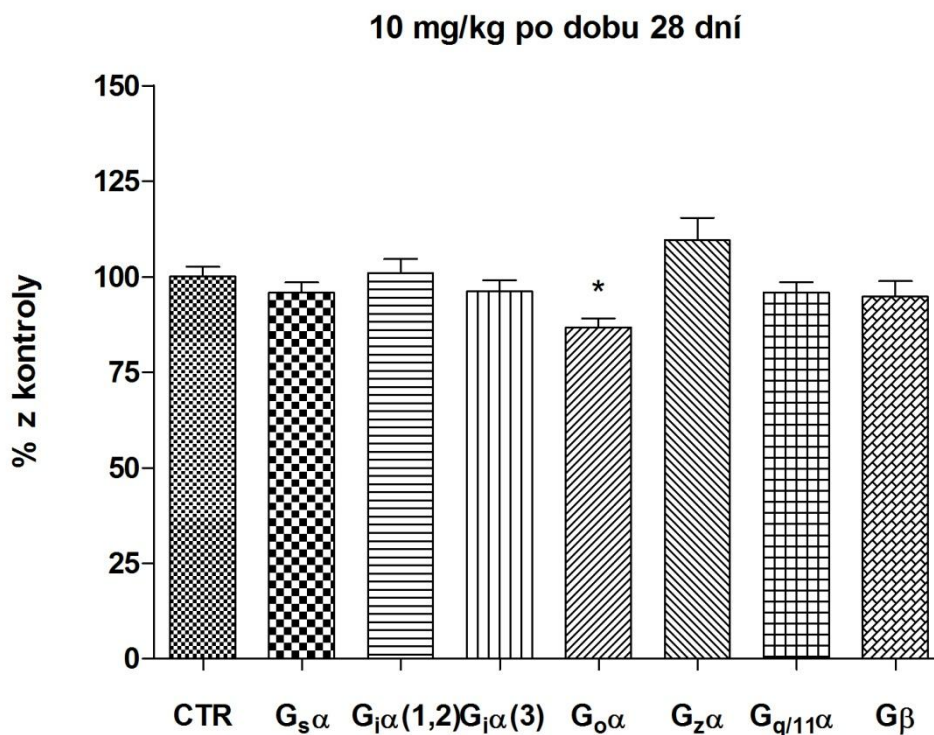
C I, C II: membrány kontrolní skupiny; M I - M VI: membrány morfinové skupiny (Tab. 1)



**Graf 1: Vliv chronického působení morfinu (10 mg/kg; 10 dní) na distribuci vybraných podjednotek G-proteinů v plazmatických membránách myokardu potkana**

Proteiny plazmatické membrány byly rozděleny pomocí metody SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a detekovány specifickými protilátkami jednotlivých zkoumaných podjednotek G-proteinů. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky s použitím programu GraphPad Prism 5. Relativní změny v množství zkoumaných proteinů ve vzorcích morfinové skupiny jsou vyjádřeny procentuálně ( $\pm$  SEM) vzhledem k množství stanovenému v odpovídajících kontrolních vzorcích (100 %). Výsledky byly získány ze tří nezávislých pokusů.

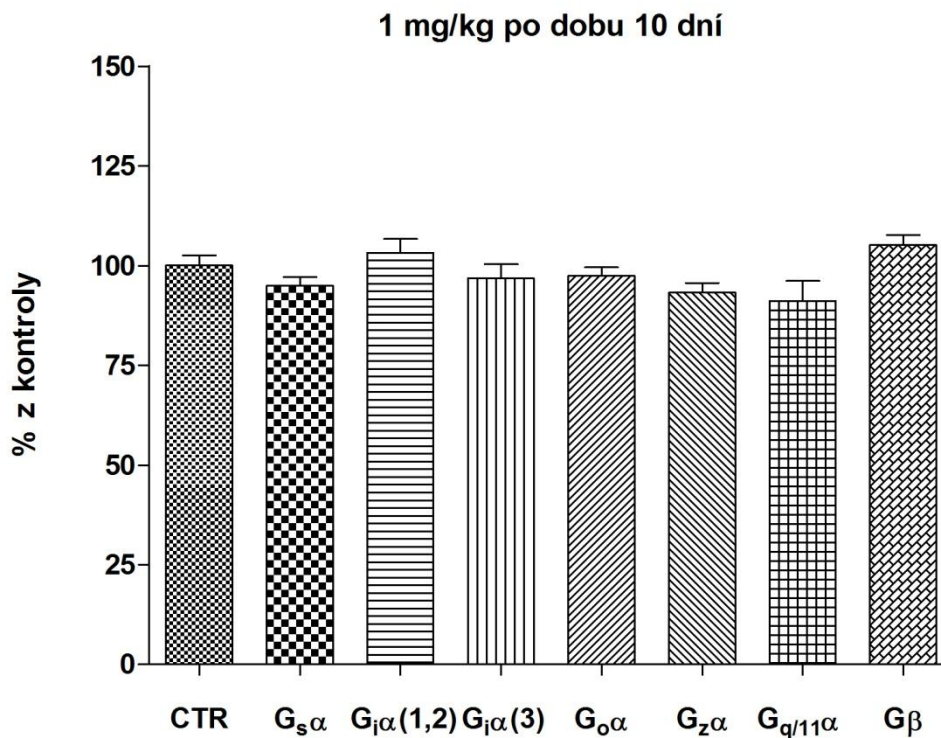
\*  $p < 0,05$ ; statisticky významný rozdíl (*Studentův t-test*): G<sub>o</sub>α vs. CTR



