

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie živočichů

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky

Oddělení vývojové kardiologie



Vliv metadonu na ischemickou toleranci srdce laboratorního potkana

The effect of methadone on cardiac ischemic tolerance in rats

Linda Mošovská

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Neckář Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 6.8.2013

Linda Mošovská

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především mému školiteli RNDr. Janu Neckářovi Ph.D. za pomoc při praktických pokusech, trpělivost, pevné nervy a cenné rady při sepisování této diplomové práce. Dále celému Oddělení vývojové kardiologie FgÚ AV ČR, kde pokusy probíhaly.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Akademie věd (IAA501110901).

Abstrakt

Opioidy jsou vnímány jako nebezpečné návykové látky, které se v medicíně hojně využívají pro své silné analgetické účinky. Opioidy (mezi něž patří morfin a metadon) nicméně mohou hrát významnou roli také v odolnosti srdce k ischemii, a to tak, že snižují míru buněčného poškození. Tento protektivní účinek byl dosud dobře prozkoumán u morfinu, o vlivu metadonu na myokard však není známo téměř nic. Hlavním cílem této diplomové práce proto bylo zjistit, jak ovlivní chronické podávání metadonu ischemickou toleranci srdce laboratorního potkana.

Naše experimenty jsme prováděli s potkany kmene Wistar ve dvou sériích. V první sérii jsme aplikovali morfin (10 mg/kg/den, intramuskulárně - i.m.) nebo metadon (2 mg/kg/den, i.m.) po dobu 10 dnů. V druhé sérii pokusů jsme aplikovali metadon po dobu 28 dnů (2 mg/kg/den, i.m.). Pro analýzu ischemické tolerance srdce jsme použili metodu izolovaného perfundovaného srdce. Výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií byl analyzován v průběhu 50 min ischemie a na počátku reperfuze. Velikost infarktu byla analyzována histochemicky, za použití tetrazoliových solí a KMnO_4 po 1 h reperfuze a byla stanovena planimetricky.

V první sérii experimentů analyzujících vliv 10 denního podávání obou opioidů na odolnost srdce k ischemii jsme neprokázali významný účinek morfinu ani metadonu jak na ischemické a reperfuzní arytmiie, tak na velikost infarktu. V druhé sérii pokusů nedošlo k významné změně ve výskytu a závažnosti ischemických arytmií u srdcí potkanů v důsledku 28 denního podávání metadonu. Další parametry jsme nemohli porovnat z důvodu vysokého výskytu komorových fibrilací v počátku reperfuze. Z dosažených výsledků lze usuzovat, že chronické podávání vysoké dávky metadonu nemá zásadní vliv na ischemickou toleranci srdce potkana.

Klíčová slova: metadon, srdce, ischemie-reperfuze, velikost infarktu, arytmiie.

Abstract

Opioids are considered as a dangerous addictive substances which are widely used in medicine for their strong analgetic effects. Opioids (such as morphine and methadon) may nevertheless play an important role in the resistance of the heart to ischemia by reducing the rate of cell damage. This protective effect is well understood about morphine but we don't know almost nothing about effects of methadone on the myocardium. The main aim of this thesis was to find out how chronic methadone treatment affects ischemic tolerance of rat hearts.

For our experiments we used Wistar rats in two series. In the first series we administered morphine (10 mg/kg/day, i.m.) or methadone (2 mg/kg/day, i.m.) for 10 days. In the second experiment series we administered methadon for 28 days (2 mg/kg/day, i.m.). For analysis of the ischemic heart tolerance we used the isolated perfused heart method. Incidence and severity of ischemia and reperfusion arrhythmias were analyzed during the 50 min of ischemia and early reperfusion. Infarct size was analyzed histochemically, using tetrazolium salts and KMnO_4 1 h after reperfusion and was determined by planimetric method.

In the first series of experiments analyzing the effect of 10-day administration of both opioids on the resistance of the heart to ischemia we did not find a significant effect of morphine and methadon on ischemic and reperfusion arrhythmias and the infarct size. In the second series of experiments, there was no significant change in the incidence and severity of ischemic arrhythmias in the rat heart due to the 28-day administration of methadone. Other parameters we could not compare because of the high incidence of ventricular fibrillation in the early reperfusion. The results suggest that chronic administration of high doses of methadone has no significant effect on ischemic tolerance of rat heart.

Key words: methadone, heart, ischemia-reperfusion, infarct size, arrhythmias.

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod	10
2. Literární přehled	11
2.1. <u>Opioidy</u>	11
2.2. <u>Ischemie myokardu</u>	13
2.2.1. Metabolismus srdce v průběhu ischemie.....	13
2.2.2. Strukturální a funkční projevy ischemie.....	16
2.2.2.1. Buněčné poškození.....	16
2.2.2.2. Ischemické arytmie.....	17
2.3. <u>Reperfuze myokardu</u>	18
2.3.1. Reperfuze arytmie.....	20
2.3.2. Stunning.....	21
2.3.3. Volné kyslíkové radikály (ROS).....	21
2.4. <u>Kardioprotektivní fenomény</u>	22
2.4.1. Ischemický preconditioning.....	23
2.4.2. Postconditioning.....	25
2.4.3. Chronická hypoxie.....	25
2.4.4. Kardioprotektivní působení opioidů.....	27
2.4.4.1. Opioidy indukovaný preconditioning (OPC).....	27
2.4.4.2. Opioidy indukovaný postconditioning.....	31
2.4.4.3. Opioidy v chronické hypoxii.....	31
2.4.4.4. Dlouhodobé podávání opioidů.....	32
2.4.4.5. Metadon v kardioprotekci.....	34
3. Cíle diplomové práce	35
4. Materiál a metody	36
4.1. <u>Experimentální skupiny</u>	36
4.2. <u>Metoda izolovaného perfundovaného srdce</u>	36
4.2.1. Přípravná fáze pokusu.....	37
4.2.2. Průběh experimentu.....	39
4.2.3. Experimentální protokol.....	41

4.2.4.	Měření EKG a krevního tlaku.....	41
4.2.5.	Stanovení velikosti infarktu.....	41
4.2.6.	Vyhodnocení experimentálně získaných dat.....	43
4.2.6.1.	Vyhodnocení ischemických a reperfuzních arytmií.....	43
4.2.6.2.	Hodnocení velikosti infarktu.....	45
4.3.	<u>Statistické hodnocení naměřených dat</u>	47
5.	Výsledky	48
5.1.	<u>Série I – 10ti denní podávání opioidů</u>	48
5.1.1.	Ischemické a reperfuzní arytmie.....	50
5.1.1.1.	Ischemické arytmie.....	50
5.1.1.2.	Reperfuzní arytmie.....	55
5.1.2.	Velikost infarktu.....	59
5.2.	<u>Série II – 28mi denní podávání metadonu</u>	61
5.2.1.	Ischemické a reperfuzní arytmie.....	62
5.2.1.1.	Ischemické arytmie.....	63
5.2.1.2.	Reperfuzní arytmie.....	67
5.2.2.	Velikost infarktu.....	71
5.3.	<u>Kontroly</u>	73
5.3.1.	Ischemické a reperfuzní arytmie.....	74
5.3.1.1.	Ischemické arytmie.....	74
5.3.1.2.	Reperfuzní arytmie.....	78
5.3.2.	Velikost infarktu.....	82
6.	Diskuze	84
6.1.	<u>Shrnutí výsledků</u>	84
6.2.	<u>Protektivní úloha opioidů</u>	85
6.3.	<u>Vliv metadonu na srdce</u>	87
6.4.	<u>Metodické problémy se sérií II.</u>	88
7.	Závěr	90
8.	Použitá literatura	91

Seznam zkratek

AR - oblast srdce zasažená infarktem (area at risk)

ATP - adenosin trifosfát

BNTX - 7- benzyldenaltrexon

D – dvojité předčasné komorové stahy (doublets)

GSHP - glutathion peroxidáza

HR – tepová frekvence

i.m. – intramuskulárně

IP3 - inositol trifosfát

IPC - ischemický preconditioning

IS – velikost infarktového ložiska (infarct size)

LAD - sestupná větev levé koronární arterie (left anterior descendens)

LV - levá komora (left ventricle)

ME - Met⁵-enkefalin

Metadon 10 – zvířata, jimž byl podáván metadon v dávce 2 mg/kg/den po dobu 10 dnů

Metadon 28 – zvířata, jimž byl podáván metadon v dávce 2 mg/kg/den po dobu 28 dnů

Morfin 10 – zvířata, jimž byl podáván morfin v dávce 10 mg/kg/den po dobu 10 dnů

mPTP – mitochondriální pór (mitochondrial permeability transition pore)

NADH - nikotinamidadenindinukleotid

NO - oxid dusnatý

OPC - opioidní preconditioning

OR - opioidní receptor(y)

PC - preconditioning

PCr - kreatin fosfát

PI3 kináza - fosfatidylinositol kináza

PKC - proteinkináza C

POC - postconditioning

PVCs – celkový počet předčasných komorových komplexů

ROS - volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)

S – jednoduché předčasné komorové stahy (singles)

SOD - superoxididismutáza

T – trojitě předčasné komorové stahy (triplets)

TTC - 2, 3, 5 - trifenyltetrazolium chlorid

VF - komorové fibrilace (ventricular fibrillation)

VT - komorové tachykardie (ventricular tachycardia)

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění postihují srdce a cévy. Z celé řady chorob se nejčastěji vyskytuje mozková mrtvice a ischemická choroba srdeční a její akutní forma, infarkt myokardu. Ve vyspělých státech je nekróza myokardiálních buněk v důsledku infarktu hlavní příčina smrti, ročně na toto onemocnění zemře okolo 2 milionů lidí, což je přibližně 40 % všech úmrtí. Právě proto se předmětem výzkumu mnoha laboratoří po celém světě stalo studium patologických změn doprovázejících infarkt myokardu, a nebo naopak, studium mechanismů, které tyto patologické změny omezí.

Srdce má svoji přirozenou odolnost k ischemii, která s věkem klesá. Tuto odolnost však můžeme zvýšit některými látkami nebo postupy. Mezi známé kardioprotektivní fenomény se řadí např. adaptace na chronickou hypoxii, tzv. preconditioning a postconditioning nebo podání opioidů.

