Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Vliv chronického působení morfinu na funkci signálních systémů řízených trimerními G-proteiny v srdci potkana

Bc. Jitka Škrabalová

Praha 2011

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Prohlášení o samostatném vypracování práce

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně na základě uvedených literárních zdrojů a konzultací se svým školitelem.

V Praze dne 29. 8. 2011 ……

Bc. Jitka Škrabalová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, Dsc. za jeho odborné vedení, ochotu a cenné rady při sepisování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu ve studiu a kolegům z laboratoře za zodpovídání nesčetných dotazů a příjemné pracovní prostředí.

Abstrakt

V nedávné době bylo zjištěno, že působení morfinu může významně omezovat poškození tkáně, ke kterému dochází v průběhu ischemie myokardu. Molekulární mechanismy, kterými morfin působí na srdce, jsou však doposud jen velmi málo objasněny. Záměrem této práce bylo sledovat vliv chronického 10denního a 27denního působení nízkých (1 mg/kg/den) a vysokých (10 mg/kg/den) dávek morfinu na expresi vybraných receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR) a na expresi a aktivitu adenylylcyklázy (AC).

Chronický vliv morfinu snižoval expresi κ-opioidních receptorů až při 27denním působení, 10denní působení nemělo na expresi receptorů vliv. Při stanovení exprese β_1-AR a β_2-AR pomocí imunoblotů nebyla zjištěna významná změna jejich distribuce, avšak přesnější stanovení exprese β-AR pomocí saturační vazebné studie odhalilo, že při 27denním podávání vysokých dávek morfinu dochází k patrnému nárůstu celkového počtu těchto receptorů. Podávání vysokých dávek morfinu indukovalo zvýšenou expresi adenylylcyklázy (AC) isoformy V/VI, množství exprimované AC se přitom snižovalo úměrně s dobou od ukončení podávání morfinu. Nízké dávky morfinu indukovaly expresi AC jen při 27denním podávání. Chronické působení morfinu nemělo vliv na bazální aktivitu AC, zvyšovalo však stimulovanou aktivitu AC, a snížilo inhibiční vliv aktivovaných Gi podjednotek na aktivitu AC.

Z našich výsledků vyvozujeme, že chronické působení morfinu má vliv na zvýšení exprese AC V/VI a primárně neindukuje změnu množství opioidních receptorů v cytoplasmatické membráně. Chronické podávání morfinu zřejmě ovlivňuje β-adrenergní signální systém a vede k upregulaci stimulačních a downregulaci inhibičních drah ovlivňujících aktivitu AC.

Klíčová slova: morfin, receptory spřažené s G-proteiny, opioidní receptory, β-adrenergní receptory, adenylylcykláza

Abstract

It has recently been discovered that the effect of morphine can significantly reduce the tissue damage that occurs during myocardial ischemia. The molecular mechanisms by which morphine acts on the heart are still little understood. The aim of this thesis was to monitor the effect of chronic 27-day and 10-day administration of low (1 mg/kg/day) and high (10 mg/kg/ day) doses of morphine on the expression of selected G-protein-coupled receptors (GPCR) and on the expression and activity of adenylyl cyclase (AC).

Chronic (27 days) morphine treatment reduced the expression of κ-opioids receptors, but 10-day morphine exposure did not influence the expression of these receptors. Assessment of β_1- and β_2-AR by immunoblot technique did not show any significant change in the expression, but the more accurate determination of β-AR expression using the saturation binding studies revealed that 27-day treatment with high doses of morphine appreciable increased the total number of these receptors. Administration of high doses of morphine led to marked up-regulation of adenylyl cyclase (AC) isoforms V/VI, and the amount of AC decreased proportionally with the time of discontinuation of morphine administration. Low doses of morphine up-regulated AC only during 27-day administration. Chronic morphine exposure did not affect the basal aktivity of AC however, it increased the stimulated AC aktivity and reduce the inhibitory effect of activated Gi subunits on the enzyme activity.

Our results indicate that chronic morphine exposure has significant effect on the expression of AC V/ VI and does not induce any change in the amount of opioid receptors in the cytoplasmic membrane. Chronic morphine administration appears to affect myocardial β-adrenergic signaling system and leads to upregulation of the stimulatory pathways and downregulation of the inhibitory pathways affecting the activity of AC.

Keywords: morphine, G-protein coupled receptors (GPCR), opioid receptors, β-adrenergic receptors, adenylyl cyclase

OBSAH

Seznam zkratek……...8

1. Úvod……10

2. Literární přehled……...11

2.1 Morfin……...11

2.2 Receptory spřažené s G-proteiny……..13

2.3 Opioidní receptory……16

2.4 Myokardiální adrenergní signální systém……20

2.5 Kardioprotektivní působení morfinu……22

2.6 Vliv chronického působení morfinu na signální dráhy GPCR v srdci……..24

3. Cíle diplomové práce……27

4. Materiál a metody……..28

4.1 Pokusná zvířata……28

4.2 Optimalizace metody homogenizace a frakcionace myokardu……29

4.2.1 Roztoky……...29

4.2.2 Postup práce……29

4.3 Stanovení proteinů……30

4.3.1 Roztoky……...31

4.3.2 Postup práce……31

4.4 Elektroforéza a imunobloting……...32

4.4.1 Roztoky……...32

4.4.2 Postup práce……32

4.5 Stanovení enzymové aktivity adenylylcyklázy…….33

4.5.1 Roztoky……...34

4.5.2 Postup práce……34

4.6 Saturační vazebné pokusy…….35

4.6.1 Roztoky……...35

4.6.2 Postup práce……35

4.7 Analýza dat……...36

5. Výsledky…….37

5.1 Optimalizace metody homogenizace a frakcionace myokardu……37

5.2 Vliv dlouhodobého podávání morfinu na expresi adenylylcyklázy v myokardu potkanů ……...39

5.3 Stanovení aktivity adenylylcyklázy v myokardu potkanů……40

5.3.1 Bazální a stimulovaná aktivita AC…….40

5.3.2 Inhibiční vliv selektivních agonistů na aktivitu AC……...41

5.4 Sledování exprese vybraných GPCR v myokardu potkanů po dlouhodobém podávání morfinu……41

5.4.1 Exprese opioidních receptorů…….41

5.4.2 Exprese β_1- a β_2-adrenergních receptorů – stanovení pomocí imunoblotingu…….43

5.4.3 Exprese β_1- a β_2-adrenergních receptorů – sanovení pomocí saturačních vazebných studií……..44

6. Diskuse……47

7. Závěr……...53

8. Seznam použité literatury…….54

Seznam zkratek

AC	adenylylcykláza
AR	adrenergní receptory
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
DAG	diacylglycerol
DOR	delta opioidní receptory
EOP	endogenní opioidní peptidy
ERK	kinázy regulované extracelulárním signálem
GABA	kyselina γ-aminomáselná
GDP	guanosindifosfát
GEF	guanin-nukleotidový výměnný faktor
GIRK	G-proteinem aktivovaný dovnitř usměrňující kanál
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
GRK	G-protein vázající receptorové kinázy
GSKβ	glykogen syntáza kináza β
GTP	guanosintrifosfát
Ih	hyperpolarizací aktivovaný kationový kanál
IPC	ischemický preconditioning
IP_3	inositol 1,4,5-trifosfát
KOR	kappa opioidní receptor
mPTP	mitochondriální permeabilní přechodné kanály

MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MOR	mí opioidní receptor
OPC	opioidní preconditioning
OR	opioidní receptory
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLA	fosfolipáza A
PLC	fosfolipáza C
PLN	fosfolamban
POC	postconditioning
RGS	regulační proteiny G-proteinové signalizace
RNA	ribonukleová kyselina
RYR	ryanodinové receptory
SR	sarkoplasmatickém retikulu
TOR	target of rapamicin (kináza)
7TM	sedm transmembránových α-helikálních segmentů

1. Úvod

Morfin je přirozeně se vyskytující opioid, který se pro své silné analgetické účinky využívá široce v klinické praxi. Při vazbě na receptor vyvolává morfin svůj primární efekt napodobováním endogenních opioidních peptidů, které se přirozeně vytvářejí v tělech živočichů a podílejí se zde na regulaci četných fyziologických funkcí. V nedávné době bylo zjištěno, že morfin může svým působením významně snížit poškození, ke kterému dochází během infarktu myokardu. Molekulární mechanismy působení morfinu byly do té doby zkoumány především v centrální nervové soustavě v souvislosti se snahou objasnění vzniku tolerance a závislosti, ke které dochází po dlouhodobém působení morfinu. O vlivu morfinu na signální dráhy v srdci se tak ví zatím jen poměrně málo. Morfin působí v srdci především na κ a δ opioidní receptory, po jejichž aktivaci dochází k inhibičnímu působení na adenylylcyklázu (AC). Bylo však také zjištěno, že chronické působení morfinu může naopak vyvolat i zvýšenou senzitivitu AC. Chronické působení morfinu může zřejmě zároveň ovlivňovat také β-adrenergní signální systém, který tvoří rozhraní mezi sympatickým nervovým systémem a kardiovaskulárním systémem a je tak důležitým regulátorem srdečních funkcí.

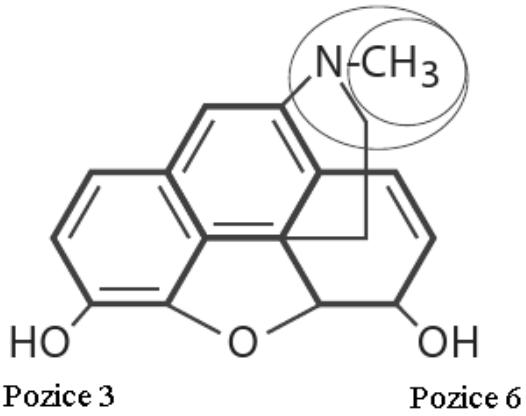
Cílem této diplomové práce je prozkoumat, jaký vliv má chronické působení morfinu na expresi κ a δ opioidních receptorů a β-adrenergní receptorů a na aktivitu a expresi AC. Tento výzkum může přinést nové poznatky o důležitých mechanizmech řídicích srdeční činnost, které mohou být potenciálně ovlivněny dlouhodobým působením morfinu.

2. Literární přehled

2.1 Morfin

Morfin je přirozeně se vyskytující alkaloid patřící do skupiny opioidů, tedy látek, které vyvolávají svůj účinek vazbou na opioidní receptory a zároveň jsou stereospecificky antagonizovány naloxonem (viz obr. 1). Morfin je součástí opia, které je získáváno z pryskyřice vlčího máku *Papaver somniferum* (*Oxford Textbook of Palliative Medicine*, 1998). Zároveň se morfin vyskytuje také v tkáních a tělesných tekutinách živočichů, nicméně v daleko menší koncentraci než v *Papaver somniferum*. Jeho biosyntetické cesty byly nalezeny například v játrech, krvi nebo mozku živočichů. Morfin syntetizovaný v tělech živočichů se zřejmě podílí především na modulaci vnímání bolesti tím, že zvyšuje práh pro bolestivé stimuly. (Benyhe, 1994; Corbett et al., 2006).

Opium je pro své vlastnosti používáno z léčebných, ale i sociálních důvodů už po dlouhá tisíciletí. Tato látka dokáže tlumit bolest, navozovat spánek, bránit průjmům a produkovat stavy euforie (*Pharmacology*, 2003). Morfin byl jako první alkaloid izolován z opia německým lékárníkem Friedrichem Serturnerem roku 1804. Jeho název byl odvozen od jména řeckého boha snů Morfeuse (Benyhe, 1994).



Obr. 1: Struktura morfinu. Morfin se skládá z benzenového jádra s fenolovou hydroxylovou skupinou na pozici 3, alkoholovou hydroxylovou skupinou na pozici 6 a terciálního atomu dusíku. Obě hydroxylové skupiny mohou být konvertovány na ethery nebo estery. Po O-methylaci na pozici 3 vzniká kodein, Po O-acetylaci na pozici 3 a 6 vzniká diacetylmorfin (heroin). Terciální dusík je důležitý pro analgetické vlastnosti

morfinu, pokud by byl dusík v kvarterní formě, morfin by nebyl schopen projít do centrální nervové soustavy a výrazně by se tím snížil stupeň analgesie (upraveno podle Trescot et al., 2008).

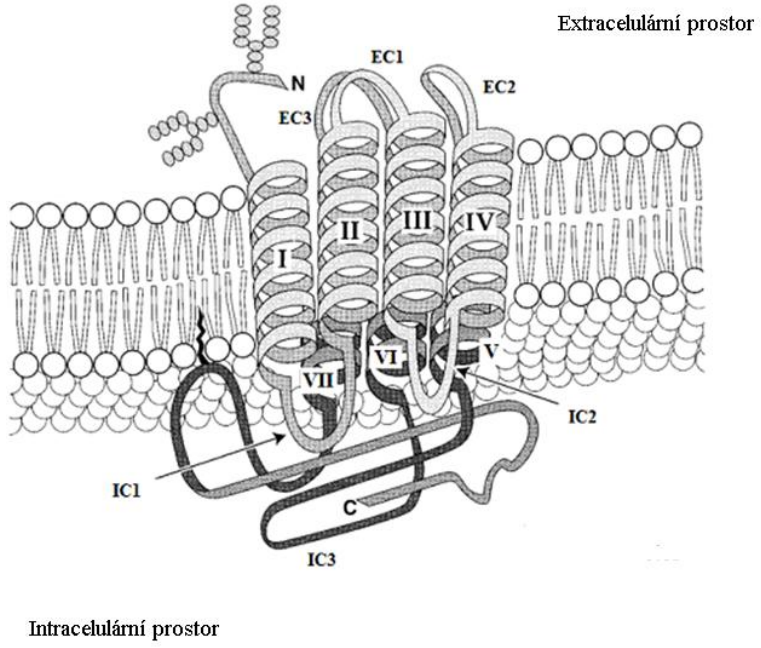
Krátce po izolaci se začaly široce využívat léky obsahující morfin k léčení kolik, průjmů a potlačování nejrůznějších bolestivých stavů. Spolu s nárůstem využívání morfinu jako léku začalo růst jeho zneužívání, a to především ve formě jeho derivátu diacetylmorfinu – heroinu. Legální užívání morfinu a dalších opioidů se z toho důvodu dostalo pouze do rukou lékařů, kteří se v případě neoprávněného předepsání tohoto léku vystavovali hrozbě ztráty lékařské licence a trestního stíhání. Tato striktní regulace vedla k neochotě lékařů předepisovat opioidy a dotkla se tak především pacientů, jejichž bolestivé stavy byly nedostatečně léčeny. Koncem 20. století bylo díky lékařům z řad zastánců užívání opioidů jako nenahraditelných léčiv pro tlumení bolestí obnoveno a přijato používání opioidů pro léčbu akutních bolestí, bolestí spojených s rakovinou a bolestí spojených s terminálními stádii různých chorob (Ballantyne a Mao, 2003; Hill 1996). Morfin a další opioidy dodnes zůstávají nejefektivnějšími analgetiky a navzdory medicínským pokrokům jsou to často i jediná analgetika schopná utlumit prudké bolesti (Ballantyne, 2008).

Při dlouhodobém podávání morfinu často dochází k adaptivním změnám v odpovědi na jeho působení a rozvíjí se tolerance a závislost. Tolerance může být definována jako snížení citlivosti organismu na danou látku v důsledku jejího dlouhodobého nebo opakovaného užívání. Závislost lze definovat jako absolutní potřebu dané látky pro udržení normální fyziologické funkce (Taylor a Fleming, 2000). Tolerance se vyvíjí velice rychle, může se objevit již 12-24 hodin po podání morfinu a je často doprovázena fyzickým abstinenčním syndromem. Pokud mluvíme o závislosti, je nutné rozlišovat mezi terapeutickou, fyzickou a psychickou závislostí. Terapeutická závislost se může vyskytovat u pacientů, kteří vyžadují léčbu opioidními analgetiky pro potlačení příznaků nebo průběhu nemoci a jsou tak pouze závislí na terapeutickém působení daného opioidu. Tato terapeutická závislost může, ale nemusí vést k rozvoji fyzické závislosti, ale nikdy není spojena s psychickou závislostí. Fyzická závislost je spojena s abstinenčním syndromem. Pokud se tedy u pacienta rozvinula fyzická závislost, dojde při náhlém přerušení podávání opiodního analgetika k rozvoji abstinenčních příznaků. Ty se objevují přibližně 12 hodin po přerušení podávání opioidu a jsou charakteristické pocitem úzkosti, nervozitou, podrážděností, střídáním

zimnic s horkými návaly. Po 2-3 dnech dochází k vyvrcholení abstinenčního syndromu, tento stav je doprovázen nevolností, zvracením, křečemi břicha, třesem a nespavostí. Vzniku abstinenčních příznaků lze zabránit pomalým a postupným snižováním dávky opioidu až do úplného přerušení jeho podávání. Zatímco fyzické příznaky závislosti mizí za několik dní, výjimečně za několik týdnů, projevy psychické závislosti, které jsou spojeny s neustálým bažením po dané látce a tendencí jí vyhledávat, získávat a užívat, přetrvávají po měsíce až roky. Psychická závislost se jen výjimečně objevuje u pacientů, kteří užívali opioidy jako analgetika (*Oxford Textbook of Palliative Medicine*, 1998; *Pharmacology*, 2003).