**Graf 2: Vliv chronického působení morfinu (10 mg/kg; 28 dní) na distribuci vybraných podjednotek G-proteinů v plazmatických membránách myokardu potkana**

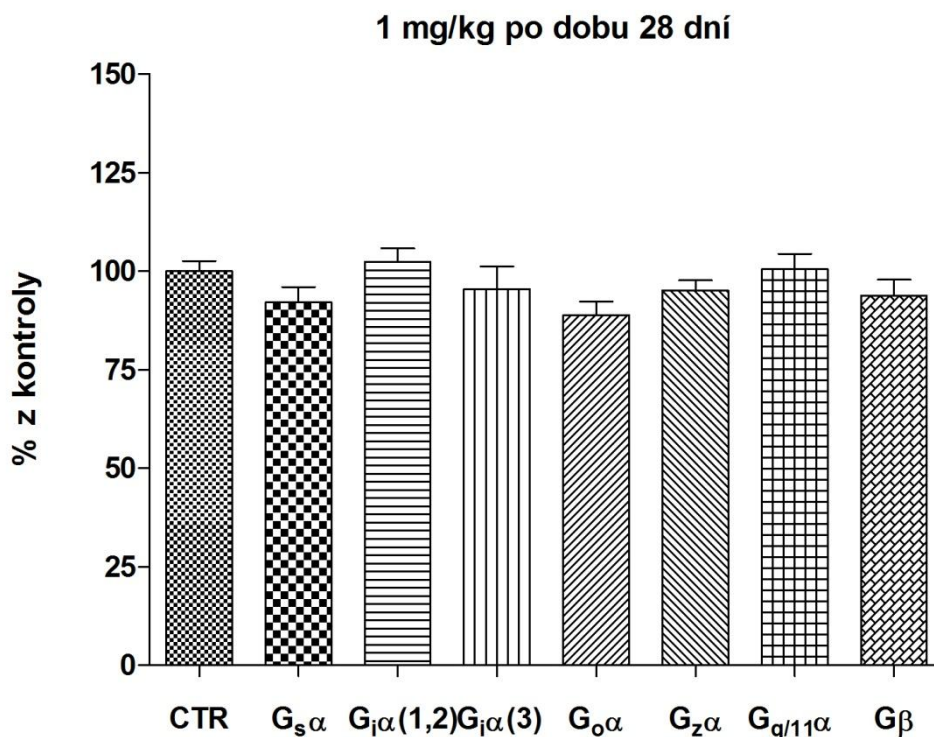
Proteiny plazmatické membrány byly rozděleny pomocí metody SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a detekovány specifickými protilátkami jednotlivých zkoumaných podjednotek G-proteinů. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky s použitím programu GraphPad Prism 5. Relativní změny v množství zkoumaných proteinů ve vzorcích morfinové skupiny jsou vyjádřeny procentuálně ( $\pm$  SEM) vzhledem k množství stanovenému v odpovídajících kontrolních vzorcích (100 %). Výsledky byly získány ze tří nezávislých pokusů.

\*  $p < 0,05$ ; statisticky významný rozdíl (*Studentův t-test*):  $G_o\alpha$  vs. CTR



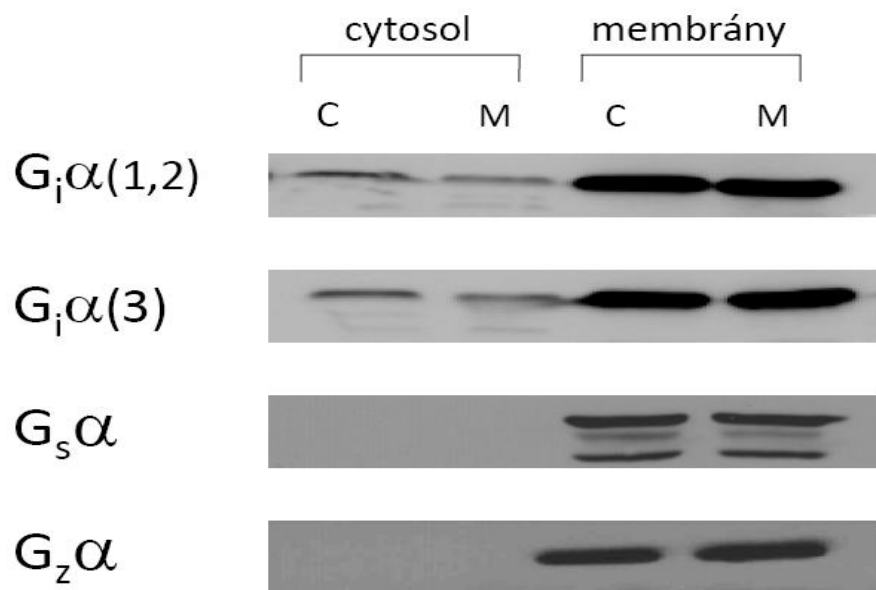
**Graf 3: Vliv chronického působení morfinu (1 mg/kg; 10 dní) na distribuci vybraných podjednotek G-proteinů v plazmatických membránách myokardu potkana**

Proteiny plazmatické membrány byly rozděleny pomocí metody SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a detekovány specifickými protilátkami jednotlivých zkoumaných podjednotek G-proteinů. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky s použitím programu GraphPad Prism 5. Relativní změny v množství zkoumaných proteinů ve vzorcích morfinové skupiny jsou vyjádřeny procentuálně ( $\pm$  SEM) vzhledem k množství stanovenému v odpovídajících kontrolních vzorcích (100 %). Výsledky byly získány ze tří nezávislých pokusů.