Opioidy jsou přirozeně se vyskytující nebo syntetické látky, které mají velké analgetické účinky, pro které jsou využívány v lékařství. Před téměř 20ti lety však bylo zjištěno, že mohou mít ještě jiný pozitivní účinek, a tím je schopnost zmenšit poškození srdce, které je vyvoláno infarktem myokardu. Přesný mechanismus této protekce ještě není zcela objasněn.

Tato práce se věnuje roli syntetického opioidu metadonu v toleranci srdce k akutní ischemii a pokouší se objasnit, jestli může aplikace metadonu snížit výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií a zmenšit velikost infarktu. Toto téma je velmi zajímavé nejen proto, že by mohlo přispět k léčbě ischemické choroby srdeční, ale i proto, že se o něm dosud mnoho neví.

2. Literární přehled

2.1. Opioidy

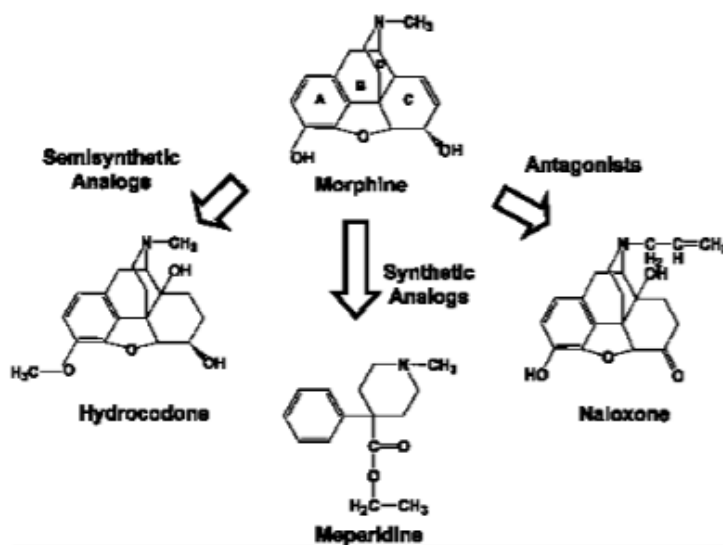
Pojmem opioid se označuje každá sloučenina vážící se na specifické opioidní receptory (OR). Tyto receptory se vyskytují převážně v centrálním nervovém systému, ale i v tenkém a tlustém střevu, ledvinách, plicích, slezině, varlatech, vaječnicích a děloze (Wittert a kol. 1996). OR dělíme na 4 hlavní skupiny: δ -OR, μ -OR, κ -OR a nociceptinový receptor (NOP-R), dříve znám jako tzv. sirotčí receptor (ORL-1). První 3 základní typy OR se dále dělí na podtypy ($\mu_1 - \mu_3$, $\kappa_1 - \kappa_3$, $\delta_1 - \delta_2$) (Tso a Wong, 2003).

Rozlišujeme 4 skupiny opioidů:

- 1) Endogenní opioidní peptidy (EOPs) - jsou produkovány v těle živočichů.
- 2) Opioidní alkaloidy - přirozeně se vyskytující, např. morfin nebo kodein.
- 3) Semisyntetické - uměle vytvořeny z přirozeně se vyskytujících opioidů, např. heroin.
- 4) Plně syntetické - např. metadon (Doyle a kol., 1998).

Všechny tyto peptidy mají 4 prohormonové prekurzory (pro-enkefalin, pro-opiomelanokortin, pro-dynorfin a pro-nociceptin), ze kterých vznikají (Pugsley, 2002).

Název "opiooid" je odvozen od názvu vlčího máku (*Papaver somniferum*), v jeho semenech jsou alkaloidy s fenantrenovou strukturou, morfin, kodein a tebain (viz obr. č. 1).



Obrázek č. 1: Chemická struktura morfinu, hlavního alkaloidu získávaného z rostliny *Papaver somniferum*, a chemicky podobných semisyntetických a syntetických analogů. Ze základní struktury morfinu se také syntetizuje antagonist OR, naloxon. Cyklická jádra v molekule morfinu, označená A, B, a C, znázorňují ty oblasti molekuly, které tvoří jádro fenantrenu (převzato z Pugsley, 2002).

Opioidy se využívají v lékařství kvůli své schopnosti analgezie (úleva od bolesti), tlumí kašel, odstraňují dušnost a působí jako antistresový faktor. Využívají se především pro zmírnění silné akutní bolesti a pooperační bolesti, chronické bolesti a bolesti způsobené nádorovým bujením. Pacientům se mohou podávat ústně (ve formě tablet, kapek, sirupů), intravenózně, subkutánně nebo rektálně. Prozatím nebyla objevena žádná jiná farmaka, která by dobře tišila silnou bolest.

Dlouhodobá aplikace opioidů vede k rozvinutí tolerance, snižuje se analgetický účinek a je potřeba navyšovat dávku. Kromě tolerance může dlouhodobé podávání navodit závislost. Závislost je definována jako absolutní potřeba dané látky, aby byly v organismu zachovány normální fyziologické funkce (Taylor a Fleming, 2001). Při ukončení léčby opioidy musíme dávky pacientovi postupně snižovat, náhlým vysazením léku po delší době užívání bychom vyvolali abstinenční příznaky.

2.2. Ischemie myokardu

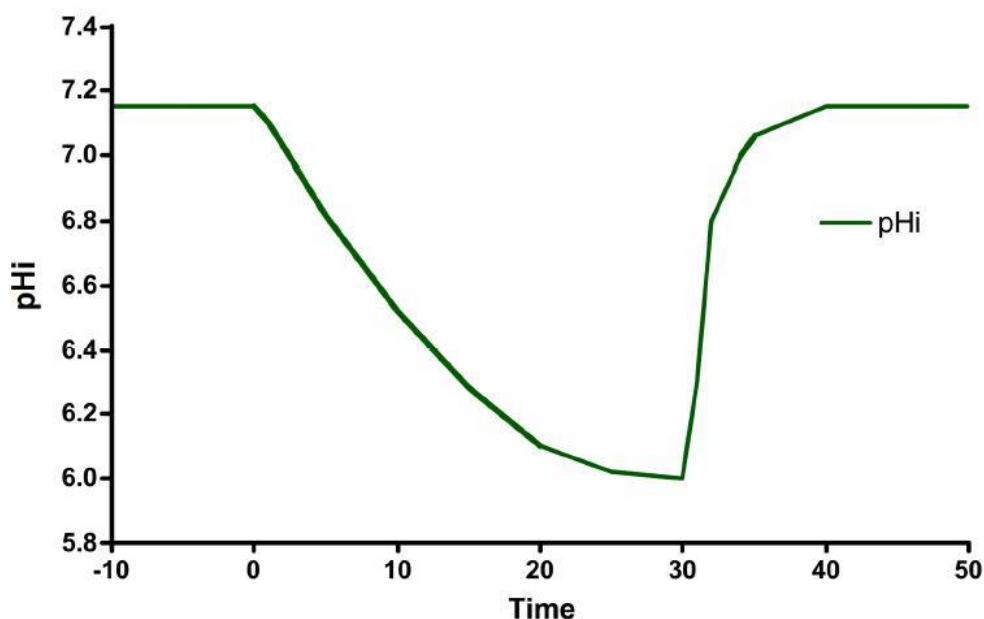
Ischemie myokardu vzniká při nedostatečném krevním zásobení srdce nebo jeho úplném zastavení. V jeho důsledku dochází k omezenému zásobení myokardu kyslíkem. Příčinou bývá uzavření některé z koronárních artérií např. trombem. Další z možností vzniku ischemie je lokální spazmus hladkého svalstva koronární tepny.

Ischemie vyvolává patofyziologické změny srdečního svalu, pokud se však průtok koronární artérií obnoví včas, jsou tyto změny reverzibilní. Je-li ischemie dlouhodobého charakteru (desítky minut až hodiny), začínají tyto změny být ireverzibilní a dochází k buněčné smrti, infarktu myokardu (Ošřádal a kol., 2003). Patologické změny vyvolané akutním infarktem myokardu můžeme rozdělit na poškození ischemické, vznikající při uzavření krevního průtoku koronární artérií, a na poškození reperfuze, které je způsobeno opětovným otevřením této tepny po dlouhodobé ischemii.

2.2.1. Metabolismus srdce v průběhu ischemie

Srdce je aerobní orgán, který ke svému správnému fungování vyžaduje kyslík. energii získává štěpením látek (např. glukóza, laktát, pyruvát a volné mastné kyseliny) a tuto energii ukládá do makroergní vazby ve sloučeninách adenosin trifosfát (ATP) a kreatin fosfát (PCr). Energie z ATP se využívá ihned, ve formě PCr se ukládá do zásoby.