2.2 Receptory spřažené s G-proteiny

Receptory spřažené s G-proteiny (heterotrimerními regulačními proteiny vázajícími guaninové nukleotidy), zkráceně GPCR, tvoří největší rodinu membránových receptorů. Zprostředkovávají nejvíce fyziologických odpovědí na působení hormonů, neurotransmiterů a podnětů okolního prostředí a mají tak vysoký potenciál jako terapeutické cíle pro široké spektrum chorob. GPCR jsou charakteristické svojí strukturu tvořenou sedmi transmembránovými α-helikálními segmenty (7TM) oddělenými třemi intracelulárními a třemi extracelulárními smyčkami, extracelulárním N koncem a cytoplasmatickým C koncem (viz obr. 2).



Obr 2: Struktura GPCR. I-VII- transmembránové α-helixy, IC1-IC3- intracelulární

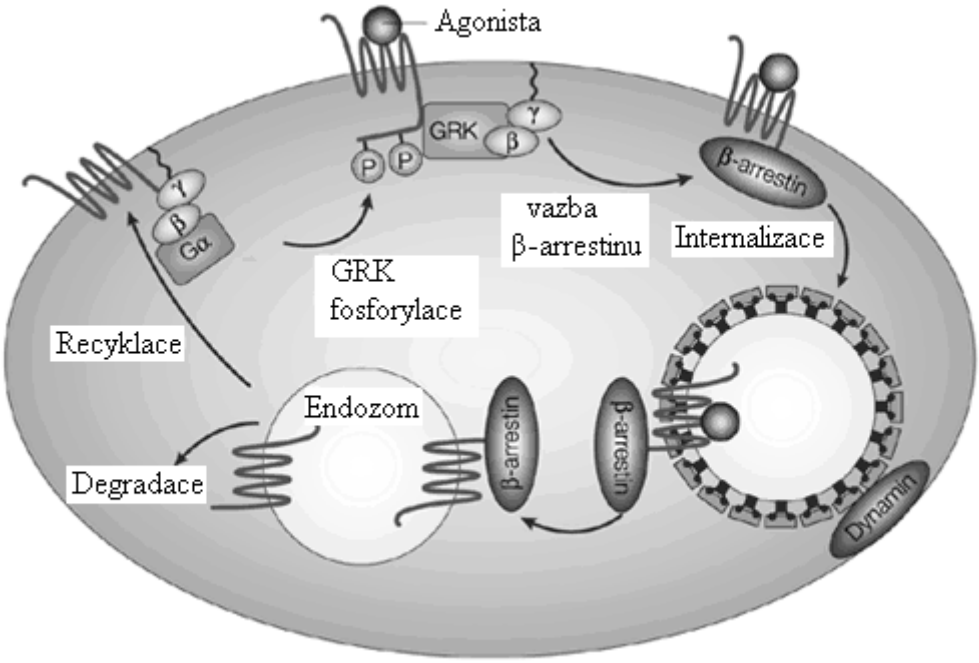
smyčky, EC1-EC3- extracelulární smyčky, N- extracelulární N konec, C- cytosolický C konec (upraveno podle Morris a Malbon).

Extracelulární povrch receptoru má důležitou roli při rozpoznání a vazbě signální molekuly, zatímco intracelulární část receptoru se podílí na rozpoznání a aktivaci G-proteinů. Na základě sekvenčních a strukturálních podobností se mohou GPCR obratlovců dělit do tří hlavních rodin: rodopsinové, sekretinové a glutamátové. Rodopsinová rodina je největší a nejrozmanitější, její členové mají charakteristické sekvenční motivy, ze kterých vyplývají společné strukturální rysy a aktivační mechanismus. Navzdory tomu mají jednotlivé GPCR této rodiny jedinečnou kombinaci signál přenášející aktivity, která ovlivňuje různé G-proteinové podtypy, různé komplexy regulačních procesů a tím i různé signální dráhy závislé na G-proteinech.

Účinná energie přenášená mezi vazebným místem GPCR a místem interakce s G-proteinem je závislá na četných interakcích mezi receptorem a jeho ligandem, nejedná se tedy jen o pouhé zaplnění vazebného místa. Plný agonista je schopný maximální receptorové stimulace, zatímco částečný agonista nedosáhne plné aktivity ani při své saturující koncentraci. Neutrální agonista nemá sice žádný efekt na aktivitu, ale může bránit navázání jiných ligandů. Působení antagonisty redukuje bazální aktivitu receptoru pod aktivitu receptoru s navázaným ligandem (Rosenbaum et al., 2009; Gether a Kobilka, 1998). Navázání ligandu na GPCR indukuje konformační změnu transmembránových α-helixů, která přeruší iontovou interakci mezi třetím a šestým transmembránovým segmentem na cytoplasmatické straně a umožní tak navázání G-proteinu (Ballesteros et al., 2001). G proteiny se skládající se z Gα podjednotky s GTPázovou aktivitou (schopností vázat a hydrolyzovat guanosintrifosfát- GTP) a Gβγ dimeru, který slouží jako funkční monomer. Pokud je na Gα podjednotce navázán guanosindifosfát- GDP, je Gα podjednotka spojena s Gβγ dimetrem a tvoří neaktivní heterotrimer. Konformační změna receptoru, ke které dochází po aktivaci agonistou, katalyzuje uvolnění GDP z Gα podjednotky a jeho výměnu za GTP. Aktivovaný receptor tedy slouží jako guanin-nukleotidový výměnný faktor (GEF) pro G-proteiny. Tato změna současně oslabuje afinitu Gα k receptoru a Gβγ dimeru. Uvolněné podjednotky pak ovlivňují aktivitu jedné nebo více efektorových molekul jako jsou adenylylcyklázy (AC), fosfolipázy A nebo C (PLA, PLC) nebo iontové kanály; ty pak produkují druhé posly a šíří tak dál signál uvnitř buňky. G-proteiny jsou obecně děleny podle svých α podjednotek do čtyř hlavních skupin: G_s, G_q, G_i a G_{12}. Časté působení

jednotlivých skupin je: G_s aktivace AC, G_i inhibice AC a aktivace dovnitř usměrňujícího draselného kanálu (GIRK), G_q aktivace fosfolipázy Cβ a G_{12} aktivace Rho (GEF protein). Aktivovaný stav G-proteinu setrvává, dokud není hydrolyzováno GTP navázané na Gα, potom Gα a Gβγ dimer znovu asociují do neaktivního heterotrimeru (Hamm a Gilchrist, 1996; Clapham a Neer, 1997; Pierce et al., 2002). Za hydrolýzu GTP jsou zodpovědné regulační proteiny G-proteinové signalizace (RGS), tyto proteiny mají na své RGS doméně protein aktivující GTPázu, ten po interakci s aktivovaným Gα hydrolyzuje GTP na GDP a je tak zodpovědný za rychlé vypnutí G-proteinu (De Vries et al., 2000).

GPCR a jejich signální dráhy zprostředkovávají celou řadu esenciálních fyziologických odpovědí buňky na extracelulární podměty a proto musí být jejich působení krátkodobě i dlouhodobě regulováno tak, aby mohlo dojít k desenzitizaci receptoru i při přetrvávajícím stimulu. Častým způsobem dlouhodobé regulace je downregulace receptoru. Dochází k ní po dlouhodobém působení agonisty a vztahuje se čistě na ztrátu receptorů v důsledku zvýšené degradace receptoru nebo snížené syntézy receptorů a destabilizace messenger RNA. Ukončení signalizace v tomto případě trvá několik hodin. Na rychlé desenzitizaci GPCR se podílejí tři rodiny regulačních molekul: proteinkinázy regulované druhými posly – PKA a PKC, G-protein vázající receptorové kinázy (GRK) a arrestiny. Jedním z mechanizmů desenzitizace je zpětnovazebná regulace receptorů, kdy po aktivaci receptorů dochází k aktivaci efektorových molekul jako je AC produkující cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) nebo fosfolipáza C (PLC), která štěpí v membráně fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na inositol 1,4,5-trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG) a tak dochází k aktivaci PKA (aktivovaná cAMP) nebo PKC (aktivovaná DAG). Kinázy pak fosforylují intracelulární části GPCR, receptor mění svou konformaci a ztrácí schopnost vázat a aktivovat další G-proteiny. Tímto způsobem dochází k heterologní regulaci, tedy desenzitizaci zprostředkované bez specifických agonistů. Každý stimulant zprostředkovávající produkci cAMP nebo DAG má zároveň potenciál snižovat citlivost každého GPCR. Hlavním regulačním mechanizmem je rychlá homologní desenzitizace zprostředkovaná agonistou daného GPCR. K této regulaci dochází za pomoci serin/treoninových protein kináz GRK, které fosforylují aktivované GPCR. Na fosforylovaný receptor se váže β-arrestin a brání tak navázání dalšího G-proteinu. Navázání β-arrestinu může zároveň iniciovat internalizaci receptoru (Lefkowitz, 1998; Pitcher et al. 1998) viz obr. 3.



Obr. 3: Homologní desenzitizace GPCR. Aktivace receptoru agonistou vede k disociaci Gα a Gβγ podjednotky. Volná Gβγ rekrutuje několik GRK (G-protein vázající receptorové kinázy), které pak specificky fosforylují GPCR s navázaným agonistou. Fosforylace vede k navázání β-arrestinu na receptor a vzniklý komplex receptor-β-arrestin je internalizován váčkem opláštěným klatrinem. Endocytovaný váček přechází v endozom. V kyselém prostředí endozomu dochází k defosforylaci receptoru. Receptor je poté vrácen zpátky do plasmatické membrány nebo degradován (upraveno podle Pierce et al., 2002).

2.3 Opioidní receptory

Opioidní receptory (OR) můžeme rozdělit na tři hlavní skupiny: μ (mí) - MOR, κ (kappa) - KOR a δ (delta) - DOR. Podle farmakologických studií má navíc každá skupina dva až tři receptorové podtypy (μ_1-μ_3, κ_1-κ_3, δ_1-δ_2). Jednotlivé skupiny se od sebe liší distribucí, specifickými ligandy a svou funkcí (Minami a Satoh, 1995; Jordan et al., 2000). Klonováním jednotlivých OR bylo zjištěno, že tyto receptory patří do velké rodiny GPCR. Podle aminokyselinových sekvencí jednotlivých skupin OR dosahují přibližně 30% homologie s dalšími členy rodiny GPCR, zatímco homologie mezi jednotlivými skupinami OR dosahuje 60 - 70 %. Nejvyšší homologie mezi OR je na transmembránových segmentech a intracelulárních smyčkách, naopak nejnižší

homologie je na druhé a třetí extracelulární smyčce, na extracelulárním N konci a intracelulárním C konci (Jordan et al., 2000).

Distribuce OR je dobře zmapována v centrální nervové soustavě (CNS), kde jsou s menšími regionálními rozdíly široce zastoupeny všechny tři skupiny OR (Mansour et al., 1995). Výzkumu distribuce OR v periferní tkáni bylo zatím věnováno poměrně málo pozornosti. Přítomnost všech skupin OR byla doposud zjištěna v tenkém střevě, tlustém střevě, nadledvinách, ledvinách, plicích, slezině, varlatech, vaječnících a děloze. V žaludku byly nalezeny pouze DOR a KOR, v játrech pouze MOR a DOR. V srdci byl zjištěn výskyt převážně KOR a v menší míře se zde vykytovaly i DOR, MOR zde nebyly detekovány (Wittertet al., 1996). Různé projevy působení aktivovaných OR nejsou tedy důsledkem toho, že by každá skupina receptorů vyvolávala různou buněčnou odpověď, ale právě různé anatomická distribuce jednotlivých typů OR (Corbett et al., 2006).

Všechny aktivované OR váží pertusis toxin senzitivní G_i/G_o proteiny. Působení aktivovaných G_i/G_o proteinů v buňce je:

A) Inhibice AC

V důsledku inhibice AC dochází k poklesu cAMP v buňce. Pokles cAMP inhibuje hyperpolarizací-aktivované kationové kanály (Ih), které zajišťují kationtově neselektivní tok do buňky. Jejich inhibicí dochází k poklesu membránového potenciálu a tím i buněčné excitability (Williams et al., 2001). Pokles cAMP zároveň snižuje aktivitu cAMP dependentní kinázy PKA a může tak dojít k poklesu na PKA závislém uvolňování neurotransmiterů (Corbett et al., 2006).

B) Regulace iontových kanálů

Iontové kanály jsou regulovány většinou působením Gβγ podjednotky. Opioidy mohou aktivovat několik druhů draselných kanálů, například GIRK nebo Ca^{2+}dependentní K^+ kanály. Opioidy zároveň inhibují napětím ovládané vápenaté kanály a tím snižují vtok Ca^{2+} do buňky. V důsledku opioidní regulace iontových kanálů tedy dochází ke snížení excitability buňky a výlevu neurotransmiterů (Williams et al., 2001; Zollner a Stein, 2007).

C) Inhibice uvolňování neurotransmiterů

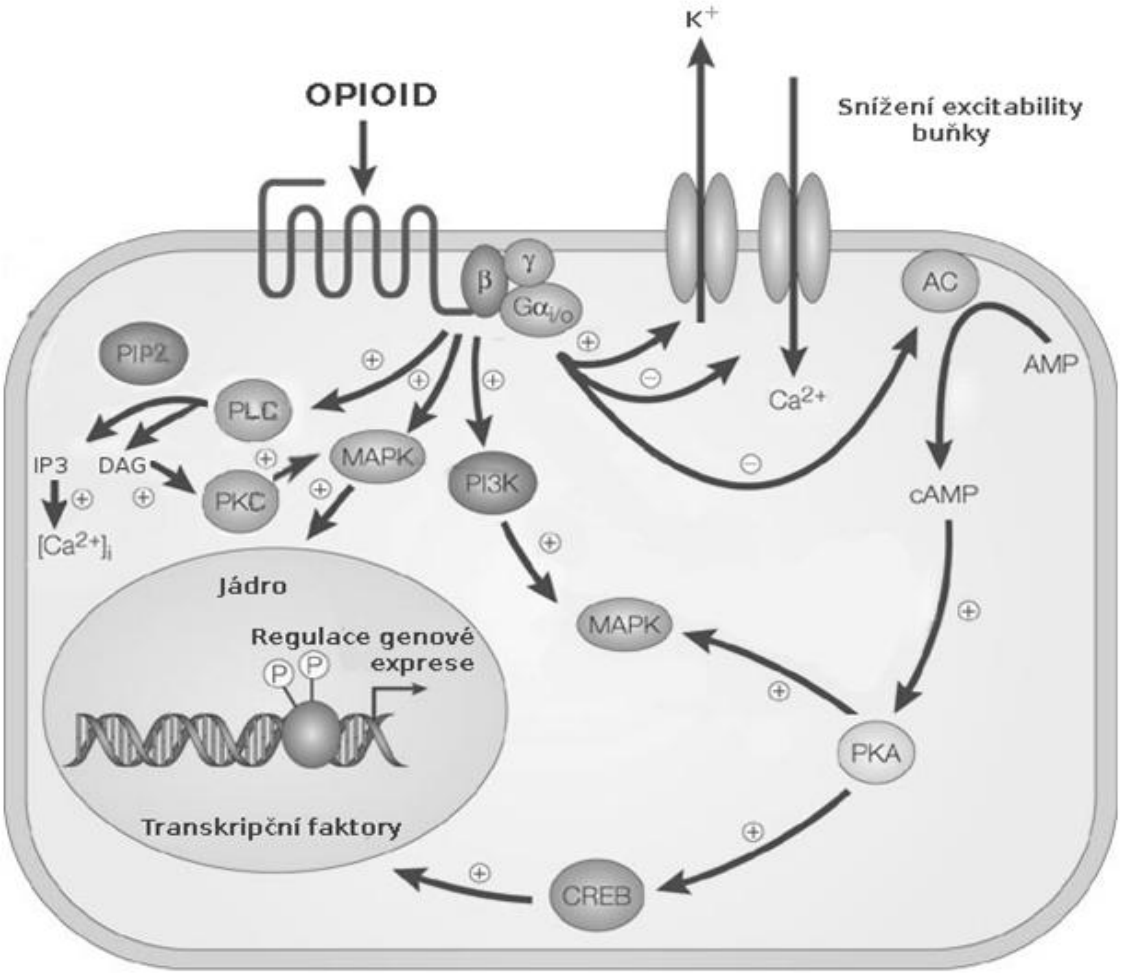
K inhibici může docházet opioidní regulaci iontových kanálů nebo přímou inhibicí mašinerie výlevu neurotransmiterů. V závislosti na místě působení pak opioidy inhibují uvolnění excitačních i inhibičních neorotransmiterů. Existují například dostatečné důkazy o tom, že všechny typy OR mohou inhibovat uvolnění neurotransmiterů glautamátu, GABA (kyselina γ-aminomáselná) a glycinu v CNS (Williams et al., 2001; Corbett et al., 2006).