**Graf 4: Vliv chronického působení morfinu (1 mg/kg; 28 dní) na distribuci vybraných podjednotek G-proteinů v plazmatických membránách myokardu potkana**

Proteiny plazmatické membrány byly rozděleny pomocí metody SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a detekovány specifickými protilátkami jednotlivých zkoumaných podjednotek G-proteinů. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky s použitím programu GraphPad Prism 5. Relativní změny v množství zkoumaných proteinů ve vzorcích morfinové skupiny jsou vyjádřeny procentuálně ( $\pm$  SEM) vzhledem k množství stanovenému v odpovídajících kontrolních vzorcích (100 %). Výsledky byly získány ze tří nezávislých pokusů.



**Obr. 10: Reprezentativní imunoblotty detekovaných  $G_i\alpha(1,2)$ ,  $G_i\alpha(3)$ ,  $G_s\alpha$  a  $G_z\alpha$  podjednotek v plazmatických membránách a v cytosolu kontrolní (C) a morfinové (M) skupiny potkanů**

Na standardní 10 % polyakrylamidový gel bylo vždy naneseno 20  $\mu\text{g}$  proteinu plazmatických membrán nebo cytosolu na jednu jamku. Proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a detekovány specifickými protilátkami.



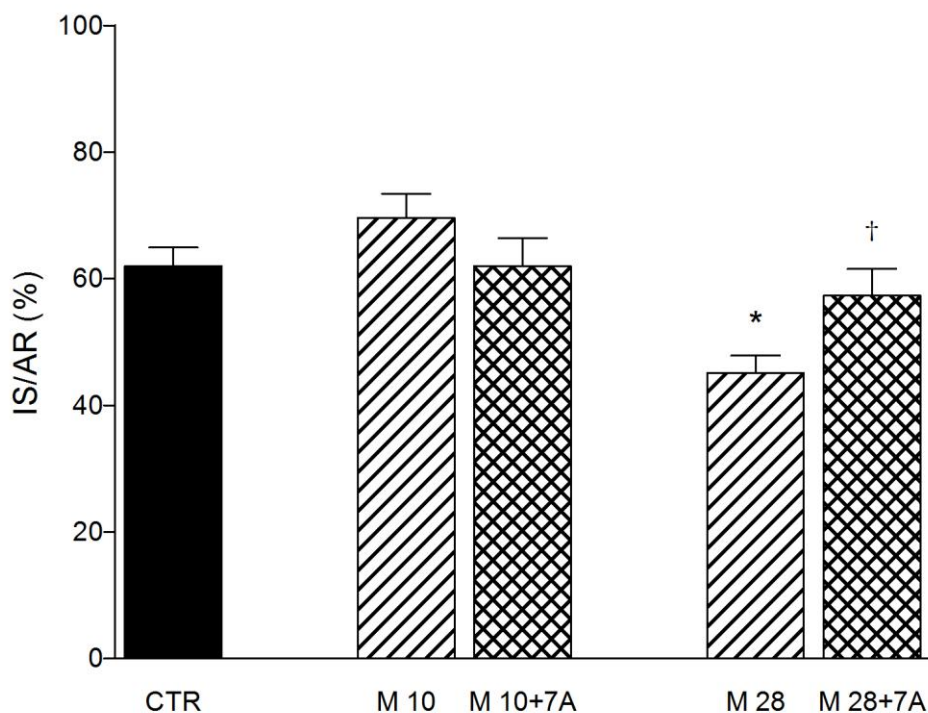
## **4.2 Vliv chronicky podávaného morfinu na odolnost myokardu**

### **4.2.1 Velikost infarktu**

Za využití metody srdce *in situ* (Neckar *et al.*, 2002) jsme analyzovali vliv dlouhodobé stimulace opioidních receptorů morfinem na rozsah ischemického poškození myokardu (velikost infarktu, ischemické arytmie) po okluzi sestupné větve levé koronární arterie. Bylo zjištěno, že 10 - denní podávání morfinu potkanům nemělo statisticky významný vliv na velikost ischemického poškození myokardu. Oproti tomu u morfinové skupiny potkanů, které byl podáván morfin po dobu 28 dní, byly zaznamenány statisticky signifikantní změny. U této skupiny zvířat došlo k významnému snížení velikosti ischemického poškození myokardu o 27 % v porovnání s kontrolní skupinou. Vysazení morfinu po dobu 7 dní následně po ukončení jeho podávání vedlo k významnému zvýšení velikosti infarktu, který odpovídal kontrole. Tedy došlo k vymizení protektivního účinku. Získané výsledky shrnuje graf č. 5.