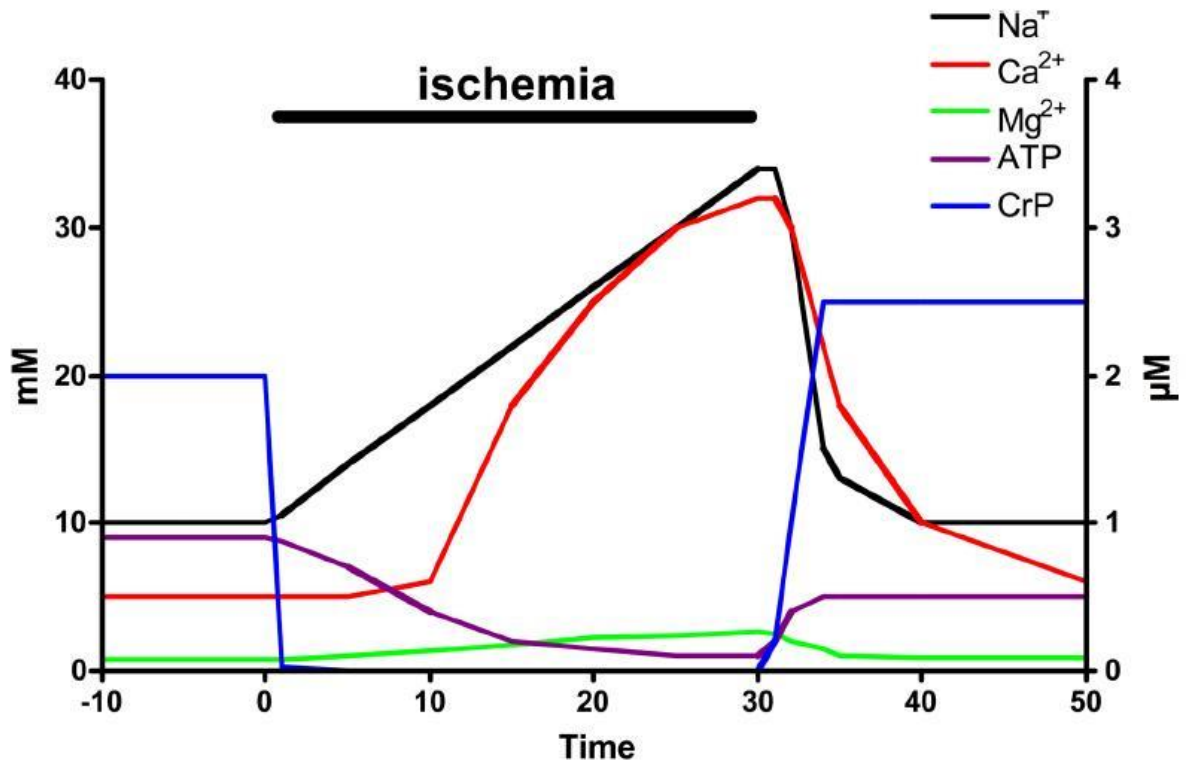
Pokud dojde v důsledku akutního infarktu myokardu k rapidnímu úbytku kyslíku v buňkách, začne převládat anaerobní metabolismus. Hladina ATP poklesne na minimum už během prvních 15 - 20 min ischemie. Klesá i množství PCr. Hlavním zdrojem energie se pak stává glukóza, která je získána odbouráním zásob glykogenu. Z anaerobní glykolýzy lze však získat pouze 2 molekuly ATP místo původních 38 molekul v případě oxidativní fosforylace. Glukóza se odbourává na pyruvát a ten na laktát, který se v buňce hromadí. S přibývajícím délkou ischemie se snižují zásoby glukózy, zvyšuje se množství laktátu, H^+ (acidóza) a redukované formy nikotinamidových koenzymů (NADH) a klesá intracelulární pH (viz obr. č. 2). Většina těchto změn se pak podílí na poruchách srdeční kontraktility v průběhu akutní ischemie (Ošřádal a kol., 2003).



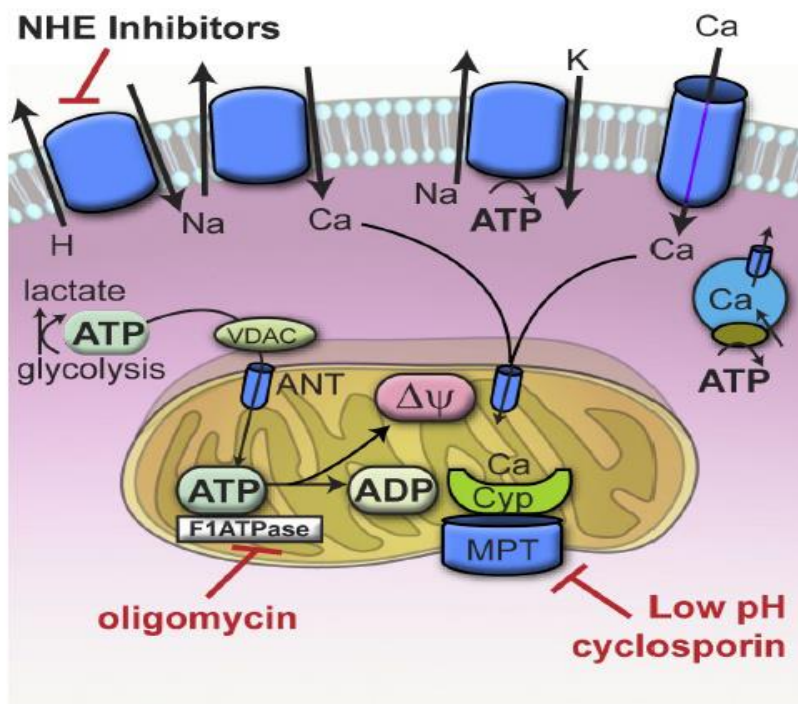
Obrázek č. 2: Změny hodnoty intracelulárního pH (pHi) v průběhu ischemie (převzato z Murphy a Steenbergen, 2008).

Ke vzniku ireverzibilního poškození buňky pravděpodobně nejvíce přispívají poruchy iontové rovnováhy. Vzhledem k tomu, že řada transportních iontových pump a kanálů je závislá na ATP, odráží iontová balance energetický stav myokardu. V průběhu ischemie se zvyšuje hladina Ca^{2+} a dochází k tzv. vápníkovému přetížení (viz obr. č. 3). Bylo zjištěno, že pokud tento nárůst Ca^{2+} zastavíme, snížíme množství nekrotické tkáně (Imahashi a kol., 2005). Za normálních podmínek každá systola začíná vstupem Ca^{2+} do buňky přes Ca^{2+} iontový kanál L-typu. To uvolní další Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula. Díky zvýšené koncentraci Ca^{2+} v buňce dojde ke kontrakci myofibril. Vápníkové kationty jsou z cytosolu srdeční buňky odčerpány pomocí Na^+ - Ca^{2+} výměníku a především zpět do sarkoplazmatického retikula je čerpá ATP dependentní sarkolemální vápníková pumpa (SERCA). Při ischemii odchází nadbytečný H^+ ven z buňky Na^+ - H^+ výměníkem, což má za následek intracelulární zvýšení hladiny sodných iontů (Murphy a kol., 1991). Jak ilustruje obr. č. 4, toto zvýšení (spolu s depolarizací membrány) zapříčiní opačný chod Na^+ - Ca^{2+} výměníku a vápenaté ionty se tedy z extracelulárního prostředí přečerpávají do intracelulárního (Imahashi a kol., 2005). Pokud před ischemií podáme zvířeti blokátory Na^+ - H^+ výměníku (Karmazyn, 1988) nebo Na^+ - Ca^{2+} výměníku (Murphy a

kol., 1991), omezíme vápníkové přetížení a snížíme ischemicko-reperfuční poškození.



Obrázek č. 3: Změny koncentrace ATP, fosfokreatinu (CrP) a iontů Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ v průběhu ischemie. Je patrné, že do buňky vstupuje velké množství sodných a vápenatých kationtů, zatímco hladina energetických zásob ve formě ATP a CrP klesá téměř na nulu (převzato z Murphy a Steenbergen, 2008).



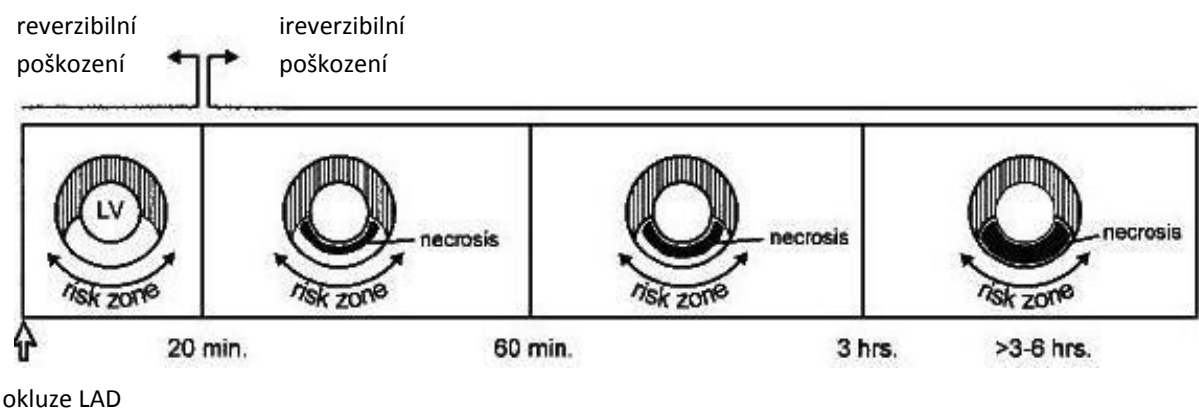
Obrázek č. 4 : Změny iontové homeostáze v kardiomyocytu v průběhu ischemie. V důsledku akutní ischemie klesá hladina ATP a díky anaerobní glykolýze klesá hodnota pH. Přebytek protonů stimuluje $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměník a posléze $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ výměník, což má za následek zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} . Většina ATP generovaného anaerobní glykolýzou se využije pro reverzní chod $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPázy}$. Ta generuje mitochondriální membránový potenciál, který je potřeba pro zpětné vychytávání Ca^{2+} do mitochondrie. Nárůst mitochondriálního Ca^{2+} může otevřít mitochondriální permeabilní pór (mPTP), ale díky nízkému pH zůstává mPTP zavřený. Otevírá se až v době reperfúze, kdy se pH vrací k normálním hodnotám (převzato z Murphy a Steenbergen, 2008).

2.2.2. Strukturální a funkční projevy ischemie

2.2.2.1. Buněčné poškození

Důsledky ischemie (vyčerpání energetických zásob buňky, acidóza, poruchy iontové homeostázy, hromadění volných kyslíkových radikálů - ROS) poškozují kardiomyocyty a mohou způsobit buněčnou smrt. K ireverzibilním změnám funkce myokardu dochází již od 15. - 30. minuty ischemie. Velikost infarktového ložiska stoupá s velikostí oblasti zasažené ischemií, s délkou ischemie (viz obr. č. 5), s rostoucí spotřebou kyslíku a s výskytem kolaterálního oběhu (část krevního oběhu srdce, spojky mezi artériemi vytváří alternativní oběh pro případ, že je některá z tepen uzavřena, např. chronickým onemocněním) a odolnosti myokardu k nedostatku kyslíku (viz kapitola 2.4.). Infarktové ložisko vzniká v subendokardiální

zóně myokardu a postupně se rozšiřuje směrem k epikardu (Kloner a Jennings, 2001). Zdá se, že buněčná smrt vyvolaná akutním infarktem myokardu probíhá jak procesem nekrózy, tak autofágie a apoptózy. Poměr mezi jednotlivými mechanizmy buněčné smrti je různý a může záležet na experimentálním modelu (např. buněčné kultury vs. *in vivo* model, neonatální vs. dospělí jedinci). Podle posledních výzkumů se zdá, že i nekróza může být regulována. Léze poškozené buňky může být provedena kontrolovanými procesy jako je mitochondriální dysfunkce, zvýšená tvorba ROS, deplece ATP nebo proteolýza (Golstein a Kroemer, 2007). Důležitým mediátorem a regulátorem všech typů buněčných smrtí jsou mitochondrie.