D) Aktivace PLCβ

Po aktivaci PLC Gβγ podjednotkou dochází k produkci IP_3 a DAG. IP_3 uvolňuje Ca^{2+} z vnitřních zásobáren buňky. DAG aktivuje PKC. Existují také zmínky o vlivu PKC na otevírání Ca^{2+} kanálů v plasmatické membráně. Po vstupu Ca^{2+} by mělo docházet k aktivaci na Ca^{2+} závislé AC a produkci cAMP. Nicméně relevance této potenciální obousměrné regulace intracelulární hladiny cAMP skrze OR není zatím zcela objasněna a současné data ukazují, že působením opioidů dochází především k inhibici produkce cAMP (Jordan a Devi, 1998; Zollner a Stein, 2007).

E) Jaderná signalizace

Chronická aktivace OR vede k aktivaci několika signálních drah vedoucích přes kinázy regulované extracelulárním signálem (ERK) a mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK). Tyto dráhy mohou být aktivovány působením Gβγ, která přes fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) nebo PKCε aktivuje MAPK. Dalším způsobem je PKA dependentní aktivace, ke které dochází převážně díky upregulaci aktivity AC při chronickém působení opioidů. Aktivované ERK/MAPK mohou fosforylovat a tím regulovat aktivitu mnoha proteinů v cytoplasmě a v jádře. Působením v jádře regulují především aktivitu transkripčních faktorů a tím ovlivňují buněčnou expresi (Williams et al., 2001; Zollner a Stein, 2007) viz obr. 4.



Obr. 4: Schéma signalizační kaskády G_i/G_o proteinů aktivovaných navázáním opioidu na OR. CREB – transkripční faktor aktivovaný zvýšenou hladinou cAMP (upraveno podle Leurs et al., 2005).

Při vazbě na opioidní receptory vykonávají opioidy včetně morfinu svůj primární efekt napodobováním přirozeně se vyskytujících endogenních opioidních peptidů (EOP), které jsou vytvářeny v tělech živočichů včetně člověka (Akil et al., 1998). Existují čtyři hlavní třídy EOP: enkefaliny, dynorfiny, endorfiny a nociceptiny, které jsou odvozeny ze čtyř prohormoních prekurzorů: pro-enkefalinu, pro-opiomelanokortinu, pro-dynorfinu a pro-nociceptinu (Pugsley, 2002). Do skupiny EOP bývají pro svou vysokou afinitu a selektivitu k MOR řazeny i endomorfiny. Doposud ale nebyl nalezen prekurzor těchto látek a proto není jasné, jestli jsou tyto látky skutečně endogenní opioidy, nebo jen peptidy které vznikly štěpením z větších proteinů

během extrakce (Corbett et al., 2006).

EOP jsou vytvářeny a distribuovány po celém těle především nervovou tkání (Pugsley, 2002), ale mohou být také produkovány jinými než neuronálními buňkami, například buňkami imunitního systému jako jsou granulocyty, monocyty a lymfocyty. Bylo zjištěno, že čím více buněk schopných produkovat EOP se zapojí do zánětlivé reakce, tím více dochází ke snížení bolestivých stimulů vznikajících v jejím důsledku (Rittner et al., 2001). V těle živočichů se EOP zapojují do četných fyziologických regulací. Modulační roli mají například: v gastrointestinálním traktu, endokrinních a autonomních funkcích, v potlačování bolestivých stimulů, při emocionálních stavech, především těch spojených s odměnou a návykovými vlastnostmi, v procesu učení a paměti (Akil et al., 1998).

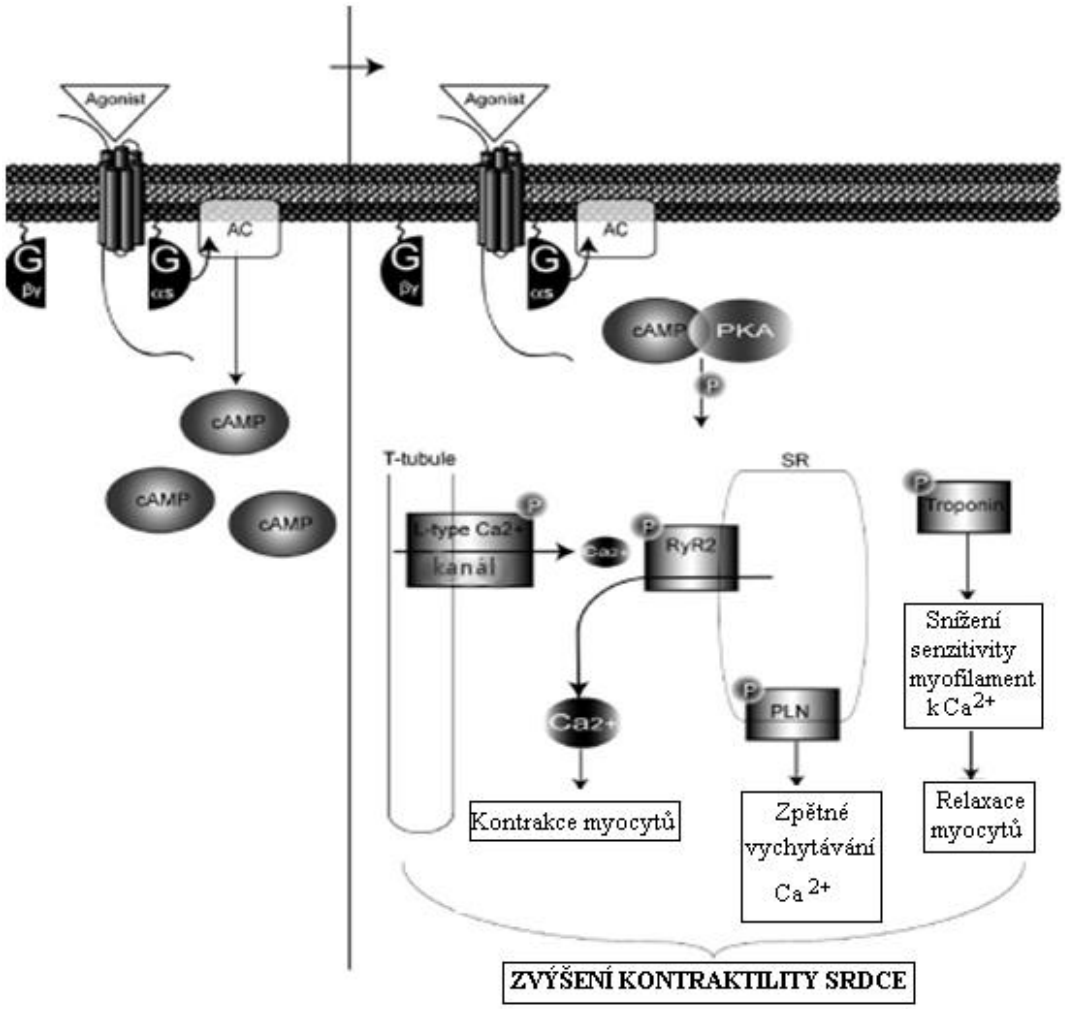
2.4 Myokardiální adrenergní signální systém

Adrenergní receptory (AR) patří do velké rodiny GPCR a jsou aktivovány vazbou katecholaminů adrenalinu a noradrenalinu. Doposud byly identifikovány tři farmakologické typy: α_1-AR, α_2-AR a β-AR, přičemž každý z těchto tří typů má ještě tři podtypy (α_{1A}, α_{1B} a α_{1C}, α_{2A}, α_{2B} a α_{2C}, β_1, β_2 a β_3), lišící se strukturálními a funkčními vlastnostmi (Strosberg, 1993). V srdeční tkáni jsou zastoupeny především β-AR, α-AR se zde vyskytují v pouze malé míře a tvoří tak jen asi 10% všech AR (Rockman et al, 2002). Důležitou roli v regulaci srdeční činnosti mají tedy především β-AR, které tvoří rozhraní mezi sympatickým nervovým systémem a kardiovaskulárním systémem. Signální systémy β-AR jsou tak jedním z klíčových regulátorů srdeční funkce (Naga Prasad et al., 2001). V srdeční tkáni se nachází především β_1-AR a β_2-AR, přičemž převládá podtyp β_1-AR, který tvoří asi 75-80% všech β-AR, v malé míře se vyskytují v srdci i β_3-AR (Gauthier, 1996; Rockman et al, 2002).

β-AR jsou spřaženy se stimulačními G_s proteiny. Aktivací $G\alpha_s$ dochází k aktivaci AC a tím k vzestupu intracelulární koncentrace cAMP. Zvýšená koncentrace cAMP aktivuje cAMP dependentní PKA, která poté v myocytech fosforyluje řadu proteinů důležitých pro srdeční funkci, například: napěťově ovládané Ca^{2+} kanály L-typu, fosfolamban (PLN), troponin I. a ryanodinové receptory (RYR). Fosforylačním vlivem PKA dochází k otevírání Ca^{2+} kanálů L-typu v transversálních T-tubulech a tím ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+}. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} spolu

s fosforylačním vlivem PKA na RYR indukuje další uvolňování Ca^{2+} a dochází ke kontrakci myofilament. Aktivovaná PKA má zároveň vliv na relaxaci myocytů. Fosforylovaný PLN působí na kanály v sarkoplasmatickém retikulu (SR) a navozuje zpětné vychytávání Ca^{2+} zpět do SR. Fosforylovaný troponin I. snižuje citlivost myofilament k Ca^{2+} a tím inhibuje kontraktilní signál a tak urychluje srdeční relaxaci (viz obr. 5). Působení aktivovaných β-AR má pozitivní ionotropní (zvyšuje se síla kontrakce) a pozitivní chronotropní (v důsledku rychlejší relaxace může dříve dojít k další kontrakci a tak se zvyšuje srdeční frekvence) efekt na srdeční činnost (Brodde a Michel, 1999; Lohse et al, 2003; Salazar et al., 2007).

Ačkoli v srdci převládá podtyp β_1-AR, nemusí být funkční odpověď přenášená β_1-AR a β_2-AR rozdílná. Bylo totiž prokázáno, že funkční vazba mezi β_1-AR a AC je daleko nižší než mezi β_2-AR a AC (Levy et al., 1993). Funkce β-AR je regulována tak jako funkce dalších GPCR, pomocí PKA, PKC nebo GRK, které fosforylací receptoru způsobí jeho rozpřažení od G-proteinu. U β_2-AR může při fosforylaci receptoru pomocí PKA docházet zároveň s rozpřažením od Gs také k jakémusi přepnutí na interakci s inhibičními Gi proteiny. β_2-AR tak za určitých okolností může spouštět i jiné dráhy například s MAPK spojené signální dráhy, nebo může negativně působit na aktivitu AC a tak redukovat kontraktilitu srdce (Daaka et al., 1997).



Obr. 5: Schéma signalizační kaskády βAR spřažených s Gs proteiny v kardiomyocytu. RYR2 - ryanodinový receptor, PLN – fosfolamban (upraveno podle Salazar et al., 2007).

2.5 Kardioprotektivní působení morfinu

Roku 1986 byl popsán kardioprotektivní fenomén ischemického preconditioningu (IPC). Během IPC dochází k několika krátkým přerušením průtoku krve v koronárních tepnách, které ale nejsou natolik závažné, aby způsobily poškození srdečních buněk. Pokud tyto krátce navozené opakované ischémie působí před dlouhodobým ischemickým záchvatem, vyvolávají ischemickou toleranci a zabraňují letálnímu poškození buněk (Murry et al., 1986).

Na základě studií, které prokázaly, že se vzrůstajícím věkem vzrůstá i množství EOP v srdci (Boluyt et al., 1993) a že působením ischemie dochází k rychlé indukci syntézy a uvolňování EOP (Paradis et al., 1992), byla vyslovena teorie, že IPC zvyšuje

hladinu EOP, které pak působí kardioprotektivně. Tato teorie byla záhy potvrzena, když po přidání nespecifického opiodního antagonisty naloxonu před nebo těsně po IPC došlo ke zrušení protektivního efektu IPC (Schultz et al., 1995).

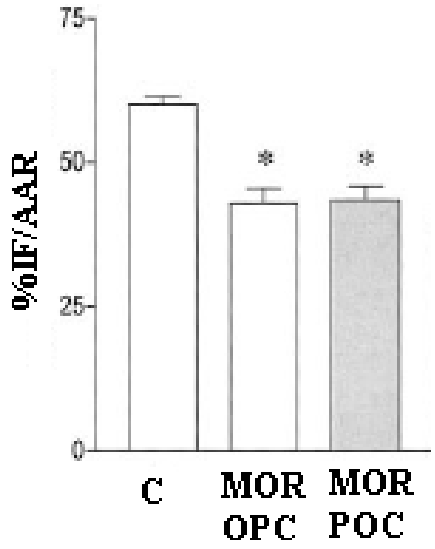
O rok později bylo dokázáno, že při podávání morfinu před ischemií, tedy opioidním preconditioningu (OPC), dochází k podobnému protektivnímu účinku jako při IPC. Zároveň bylo prokázáno, že důležitou roli v protekci hraje otvírání ATP senzitivních K^+ kanálů (Schultz et al, 1996) působení PKC (Miki et al., 1998) a aktivace mitochondriálních K^+ kanálů (Liang a Gross, 1999).

Podáváním specifických antagonistů, nebo selektivních agonistů jednotlivých typů OR, bylo zjištěno, že se v kardioprotekci uplatňují δ_1-OR (Schultz et al., 1998), κ-OR (Wang et al., 2001), a δ_2-OR (Maslov et al., 2009). Vliv působení μ-OR nebyl prokázán (Schultz et al., 1998; Maslov et al., 2010).

Experimenty s ischemickým i opioidním preconditioningem vykazovaly sice dobré výsledky, ale jelikož lze u pacientů jen těžko předpovídat nástup ischemie, jejich případné použití pro klinickou praxi bylo minimální. Z tohoto důvodu Zhao et al. (2003) zkusil provést možnou kardioprotektivní terapii, která spočívala ve střídavém přerušování krevního toku ischemického srdce, těsně před reperfuzí - ischemický postconditioning (POC). Výsledky tohoto pokusu ukázaly srovnatelnou míru kardioprotekce s IPC. Ke kardioprotektivnímu efektu docházelo i při podávání morfinu těsně před reperfuzí - opioidním POC na zvířecím (Gross et al., 2004a), viz obr. 6, i lidském modelu. Morfin je rutině podáván pacientům během akutního infarktu myokardu jako analgetikum, které má zmírnit prudké bolesti. Gross se spolupracovníky (2004b) proto vyzkoušel podávat morfin pacientům i během reperfuze, což vedlo ke snížení poškození srdce.

O signálních drahách vedoucích k příznivému působení opioidů během POC, se zatím ví jen velmi málo. Důležitou roli zřejmě hrají kinázy PI3K a TOR (target of rapamicin), které po aktivaci OR fosforylují glykogen syntázu kinázu β (GSKβ) a tím ji inaktivují (Gross et al., 2004a). GSKβ se v buňce podílí na mnoha procesech například na transkripci a translaci, metabolismu, buněčném dělení a apoptóze. Podle jedné studie má působení PI3K a inaktivace GSKβ během morfinového POC inhibiční vliv na Ca^{2+} indukované otevírání mPTP (mitochondriální permeabilní přechodné kanály). Tento inhibiční vliv je spojen se zlepšením respirační funkce mitochondrií a zvýšením

odolnosti mitochondrií proti Ca^{2+} přehlcení, ke kterému dochází během reperfuze a které vede často až k nekróze (Obame et al., 2008).



Obr. 6: Porovnání kardioprotektivního působení morfinového preconditioningu (MOR-OPC) a postconditioningu (MOR-POC) oproti kontrolám (C). Velikost infarku (IF – infarkt size) vyjádřena v procentech postižené oblasti (AAR – area at risk). MOR-OPC 40,2±3,6 %, MOR-POC 43,6±3,6 %, C 60±1,1 %. *p<0,001 porovnávána kontrolní skupina oproti morfinovým skupinám (upraveno podle Gross et al., 2004a).

2.6 Vliv chronického působení morfinu na signální dráhy GPCR v srdci

Morfin se váže s největší afinitou na MOR, ale zároveň se může vázat také na DOR a KOR (Martin, 1983). Přímo v srdeční tkáni byly zatím lokalizovány pouze KOR a DOR, přítomnost MOR nebyla zatím potvrzena (Wittertet al., 1996) a je tedy pravděpodobné, že morfin ovlivňuje srdeční činnost právě působením na tyto dva typy receptorů. Akutní působení morfinu, jak už bylo popsáno výše, je spojené především s aktivací inhibičních Gi proteinů, jejichž působením na kationové kanály a inhibici AC se snižuje excitabilita buňky a tím i případný výlev neurotransmiterů (Jordan a Devi, 1998; William set al., 2001; Corbett et al., 2006; Zollner a Stein, 2007). Zatímco akutní působení opioidů je spojeno se snížením hladiny cAMP v buňce, jejich chronické působení vede naopak ke zvýšení aktivity AC. Tento jev je popisován jako heterologní senzitizace AC, nebo také AC supersenzitivita (Watts, 2002) a byl zkoumán především v centrální nervové soustavě v souvislosti se snahou o objasnění vzniku tolerance a

nástupu abstinenčního syndromu, ke kterému dochází v důsledku chronického podávání opioidů. AC supersenzitivita je podle těchto průzkumů považována za jednu z buněčných adaptací, která by mohla zdůvodnit neuronální hyperaktivitu, ke které dochází během nástupu opioidního abstinenčního syndromu (Nestler, 1996; Nestler et al., 1996).