### **4.2.2 Ischemické arytmie**

Komorové arytmie byly sledovány v průběhu 20 minutové ischemie. Graf č. 6 ukazuje celkový počet předčasných komorových stahů během ischemie u jednotlivých skupin. U potkanů, kterým byl podáván morfin ve vysokých dávkách po dobu 10 dní (10 mg/kg), bylo zjištěno statisticky významné snížení počtu předčasných komorových stahů z  $273 \pm 60$  (u kontrol) na  $107 \pm 42$  (u morfinové skupiny). Prodloužení doby podávání morfinu na 28 dní vedlo k vymizení antiarytmického účinku ( $411 \pm 127$ ). Také vysazení morfinu u skupiny se sníženým výskytem arytmií vedlo k normalizaci výskytu ischemických arytmií, který odpovídal kontrolám ( $470 \pm 300$ ) (Graf 6).



**Graf 5: Vliv chronického podávání morfinu na velikost infarktu**

Relativní velikost infarktu vztažena na velikost ohrožené oblasti (IS/AR).

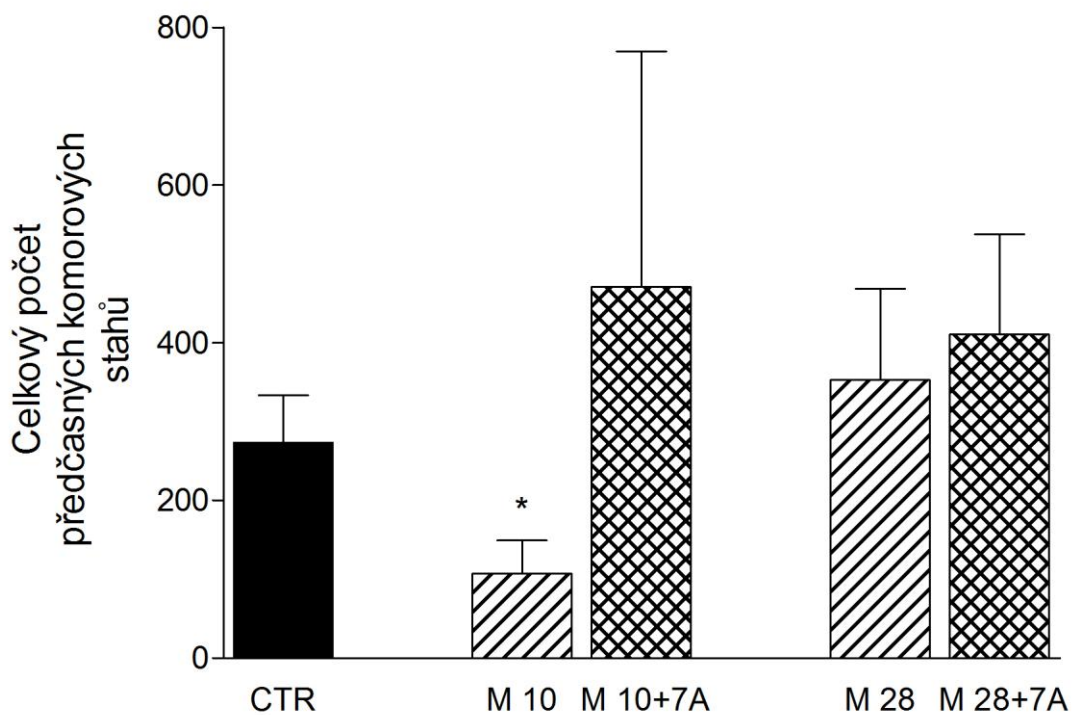
Rozsah ischemického poškození (IS) je vyjádřen v procentech velikosti ohrožené oblasti (AR).

CTR: kontrolní skupiny; M 10: 10 dní podávání 10 mg/kg morfinu; M 10+7A: 10 dní podávání

10 mg/kg morfinu a 7 dní vysazení; M 28: 28 dní podávání 10 mg/kg morfinu; M 28+7A:

28 dní podávání 10 mg/kg morfinu a 7 dní vysazení.

\*  $p < 0,05$ ; statisticky významný rozdíl (ANOVA test): M 28 vs. CTR



**Graf 6: Celkový počet předčasných komorových stahů**

CTR: kontrolní skupiny; M 10: 10 dní podávání 10 mg/kg morfinu; M 10+7A: 10 dní podávání 10 mg/kg morfinu a 7 dní vysazení; M 28: 28 dní podávání 10 mg/kg morfinu; M 28+7A: 28 dní podávání 10 mg/kg morfinu a 7 dní vysazení.

\*  $p < 0,05$ ; statisticky významný rozdíl (ANOVA test): M 10 vs. CTR

## 5. DISKUZE

Předmětem studia této diplomové práce bylo sledování důsledků dlouhodobého podávání morfinu na expresi a distribuci vybraných podjednotek heterotrimerních G-proteinů v preparátech potkaního myokardu. Dále byl sledován potenciální kardioprotektivní účinek dlouhodobé stimulace opioidních receptorů morfinem.