Obrázek č. 5: Časový průběh vzniku nekrotického ložiska v důsledku akutní ischemie je znázorněn na příčném řezu levou komorou (LV). Přibližně 15 - 20 minut po začátku ischemie může být ještě poškození myokardu reverzibilní. Čím déle ischemie přetrvá, tím více se infarktové ložisko rozšiřuje ze subendokardiální oblasti myokardu k epikardu. Risk zone - ta část myokardu, která je postižena ischemií (podle Kloner a Jennings, 2001).

2.2.2.2. Ischemické arytmie

Typický funkční projev ischemie jsou arytmie, poruchy vzniku a šíření elektrického vzruchu myokardem. Srdeční rytmus zdravého člověka se pohybuje okolo 60 - 80 tepů za minutu. V malé míře nemusejí arytmie způsobovat vážné potíže a neohroží člověka na životě, nicméně závažné arytmie mohou bez patřičné léčby vést až ke smrti. Výskyt arytmií lineárně roste s věkem a závažností srdečního onemocnění (Ošťádal a kol., 2003). Ischemické arytmie jsou hlavní příčinou úmrtí v důsledku akutního infarktu myokardu.

Poruchy rytmu s frekvencí vyšší než 100 tepů za minutu se označují jako tachykardie, oproti tomu frekvence nižší než 60 tepů za minutu jako bradykardie.

Dominantní roli při vzniku arytmí u akutní ischemie myokardu hraje zvýšení hladiny extracelulárního draslíku. Tato extracelulární koncentrace se zvyšuje kvůli porušeným funkcím struktur buněčné membrány (Ošťádal a kol., 2003).

2.3. Reperfuze myokardu

Reperfuzí se označuje obnova arteriálního průtoku do ischemického myokardu, která má za následek navrácení metabolismu zpět k aerobnímu metabolismu (Jennings a kol., 1990). Průtok krve znovu zprůchodněnou artérií se prudce zvýší v počátku reperfuze, a to až na 400 - 600% klidových hodnot před ischemií. Vrcholu dosahuje v prvních 5 minutách od začátku reperfuze a poté klesá. Na původní hodnoty se navrácí přibližně po 15 minutách (Bolli a kol., 1988).

Během reperfuze se extracelulární pH rychle navrácí do normálu. Koncentrace laktátu se snižuje na svoji původní hodnotu díky systémovému oběhu a oxidaci na CO_2 a H_2O . Tímto způsobem se pH ustálí na své původní hladině již do cca 2 minut od začátku reperfuze (Fleet a kol., 1985). Nicméně uvnitř buňky je stále acidické prostředí. Vyšší intracelulární koncentrace H^+ aktivuje $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměník, který čerpá H^+ ionty ven z buňky, výměnou za Na^+ .

Zvyšující se množství cytosolického Na^+ je normalizováno $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPázou a také $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ výměníkem, čímž se přechodně zvýší intracelulární hladina Ca^{2+} (Murphy a Steenbergen, 2008).

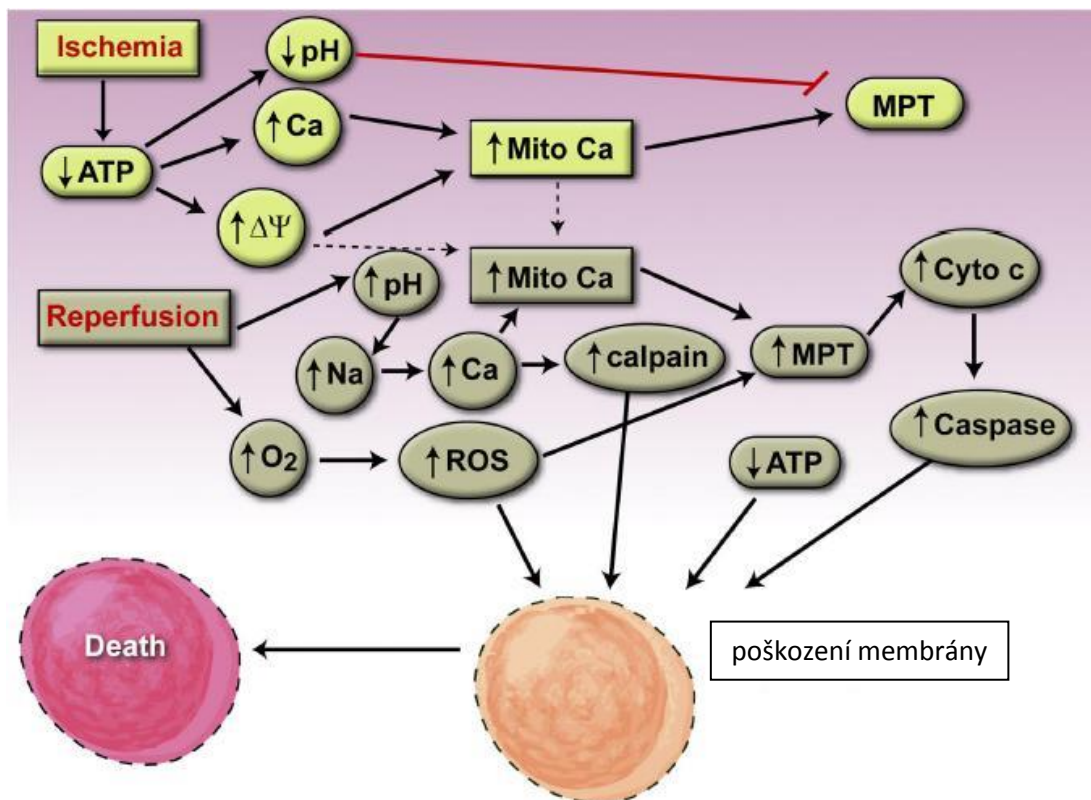
Nárůst hladiny mitochondriálního Ca^{2+} indukuje otevření mPTP póru v mitochondriální membráně, kterým ztrácí svůj membránový potenciál na vnitřní membráně, poruší se mitochondriální iontová rovnováha a prostřednictvím kaspáz se aktivuje apoptóza. Bylo zjištěno, že vlivem nízkého pH v ischemii je otevření mPTP blokováno, tudíž k mitochondriální destabilizaci dochází až během reperfuze, kdy se hodnota pH zvyšuje k fyziologickým hodnotám (Griffiths a kol., 1998). Jak bylo prokázáno v posledních několika letech, inhibicí mPTP se dá omezit rozvoj reperfuzního poškození myokardu. To může být zajištěno například přímou inhibicí

mPTP pomocí cyklosporinu A (Griffiths a kol., 2000) nebo nepřímo snížením Ca^{2+} a intracelulárního pH.

Předmětem diskusí dosud zůstává, zda-li ireverzibilní poškození kardiomyocytů vzniká hlavně v ischemii nebo k nějakému poškození dochází i v průběhu reperfuze. Toto téma je důležité hlavně pro klinickou praxi, jelikož podáním kardioprotektivních látek před reperfuzí bychom mohli tomuto poškození zabránit. Ukázalo se, že opravdu existuje mnoho farmak nebo postupů, které v časně fázi reperfuze signifikantně snižují velikost infarktu, např. postconditionig (POC, viz kapitola 2.6.4.) a celou řadu buněčných struktur, které se mohou podílet na jeho signalizaci.

Na počátku reperfuze se prudce zvyšuje množství produkovaných ROS (Arroyo a kol., 1987), což ilustruje obr. č. 6. Jak bylo experimentálně prokázáno, koncentrace ROS je vysoká již v první minutě reperfuze a vrcholí v prvních minutách po zprůchodnění koronární artérie (Bolli a kol., 1988). Neznamená to, že by se ROS netvořili již v ischemii, ale jejich koncentrace je nízká, jelikož se během ischemie nedostává do tkáně kyslík a ROS tedy mohou vznikat jen ze zbytkových molekul kyslíku. Zdá se, že i malé množství ROS v ischemii může poškodit elektrontransportní řetězec, který není schopný efektivně převádět elektrony (Lesnfsky a kol., 2004). Díky tomu se v reperfuzi, kdy se obnoví přísun kyslíku, výrazně zvyšuje hladina ROS, které jsou generovány v dýchacím řetězci na komplexu I a III. S těmito změnami je spojeno zvětšování velikosti mitochondrií (bobtnání), velmi dobře patrné v elektronovém mikroskopu.

Bylo zjištěno, že mPTP se neotvírá jen v důsledku zvýšené koncentrace Ca^{2+} , ale významně se na tomto ději podílejí i ROS (Kim a kol., 2006). Není proto překvapením, že některé antioxidanty podané v reperfuzi (jako například vitamin C a E) mohou snižovat ischemické poškození (Qin a kol., 2006).



Obrázek č. 6: Přehled dějů během ischemie a reperfuze, vedoucích k otevření mPTP póru, aktivaci kaspáz a následné buněčné smrti (převzato z Murphy a Steenbergen, 2008).

2.3.1. Reperfuzní arytmie

Reperfuzní arytmie vznikají v důsledku komplexních buněčných a humorálních reakcí, doprovázející opětovné zprůchodnění koronární tepny. Jako primární příčinou jejich tvorby jsou považovány látky akumulované v myokardu během reperfuze. Klíčovou úlohu zde sehrávají ROS, ale i Ca^{2+} , inositol trifosfát (IP₃) a další. Tyto biochemické modulátory způsobují komplexní změny na úrovni membránových iontových kanálů. Reperfuzní arytmie signalizují obnovení průtoku koronární artérií, ale zároveň indikují reperfuzní poškození. Ačkoliv existuje řada studií s látkami, které mohou inhibovat projevy reperfuzního poškození, dosud není žádné doporučení pro jejich použití v klinické praxi (Jurkovicová a Cagán, 1998).