Do dnešní doby bylo popsáno celkem devět savčích membránově vázaných izoforem AC, které se od sebe liší svou tkáňovou distribucí a regulačními vlastnostmi, což umožňuje buňkám reagovat na stejné stimuly různým způsobem. AC jsou často podle sekvenčních a regulačních podobností děleny do několika skupin. Skupina 1 zahrnující AC I, AC III a AC VIII, je regulována intracelulárním Ca^{2+} vázaným na kalmodulin. Skupina 2 zahrnující AC II, AC IV a AC VII může být stimulována Gβγ podjednotkou. Skupina 3 zahrnující AC V a AC VI je negativně regulována Gi proteiny a také přímo Ca^{2+} (Patel et al., 2001). Při akutním působení morfinu jsou isoformy AC I, V, VI a VIII inhibovány, zatímco při chronickém působení morfinu jsou tyto isoformy supersenzitizovány. Isoformy AC II, IV a VII jsou naopak při akutním působení morfinu aktivovány a při chronickém působení superinhibovány. Superinhibice je analogická k projevu supersenzitizace popsanému výše. (Schallmach et al., 2006).

V myokardu byla popsána přítomnost čtyř isoforem AC (IV - VII). Přitom dominantními isoformami jsou zde AC V a AC VI, isoformy AC IV a AC VII se zde vyskytují v daleko menším množství. AC V je lokalizována především v srdečních síních. AC VI je distribuována v síních i komorách a je často kolokalizovaná s β_1-AR (Wang a Brown, 2004).

Heterologní senzitizace AC byla později sledována i v jiných než neuronálních buňkách. V různých buněčných kulturách po chronickém působení morfinu docházelo k supersenzitivizaci AC VIII (Steiner et al., 2005) a superinhibici AC II (Schallmach et al., 2006). Je proto pravděpodobné, že k podobné modulaci aktivity AC může docházet i v signálním systému myokardu. V jediné existující studii, která se zabývala touto problematikou na psím srdci, nebyla ale prokázána žádná významná změna v enzymatické aktivitě AC (Napier et al., 1999).

Signální systém opoioidních receptorů v srdci může být funkčně propojen s β-AR systémem. O propojení těchto dvou signálních systémů svědčí například studie, která dokázala, že během aktivace sympatiku jsou spolu s noradrenalinem uvolňovány i opioidní peptidy, které slouží jako důležitý inhibiční kontrolní mechanismus chránící

myocyty před případným přehlcením Ca^{2+} (Xiao et al., 1997). Obecně je podávání morfinu doprovázeno snížením kardiovaskulární funkce a vzrůstající parasympatickou aktivitou (Randich et al., 1991). Aktivace OR tak působí analogicky k signálnímu systému βAR, který naopak kardiovaskulární funkce zvyšuje (Salazar et al., 2007).

Působení morfinu může zároveň modulovat činnost signálního systému βAR. Bylo například zjištěno, že po dlouhodobém podávání morfinu dochází ke zvýšení extracelulárního noradrenalinu v CNS (Fuentealba, 2000) a k upregulaci β_2AR v buněčných kulturách (Ammer a Schulz, 1996). Při dlouhodobém podávání morfinu a jeho následném odebrání docházelo k nárůstu množství katecholaminů v srdci potkana (Rabadán, 1997).

3. Cíle diplomové práce

1. Optimalizace metody homogenizace a frakcionace myokardu. Zvolení nejvhodnějšího způsobu homogenizace pro izolaci plazmatických membrán.

2. Sledování exprese a aktivity adenylylcyklázy v myokardu potkanů po dlouhodobém podávání morfinu.

3. Sledování exprese vybraných GPCR (β_1- a β_2-AR, delta-OR a kappa-OR) v myokardu potkanů po dlouhodobém podávání morfinu.

4. Materiál a metody

4.1 Pokusná zvířata

K pokusu bylo použito šest skupin po dvanácti jedincích mladých dospělých samců potkanů kmene Wistar, kterým byly podávány vysoké (10 mg/kg/den) nebo nízké dávky (1 mg/kg/den) morfinu po dobu 10 až 27 dnů a jedna skupina kontrolní o deseti jedincích, kterým byl podáván fyziologický roztok po dobu deseti dnů. Po ukončení podávání morfinu byli potkani usmrceni ihned nebo s odstupem 2-6 dnů (viz tab. 1.). Po usmrcení bylo potkanům vyjmuto srdce, které bylo následně rozděleno na pravou komoru, septum a levou komoru. Následující experimenty probíhaly na vzorcích tkáně získané z levé srdeční komory. Tyto vzorky byly dále zpracovány vybranou nejvhodnější metodou homogenizace a frakcionace myokardu (viz 4.2 Standardizace metody homogenizace a frakcionace myokardu – vybrána metoda II. viz 5.1). Takto upravené vzorky pak byly použity k dalším pokusům.

Tabulka 1.: Schéma podávání morfinu a základní parametry jednotlivých skupin pokusných zvířat.

Skupina	**C**	**M_V-10R2**	**M_V-10R3**	**M_V-10R6**	**M_N-10**	**M_V-27**	**M_N-27**
Počet jedinců	10	12	12	12	12	12	12
Úmrtí během podávání	-	-	-	1	-	1	-
Dávka morfinu (mg/kg/den)	-	10	10	10	1	10	1
Délka podávání (den)	10	10	10	10	10	27	27
Regrese (den)	-	2	3	6	-	-	-
Průměrná TH (g)	335,4 ± 6,5	301,0 ± 6,3	297,6 ± 4,4	315,5 ± 5,4	312,5 ± 5,4	314,8 ± 5,3	361,1 ± 6,2
Průměrná HLK (g)	0,449 ± 0,01	0,408 ± 0,02	0,408 ± 0,01	0,405 ± 0,02	0,428 ± 0,01	0,420 ± 0,01	0,472 ± 0,02
Celková HLK (g)	4,49	4,89	4,90	4,45	5,14	4,62	5,65
LK/TH	1,34	1,35	1,37	1,28	1,37	1,33	1,30
HS/TH	2,37	2,42	2,42	2,35	2,41	2,36	2,24

TH - tělesná hmotnost, HLK - hmotnost levé komory, HS - hmotnost srdce.

4.2 Optimalizace metody homogenizace a frakcionace myokardu

4.2.1 Roztoky

Homogenizační pufr TMES (pH 7,4): 20mM Tris, 3mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 250 mM sacharóza

Pufr TME (pH 7,4): 20mM Tris, 3mM $MgCl_2$, 1mM EDTA

18% Percoll: Percoll naředěn na 18% v homogenizačním pufru TMES

4.2.2 Postup práce

K optimalizaci metody byly použity čtyři vzorky srdeční tkáně o stejné hmotnosti (levé komory + septa získané z mladých dospělých potkanů kmene Wistar). Všechny vzorky srdeční tkáně byly naředěny vychlazeným homogenizačním pufrem TMES (na 1g tkáně 4 ml pufru) a nahrubo nastříhány. Aby se zabránilo štěpení proteinů během homogenizace a frakcionace, byl ke vzorkům přidán inhibitor proteáz Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Jednotlivé vzorky tkáně byly dále různým způsobem mechanicky homogenizovány (viz tab. 2 - 1. homogenizace). Poté byly homogenáty centrifugovány při 2 100 ot./min (600g), 10 min, 4°C, bez brzdy na centrifuze Hettich Universal R30.

Tabulka 2.: Jednotlivé vzorky srdeční tkáně (I-IV.) s uvedenou metodou první a druhé homogenizace.

Vzorek	1. homogenizace	2. homogenizace
I.	Ultra-Turrax (24 000 ot./min) – 15 s	Ultra-Turrax (24 000 ot./min) – 15 s
II.	Ultra-Turrax (24 000 ot./min) – 15 s P-E sklo-teflonový homogenizátor (1 200 ot./min) - 10x nahoru-dolů	P-E sklo-teflonový homogenizátor (1 200 ot./min) - 10x nahoru-dolů
III.	P-E sklo-teflonový homogenizátor (1 200 ot./min) - 10x nahoru-dolů	P-E sklo-teflonový homogenizátor (1 200 ot./min) - 10x nahoru-dolů
IV.	P-E sklo-teflonový homogenizátor (1 200 ot./min) - 30x nahoru-dolů	P-E sklo-teflonový homogenizátor (1 200 ot./min) - 30x nahoru-dolů

P-E – Potter-Elvehjemův homogenizátor.

Supernatanty (S1) byly odebrány a uchovány na ledu. Pelety byly resuspendovány v pufru TMES (na 1 g původního množství tkáně přidány 4 ml pufru). K resuspendovaným peletům byl přidán inhibitor proteáz (Complete Protease Inhibitor Cocktail) a jednotlivé skupiny peletů byly různým způsobem rehomogenizovány (viz tab. 2 – 2. homogenizace). Po 2. homogenizaci byly homogenáty opět centrifugovány při 2 100 ot./min (600g), 10 min, 4°C, bez brzdy, na centrifuze Hettich Universal R30. Supernatanty z druhé centrifugace (S2) byly spojeny a důkladně promíchány se supernatanty S1 stejné skupiny. Spojené supernatanty* byly poté navrstveny na 18% Percoll a centrifugovány při 26 000 ot./min (60 000g), 15 min, 4°C, maximální zrychlení, minimální zpomalení, rotor Ti50.2 Beckman. Vysokoobrátkovou centrifugací byly v Percollu separovány dvě frakce - horní frakce obohacená o plasmatické membrány a dolní buněčná frakce obohacená o mitochondrie. Obě frakce byly postupně odebrány, naředěny v přebytku TME a centrifugovány při 40 000 ot./min (150 000g), 60 min, 4°C, maximální zrychlení, maximální zpomalení, rotor Ti50.2 Beckman. Po centrifugaci byly odsáty supernatanty a jednotlivé pelety byly resuspendovány v TME pufru.

*Při homogenizaci a frakcionaci myokardu kontrol a morfinem ovlivněných potkanů byly spojené supernatanty rozděleny na dvě části. Přibližně 3/5 byly navrstveny na 18% Percoll (dále postup viz výše) a 2/5 byly využity na izolaci cytosolu a hrubých membrán. Druhá část supernatantů byla centrifugována při 300 000 x g, 60 min, 4°C, rotor MLA-80 (ultracentrifuga Beckman Optima). Po centrifugaci byl odsát supernatant (cytosol) a pelet (hrubé membrány) byl resuspendován v TME pufru.

4.3 Stanovení proteinů

Obsah proteinů v jednotlivých frakcích získaných po homogenizaci a frakcionaci srdeční tkáně byl stanoven metodou BCA (Bicinchoninic acid protein assay).

4.3.1 Roztoky

Standard BSA (hovězí sérový albumin) c = 1 µg/µl a c = 0,1 µg/µl

Činidlo A (pH 11,25): 8 mg monohydrátu uhličitanu sodného a 1,6 mg vinanu sodného doplněno do objemu 100 ml

Činidlo B: 4 mg BCA (Bicinchoninic acid) ve 100 ml vody

Činidlo C: 0,4 mg pentahydrátu síranu měďnatého v 10 ml vody

Pracovní roztok: 1 díl činidla C smíchaný s 25 díly činidla B a s 26 díly činidla A

4.3.2 Postup práce

Na mikrotitrační destičce byla připravena řada BSA standardů obsahujících 0,2 - 50 µg proteinů ve 100 µl. (viz tab. 3).

Tabulka 3.: Schéma pipetování BSA standardů na mikrotitrační destičku.

Číslo standardu	**BL**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
µg BSA	0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0,1µg/µl)	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1µg/µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H_2O	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

BL – blank.

Vzorky buněčných frakcí byly v poměru 0,1:100 naředěny vodou a po 100 µl pipetovány v triplikátech na mikrotitrační destičku. Ke všem standardům a vzorkům bylo poté přidáno 100 µl pracovního roztoku a destička byla inkubována 30 minut při 60°C. Mikrotitrační destička se vzorky byla poté přečtena při vlnové délce 562 nm na destičovém multireaderu Synergy. Změřené výsledky byly vyhodnoceny v programu Gen 5.

4.4 Elektroforéza a imunobloting

Pomocí elektroforézy a imunoblotingu bylo za pomoci specifických protilátek pro plasmatické membrány zjišťováno, při kterém způsobu homogenizace myokardu došlo k nejlepší separaci frakce plasmatických membrán. Na vzorcích získaných z morfinem ovlivněných jedinců byla pak zkoumána exprese AC a vybraných GPCR.

4.4.1 Roztoky

Leammliho vzorkový pufr: 2,4 ml 1 M Tris-HCl 1 ml glycerolu, 0,8 g dodecylsíranu sodného (SDS), 0,8 g dithiothreitolu (DTT) a 1 mg bromfenolové modři doplněno vodou do objemu 10 ml

TBS pufr (pH 8,0) 10x koncentrovaný: 45 ml 4 M NaCl, 12 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) a 63 ml H_2O

Blokovací pufr: TBS obsahující (5% mléko) a 0,1% Tween-20

Ředící pufr: TBS obsahující 1% mléko a 0,1% Tween-20

Promývací pufr: TBS obsahující 0,3% Tween-20

4.4.2 Postup práce

K izolovaným vzorkům frakcí plasmatických membrán a frakcí mitochondrií (mitochondriální frakce využita pouze při zjišťování optimálních podmínek pro homogenizaci a frakcionaci myokardu) byl přidán Leammliho vzorkový pufr v poměru 3:1 konečné koncentrace vzorku 1 μg/μl a poté byly vzorky povařeny 2 min při 100°C. Proteiny byly rozděleny na 10% (nebo 8% v případě detekce AC) polyakrylamidovém gelu a elektroforeticky přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Nitrocelulosová membrána byla 30 min blokována v blokovacím pufru a poté inkubována přibližně 12 h při 4°C s primárními protilátkami naředěnými v poměru 1:100-1:1000 v ředícím pufru. Po inkubaci byla membrána 3x 10 min promyta v promývacím pufru a poté inkubována 1 h při laboratorní teplotě v sekundárních protilátkách značených křenovou peroxidázou naředěných 1:40 000 v ředícím pufru (viz tab. 4). Po druhé inkubaci byla membrána několikrát důkladně propláchnuta vodou, 3x 10 min promyta promývacím pufrem a krátce inkubována s chemoluminiscenčním substrátem pro křenovou peroxidázu (Pierce

Super Signal). Intenzita chemiluminiscence byla detekována vyvoláním na film na přístroji Optimax (Fomei) a vyhodnocena programem ImageQuant.

Tabulka 4: Použité protilátky pro detekci jednotlivých proteinů, jejich ředění a specifické sekundární protilátky.

Standardizace metody homogenizace a frakcionace myokardu				
Protein	**PP**	**ředění PP**	**Blok. pufr**	**SP**
G_β	sc-378 (SCBt)	1:10000	s mlékem	AR
Na/K-ATPaza	sc-28 800 (SCBt)	1:5000	s mlékem	AR
AC a GPCR				
Protein	**PP**	**ředění PP**	**Blok. pufr**	**SP**
AC V/VI	sc-590 (SCBt)	1:100	s mlékem	AR
δ-OR	sc-7492 (SCBt)	1:100	bez mléka	DAG
κ-OR	sc-7493 (SCBt)	1:100	bez mléka	DAG
β_1-AR	sc-568 (SCBt)	1:3000	s mlékem	AR
β_2-AR	sc-569 (SCBt)	1:5000	s mlékem	AR

PP - primární protilátky, SP – sekundární protilátky, SCBt – Santa Cruz Biotechnology, AR – anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase-linked (GE Healthcare UK), DAG – donkey anti-goat IgG sc-2033 (Santa Cruz Biotechnology).

4.5 Stanovení enzymové aktivity adenylylcyklázy

Aktivita AC byla sledována na frakci plasmatických membrán získaných ze srdeční tkáně morfinem ovlivněných potkanů (skupina M_V-10R2: 10 mg/kg/den, po dobu 10 dní, odstup 2 dny- viz 4.1) a porovnána oproti kontrolám. Zkoumáno bylo:

- Bazální aktivita AC
- Stimulovaná aktivita AC

- přímou stimulací AC pomocí $MnCl_2$ a forskolinu
- stimulací $G\alpha_s$ působením NaF,
- aktivací přes β_1- a β_2-AR isoprenalinem

- Inhibičních vliv selektivních agoninistů
- δ-OR DADLE ([D-alanin^2, D-leucin^5]-enkefalin)
- κ-OR U50488
- acetylcholinových receptorů muskarinového typu (mAChR) karbacholu

4.5.1 Roztoky

Reakční směs: 240 mM, 0,1 M $MgCl_2$, 10 mM GTP, 10 mg/ml BSA, 1 mM IBMX (isobutylmethylxantin), 300 mM KPEP (draselná sůl fosfoenolpyruvátu), 2500 jednotek PK, 2,5 M NaCl

4.5.2 Postup práce

Plasmatické membrány kontrol a morfinem ovlivněných jedinců byly naředěny na stejnou koncentraci 0,5 µg/µl. Vzorky pro stanovení basální aktivity byly připraveny smícháním 40 µl reakční směsi (RS), 30 µl H_20 a 20 µl tkáně. Vzorky pro stanovení stimulované aktivity byly připraveny smícháním 40 µl RS, 10 µl jednoho ze stimulantů (100 mM $MnCl_2$, 10 µM forskolinu, 100 mM NaF a 10 µM isoprenalinu), 20 µl H_20 a 20 µl tkáně. Vzorky pro stanovení inhibované aktivity byly připraveny smícháním 40 µl RS, 10 µl H_20, 10 µl 10 µM forskolinu, 10 µl jednoho z inhibitorů (10 µM DADLE, 10 µM U50488, 10 µM karbachol) a 20 µl tkáně. Všechny vzorky byly nejdříve inkubovány 1 min ve vodní lázni při 30°C. Reakce byla odstartována přidáním 10 µl 0,4 mM ATP a důkladným promícháním. Vzorky byly ihned poté inkubovány 20 min ve vodní lázni při 30°C. Reakce byla ukončena přidáním 200 µl 0,15 M HCl, promícháním a uložením vzorků na led. Enzymová aktivita v připravených vzorcích byla detekována pomocí komerčního kitu ke zjišťování produkce cAMP (Monoclonal Anti-cAMP Antibody Based Direct cAMP ELISA kit, NewEast Biosciences), měření provedeno na přístroji Synergy a výsledky vyhodnoceny v programu Gen 5.