Morfin je klinicky velmi významná látka používána k tlumení velkých bolestí, avšak chronické podávání vysokých dávek této látky s sebou přináší pozitivní i negativní důsledky na organismus. Tím známým žádoucím efektem jsou jeho klinicky významné analgetické účinky, mezi ty nežádoucí patří vznik závislosti a možné poškození myokardu při podávání vysokých dávek morfinu (Adriaensen *et al.*, 2003). Veškeré účinky a molekulární mechanismy působení morfinu na srdce však nejsou dosud zcela objasněny. Morfin je agonistou všech typů opioidních receptorů (Minami a Satoh, 1995). Přítomnost  $\mu$  opioidního receptoru v srdci však nebyla zjištěna. Řada studií prokázala, že morfin působí na srdce aktivací  $\delta$  a  $\kappa$  opioidních receptorů (McPherson a Yao, 2001; Schultz a Gross, 2001) a tyto receptory jsou spřaženy s inhibičními G-proteiny třídy  $G_i/G_o$  (Minami a Satoh, 1995).

Podstatnou částí této práce bylo zkoumání možného vlivu vysokých (10 mg/kg/den), ale i nižších dávek (1 mg/kg/den) morfinu na expresi podjednotek  $G_s\alpha$ ,  $G_i\alpha(1,2)$ ,  $G_i\alpha(3)$ ,  $G_o\alpha$ ,  $G_z\alpha$ ,  $G_{q/11}\alpha$  a  $G\beta$  proteinů v srdečním svalu potkana. Imunodetekce prostřednictvím specifických protilátek po předchozím rozdělení proteinů (metoda SDS-PAGE) frakce plazmatických membrán z Percollového gradientu prokázala signifikantní změny v hladině podjednotky  $G_o\alpha$  proteinu mezi kontrolní a morfinem ovlivněnou skupinou. Porovnáním výsledků získaných ze vzorků tkáně myokardu kontrolních a morfinem ovlivněných zvířat bylo zaznamenáno mírné snížení hladiny  $G_o\alpha$  proteinů. Hladina podjednotky  $G_o\alpha$  proteinu byla u morfinové skupiny (10 mg/kg morfinu po dobu 10 dní) nižší asi o 9 % oproti skupině kontrol a hladina  $G_o\alpha$  proteinu byla u morfinové skupiny (10 mg/kg morfinu po dobu 28 dní) nižší asi o 13 % vzhledem ke kontrolám.

Naše výsledky dále ukázaly, že dlouhodobé podávání morfinu neovlivnilo expresi podjednotek  $G_s\alpha$ ,  $G_i\alpha$ ,  $G_z\alpha$ ,  $G_{q/11}\alpha$  a  $G\beta$  proteinů. Při chronické stimulaci opioidního receptoru dochází po prvotním poklesu hladiny cAMP k jeho nadprodukcí, k tzv. superaktivaci adenylcyklázy (Watts, 2002). Je známo, že podjednotka  $G_s\alpha$  stimuluje

adenylylcyklázu. V naší práci však nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v množství této podjednotky ve vzorcích kontrolní a morfinové skupiny.

Napier a spol. (1999) ukázali na preparátech psího srdce, že chronické podávání morfinu (75 mg/kg/den) zvyšuje expresi  $G_i\alpha$  a  $G_s\alpha$  proteinů (Napier *et al.*, 1999). Další studie prokázaly, že při podávání 10 mg/kg/den morfinu byla v hippokampálních oblastech u myší exprese podjednotky  $G_s\alpha$  snížena a exprese  $G_o\alpha$  naopak zvýšena (Przewlocki a Przewlocka, 2001). Na modelu potkaního srdce však vliv morfinu na expresi G-proteinů nebyl dosud sledován. Rozdíly mezi našimi výsledky a výsledky publikovanými mohou být pravděpodobně způsobeny rozdíly ve zvířecím modelu a podmínkách experimentu.

Příčinou snížení exprese podjednotky  $G_o\alpha$  proteinů může být zřejmě proces zvaný *down-regulace*. V důsledku toho dochází k celkovému snížení hladiny receptorů a G-proteinů po opakované či dlouhodobé stimulaci receptorů agonistou (Svoboda a Novotny, 2002; Svoboda *et al.*, 2004). Dlouhodobá stimulace receptoru hormonem vede nejprve k poklesu hladin příslušných G-proteinů v plazmatické membráně, později k poklesu celkového množství G-proteinů v buňce (degradace; *down-regulace*). Bylo zjištěno, že procesu desenzitizace se mohou účastnit všechny podjednotky třídy  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  proteinů (Milligan, 1993).

Další částí této diplomové práce bylo zkoumání vlivu chronického podávání morfinu na distribuci podjednotek  $G_i\alpha(1,2)$ ,  $G_i\alpha(3)$ ,  $G_s\alpha$ ,  $G_z\alpha$ , proteinů mezi membránami a cytolem. Z našich výsledků vyplynulo, že v cytosolu se na rozdíl od membránové frakce vyskytovalo pouze minimální množství  $G_i\alpha(1,2)$  a  $G_i\alpha(3)$  proteinů. Obsah podjednotky  $G_s\alpha$  a  $G_z\alpha$  v cytosolární frakci nebyl zjištěn. Můžeme tedy říci, že v cytosolu byla prokázána určitá hladina  $G_i\alpha(1,2)$  a  $G_i\alpha(3)$  proteinů. Některé  $G\alpha$  podjednotky mohou být tedy solubilizovány, tj. může dojít k jejich uvolnění z membrány a přenosu do cytosolu (Chabre, 1987).