2.3.2. Stunning

Braunwald a Kloner (1982) popsali tzv. omráčený myokard (stunning) jako dlouhodobou postischemickou dysfunkci životaschopné tkáně srdce, zachráněné v důsledku včasné reperfuze. Myokardiální stunning je reverzibilní děj, který může přetrvávat několik hodin až dnů po reperfuzi, v závislosti na mnoha parametrech jako např. délka trvání ischemie nebo dostatečný arteriální průtok (Kloner a kol., 1983). Charlat a kol. (1989) ukázali na psím modelu, že po 15 minutové okluzi sestupné větve levé koronární artérie (LAD) byla potřebná až 48 hodinová reperfuze, aby došlo ke kompletnímu obnovení systolické funkce, zatímco při okluzi LAD po dobu 1 minuty stačila pouze 30 minutová reperfuze (Kloner a kol., 1983).

Roberto Bolli se svými spolupracovníky (1989) dokázal, že z 50 až 70% vzniká myokardiální stunning v důsledku zvýšené hladiny ROS, uvolňovaných v několika prvních minutách reperfuze. To tedy znamená, že stunning je jednou z forem reperfuzního poškození srdce. Efekt stunningu může být zmírněn intravenózním podáním antioxidantních enzymů, které degradují ROS, a to superoxid dismutáza (SOD) a kataláza (Przyklenk a Kloner, 1986, Jeroudi a kol., 1990). Tyto enzymy však musí být aplikovány těsně před reperfuzí (Bolli a kol., 1989). Další velmi pravděpodobná příčina vzniku stunningu jsou poruchy vápníkové homeostázy, podáváním antagonistů vápníku se zlepšil obnova kontrakcí po ischemické zátěži (Ošťádal a kol., 2003).

Přesný mechanismus, jakým stunning působí, není zcela objasněn. Jedna z možností je dostupnost Ca^{2+} a citlivost kontraktálního aparátu k Ca^{2+} . Jako další se uvádí nedostatečná produkce energie mitochondriemi, zhoršené využití energie myofibrilami, poruchy mikrocirkulace, porušení kontraktálního aparátu proteolýzou troponinu I (McDonough a kol., 1999) nebo porušení extracelulární matrix.

2.3.3. Volné kyslíkové radikály (ROS)

Volné radikály jsou obecně nestabilní atomy nebo molekuly, které mají velmi krátkou dobu existence a vysokou reaktivitu vůči jiným strukturám. V jejich elektronovém obalu chybí jeden nebo více nespárovaných elektronů. Snahou volných radikálů je dostat se zpět do rovnovážného stavu. Jejich nebezpečí tedy tkví

v tom, že se snaží si doplnit chybějící elektron z jiných molekul, které ale tímto mění na sekundární radikály a dochází k řetězovému šíření.

ROS jsou považovány za jednu z hlavních příčin vzniku ischemicko-reperfuzního poškození (viz kapitoly 2.3., 2.3.1. a 2.3.2.). Vznikají v organismu z molekulárního kyslíku působením toxinů, karcinogenů nebo při fyziologickém zpracování kyslíku mitochondriemi. Mitochondrie jsou dokonce největším producentem ROS v buňce. ROS jsou tedy běžným produktem buněčného metabolismu a mají také významnou signalizační úlohu, ačkoliv dříve byly považovány za doprovodný jev k procesu stárnutí, k neurodegenerativním nebo nádorovým onemocněním či k jiným patologiím (Dickinson a kol., 2010). ROS se tvoří jedoelektronovou redukcí O_2 v elektrontransportním řetězci za vzniku superoxidu $O_2^{\cdot-}$. Ten je dále metabolizován pomocí SOD na peroxid vodíku, který je odbouráván na vodu pomocí glutathion peroxidázy (GSHP). Za fyziologických podmínek se superoxid vytvoří přibližně z 1 - 3% molekul kyslíku, nad touto hladinou už pak dochází k oxidačnímu stresu, který může způsobit zhoršení kontraktility myokardu nebo jeho strukturální poškození (Misra a kol., 2009). Zvýšená koncentrace ROS poškozuje hlavně membránové fosfolipidy, ale i DNA a proteiny. Akumulace mutací a delecí v mitochondriální i nukleární DNA vede k postupnému zkracování telomer v jaderné DNA.

Produkce ROS je kontrolována antioxidanty, jako např. GSHP a SOD, nebo nízkomolekulárními látkami jako je vitamin E a kyselina askorbová (vitamin C) (Evans a Halliwell, 1999).

2.4. Kardioprotektivní fenomény

Jak již bylo popsáno výše, ischemie srdečního svalu vzniká jako výsledek disproporce mezi množstvím kyslíku buňce dodávaného a množstvím kyslíku, které buňka skutečně potřebuje. Míra poškození nezávisí jen na intenzitě a délce ischemie, ale i na odolnosti myokardu k nedostatku kyslíku. Každé srdce má svou přirozenou toleranci k ischemii, měnící se s věkem. Rozdíl existuje i mezi pohlavími, mladé ženy mají menší pravděpodobnost infarktu než staří muži (Ošťádal a kol., 2003). Tuto toleranci je možné lidským zásahem zvýšit, a to např. preconditioningem

(IPC), postconditioningem, jak již bylo uvedeno výše, farmakologickými zásahy aktivující tyto děje nebo adaptací na chronickou hypoxii. Kardioprotekce se studuje na třech nejzávažnějších projevech ischemie, kterými jsou infarkt myokardu, postischemická obnova kontraktálních funkcí myokardu a výskyt a závažnost ischemických a reperfučních arytmií.

2.4.1. Ischemický preconditioning

IPC byl jako kardioprotektivní strategie poprvé popsán již v roce 1986 (Murry a kol.) a nastartoval další výzkumy ohledně mechanismu jeho kardioprotektivního účinku. I přesto, že dnes známe spoustu signálních kaskád, které se podílejí na aktivaci kardioprotekce, její přesný mechanismus nebyl dosud zcela objasněn.

V původní studii Murry a kol. (1986) použili experimentální protokol, kdy 4x po sobě byla uzavřena LAD koronární artérie, 5 minut ponechali srdce v ischemii a po povolení podvazu byl myokard 5 minut v reperfuzi. Toto krátké uzavření koronární artérie nebylo natolik závažné, aby způsobilo ireverzibilní poškození srdce, ale bylo dostatečné na to, aby při delší okluzi té samé artérie nedocházelo k tak rychlému vyčerpání ATP (Murry a kol., 1990), snížilo se množství tvorby laktátu a zmenšila se infarktová oblast. Později se ukázalo, že IPC má antiarytmické účinky (Lukas a Botsford, 1997) a snižuje kontraktální dysfunkci. Protekce pomocí IPC vymizí přibližně 1 - 2 h po provedení IPC (Vanwinkle a kol., 1991). Kardioprotekce se znovu objeví za 24 h po IPC, tomuto jevu říkáme "pozdní fáze IPC" neboli "second window of IPC" (Rizvi a kol., 1999). Mechanismus této pozdější fáze IPC je jiný než u klasického PC (popsaného Murrym) a významně se na něm podílí exprese nových proteinů a genů.

Jelikož účinek IPC vymizí již po první hodině od jeho aktivace, myslelo se, že IPC je zprostředkován nějakým mediátorem, který je rychle degradován. Touto látkou by mohl být např. glykogen, jeho koncentrace se během IPC snižuje. Nedostatek glykogenu omezuje anaerobní glykolýzu a během následné ischemie se vyprodukuje méně laktátu (Steenbergen a kol., 1993). Omezením anaerobní glykolýzy nevznikne tolik H^+ , díky tomu tolik nestoupne intracelulární koncentrace Na^+ (přes Na^+-H^+ výměník) ani Ca^{2+} (přes Na^+-Ca^{2+} výměník) (Murphy a kol., 1991). Naproti tomu řada výsledků nenasvědčuje tomu, že by úbytek glykogenu měl sám o sobě

kardioprotektivní účinky (King a Opie, 1996, Soares a kol., 1997), tudíž stále není jasné, který mediátor je zodpovědný za účinek IPC.

Studie z posledních let ukazují, že IPC vede k aktivaci signálních kaskád, které poté vedou ke kardioprotekci. IPC způsobí uvolnění agonistů jako např. adenosinu, bradykininu nebo opioidů, které se váží na receptory spřažené s G-proteiny a tím aktivují kardioprotektivní signální kaskády. Aktivace těchto receptorů aktivuje fosfatidylinositol (PI3) kinázu, která dále aktivuje Akt kinázu. Receptory spřažené s G-proteiny jsou internalizovány navázáním β -arrestinu, klatrinu a adaptorových proteinů. Signály přes β -arrestin a jiné endozomální signály vedou k aktivaci různých kináz a fosfatáz. Mnohé z těchto signálních drah směřují k mitochondriím, kde mohou otevřít mitochondriální K_{ATP} kanál a inhibovat otevření mPTP póru (Murphy a Steenbergen, 2008), což je dnes považováno za hlavní protektivní účinek IPC.

Ukázalo se, že acidózu během ischemie kromě IPC snižuje také nadměrná exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Imahashi a kol., 2004), působení diazoxidu (který aktivuje IPC otevřením mitochondriálního K_{ATP} kanálu) (Forbes a kol., 2001) a adenosinu (Fralix a kol., 1993). Mechanismus odpovědný za zmírnění acidózy pomocí těchto kardioprotektivních látek je však dosud neznámý.

Existují nepřímé důkazy o účasti ROS ve spouštěcím mechanismu IPC. Podáním látek vychytávajících ROS v průběhu IPC vymizel jeho ochranný efekt (Baines a kol., 1997, Das a kol., 1999). Zdá se, že ROS vytvořené během krátké ischemie a reperfuze v množství nižším než to, které už je schopné poškodit buňku, aktivují mediátory, které spouštějí signalizaci IPC a stimulují tak kardioprotekci. Jiné studie ukazují vliv IPC na snížení uvolňování ROS v průběhu ischemie a reperfuze (Crestanello a kol., 1996). Jinými slovy, efekt ROS, které se vytvoří během krátkých okluzí artérie při IPC je ten, že při následné dlouhodobé ischemii je pak množství vytvořených ROS menší, tudíž je menší i míra poškození myokardu (Kevin a kol., 2003).