4.6 Saturační vazebné pokusy

Při saturačním vazebném experimentu bylo měřeno množství a afinita β_1- a β_2-AR ve vzorku hrubých membrán kontrol a morfinem ovlivněných jedinců za pomoci specifického radioligandu [^{3}H]-CGP12177.

4.6.1 Roztoky

Inkubační médium (pH 7,4): 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM kyselina askorbová

Promývací pufr (pH 7,4): 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$

[^{3}H]-CGP12177: radioaktivně značený agonista β_1- a β_2-AR, 50,0 Ci/mmol

0,6% Polyethyleneimine (PEI): PEI naředěn na 0,6% roztok ve vodě

4.6.2 Postup práce

Stanovení bylo prováděno v triplikátech s použitím sedmi koncentrací radioligandu [^{3}H]-CGP12177 (4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,05 nM, 0,025 nM, 0,0125 nM a 0,00625 nM). 100 µl vzorku hrubých membrán o koncentraci 1 µg/µl bylo spolu s 300 µl inkubačního média a 100 µl radioligandu [^{3}H]-CGP12177 inkubováno ve vodní lázni při 37°C do rovnováhy ≅1 h (celkový objem reakční směsi 0,5 ml). Nespecifická vazba byla stanovena v duplikátu jako vazba [^{3}H]-CGP12177 v přítomnosti 10 µM L-propranolu. Reakce byla ukončena přidáním 3 ml vychlazeného promývacího pufru ke vzorku a filtrací přes filtry ze skelných vláken GF/B (Watman). Filtry byly poté ještě dvakrát promyty 3 ml promývacího pufru. Aby se zabránilo ztrátě receptorů v malých membránových fragmentech, které by nemusely být zachyceny, byly filtry před filtrací 1 h namáčeny ve vychlazeném 0,6% PEI. Radioaktivita zachycená na filtrech byla stanovena kapalnou scintilační spektrometrií na přístroji Ray-Test ve 4 ml scintilačního koktejlu (CytoScint). Maximální počet vazebných míst (Bmax) v daném vzorku a rovnovážná disociační konstanta (Kd) byly určeny pomocí počítačového programu (GraphPad Prism).

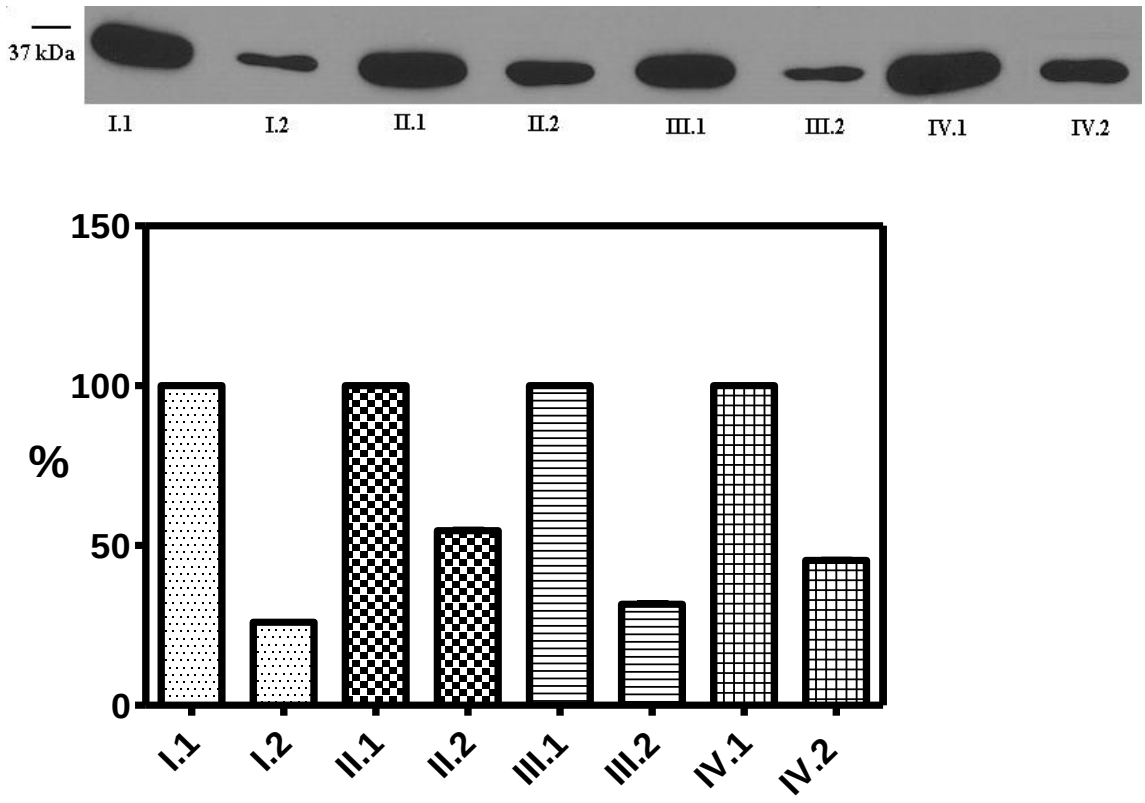
4.7 Analýza dat

Získaná data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů. Výsledky byly statisticky analyzovány užitím Studentova t-testu. Statistická významnost byla určena na hladině $p<0,05$-$0,001$.

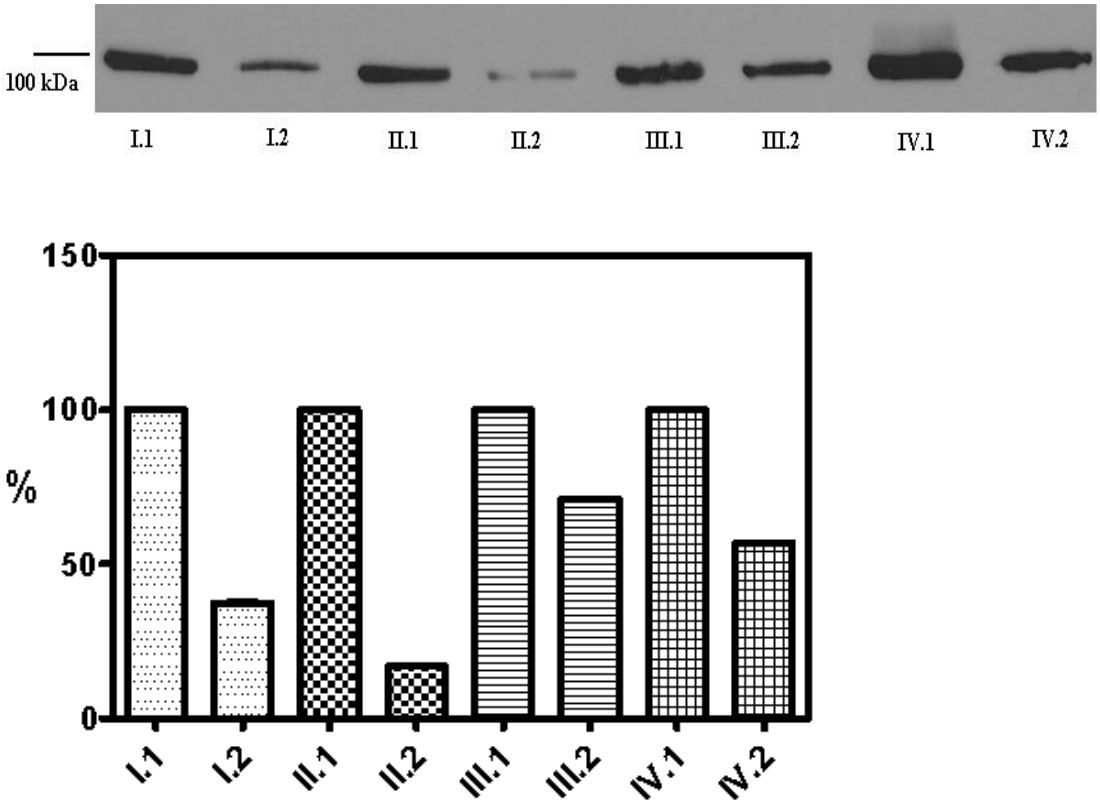
5. Výsledky

5.1 Optimalizace metody homogenizace a frakcionace myokardu

Cílem optimalizace této metody bylo nalezení nejvhodnějšího způsobu homogenizace srdeční tkáně tak, aby došlo k co nejlepší separaci plasmatických membrán, které budou použity pro další experimenty. Pro hodnocení jednotlivých způsobů homogenizace byly vybrány dva běžné proteiny plasmatických membrán G_β a Na/K-ATPaza a za pomoci elektroforézy a imunoblotů bylo porovnáváno jejich množství ve frakci mitochondriální oproti frakci plasmatických membrán a tak byla určena míra kontaminace mitochondriální frakce proteiny plasmatické membrány (viz obr. 7 a 8).



Obr. 7: Distribuce proteinu G_β v horních frakcích obohacených o plasmatické membrány (1) a spodních frakcích obohacených o mitochondrie (2) u jednotlivých způsobů homogenizace myokardu (I-IV). Na grafu porovnáváno procento kontaminace mitochondriálních frakcí proteinem G_β.



Obr. 8: Distribuce proteinu Na/K-ATPázy v horních frakcích obohacených o plasmatické membrány (1) a spodních frakcích obohacených o mitochondrie (2) u jednotlivých způsobů homogenizace myokardu (I-IV). Na grafu porovnáváno procento kontaminace mitochondriálních frakcí proteinem Na/K-ATPázou.

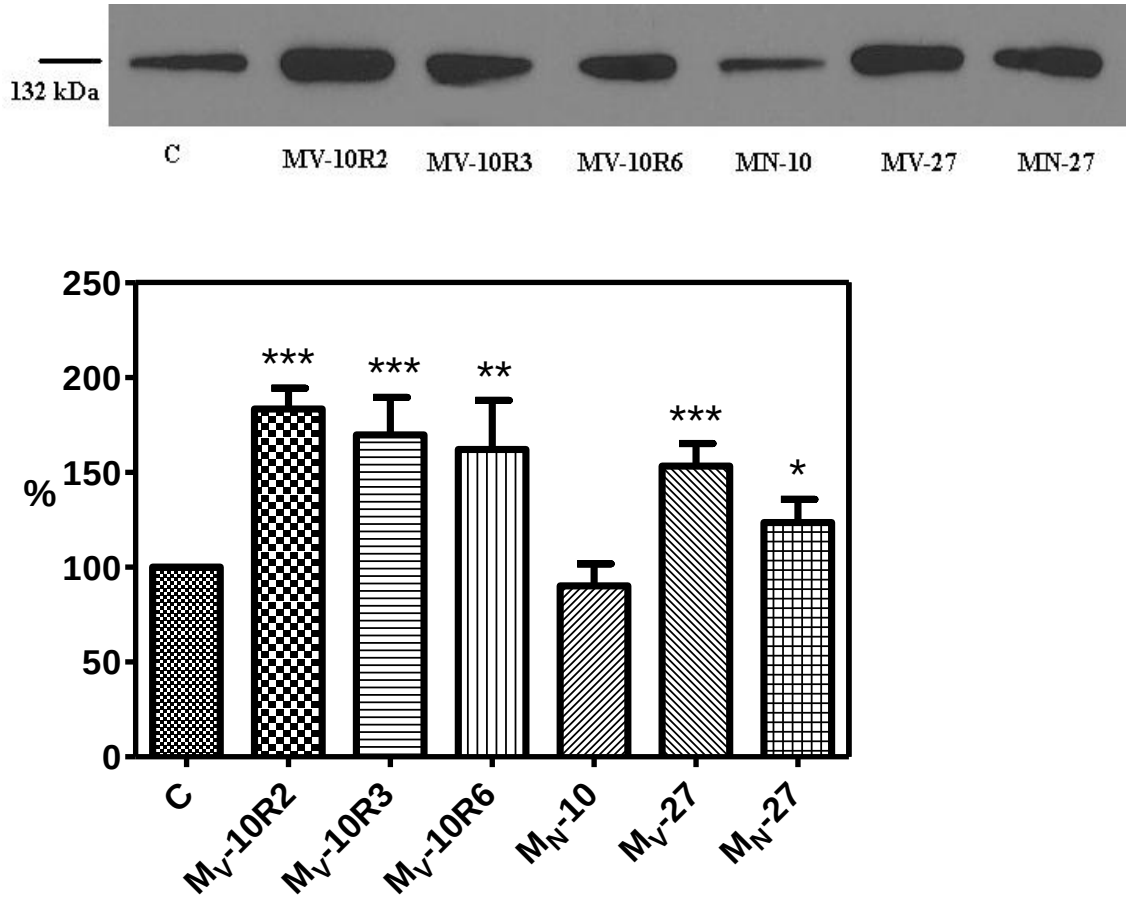
Na obrázcích 1. a 2. je možné vidět, že k nejmenší kontaminaci mitochondriální frakce proteiny plasmatické membrány, tudíž k zachování maxima membránových proteinů ve frakci plasmatických membrán, došlo u I. a II. způsobu homogenizace. S přihlédnutím na výtěžnost daného způsobu homogenizace (viz tab. 5) byl pro další pokusy zvolen II. způsob homogenizace (1. homogenizace: Ultra-Turrax (24 000 ot./min) – 15 s, sklo-teflonový homogenizátor (1200 ot./min) - 10x nahoru-dolů, 2. homogenizace sklo-teflonový homogenizátor (1200 ot./min) - 10x nahoru-dolů).

Tab. 5: Koncentrace proteinů horních a spodních frakcí u jednotlivých způsobů homogenizace.

Vzorek	I. 1	I. 2	II. 1	II. 2	III. 1	III. 2	IV. 1	IV. 2
Koncentrace (mg/ml)	5,3	3,4	6,8	4,1	5,7	3,5	7,0	4,6

5.2 Vliv dlouhodobého podávání morfinu na expresi adenylylcyklázy v myokardu potkanů

Podle našich výsledků docházelo po dlouhodobém podávání vysokých dávek morfinu (10 mg/kg/den) k signifikantnímu zvýšení exprese AC podtypu V/VI. Množství exprimované AC se přitom snižovalo s dobou odstupu od ukončení podávání morfinu. Při podávání nízkých dávek morfinu (1 mg/kg/den) po dobu 10 dní nedocházelo k signifikantnímu zvýšení exprese, zatímco při podávání nízkých dávek po dobu 27 dní byla exprese AC mírně zvýšená, ale zároveň byla tato exprese nižší než při podávání vysoké dávky morfinu po stejně dlouhou dobu. Množství exprimované AC u zvířat, kterým byly podávány vysoké dávky morfinu, je vyšší u kratšího podávání po dobu 10 dní, než u dlouhodobějšího podávání morfinu po dobu 27 dní (viz obr. 9).

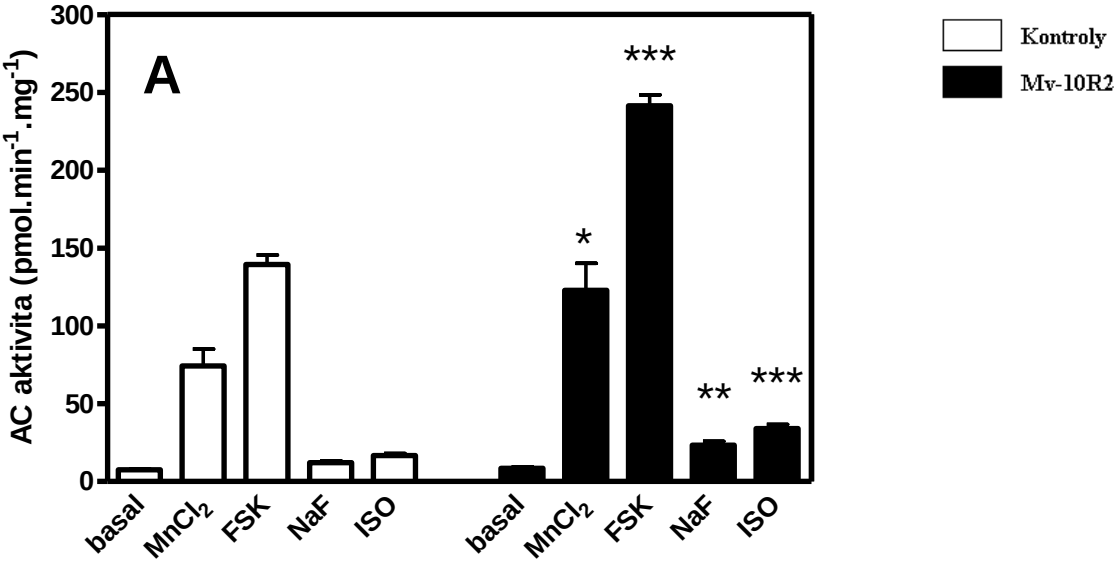


Obr. 9: Exprese AC podtypu V/VI u kontrol a jednotlivých skupin morfinem ovlivněných potkanů. V grafu je relativní úroveň exprese vyjádřená v procentuální změně oproti kontrolám. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 (porovnávána kontrolní skupina oproti skupinám s morfinem ovlivněnými jedinci).