Na rozdíl od našich současných pozorování byl v některých předchozích studiích popsán výskyt cytosolárních forem  $G_s\alpha$  proteinů (Novotny *et al.*, 2001; Ransnas a Insel, 1989; Witte *et al.*, 1999). Tato odlišnost zřejmě souvisí se způsobem přípravy cytosolární frakce. V našem případě byl cytosol získán ultracentrifugací postnukleárního supernatantu při 300000 x g (60 min), což umožňuje mnohem účinnější oddělení partikulární frakce než podmínky, které byly použity v předchozích podobných experimentech.

Pomocí metody srdce *in situ* jsme dále detekovali vliv chronické stimulace opioidních receptorů morfinem na rozsah ischemického poškození myokardu (velikost infarktu, ischemické arytmie) po okluzi sestupné větve levé koronární arterie, kterou byl do příslušné oblasti myokardu levé komory srdeční zastaven přívod kyslíku a živin.

U morfinové skupiny potkanů, které byl podáván morfin (10 mg/kg) po dobu 28 dní, byly zaznamenány statisticky signifikantní změny. Relativní rozsah ischemického poškození myokardu byl u této skupiny zvířat menší o 27 % v porovnání s kontrolní skupinou. Přitom po vysazení morfinu došlo po 7 dnech k vymizení protektivního účinku. Také bylo zjištěno, že 10-denní podávání morfinu (10 mg/kg) potkanům nemělo statisticky významný vliv na velikost ischemického poškození myokardu.

Dalším sledovaným parametrem ischemického poškození byl výskyt ischemických arytmií. Výsledky ukázaly, že u potkanů, kterým byl podáván morfin ve vysokých dávkách po dobu 10 dní (10 mg/kg), došlo ke statisticky významnému snížení počtu předčasných komorových stahů z  $273 \pm 60$  (u kontrol) na  $107 \pm 42$  (u morfinové skupiny). Vysazení morfinu po dobu 7 dní následně po ukončení jeho podávání vedlo k normalizaci výskytu ischemických arytmií.

Mezi dnes nejvíce studované kardioprotektivní fenomény patří tzv. ischemický *preconditioning* (IPC) (Murry *et al.*, 1986). Jedná se o termín vyjadřující určitou míru adaptace buněk myokardu na opakované ataky ischemie. IPC působí antiischemicky a chrání tak srdeční tkáň před důsledky akutního ischemicko-reperfuzního poškození (Schultz a Gross, 2001).

Několik studií potvrdilo, že opioidní receptory mají důležitou úlohu při morfinem indukovaném *preconditioningu* (Chen *et al.*, 1996; McPherson a Yao, 2001; Shi *et al.*, 2003). S dosud známých poznatků vyplývá, že v mechanismu IPC se uplatňují také ATP závislé draselné kanály ( $K_{ATP}$  kanály) a proteinkináza C (McPherson a Yao, 2001; Valtchanova-Matchouganska a Ojewole, 2003). Stimulací opioidního receptoru morfinem při indukci IPC dochází k aktivaci proteinkinázy C (PKC) a  $K_{ATP}$  kanálů (McPherson a Yao, 2001; Schultz *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004). PKC může zřejmě aktivovat  $K_{ATP}$  kanály a další signální dráhy, např. MAPK kinázovou kaskádu. (Light *et al.*, 1996; Schultz a Gross, 2001). Otevřením  $K_{ATP}$  kanálů dochází k hyperpolarizaci membrány a buňka proto tak snadno nepodlehne ischemické depolarizaci a vtoku vápníku do buňky (Schultz a Gross, 2001). Avšak detailní analýza protektivních nitrobuněčných mechanismů zatím chybí.

Již dříve bylo ukázáno, že chronické působení morfinu může vykazovat kardioprotektivní účinek u myši (Peart a Gross, 2004; Shi *et al.*, 2003; Schultz a Gross, 2001). Naše nálezy nižšího výskytu ischemických arytmií u potkanů, kterým byl podáván morfin (10 mg/kg; 10 dní), potvrzují možnost ochranného působení morfinu proti arytmiím. Podobný antiarytmický efekt byl také pozorován u potkanů, kterým byl podáván morfin (20 mg/kg; 3 týdny) v pitné vodě (Chan *et al.*, 1987).

Výsledky našich fyziologických experimentů prokázaly u morfinové skupiny potkanů, kterým byly podávány vysoké dávky morfinu, významné snížení velikosti infarktu a omezení počtu ischemických arytmií (v závislosti na dávce a délce podávání morfinu). Tyto výsledky naznačují, že kardioprotektivní efekt morfinu závisí na jeho dávce a délce podávání.