2.4.2. Postconditioning

Z důvodu nemožnosti předpovědět, kdy dojde k ischemii, je kardioprotektivní efekt IPC v klinické praxi těžko použitelný. Naproti tomu zásahy v průběhu reperfuze už možné jsou. V roce 2003 přišel Zhao a kol. s tím, že přerušovaná reperfuze může také snížit velikost infarktu. Přesný experimentální protokol (počet epizod a trvání jednotlivých epizod ischemie a reperfuze) potřebný pro vznik protekce závisí na experimentálním modelu a živočišném druhu. Ischemický POC je definován jako opakovaná krátká okluze LAD po uvolnění dlouhodobé koronární okluze a snižuje míru poškození srdce (Cohen a Downey, 2011). Yang a kol. (2004) ukázali, že pokud s POC začneme 10 min po začátku reperfuze, ztratí svoje kardioprotektivní účinky.

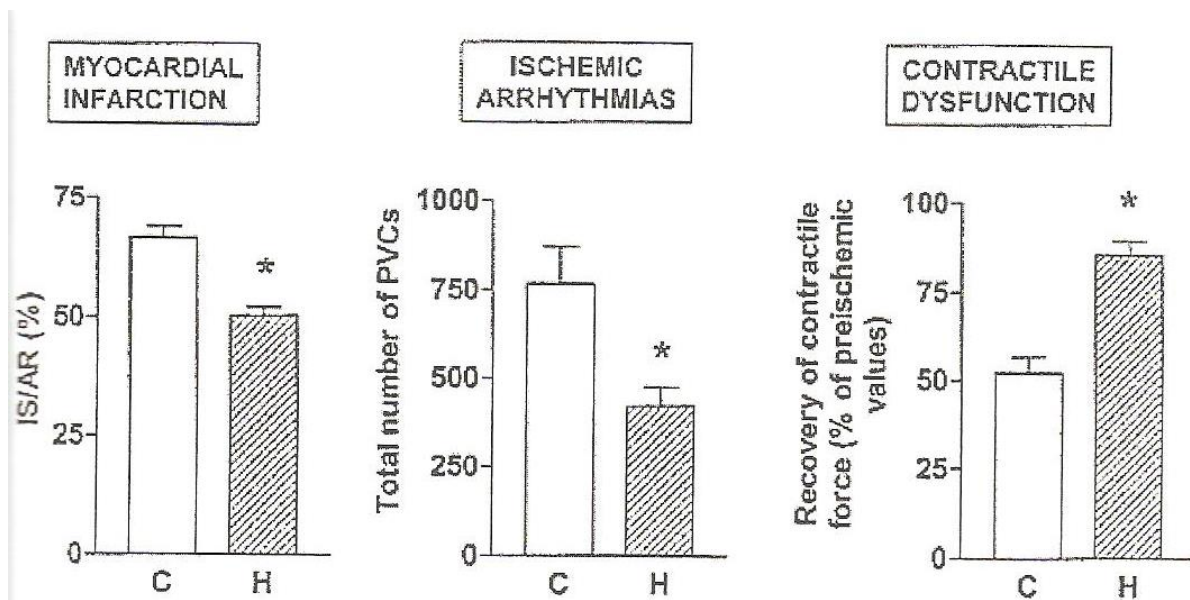
Většina experimentů tedy dokazuje, že POC významně snižuje velikost infarktu (Heusch a kol., 2006). Překvapivě bylo zjištěno, že protekce zprostředkovaná pomocí POC je způsobena skrz aktivaci mnoha stejných signálních molekul, které se účastní IPC (Hausenloy a kol., 2005). Protektivní efekt POC je blokován např. po podání antagonistů adenosinových receptorů (Morrison a kol., 2007), po podání inhibitorů PI3 kinázy (Tsang a kol., 2004) nebo v důsledku působení inhibitorů proteinkinázy C (PKC; Philipp a kol., 2006). Za protektivní v časně fázi reperfuze jsou dále považovány inhibitory $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměníku (Zhao a kol., 2003), aktivátory kináz (Hausenloy a kol., 2004), erythropoetin (Hanlon a kol., 2005), mPTP (Hausenloy a kol., 2003), kináza glykogen syntázy a řady membránových receptorů včetně opioidních (Gross a kol., 2004). K podání látky však musí dojít ihned na začátku reperfuze (Yang a kol., 2004).

2.4.3. Chronická hypoxie

Hypoxie je způsobena nízkým parciálním tlakem kyslíku v arteriální krvi. Na myokard jsou kladeny vyšší metabolické nároky, což může zapříčinit fyziologické změny. Tento jev sice chrání srdce před ischemickým poškozením, na druhou stranu ale působí též negativně, neboť vede k rozvoji plicní hypertenze nebo hypertrofie pravé komory. Přírozenou formou výskytu hypoxického prostředí jsou vysoké nadmořské výšky a také fetální oběh. Myokard novorozenců je přirozeně odolnější k ischemii než u dospělých jedinců, po narození tato odolnost klesá (Ostadal a kol., 1999).

Adaptace na chronickou hypoxii je pravděpodobně nejstarším zkoumaným kardioprotektivním jevem. První pozorování byla publikována na počátku 2. poloviny minulého století (Hurtado, 1960), kdy byl zjištěn nižší výskyt infarktu u lidí, kteří žili ve vysokohorském prostředí. Pokusy prováděné na potkanech, adaptovaných na nadmořskou výšku 7 000 m v hypobarické komoře, taktéž potvrdily kardioprotektivní působení hypoxie (Kopecky a Daum, 1958). Jak ilustruje obr. č. 7, adaptace na chronickou hypoxii významně snížila velikost infarktu (Neckár a kol., 2002), zlepšila postischemickou obnovu kontraktilních funkcí myokardu (Kopecky a Daum, 1958) a snížila výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií (Asemu a kol., 1999). Na rozdíl od krátkodobého působení IPC a POC, protektivní účinky chronické hypoxie na ischemický myokard přetrvávají až po dobu několika týdnů (Neckár a kol., 2004), čímž dělají chronickou hypoxii velmi zajímavou z klinického hlediska.

Přesný molekulární mechanismus působení chronické hypoxie zatím není zcela objasněn. Předpokládá se, že zahrnuje zvýšenou expresi některých izoform PKC (Neckár a kol., 2005), aktivaci MAP kináz (Strnisková a kol., 2006) nebo heat shock proteinů (Shi a kol., 2002). Další roli zde hraje oxid dusnatý (NO). Chronická hypoxie zvyšuje produkci NO v myokardu a jeho prostřednictvím zvyšuje odolnost srdce k ischemii (Forkel a kol., 2004).



Obrázek č. 7: Kardioprotektivní účinky adaptace na chronickou hypoxii (7000m, 8 hod/den, 5 dní/týden) u potkanů. IS/AR – velikost infarktu, PVCs – celkový počet předčasných komorových komplexů. *P < 0,05 (převzato z Ostadal a Kolar, 2007).

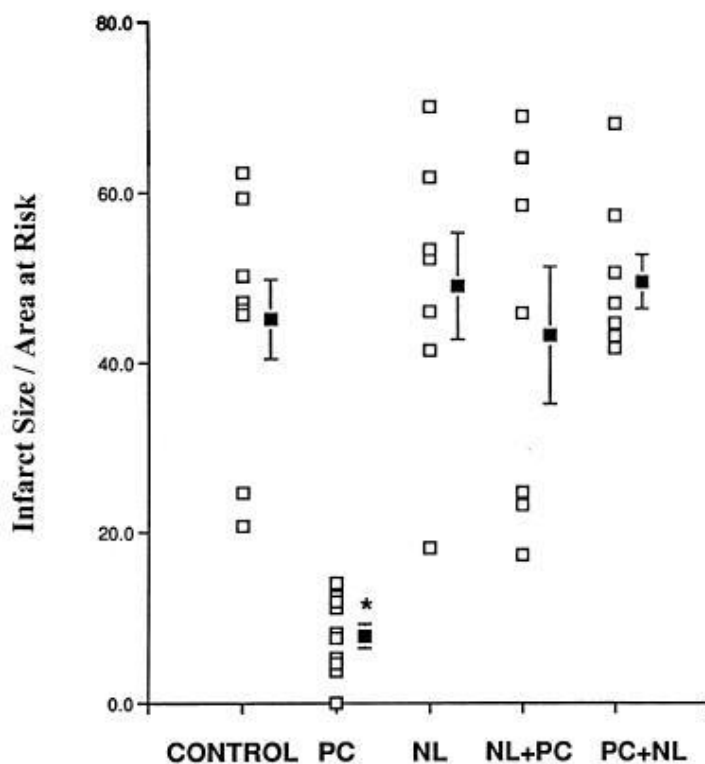
2.4.4. Kardioprotektivní působení opioidů

Opioidní peptidy a exogenní opioidy jako např. morfin jsou známé svým vlivem na kardiovaskulární systém. Nicméně až do nedávna nebylo zřejmé, zda aktivace specifických OR má za následek snížení velikosti infarktu u pokusných zvířat a redukci buněčné smrti u izolovaných kardiomyocytů. Tyto ochranné účinky se objeví po podání opioidů při farmakologickém PC i POC (Schultz a Gross, 2001). Kardioprotektivním účinkům opioidů se věnují detailněji následující kapitoly.

2.4.4.1. Opioidy indukovaný preconditioning (OPC)

Schultz a kol. (1995) publikovali jako první, že opioidy navozují protektivní efekt IPC v srdci a jiných orgánech pomocí aktivace specifických OR. Pokud byl potkanům podán neselektivní antagonist OR, naloxon, kardioprotektivní účinek OPC vymizel (viz obr. č. 8). Je jedno, zda byl naloxon aplikován před nebo po stimulaci OPC, v obou případech došlo k vymizení kardioprotekce.