5.3 Stanovení aktivity adenylylcyklázy v myokardu potkanů

5.3.1 Bazální a stimulovaná aktivita AC

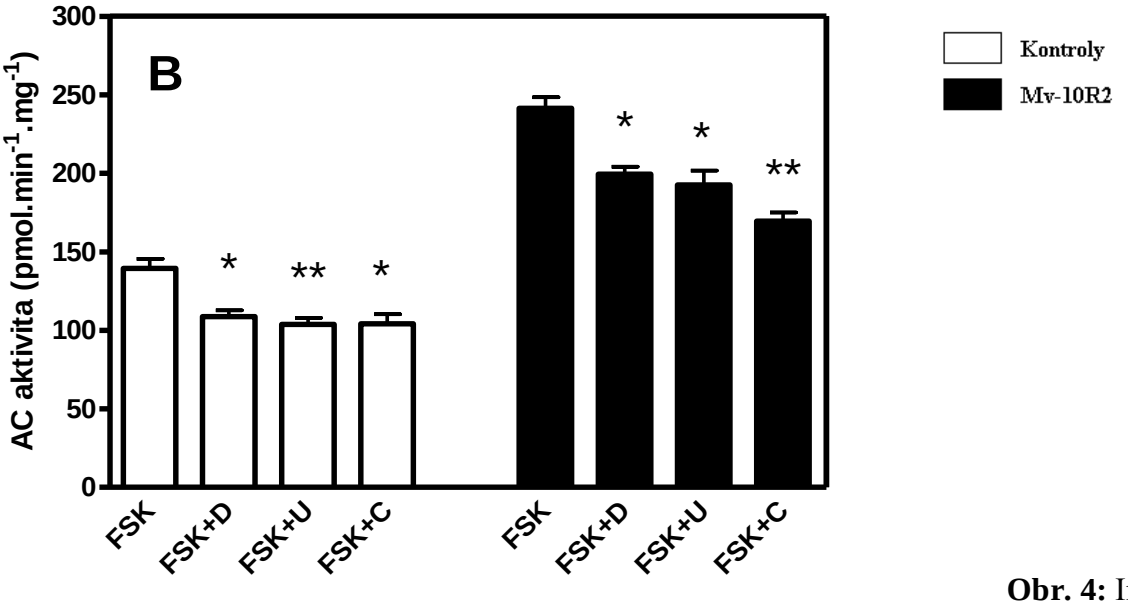
Bazální aktivita AC nebyla u morfinem ovlivněných jedinců (M_V-10R2) významně změněna. U stimulované aktivity došlo k signifikantnímu zvýšení při přímé stimulaci AC pomocí $MnCl_2$ i forskolinu. K signifikantnímu zvýšení aktivity došlo i při zprostředkované stimulaci pomocí NaF, který aktivuje $G\alpha_s$ podjednotky a působením isoprenalinu, který aktivuje β_1- a β_2-AR (viz obr. 10). K procentuálně větší změně aktivity došlo u nepřímé stimulace, kdy došlo k nárůstu aktivity o 105 % při stimulaci isoprenalinem a o 91 % při stimulaci NaF. Při přímé stimulaci byla aktivita zvýšena o 73 % při stimulaci forskolinem a o 66 % při stimulaci $MnCl_2$.



Obr. 10: Bazální a stimulovaná aktivita AC u kontrol a potkanů ovlivněných morfinem M_V-10R2. FSK - forskolin, ISO - isoprenalin, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 (porovnávána kontrolní skupina oproti skupině morfinem ovlivněných jedinců M_V-10R2).

5.3.2 Inhibiční vliv selektivních agonistů na aktivitu AC

Inhibičním působením selektivních agonistů došlo k signifikantnímu snížení forskolinem stimulované aktivity AC u kontrolních i morfinem ovlivněných skupin potkanů M_V-10R2. Aktivita AC byla přitom o 5-9 % více snížena u kontrol (DADLE o 22 %, U50488 o 26%, karbachol o 39 %) než u skupiny M_V-10R2 (DADLE o 17 %, U50488 o 20%, karbachol o 30 %), viz obr. 11.



Obr. 4: Inhibovaná

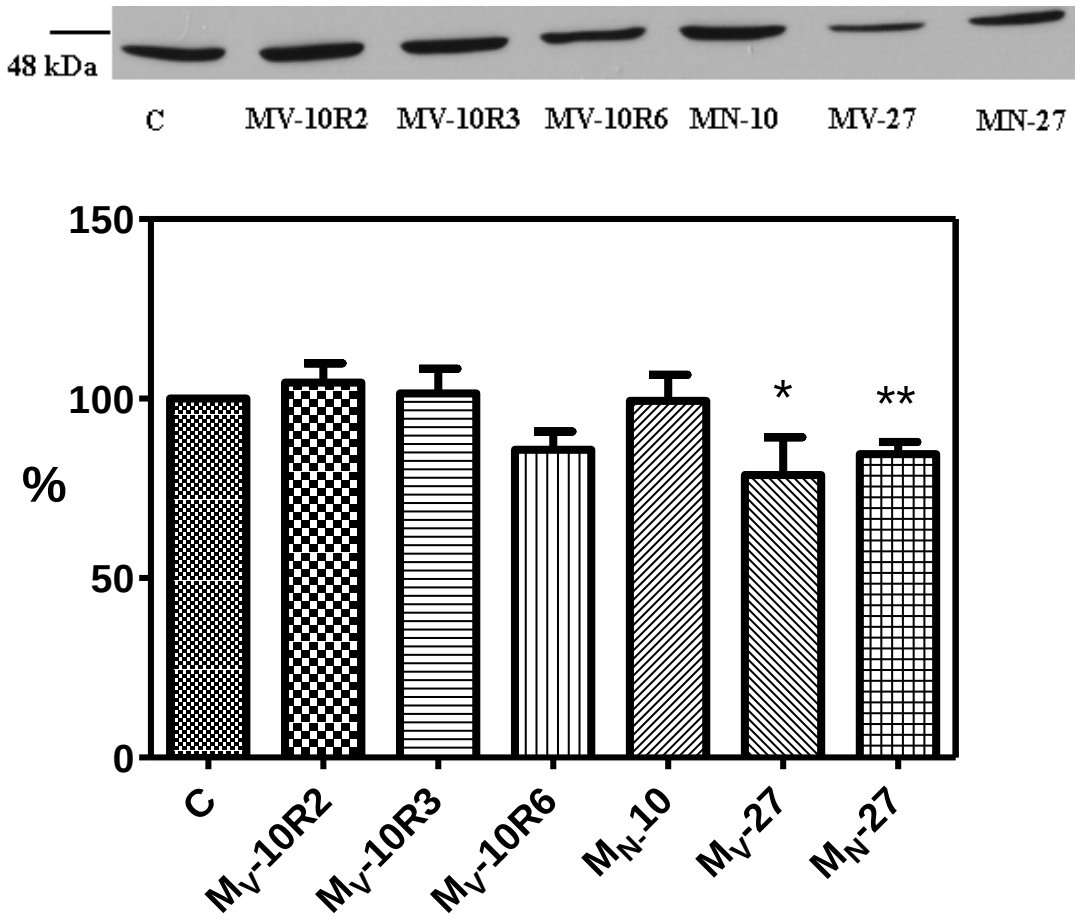
Obr. 11: Inhibovaná aktivita AC kontrol a skupiny jedinců ovlivněných morfinem M_V-10R2 působením specifických agonistů δ-OR, κ–OR a mAChR. FSK - forskolin, D - DADLE, U – U50488, C - karbachol, **p<0,001, *p<0,01 (porovnávána stimulovaná aktivita forskolinem oproti inhibované aktivitě působením specifických agonistů).

5.4 Sledování exprese vybraných GPCR v myokardu potkanů po dlouhodobém podávání morfinu

5.4.1 Exprese opioidních receptorů

V srdeční tkáni se nachází především κ-OR a δ-OR. V našich experimentech byla za pomoci imunoblotů a specifických protilátek sledována exprese těchto receptorů

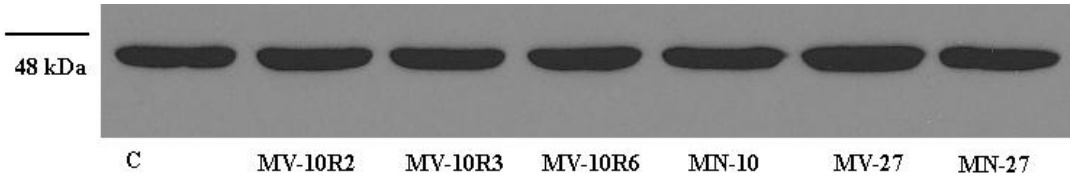
u potkanů, kteří byli dlouhodobě ovlivněni působením morfinu. Detekce OR za pomoci dostupných protilátek (δ- OR: sc-7492, Santa Cruz Biotechnology, κ-OR: sc-7493, Santa Cruz Biotechnology) byla velmi problematická a δ-OR se nepodařilo vůbec detekovat. Po úpravě metodiky (použití blokovacího pufru bez mléka, snížení ředění primárních protilátek na 1:100 s ředícím pufrem, důkladném několikanásobném promytí nitrocelulosových membrán vodou po obou inkubacích v protilátkách a zvýšení naředění sekundárních protilátek DAG na 1:40 000 s ředícím pufrem) se podařilo detekovat κ-OR. Exprese κ-OR nebyla podle našich výsledků změněna při podávání nízkých i vysokých dávek morfinu po dobu deseti dnů. K mírnému signifikantnímu snížení exprese κ-OR došlo u dlouhodobějšího podávání morfinu po dubu 27 dní a to u podávání vysokých i nízkých dávek. K většímu snížení exprese přitom došlo u skupiny, která dostávala vyšší dávky morfinu (viz obr. 12).

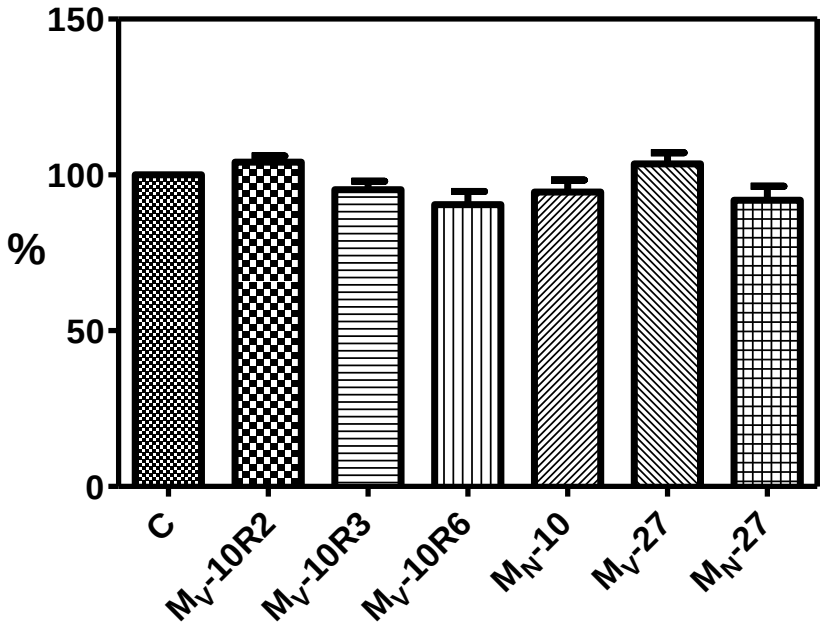


Obr. 12: Exprese κ-OR u kontrol a jednotlivých skupin morfinem ovlivněných potkanů. V grafu je relativní úroveň exprese vyjádřená v procentuální změně oproti kontrolám. **p<0,01, *p<0,05, (porovnávána kontrolní skupina oproti skupinám s morfinem ovlivněnými jedinci).

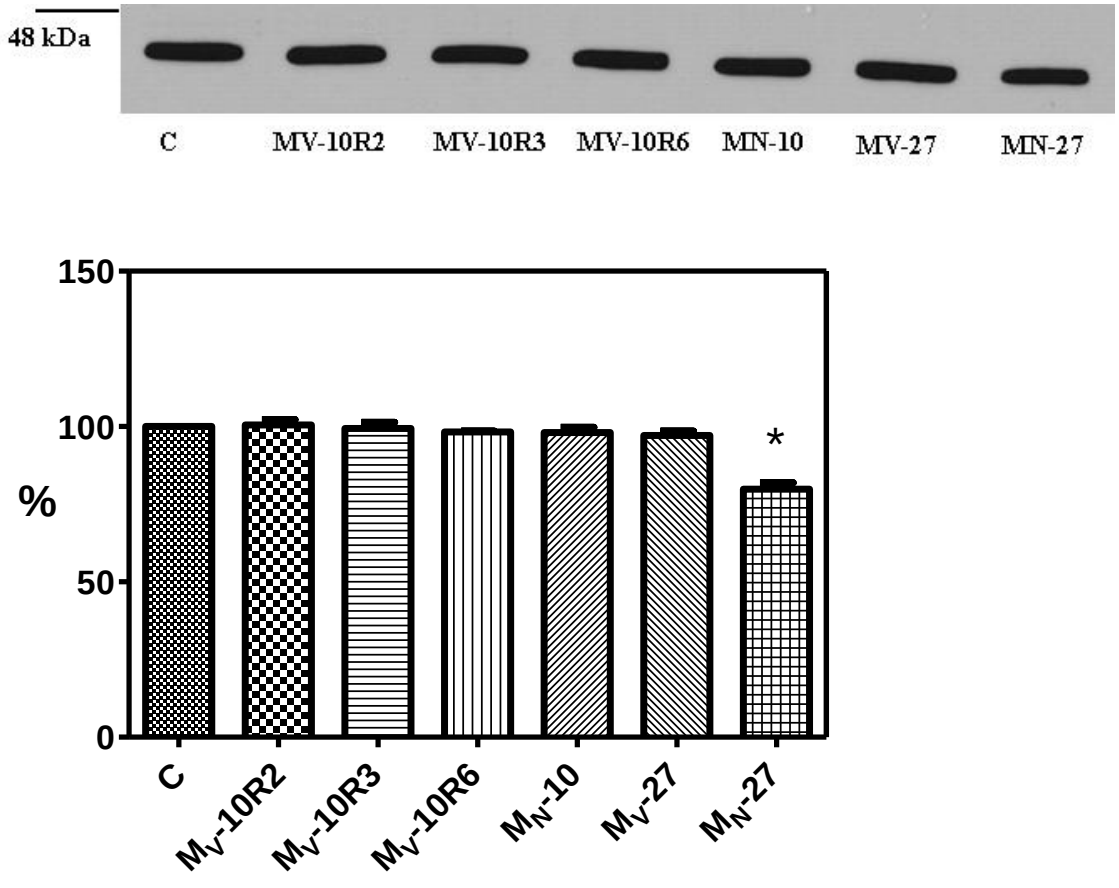
5.4.2 Exprese β_1- a β_2-adrenergních receptorů – stanovení pomocí imunoblotingu

V myokardiálním adrenergním signálním systému hrají důležitou roli především β-AR, kterých se zde vyskytuje asi 10x více než α-AR. V srdeční tkáni jsou zastoupeny především podtypy β_1 a β_2. Podle některých hypotéz by mohlo dlouhodobé podávání morfinu ovlivňovat obrat katecholaminů a tím i myokardiální adrenergní signální systém. Podle našich experimentů nedocházelo při dlouhodobém podávání vysokých i nízkých dávek morfinu k signifikantní změně exprese β_1-AR (viz obr. 13) ani β_2-AR mimo skupiny, které byly podávány nízké dávky morfinu po dobu 27 dní (M_N-27). U této skupiny došlo k signifikantnímu snížení exprese β_2-AR (viz obr. 14).