## 6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala vlivem chronického působení morfinu na expresi a distribuci vybraných podjednotek G-proteinů v myokardu potkana. Dále byly sledovány potenciální kardioprotektivní účinky morfinu - byla zkoumána frekvence komorových arytmií a rozsah ischemického poškození srdce po podvázání sestupné větve levé koronární arterie. Na základě provedených experimentů jsme dospěli k těmto závěrům:

1. Dlouhodobé podávání morfinu neovlivnilo expresi podjednotek  $G_s\alpha$ ,  $G_i\alpha$ ,  $G_z\alpha$ ,  $G_{q/11}\alpha$  a  $G\beta$  proteinů v plazmatických membránách, ale bylo zaznamenáno mírné snížení hladiny  $G_o\alpha$  proteinu.
2. V cytosolu byla prokázána určitá hladina  $G_i\alpha(1,2)$  a  $G_i\alpha(3)$  proteinů, ale nebyla zjištěna přítomnost podjednotek  $G_s\alpha$  a  $G_z\alpha$  v cytosolární frakci.
3. Chronické podávání vysokých dávek morfinu může vyvolat kardioprotektivní účinky. Došlo k významnému snížení velikosti infarktu a k omezení počtu ischemických arytmií (v závislosti na dávce a délce podávání morfinu).



## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Adriaensen, H., Vissers, K., Noorduyn, H., and Meert, T. (2003). Opioid tolerance and dependence: an inevitable consequence of chronic treatment? *Acta Anaesthesiol Belg* 54, 37-47.
2. Birnbaumer, L., Abramowitz, J., and Brown, A.M. (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1031, 163-224.
3. Blume, A.J., Lichtshtein, D., and Boone, G. (1979). Coupling of opiate receptors to adenylate cyclase: requirement for Na<sup>+</sup> and GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5626-5630.
4. Bourne, H.R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9, 134-142.
5. Bray, P., Carter, A., Simons, C., Guo, V., Puckett, C., Kamholz, J., Spiegel, A., and Nirenberg, M. (1986). Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8893-8897.
6. Breitwieser, G.E. (2004). G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res* 94, 17-27.
7. Brownstein, M.J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5391-5393.
8. Buchanan, F.G., and DuBois, R.N. (2006). Emerging roles of beta-arrestins. *Cell Cycle* 5, 2060-2063.
9. Connor, M., and Christie, M.D. (1999). Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 493-499.

10. Chabre, M. (1987). The G proteins connection: is it in the membrane or cytoplasm? *Trends Biochem Sci* 12, 213-215.
11. El Mouedden, M., and 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. *Pharmacol Biochem Behav* 87, 30-40.
12. Ferdinandy, P., Schulz, R., and Baxter, G.F. (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 59, 418-458.
13. Freedman, N.J., and Lefkowitz, R.J. (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* 51, 319-351; discussion 352-313.
14. Freedman, N.J., and Lefkowitz, R.J. (2004). Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest* 113, 1379-1382.
15. Fukami, K. (2002). Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J Biochem* 131, 293-299.
16. Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56, 615-649.
17. Gray, A.C., Coupar, I.M., and White, P.J. (2006). Comparison of opioid receptor distributions in the rat central nervous system. *Life Sci* 79, 674-685.
18. Hamm, H.E., and Gilchrist, A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 8, 189-196.
19. Hollinger, S., and Hepler, J.R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54, 527-559.

20. Homburger, V., Brabet, P., Audigier, Y., Pantaloni, C., Bockaert, J., and Rouot, B. (1987). Immunological localization of the GTP-binding protein Go in different tissues of vertebrates and invertebrates. *Mol Pharmacol* 31, 313-319.
21. Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., and Morris, H.R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258, 577-580.
22. Hurley, J.H. (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 274, 7599-7602.
23. Chan, M.Y., Dai, S., and Ko, W.W. (1987). Effects of morphine on cardiovascular responses to acute myocardial ischaemia in rats. *Br J Pharmacol* 90, 537-543.
24. Chen, Y., Liu, J., and Yu, L. (1996). Functional coupling of a mu opioid receptor to G proteins and adenylyl cyclase: modulation by chronic morphine treatment. *Addict Biol* 1, 49-59.
25. Inturrisi, C.E. (2002). Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain* 18, S3-13.
26. Iyengar, R. (1993). Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *Faseb J* 7, 768-775.
27. Johnston, C.A., and Watts, V.J. (2003). Sensitization of adenylate cyclase: a general mechanism of neuroadaptation to persistent activation of G $\alpha$ (i/o)-coupled receptors? *Life Sci* 73, 2913-2925.
28. Jones, D.T., and Reed, R.R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790-795.

29. Knapp, R.J., Malatynska, E., Collins, N., Fang, L., Wang, J.Y., Hruby, V.J., Roeske, W.R., and Yamamura, H.I. (1995). Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *Faseb J* 9, 516-525.
30. Koneru, A., Satyanarayana, S., and Rizwan, S. (2009). Endogenous Opioids: Their Physiological Role and Receptors. *Global Journal of Pharmacology* 3, 149-153.
31. Kreek, M.J., and LaForge, K.S. (2007). Stress responsivity, addiction, and a functional variant of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Interv* 7, 74-78.
32. Kurose, H. (2003). Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci* 74, 155-161.
33. Law, P.Y., Wong, Y.H., and Loh, H.H. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 389-430.
34. Lefkowitz, R.J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25, 413-422.
35. Light, P. E., Sabir, A. A., Allen, B. G., Walsh, M. P., French, R. J. (1996) Protein Kinase-C-Induces Changes in the Stoichiometry of ATP Binding Activite Cardiac ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels. *Circulation Research* 79, 399-406.
36. Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J., and Clapham, D.E. (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* 325, 321-326.
37. Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-465.