O 3 roky později se Schultz a kol. (1998) snažili zjistit pomocí specifických selektivních antagonistů pro μ , κ , δ_1 a δ_2 OR, který OR je zodpovědný za zvýšenou ischemickou toleranci srdce. Podařilo se jim prokázat, že inhibice δ_1 OR zablokovala kardioprotektivní účinky OPC.

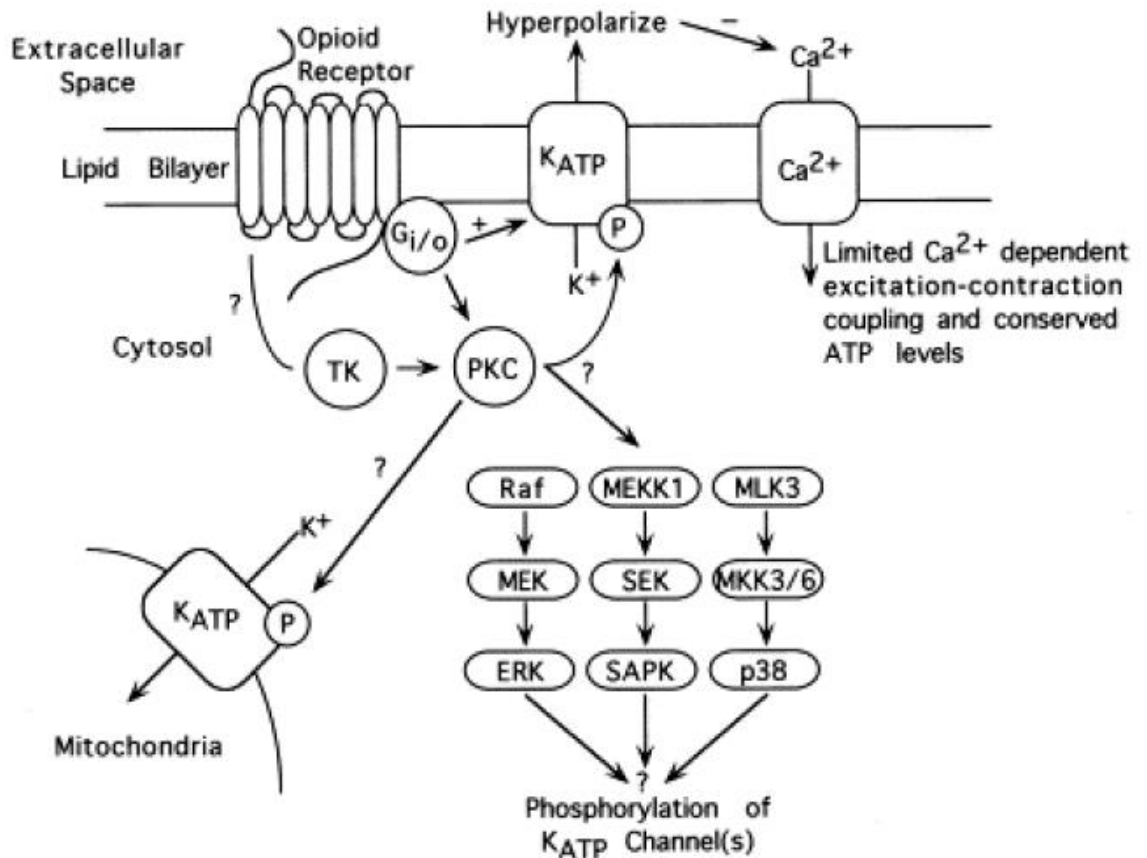


Obrázek č. 8: Velikost infarktu normalizovaná na velikost ohrožené oblasti u kontrol (control), IPC (PC), po podání naloxonu bez IPC (NL), naloxonu před IPC (NL+PC) a naloxonu po IPC (PC+NL). Černé čtverce jsou průměry z každé skupiny, bílé čtverce jsou individuální velikosti infarktu u jednotlivých srdcí (podle Schultz a kol., 1995).

Ačkoliv se předpokládalo, že zvýšení ischemické tolerance aktivací OR probíhá v důsledku aktivace δ OR, zjistilo se, že u některých živočišných druhů se na tom podílí i κ OR. Tento účinek byl zprostředkován PKC a K_{ATP} kanály (Ventura a kol., 1989). Roli PKC a mitochondriálních K_{ATP} kanálů potvrdil i Wu a kol. (2004). Jejich výsledky naznačovaly, že protektivní efekt opioidů je zprostředkován dokonce všemi třemi typy OR.

Jiné experimenty ukazují, že ischemie myokardu podporuje tvorbu a uvolňování opioidních peptidů β -endorfinů, které se přímo váží na OR v srdci, chrání myokard před nadměrným zvýšením intracelulární hladiny Ca^{2+} a tím omezují poškození buňky. Ochranný efekt β -endorfinů vzniká v důsledku aktivace G-proteinů, PKC, MAP kinázy, tyrozin kináz a také K_{ATP} kanálů, lokalizovaných na vnitřní membráně mitochondrií (Oldroyd a kol., 1992, Schultz a kol., 1996). Ukázalo se, že

signální dráhy působení opioidů na ischemický myokard (viz obr. č. 9) jsou pravděpodobně velmi podobné drahám, uplatňujícím se při IPC.



Obrázek č. 9: Pravděpodobné signální dráhy, účastníci se kardioprotekce vyvolané opioidy. Navázáním opioidu na OR (který je receptorem spřaženým s G-proteiny) dojde k aktivaci G-proteinu (Gi/o), tyrozin kináz (TK), proteinkinázy C (PKC), K_{ATP} kanálů, MAP kinázové dráhy a ke sníženému vtoku Ca²⁺ do buňky (převzato z Schultz a Gross, 2001).

Takasaki a kol. (1999) studovali vliv IPC a OPC na snížení počtu poškozených buněk králičího srdce, které vystavili ischemii a reperfuzi. Prokázali, že zvýšenou ischemickou toleranci navozuje jak IPC, tak i morfin, a že účinky obou mohou být blokovány naloxonem. Exogenní agonista OR Met⁵-enkefalin (ME) měl protektivní účinky, zatímco β-endorfin byl bez ochranného účinku. Další dva produkty pro-enkefalinu, Leu⁵-enkefalin a ME-Arg-Phe také snižovaly velikost infarktu. Z jejich

výzkumu dále vyplynulo, že endogenní mediátory IPC jsou nejspíše produkty pro-enkefalinu.

Další ze studií, která potvrdila, že morfin má podobné kardioprotektivní působení jako IPC, byla např. studie Schultze a kol. (1996). Morfin byl v tomto experimentu potkanovi podán ve třech 5 min dávkách (100 µg/kg) 30 min před okluzí. Dále bylo zjištěno, že tento protektivní efekt byl zprostředkován otevřením mitochondriálních K_{ATP} kanálů.

Studie McPhersona a Yaoa (2001) ukázala, že buněčná signalizace využívající ROS hraje roli i v morfinem indukovaném PC. Tento experiment navíc potvrdil i to, že mitochondriální K_{ATP} kanály jsou aktivované resp. se otevírají v důsledku stimulace δ_1 OR.

Dále bylo zjištěno, že kardioprotektivní účinky morfinu jsou založeny i na skutečnosti, že aplikace morfinu může hrát roli v inhibici apoptózy komorových myocytů. Tento efekt byl zprostředkován zvýšenou intracelulární koncentrací IP3, který následně uvolnil Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula (Barrère-Lemaire a kol., 2005).

Protektivní efekt morfinu byl objeven i na úrovni izolovaných kuřecích myocytů. K protekci došlo u všech koncentrací morfinu, které byly v experimentu použity (0,1 - 10 µM), nicméně největší efekt se ukázala mít koncentrace 1 µM. I v této studii byl potvrzen kardioprotektivní vliv aktivace mitochondriálních K_{ATP} kanálů (pomocí selektivních antagonistů tohoto kanálu) a klíčová role δ_1 OR v OPC v potkaním srdci, jelikož ochranný účinek morfinu vymizel podáním δ_1 selektivního antagonisty 7- benzylidenenaltrexonu (BNTX) (Liang a Gross, 1999).

Jak bylo zmíněno výše v kapitole 2.4.1., 24 - 48 h po podání opioidů se objevuje pozdní fáze protekce. Toto tvrzení dokazuje experiment, kdy selektivní δ_1 opioidní agonista TAN-67 neměl 12 h po aplikaci žádný kardioprotektivní efekt, který se však znovu objevil 24 - 48 h po podání. Tento účinek do 72 h vymizel. Ochranné účinky TAN-67 bylo možné inhibovat pomocí BNTX a glibenclamidu, neselektivního antagonisty K_{ATP} kanálu, což opět potvrzuje důležitou roli K_{ATP} kanálů (Fryer a kol., 1999).

Morfin tedy není z lékařského hlediska zajímavý jen pro svou vysokou schopnost tlášení silné bolesti, je také látkou, která významně snižuje velikost

infarktu myokardu. Jeho kardioprotektivní účinky jsou zprostředkovány aktivací δ_1 OR. V signální dráze jeho působení hraje důležitou roli PKC, mitochondriální K_{ATP} kanály a tyrozin kinázy.

2.4.4.2. Opioidy indukovaný postconditioning

Jak bylo popsáno v kapitole 2.4.2., POC má v počátcích reperfuze podobné kardioprotektivní účinky jako IPC, ale na rozdíl od něj je výrazně lépe využitelný v klinické praxi. Jelikož podání opioidů vede k podobnému efektu jako IPC, začali se vědci zabývat otázkou, jestli by podání opioidů v počátcích reperfuze nemohlo vyvolat i efekt podobný POC.

Tato hypotéza se posléze potvrdila, POC aktivovaný morfinem chránil izolované potkaní srdce otevřením mitochondriálního K_{ATP} kanálu vůči důsledkům akutní ischemie/reperfuze. V tomto experimentu však byla kardioprotekce navozena aktivací κ OR, nikoliv δ OR (Chen a kol., 2008). V jiném pokusu, kdy byl těsně před reperfuzí podán myokardu selektivní ligand δ OR BW373U86, došlo také k signifikantnímu poklesu poškození myokardu (Gross a kol., 2004). Lze tedy předpokládat, že kardioprotektivního účinku v opioidy vyvolaném POC se účastní jak κ , tak i δ OR.