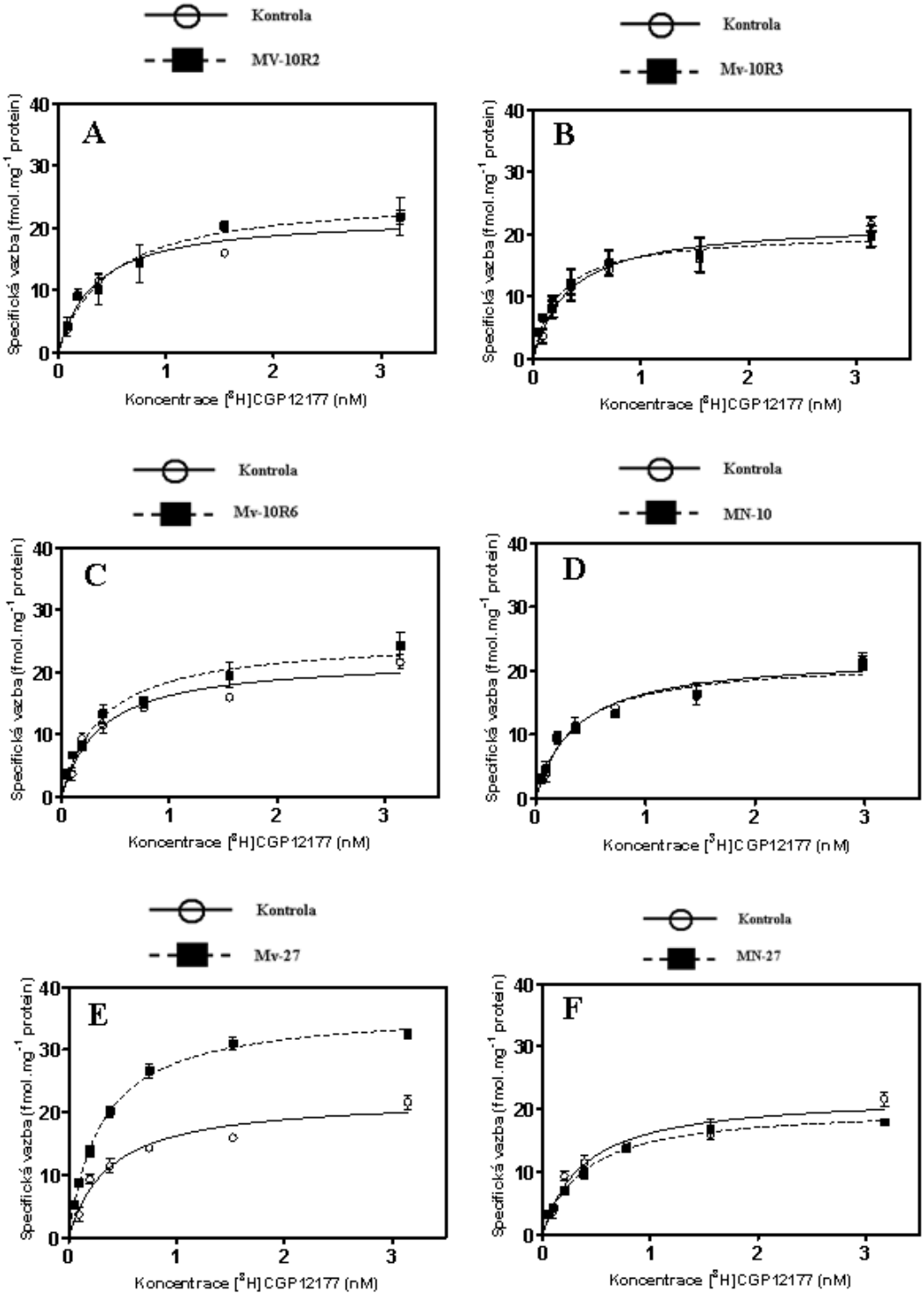
Obr. 13: Exprese β_1 u kontrol a jednotlivých skupin morfinem ovlivněných potkanů. V grafu je relativní úroveň exprese vyjádřená v procentuální změně oproti kontrolám. $p<0,05$ (porovnávána kontrolní skupina oproti skupinám s morfinem ovlivněnými jedinci).



Obr. 14: Exprese β_2 u kontrol a jednotlivých skupin morfinem ovlivněných potkanů. V grafu je relativní úroveň exprese vyjádřená v procentuální změně oproti kontrolám. *p<0,05 (porovnávána kontrolní skupina oproti skupinám s morfinem ovlivněnými jedinci).

5.4.3 Exprese β_1- a β_2-adrenergních receptorů – stanovení pomocí saturačních vazebných studií

Vazebné studie byly zvoleny jako doplňující experiment imunoblotů pro sledování množství β-AR. Tato metoda je oproti imunoblotům citlivější a tak lze lépe detekovat rozdíl v expresi receptorů mezi jednotlivými pokusnými skupinami. Za pomoci saturačního vazebného experimentu byla ve vzorcích jednotlivých experimentálních skupin měřena a porovnávána specifická vazba ligandu [^{3}H]-CGP12177 na β-AR v rovnovážném stavu v závislosti na rostoucí koncentraci radioligandu (viz obr. 15).



Obr. 15: Porovnání saturační vazebné křivky kontroly se saturačními vazebnými křivkami morfinem ovlivněných skupin: M_V-10R2 (A), M_V-10R3 (B), M_V-10R6 (C), M_N-10 (D), M_V-27 (E), M_N-27(F).

Pomocí saturační vazebné křivky byl určen maximální počet vazebných míst (Bmax) a rovnovážná disociační konstanta (Kd). Počet receptorů (Bmax) se signifikatně změnil pouze při podávání vysokých dávek morfinu po dobu 27 dnů (M_V-27), kdy došlo k nárůstu počtu vazebných míst o 57% oproti kontrolní skupině. Afinita receptorů k radioligandu (Kd) nebyla u žádné z pokusných skupin signifikantně změněna (viz tab. 6).

Tab. 6: Vazabné charakteristiky β-AR v myokardu kontrolních a morfinem ovlivněných potkanů.

Skupina	**Bmax (fmol/mg)**	**Kd (nM)**
C	23.0 ± 0.7	0.31 ± 0.03
M_V-10R2	23.5 ± 1.4	0.36 ± 0.11
M_V-10R3	20.5 ± 0.5	0.22 ± 0.02
M_V-10R6	25.3 ± 0.1	0.38 ± 0.05
M_N-10	22.2 ± 1.2	0.36 ± 0.12
M_V-27	36.2 ± 0.7 *	0.32 ± 0.03
M_N-27	20.4 ± 0.7	0.40 ± 0.07

*p<0,001 (porovnávána kontrolní skupina oproti skupinám s morfinem ovlivněnými jedinci)

6. Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv chronického působení nízkých a vysokých dávek morfinu na vybrané signální systémy řízené trimerními G-proteiny v srdci potkana. Sledována byla exprese vypraných GPCR – δ- a κ- opioidních receptorů, β_1- a β_2- adrenergních receptorů a exprese a aktivita adenylylcyklázy izotypu V/VI v plasmatických membránách kardiomyocytů, které byly separovány námi optimalizovanou metodikou homogenizace a frakcionace myokardu. Výsledky ukázaly, že podávání nízkých i vysokých dávek morfinu po dobu 10 dní neovlivňuje množství KOR, zatímco podávání nízkých i vysokých dávek morfinu po dobu 27 dní snižuje expresi KOR. Detekce DOR se v rámci této práce nezdařila. Dlouhodobé působení nízkých ani vysokých dávek morfinu nemělo vliv na expresi β_1-AR. Při podávání nízkých dávek morfinu po dobu 27 dní jsme pozorovali mírné snížení exprese β_2-AR, ačkoli dlouhodobé podávání vysokých dávek, případně nízkých i vysokých dávek po dobu 10 dní, expresi β_2-AR neovlivnilo. Pokud byla exprese stanovena saturační vazebnou studií s neselektivním ligandem β-AR, docházelo při podávání vysokých dávek morfinu po dobu 27 dní k nárůstu počtu receptorů, přičemž jejich afinita k ligandu zůstala zachována. Podařilo se nám prokázat, že podávání vysokých dávek morfinu indukuje expresi AC V/V. Množství exprimované AC se po ukončení podávání morfinu postupně snižovalo směrem k hladině AC u morfinem neovlivněných potkanů. Dlouhodobější podávání vysokých i nízkých dávek morfinu po dobu 27 dnů zvyšovalo expresi AC, nicméně zvýšená exprese u vyšších dávek morfinu byla na nižší hladině, než při 10denním podávání. Tento jev by mohl znamenat, že se buňka vypořádává s působením morfinu postupným zapojováním různých regulačních mechanismů. Při dlouhodobém podávání vysokých dávek morfinu nedocházelo ke změně basální aktivity AC, zatímco stimulovaná aktivita byla oproti kontrolám signifikantně zvýšena. K většímu nárůstu stimulované aktivity přitom docházelo při nepřímé aktivaci AC pomocí stimulace Gαs a aktivace β-AR, než při přímé stimulaci AC. Z těchto výsledků je patrné, že se zvýšená aktivita AC po chronickém podávání morfinu nedá zdůvodnit pouze zvýšenou expresí AC. Inhibiční vliv aktivovaných Gi podjednotek na aktivitu AC byl nižší u morfinem ovlivněných jedinců než u kontrol, což svědčí o tom, že při chronickém působení morfinu dochází k aktivaci regulačních mechanismů, které

způsobí downregulaci drah vedoucích k inhibici AC. Naše výsledky naznačují, že se signální systémy v myokardu potkana funkčně adaptují na přetrvávající stimulaci OR i jinak než pouhou downregulací receptorů. V buňce zřejmě dochází k souběžnému zapojení řady adaptačních mechanismů, které pomáhají buňkám myokardu vypořádat se s dlouhodobou aktivací a působením inhibičních Gi proteinů.

Morfin se váže s největší afinitou na MOR, ale zároveň se může vázat také na DOR a KOR (Martin, 1983). V srdeční tkáni potkana byla popsána přítomnost pouze KOR a DOR, přítomnost MOR nebyla potvrzena (Ventura et al., 1992; Wittertet et al., 1996). V našich experimentech jsme se proto zaměřili na sledování exprese DOR a KOR. Detekce DOR se příliš nezdařila, pravděpodobně především kvůli málo účinným komerčním protilátkám. Na tento nezdar mohl mít částečně vliv i fakt, že se v srdeční tkáni zřejmě vyskytuje poměrně malé množství DOR (Wittertet al., 1996).

S analogií k jiným GPCR převládá teorie, že dlouhodobé působení opioidů vyvolává několik odlišných událostí, které zabraňují danému opioidnímu agonistovi přenášet signál déle do buňky (Kieffer a Evans, 2002). Mezi tyto procesy patří heterologní desenzitizace skrze nespecifickou fosforylaci receptorů, která způsobí rozpřažení receptoru od G-proteinu, nebo rychlá homologní desenzitizace spojená s fosforylací receptoru specifickou GRK, která byla aktivována právě působením daného receptoru. Při homologní desenzitizaci dochází po fosforylaci receptoru k navázání arrestinu. Vzniklý komplex je poté internalizován do buňky, kde je následně recyklován nebo degradován (Lefkowitz, 1998; Pitcher et al. 1998). Tímto procesem tak dochází k omezení působení daného opioidního agonisty v důsledku snížení počtu jeho receptorů na povrchu buňky. Zmíněné procesy jsou považovány za jeden z hlavních důvodů vzniku tolerance po chronickém působení opioidů. Zatímco dlouhodobé působení mnoha endogenních a exogenních opioidů indukuje internalizaci receptoru (Kieffer a Evans, 2002), působení morfinu podle několika studií internalizaci receptoru neindukuje. Například při studii, kterou provedli Keith a spolupracovníci (1996) na buněčných kulturách, nedocházelo při působení morfinu k internalizaci DOR a MOR, a to ani v dávkách, které silně inhibovaly AC. Přitom působení dalších agonistů enkefalínu a etropínu na stejné buněčné kultury způsobilo internalizaci OR v řádu několika minut. K obdobným výsledkům došlo i v další studii, která byla rovněž provedena na buněčných kulturách (Arden et al., 1995). Naše výsledky ukázaly, že podávání nízkých i vysokých dávek morfinu po dobu deseti dnů nezpůsobuje změnu v počtu KOR v cytoplasmatických membránách a potvrzují tak předchozí studie. Buňka

tedy zřejmě reaguje na zvýšenou aktivaci OR morfinem pouze fosforylací receptoru bez následné internalizace a degradace receptoru. Internalizace receptoru je spojena s tvorbou váčku, což je poměrně energeticky náročný proces. Strategie pouhého rozpřažení receptoru od jeho efektoru při náhlé zvýšené aktivaci by tak mohla být energeticky výhodnější, zvláště uvědomíme-li si, že po ukončení daného stimulu buňka musí znovu navrátit, nebo znovu syntetizovat a navrátit (v případě internalizace spojené s degradací) odstraněné receptory zpátky do membrány. Důvod, proč působení některých agonistů způsobuje internalizaci, zatímco po působení jiných agonistů na stejný receptor k internalizaci nedochází, není doposud jasný. Tento jev nelze zřejmě vysvětlit ani různou afinitou agonistů na daný receptor, protože u dalších typů GPCR dochází k internalizaci receptoru po stimulaci částečným i plným agonistou (Jasper a Insel, 1992). Mírný úbytek množství KOR v membráně, ke kterému došlo při podávání morfinu po dobu 27 dnů, bychom mohli vysvětlit širším zapojením adaptačních mechanismů buňky pří déletrvajícím stimulu. Je možné, že buňka po 27 dnech působení morfinu část receptů internalizovala, zároveň mohlo dojít k ovlivnění signálních drah vedoucích do jádra a k snížení nebo zastavení exprese nových opioidních receptorů.

β-Adrenergní signální systém je jedním z klíčových regulátorů srdeční funkce (Naga Prasad et al., 2001). V srdeční tkáni se nachází především β_1-AR a β_2-AR, přičemž převládá podtyp β_1-AR, který tvoří asi 75-80% všech β-AR (Rockman et al, 2002). Signální systém β-AR je v srdci zřejmě funkčně propojen se signálním systémem opioidních receptorů. Bylo například zjištěno, že při aktivaci sympatiku jsou spolu s noradrenalinem uvolňovány i opioidní peptidy, které působí proti jeho funkci (Xiao et al., 1997). Blokací OR tak dochází ke zvýšení srdeční odpovědi na působení β-AR (Imai et al., 1994). Zároveň existuje několik studií, které prokazují, že popůsobení morfinu dochází ke změně obratu katecholaminů (Rabadán, 1997; Fuentealba, 2000). Z těchto důvodů jsme se v našich experimentech zabývali otázkou, zdali dlouhodobé působení morfinu ovlivní β-AR signální systém na úrovni exprese jeho receptorů. Při detekci pomocí imunoblotů jsme nezaznamenali žádné rozdíly v expresi β_1-AR ani β_2-AR, vyjma mírného snížení exprese u β_2-AR při podávání nízkých dávek morfinu po dobu 27 dní. Tento výsledek je poměrně kontroverzní a z logického hlediska není příliš zdůvodnitelný, s velkou pravděpodobností se jedná spíše o chybu v nepříliš citlivé metodě. Při citlivějším stanovení exprese pomocí saturačních vazebných studií s neselektivním ligandem β-AR, došlo při podávání vysokých dávek morfinu po dobu 27 dní k nárůstu počtu β-AR o 50 %. Podobný jev sledoval i Ammer a Schulz (1996)

v buněčných kulturách, kdy po chronickém působení morfinu, došlo k nárůstu počtu β_2-AR o 40 %. Abychom mohli potvrdit, že chronické podávání morfinu vede ke zvýšení exprese jednoho nebo více podtypů β-AR, bude zapotřebí pokračovat v dalších saturačních nebo kompetitivních vazebných studiích se specifickými ligandy pro jednotlivé typy β-AR.

V srdci se nachází čtyři isoformy AC (IV - VII). Přitom dominantními isoformami jsou zde AC V a AC VI, isoformy AC IV a AC VII se zde vyskytují v daleko menším množství (Wang a Brown, 2004). Naše experimenty prokázaly, že při podávání vysokých dávek morfinu dochází ke zvýšení exprese AC V/VI v myokardu potkana. Je tedy zřejmé, že působení morfinu může mít přímý vliv na expresi AC. Toto dokazuje i skutečnost, že spolu s odezníváním vlivu morfinu docházelo k postupnému snižování množství AC. Obecně je známo, že AC V/VI je negativně regulována Gi proteiny (Patel et al., 2001). Aktivací OR morfinem tak dochází k inhibici AC a snižuje se intracelulární koncentrace cAMP. Snížená koncentrace cAMP vede ke snížení aktivity PKA. Fosforylační aktivitou PKA dochází k regulaci mnoha buněčných pochodů, včetně regulce MAPK drah, které mohou vést až ke změně jaderné signalizace (Williams et al., 2001). Můžeme si tak představit, že určitá signální dráha aktivovaná PKA může působit inhibičně na transkripční faktory AC, nebo naopak aktivačně na supresory exprese AC. Snížená aktivita PKA, ke které dochází v důsledku inhibičního vlivu aktivovaných OR na AC, by tak mohla vést k uvolnění exprese AC a tak i k nárůstu množství AC v cytoplasmatických membránách. Naše výsledky nejsou příliš podpořeny nedávnou studií, ve které Steiner a spolupracovníci (2005) sledovali expresi AC VIII po chronické aktivaci (18 h) inhibičních Gi proteinů v buněčných liniích. Během této studie nedocházelo ke zvýšení exprese AC VIII. Na druhou stranu si musíme uvědomit, že tato studie probíhala v zcela jiných experimentálních podmínkách (buněčné kultury vs. srdce potkana, 18 h vs. 10denní působení Gi) a že byla sledována exprese isoformy AC s jinými regulačními mechanismy než má AC V/VI (Patel et al., 2001). Podle našich výsledků hraje navíc důležitou roli v indukci exprese AC nejen množství podávaného morfinu, ale i délka jeho podávání. Zatímco 10denní podávání nízkých dávek morfinu nezpůsobilo změnu exprese, 27denní podávání stejných dávek expresi AC signifikantně zvýšilo. Při podávání vysokých dávek morfinu, naopak docházelo po 10. ti denním podávání k vyššímu nárůstu exprese AC než při 27denním podávání. Menší nárůst AC V/VI by mohl být zdůvodněn sníženým počtem inhibičního působení v důsledku snížení KOR, ke kterému podle našich výsledků docházelo právě

pouze při podávání morfinu po dobu 27 dnů. Naše další výsledky, které se týkají aktivity AC, ukazují, že při chronickém podávání morfinu dochází ke zvýšení produkce cAMP. Zvýšená produkce cAMP tak oponuje úsudku o indukci exprese AC sníženou aktivací PKA, na druhou stranu je možné, že expresi AC V/VI vyvolává primární akutní podání morfinu a její zvýšená hladina přetrvává i ve chvíli, kdy se inhibiční vliv morfinu mění na aktivační. Toto by zároveň mohlo vysvětlovat i menší množství exprimované AC V/VI při 27 denním působení morfinu. Teorii o indukci exprese AC po chronickém působení morfinu tedy nemůžeme vyvrátit, nicméně pro její plné potvrzení bude třeba dalších experimentů.