38. Madamanchi, A. (2007). Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *Mcgill J Med* 10, 99-104.
39. Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., and Watson, S.J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18, 22-29.
40. McPherson, B.C., and Yao, Z. (2001). Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K(ATP) channels in myocytes. *Circulation* 103, 290-295.
41. Milligan, G. (1993). Agonist regulation of cellular G protein levels and distribution: mechanisms and functional implications. *Trends Pharmacol Sci* 14, 413-418.
42. Minami, M., and Satoh, M. (1995). Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 23, 121-145.
43. Moro, O., Lameh, J., Hogger, P., and Sadee, W. (1993). Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem* 268, 22273-22276.
44. Morris, A.J., and Malbon, C.C. (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79, 1373-1430.
45. Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
46. Napier, L.D., Roerig, S.C., Yoshishige, D.A., Barron, B.A., and Caffrey, J.L. (1999). Canine cardiac muscarinic receptors, G proteins, and adenylate cyclase after long-term morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 291, 725-732.

47. Neckar, J., Papousek, F., Novakova, O., Ost'adal, B., and Kolar, F. (2002). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol* 97, 161-167.
48. Neer, E.J. (1994). G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci* 3, 3-14.
49. Neer, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.
50. Neves, S.R., Ram, P.T., and Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science* 296, 1636-1639.
51. Novotny, J. (2006). [A brief overview of transmembrane signalling regulated by trimeric G-proteins]. *Cesk Fysiol* 55, 128-137.
52. Novotny, J., Bourova, L., Kolar, F., and Svoboda, P. (2001). Membrane-Bound and cytosolic forms of heterotrimeric G proteins in young and adult rat myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J Cell Biochem* 82, 215-224.
53. Peart, J.N., and Gross, G.J. (2004). Chronic exposure to morphine produces a marked cardioprotective phenotype in aged mouse hearts. *Exp Gerontol* 39, 1021-1026.
54. Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
55. Przewlocki, R., and Przewlocka, B. (2001). Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 429, 79-91.
56. Pugsley, M.K. (2002). The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 93, 51-75.

57. Randich, A., Thurston, C.L., Ludwig, P.S., Timmerman, M.R., and Gebhart, G.F. (1991). Antinociception and cardiovascular responses produced by intravenous morphine: the role of vagal afferents. *Brain Res* 543, 256-270.
58. Ransnas, L.A., and Insel, P.A. (1989). Quantitation of a guanine nucleotide binding regulatory protein by an enzyme-linked immunosorbent competition assay. *Anal Biochem* 176, 185-190.
59. Rebecchi, M.J., and Pentylala, S.N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80, 1291-1335.
60. Rokyta, R., Kozák, J., a kol. (2009). Metodické pokyny pro farmakoterapii bolesti. *Bolest: časopis pro studium a léčbu bolesti*. roč. 12, 4-24.
61. Salazar, N.C., Chen, J., and Rockman, H.A. (2007). Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1006-1018.
62. Satoh, M., and Minami, M. (1995). Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther* 68, 343-364.
63. Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375, 503-515.
64. Shi, E., Jiang, X., Bai, H., Gu, T., Chang, Y., and Wang, J. (2003). Cardioprotective effects of morphine on rat heart suffering from ischemia and reperfusion. *Chin Med J (Engl)* 116, 1059-1062.
65. Schallmach, E., Steiner, D., and Vogel, Z. (2006). Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: implications for acute and chronic opioid exposure. *Neuropharmacology* 50, 998-1005.

66. Schultz, J.E., and Gross, G.J. (2001). Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther* 89, 123-137.
67. Schultz, J.E., Hsu, A.K., and Gross, G.J. (1996). Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res* 78, 1100-1104.
68. Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
69. Simonds, W.F. (1999). G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* 20, 66-73.
70. Svoboda, P., and Novotny, J. (2002). Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. *Cell Mol Life Sci* 59, 501-512.
71. Svoboda, P., Teisinger, J., Novotny, J., Bourova, L., Drmota, T., Hejnova, L., Moravcova, Z., Lisy, V., Rudajev, V., Stohr, J., *et al.* (2004). Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiol Res* 53 *Suppl 1*, S141-152.
72. Toker, A. (1998). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol* 10, 254-261.
73. Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., and Hansen, H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, S133-153.
74. Valtchanova-Matchouganska, A., and Ojewole, J.A. (2003). 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, 73-80.



75. Watts, V.J. (2002). Molecular mechanisms for heterologous sensitization of adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 1-7.
76. Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85, 1159-1204.
77. Williams, J.T., Christie, M.J., and Manzoni, O. (2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81, 299-343.
78. Witte, K., Schnecko, A., and Lemmer, B. (1999). Agonist-induced release of splice variants of the alpha subunit of the stimulatory G-protein from rat cardiac membranes. *Biochem Pharmacol* 57, 539-543.
79. Wittert, G., Hope, P., and Pyle, D. (1996). Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 877-881.
80. Wu, S., Wong, M.C., Chen, M., Cho, C.H., and Wong, T.M. (2004). Role of opioid receptors in cardioprotection of cold-restraint stress and morphine. *J Biomed Sci* 11, 726-731.
81. Zimlichman, R., Gefel, D., Eliahou, H., Matas, Z., Rosen, B., Gass, S., Ela, C., Eilam, Y., Vogel, Z., and Barg, J. (1996). Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 93, 1020-1025.
82. Internetové zdroje: <http://nobelprize.org>