Zatímco akutní působení opioidů je spojeno se snížením hladiny cAMP v buňce, jejich chronické působení vede naopak ke zvýšení aktivity AC - supersenzitizace (Watts, 2002). V souvislosti se snahou vysvětlení vzniku tolerance a nástupu abstinenčního syndromu byl tento jev zkoumán především v CNS (Nestler, 1996; Nestler et al., 1996; Kieffer et al., 2002). Změna v aktivitě AC (heterologní senzitace) po chronickém působení morfinu byla později pozorována i v buněčných kulturách (Steiner et al., 2005; Schallmach et al., 2006). Z těchto pozorování je tedy zřejmé, že heterologní senzitizace není výhradní vlastností pouze neuronálních buněk. Existuje pouze jediná studie, která se zabývala touto problematikou v signálním systému myokardu. V této studii, která byla prováděna konkrétně na psím srdci, nebyla prokázána žádná významná změna v enzymatické aktivitě AC (Napier et al., 1999). V našich experimentech prováděných na potkanech docházelo po dlouhodobém podávání morfinu k signifikantnímu zvýšení stimulované aktivity AC. K většímu nárůstu stimulované aktivity přitom docházelo při nepřímé aktivaci AC pomocí stimulace Gαs (91 %) a aktivace β-AR (105 %), než při přímé stimulaci AC (66-73 %). Při chronickém působení inhibičních vlivů na AC tedy zřejmě nedochází jen ke změnám v rámci molekuly AC (zvýšení citlivosti, zvýšení exprese), ale jsou nejspíš upregulovány i dráhy vedoucí k její aktivaci. Ammer a Shultz (1996) zjistili, že při chronické působení morfinu se zvyšuje aktivita AC a zároveň, jak již bylo popsáno výše, dochází k nárůstu počtu β_2-AR. Ve stejné studii pak demonstrovali, že při přidání ireverzibilního agonisty β_2-AR dochází k poklesu zvýšených hladin aktivity AC. Další studie ukazují, že k heterologní senzitizaci AC nedojde, pokud je zablokováno působení Gi přidáním pertussis toxinu (Schallmach et al., 2006). Za heterologní senzitizaci je tedy s největší pravděpodobností zodpovědné působení Gi podjednotky, která aktivuje zatím neznámým způsobem nárůst β_2-AR. Důležitou roli v heterologní senzitizaci AC

by mohla mít i zvýšená hladina katecholaminů, ke které dochází při dlouhodobém podávání morfinu (Rabadán, 1997; Fuentealba, 2000). Podle dosavadních výzkumů se tedy dá usoudit, že by hlavní vliv na supersenzitizaci AC mohla mít upregulace β-AR signálního systému. Podle našich výsledků byl také po dlouhodobém podávání morfinu mírně snížen inhibiční vliv aktivovaných Gi podjednotek na aktivitu AC. Je tedy možné že supersenzitizace AC přispívá nejen upregulace β-AR signálního systému, ale zároveň i současná downregulace signálního systému OR.

7. Závěr

Výsledky našich experimentů ukazují, že chronické působení morfinu ovlivňuje nejenom opioidní ale i β-adrenergní signální systém v myokardu potkana. Z našich pozorování vyplývá, že na expresi vybraných opioidních a β-adrenergních receptorů má vliv pouze 27denní podávání morfinu, přičemž exprese opioidních receptorů se snižuje, zatímco exprese β-adrenergních receptorů se zvyšuje. Chronické podávání vysokých dávek morfinu po dobu 10 dní zvyšuje expresi AC V/VI, podávání nízkých dávek morfinu ovlivňuje expresi AC V/VI až po 27denním působení. Podle našich experimentů vede chronické působení morfinu k upregulaci stimulačních a downregulaci inhibičních drah ovlivňujících aktivitu AC. Tyto výsledky naznačují, že buňka reaguje na přetrvávající působení morfinu postupným zapojováním různých regulačních mechanismů a že signální dráhy opioidních receptorů jsou zřejmě propojeny se signálními dráhami β-adrenergních receptorů. Dosažené výsledky osvětlují zatím prakticky neprozkoumaný vliv chronické působení morfinu na signální dráhy v srdci potkana. Je patrné, že si tato málo probádaná oblast zasluhuje více pozornosti už kvůli možnému úzkému propojení s β-adrenergním signálním systémem, který je klíčovým regulátorem srdečních funkcí.

8. Seznam použité literatury

Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E., Watson, S. (1998) Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug and Alcohol Dependence,* 51, 127-140.

Ammer, H., Schulz, R. (1997) Chronic morphine treatment increases stimulatory Beta-2 adrenoreceptor signaling in A431 cell stably expressing the mu opioid receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 280, 512-520.

Arden, J. R., Segredo, V., Wang, Z., Lameh, J., Sadée, W. (1995) Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *Journal of Neurochemistry,* 65, 1636-1645.

Ballantyne, J. C. (2008) Medical use of opioids: what drives the debate? A brief commentary. *European Journal of Pain Supplements,* 2, 67-68.

Ballantyne, J. C., Mao, J. (2003) Opioid therapy for chronic pain. *The New England Journal of Medicine,* 349, 1943-1953.

Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G. F., Shi, L., Gether, U., Javitch, J. A. (2001) Activation of the β_2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *The Journal of Biological Chemistry,* 276, 29171-29177.

Benyhe, S. (1994) Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. *Life Sciences,* 55, 969-979.

Boluyt, M. O., Younes, A., Caffrey, J. L., O´Neil, L., Barron, B. A., Crow, M. T., Lakkatta, E. G. (1993) Age-associated increase in rat cardiac opioid production. *Americal Journal of Physiology,* 265, H212-H218.

Brodde, O. E., Michel, M. (1999) Adrenergic and muskarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews,* 51, 651—690.

Claphan, D. E., Neer, E. J. (1997) G protein βγ subunits. *Annual Reviewed of Pharmacology and Toxicology,* 37, 167-203.

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

Daaka, Y., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. (1997) Switching of the coupling of the β_2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature,* 390, 88-91.

De Vries, L. D., Zheng, B., Fisher, T., Elenko, E., Farquhar, M. G. (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annual Reviewed of Pharmacology and Toxicology,* 40, 235-271.

Fuentealba, J. A., Forray, M. I., Gysling, K. (2000) Chronic morphine treatment and withdrawal increase extracellular levels of norepinephrine in the rat bed nucleus of stria terminalis. *Journal of Neurochemistry,* 75, 741-748.

Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., Le Marc, H. (1996) Functional β3-adrenoreceptor in the human heart. *The Journal of Clinical Investigation,* 98, 556-562.

Gether, U., Kobilka, B. K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *The Journal of Biological Chemistry,* 273, 17979-17982.

Gross, E. R., Hsu, A. K., Gross, G. J. (2004a) Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase β inhibition during reperfusion in the intact rat hearts. *Circulation Research,* 94, 960-966.

Gross, E. R., Hsu, A. K., Gross, G. J. (2004b) Acute aspirin treatment abolished, whereas acute ibuprofen treatment enhances morfine-induced cardioprotection: Role of 12-Lipoxygenase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 310, 185-191.

Hamm, H. E., Gilchrist, A. (1996) Heterotrimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology,* 8, 189-196.

Hill, C. S. (1996) Government regulatory influences on opioid prescribing and their impact on the threatment of pain of nonmalignant origin. *Journal of Pain and Symptom Management,* 11, 287-298.

Imai, N., Kashiki, M., Woolf, P. D., Liang, C. S. (1994) Comparasion of cardiovascular effects of mu- and delta- opioid receptor antagonists in dogs with congensive heart failure. *Americal Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology,*267, H912-H917.

Jasper, J. R., Insel, P. A. (1992) Evolving concepts of partial agonism. The beta-adrenergic receptor as a paradigm. *Biochemical Pharmacology,* 43, 119-130.

Jordan, B., Devi, L. A. (1998) Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *British Journal of Anaesthesia,* 81, 12-19.

Keith, D. E., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Kang, L., Evans, C. J., Von Zastrow, M. (1996) Morphine activates opioid receptors without causing thein rapid internalization. *The Journal of Biological Chemistry,* 271, 19021-19024.

Kieffer, B. L., Evans, C. J. (2002) Opioid tolerance-in search of Holly Grail. *Cell,* 108, 587-590.

Lefkowitz, R. J. (1998) G Protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and β-arrestins in receptor signaling and desensitisation. *The Journal of Biological Chemistry,* 273, 18677-18680.

Leurs, R., Bakker, R. A., Timmerman, H., Esch, I. J. P. (2005) The histamine H_3 receptor: from gene cloning to H_3 receptor drugs. *Nature Reviews Drug Discovery,* 4, 107-120.

Levy, F. O., Zho, X., Kaumann, A. J., Birnbaumer, L. (1993) Efficacy of β_1-adrenergic receptors is lower then that of β_2-adrenergic receptors. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 90, 10798-10802.

Lhose, M. J., Engelhardt, S., Eschenhagen, T. (2003) What is the role of β-adrenergic signaling in heart failure? *Circulation Research,* 93, 896-906.

Liang, B. T., Gross, G. J. (1999) Direct preconditioningu of cardiac myocytes via opioid receptors and K-ATP channels. *Circulation Research,* 84, 1396-1400.

Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H., Watson, S. J. (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in Neurosciences.*18, 22-29.

Martin, W. R. (1983) Pharmacology of Opioids. *Pharmacological Reviews,* 35, 283-323.

Maslov, L. N., Lishmanov, Y. B., Oeltgen, P. R., Barzakh, E. I., Krylatov, A. V., Govindaswami, M., Browne, S. A. (2009) Activation of peripheral δ_2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury. Involvement of protein

kinase C, NO-synthase, K_{ATP} channels and the autonomic nervous system. *Life Sciences,* 84, 657-663.

Maslov, L. N., Lishmanov, Y. B., Oeltgen, P. R., Barzakh, E. I., Krylatov, A. V., Naryzhnaya, N. V., Pei, J-M., Browne, S. A. (2010) Comparative analysis of the cardioprotective properities of opioid receptor agonists in a rat model of myocardial infarction. *Academic Emergency Medicine,* 17, 1239-1246.

Miki, T., Cohen, M. V., Downey, J. M. (1998) Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Molecular and Cellular Biochemistry,* 186, 3-12.

Minami, M., Satoh, M. (1995) Molecular – biology of the opioid receptors – structures, function and distribution. *Neuroscience Research,* 23, 121-145.

Morris, A. J., Malbon, C. C. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological Reviews,* 79, 1373-1430.

Murry, C. E., Jennings, R. B., Reiner, K. A. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation,* 74, 1124-1136.

Naga Prasad, S. V., Nienaber, J., Rockman, H. A. (2001) β-adrenergic axis and heart disease. *Trends in Genetics,* 17, S44-S49.

Napier, L. D., Roerig, S. C., Yoshishige, D. A., Barron, B. A., Caffrey, J. L. (1999) Canine cardiac muscarinic receptors, G proteins, and adenylate cyclase after long-term morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 291, 725-732.

Nestler, E. J. (1996) Under siege: The brain on opiates. *Neuron,* 16, 897-900.

Nestler, E. J., Berhow, M. T., Brodkin, E. S. (1996) Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways. *Molecular Psychiatry*, 3 190-199

Obame, F. N., Plin-Mercier, C., Assaly, R., Zini, R., Dubois-Randé, J. L., Bordeaux, A., Morin, D. (2008) Cardioprotective effect of morfine and a blocker of glycogen synthese kinase 3β, SB216763 [3-(2,4-Dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 326, 252-258.

Oxford Textbook of Palliative Medicine, 2nd ed. (Doyle, D., Hanks, G., MacDonald, N., Oxford University Press, 1998).

Paradis, P., Dumont, M., Bélichard, P., Rouleau, J-L., Lemaire, S., Brakier-Gingras, L. (1992) Increased preproenkephalin A gene expression in the rat heart after induction of myocardial infarction. *Biochemistry and Cell Biology,* 70, 593-598.

Patel, T. B., Du, Z., Pierre, S., Cartin, L., Scholich, K. (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene,* 269, 13-25.

Pharmacology, 5th ed. (Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K., Churchill Livingstone, 2003).

Pierce, K. L., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 639-650.

Pitcher, J. A., Freedman, N. J., Lefkowitz, R. J. (1998) G Protein-coupled receptor kinases. *Annual Reviewed of Biochemistry,*67, 653-92.

Pugsley, M. K. (2002) The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system. *Pharmacology and Therapeutics,* 93, 51-75.

Rabadán, J. V., Milanés, M. V., Lorden, M. L. (1996) Effects of chronic morphine treatment on catecholamines kontent and mechanical response in the rat hearts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 280, 32-37.

Randich, A., Thuston, C. L., Ludwig, P. S., Timmerman, M. R., Gebhart, G. F. (1991) Antinoception and cardiovascular responses produced by intravenous morphine: the role of vagal afferents. *Brain research,* 543, 256-270.

Rittner, H. L., Brack, A., Machelska, H., Mousa, S. A., Bauer, M., Schafer, M., Stein, C. (2001) Opioid-peptide expressing leukocytes. Identification, recruitment, and stimultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anaesthesiology,* 95, 500-508.

Rockman, H. A., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J. (2002) Seven-membrane-spaning receptors and heart function. *Nature,* 415, 206-212.

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature,* 459, 356-363.

Salazar, N. C., Chen, J., Rockman, H. A. (2007) Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1768, 1006-1018.

Schallmach, E., Steiner, D., Vogel, Z. (2006) Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: implication for acute and chronic opioid exposure. *Neuropharmacology,* 50, 998-1005.

Schultz, J. E., Rose, E., Yao, Z., Gross, G. J. (1995) Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Americal Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology,* 268, H2157-H2161.

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

Schultz, J. E., Hsu, A. K., Gross, G. J. (1998) Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by δ_1 but not μ- or κ- opioid receptors. *Circulation,* 97, 1282-1289.

Steiner, D., Avidor-Reiss, T., Schallmach, E., Butovsky, E., Lev, N., Vogel, Z. (2005) Regulation of adenylate cyclase type VIII splice variants by acute and chronic $G_{i/o}$-coupled receptor activation. *Biochemical Journal,* 386, 341-348.

Strosberg, A.D. (1993) Structure, function and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science,* 2, 1198-1209.

Taylor, D. A., Fleming, W. W. (2000) Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 297, 11-18.

Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H. (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician.* 11, S133-S153.

Ventura, C., Spurgeon, H., Lakatta, E. G., Guarnieri, C., Capogrossi, M. C. (1992) κ and δ opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca^{2+} release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circulation Research,* 70, 66-81.

Wang, G-Y., Wu, S., Pei, J-M., Yu, X-Ch., Wong, T-M. (2001) κ- but not δ-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhytmia in rats. *Americal Journal Of Physiology, Heart and Circulatory Physiology,* 280, H384-H391.

Wang, T., Brown, M. J. (2004) Differential expression of adenylyl cyclase suntypes in human cardiovascular system. *Molecular and Cellular Endocrinology,* 223, 55-62.

Watts, V. J. (2002) Molecular mechanisms for heterologous sensitization of adenylate cyclase. *Perspectives in Pharmacology,* 302, 1-7.

Williams, J. T., Christie, M. J., Manzoni, O. (2001) Cellular and synaptic adaptions mediating opioid dependence. *Pharmacological Reviews,* 81, 299-343.

Wittert, G., Hope, P., Pyle, D. (1996) Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 218, 877-881.

Xiao, R. P., Pepe, S., Spurgeon, H. A., Capogrossi, M. C., Lakatta, E. G. (1997) Opioid peptide receptor stimulation reverses beta-adrenergic effects in rat heart cells. *Americal Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology,* 272, H797-H805.

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

Zollner, C., Stein, C. (2007) Opioids. *Handbook of Experimental Pharmacology,* 177, 31-63.