2.4.4.3. Opioidy v chronické hypoxii

Je dokázáno, že farmakologická aktivace OR snižuje důsledky infarktu myokardu, způsobeného akutní ischemií/reperfuzí. Opioidy hrají důležitou roli v protekci různými formami "conditioningů", ať už OPC nebo POC, popsaných v kapitolách 2.4.4.1. a 2.4.4.2. Další otázkou tedy bylo, jestli se endogenní opioidní peptidy a OR mohou podílet i na kardioprotekci vyvolané chronickou hypoxií, jelikož hladina endogenních opioidů se při hypoxii (a jiných stresových situacích např. ischemii) výrazně zvyšuje (Maslov a kol., 2013)

V recentní práci Maslova a kol. (2013) byli potkani vystaveni kontinuální hypoxii (12% O_2) za normálního atmosférického tlaku po dobu 3 týdnů. Poté jim byla provedena ischemie, před kterou zvířata dostala akutně různé antagonisty OR. Adaptace na chronickou hypoxii a následná okluze koronární artérie výrazně zvýšila koncentrace opioidů v srdci a v plazmě, což mělo za následek snížení velikosti infarktu, avšak nemělo žádný vliv na výskyt ischemických komorových arytmií. Efekt snížení velikosti infarktu byl inhibován po podání antagonistů naltribenu (antagonista

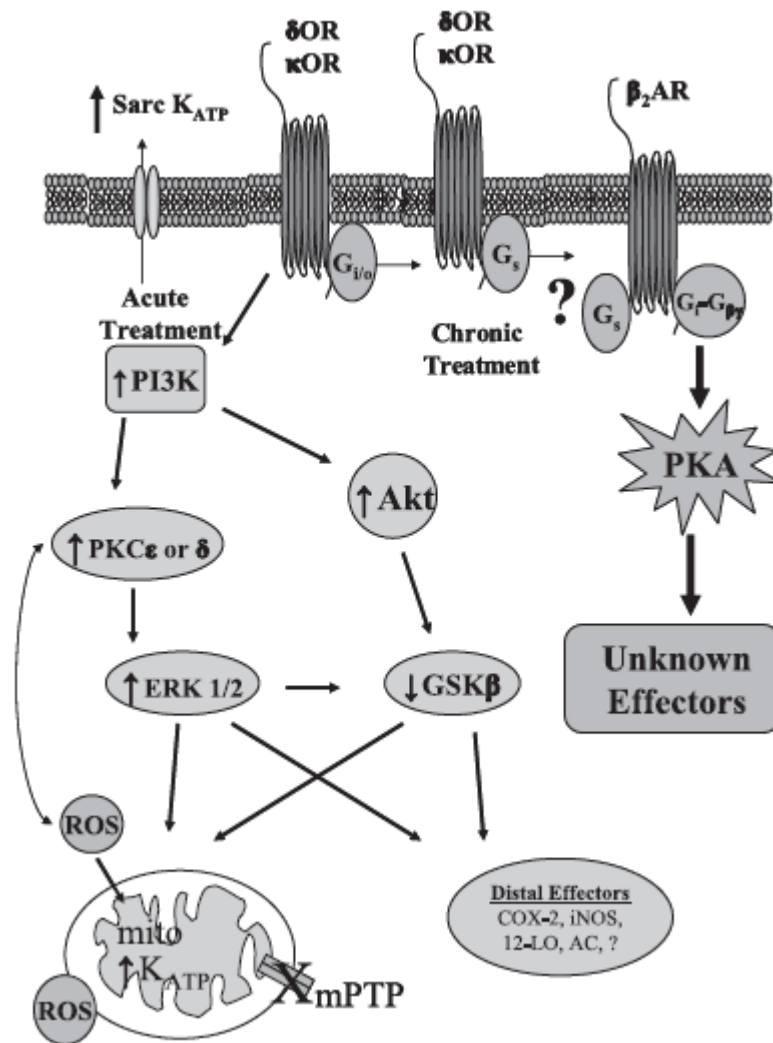
δ2 OR), CTAP (antagonista μ OR) a naloxon methiodidu (neselektivní, periferně působící antagonist OR), což naznačuje, že kardioprotektivní efekt adaptace na chronickou hypoxii snižující velikost infarktu je zprostředkován aktivací periferního δ2 OR a μ OR pomocí zvýšené hladiny endogenních opioidních peptidů (Maslov a kol., 2013).

O pár let dříve Lishmanov a kol. (2003) vystavili potkany opakovaným periodám hypobarické chronické hypoxie. Inhibicí δ OR pomocí jeho selektivního antagonisty TIPP došlo k vymizení antiarytmogenního efektu chronické hypoxie. Naproti tomu selektivní inhibice μ a κ OR neměla žádný vliv na výskyt arytmií během ischemie a reperfuze, ani na velikost infarktu. Tato studie tedy objevila klíčovou roli δ OR v inhibici ischemických arytmií na tomto modelu kardioprotektivního působení chronické hypoxie.

2.4.4.4. Dlouhodobé podávání opioidů

Stárnutí organismu je obvykle doprovázeno poklesem ischemické tolerance v myokardu, proto se Peart a Gross (2004) zaměřili na porovnání mladých a starých potkanů, co se týče vlivu opioidů na poškození myokardu akutní ischemií/reperfuzí. Jejich výsledky ukázaly, že při akutním podání morfinu vznikne protektivní účinek pouze u mláďat, nikoliv u starých potkanů. Pokud byl zvířatům morfin podáván po dobu 5 dnů, došlo ke zlepšení postischemických kontraktálních funkcí u obou věkových skupin. Tyto výsledky naznačují, že u starých jedinců je třeba intenzivnější a dlouhodobá stimulace k aktivaci kardioprotekce.

O dva roky později stejná skupina vědců přišla na to, že signální dráhy akutního a chronického podávání zahrnují jiné mediátory. Molekulární mechanismus akutního podávání probíhá stimulací $G_{i/o}$ -proteinů, IP3 kinázy, Akt kinázy, PKC, ERK kinázy, aktivací ROS a otevření K_{ATP} kanálů. Zdá se, že protekce je navíc zprostředkována inhibicí mPTP. Molekulární mechanismus chronického podávání je mnohem méně prozkoumaný, ale pravděpodobně zahrnuje G_s -proteiny, β_2 -adrenergní receptory a aktivaci protein kinázy A (viz obr. č. 10) (Peart a Gross, 2006).



Obrázek č. 10: Schéma signálních drah u akutního a chronického podávání morfinu. Akutní - $G_{i/o}$ -proteiny, IP3 kináza, Akt kináza, PKC, ERK kináza, aktivace ROS, otevření K_{ATP} kanálů, inhibice mPTP. Chronické - G_s -proteiny, β_2 -adrenergní receptory (β_2 AR), aktivace protein kinázy A (PKA) (převzato z Peart a Gross, 2006).

Výsledky spolupráce Přírodovědecké fakulty Karlovy Univerzity v Praze a Fyziologického ústavu AV ukazují, že podávání morfinu po dobu 10 dnů nemělo významný vliv na velikost ischemického poškození srdce pokusných potkanů na modelu izolovaného perfundovaného srdce potkana, jak bylo publikováno v diplomové práci Klučkové (2007).

Ke stejným výsledkům dospěla i jiná studie, která také zjišťovala vliv 10ti denního podávání morfinu na modelu anestezovaného uměle ventilovaného zvířete. Nicméně, výsledky této studie naznačují, že dlouhodobé podávání vysokých dávek opioidů mění funkci β -adrenergní resp. adenylyl cyklázové signalizace. Tyto změny

jsou doprovázeny sníženou citlivostí srdce na výskyt a závažnost ischemických komorových arytmií (Skrabalova a kol., 2012).

Další diplomová práce obhájená na PŘF UK ukázala pozitivní vliv chronického podávání morfinu na velikost infarktu po 28 dnech, nicméně po takto dlouhé době podávání již vymizel antiarytmický účinek (Bartoňová, 2011). Zdá se tedy, že různé projevy akutního infarktu myokardu (velikost nekrózy vs. ischemické arytmie) se mohou významně lišit v závislosti na době podávání opioidů.

2.4.4.5. Metadon v kardioprotekci

Jak je uvedeno v kapitole 2.1., metadon patří mezi syntetické opioidy. V lékařství je užíván jako analgetikum při akutní a chronické bolesti a pro léčbu závislosti na narkotikách. Chemicky se morfinu a heroinu nepodobá, ale váže se na stejné receptory, a tím vyvolává stejné účinky. Podobně jako morfin, je metadon agonista μ OR, ale na rozdíl od morfinu má malou afinitu ke κ a δ OR (Gross a kol., 2009). Je metabolizován výrazně pomaleji v porovnání s morfinem. Poločas rozpadu metadonu se pohybuje od 24 do 48 h v závislosti na modelovém organismu. Obvykle se v klinické praxi užívá ve formě sirupu nebo tablet. V tom je také jeho výhoda při léčbě závislosti na heroinu; díky dlouhému účinku se aplikuje méně často než heroin a navíc ne intravenózně. Dalším důvodem je známá koncentrace a chemické složení užívané látky a také snaha zabránit rozvoji abstinenčních příznaků.

Gross a kol. (2009) se snažili zjistit, zda také metadon snižuje velikost infarktu myokardu v porovnání s morfinem v závislosti na dávce a zda-li je tento protektivní účinek zprostředkován aktivací OR. Dále se zabývali otázkou, jestli snížení velikosti infarktu závisí na načasování podání metadonu a na délce trvání ischemie. Potkanům aplikovali akutně různé dávky morfinu a metadonu (0,03 - 3 mg/kg). Zjistili, že podání metadonu a morfinu má podobný kardioprotektivní účinek a snižuje velikost infarktu u potkanů. K největší protekci u obou látek došlo v dávce 0,3 mg/kg, pokud byly podány buď 30 minut před ischemií nebo 5 minut před reperfuzí a pokud ischemie trvala maximálně 30 minut. Protekce byla zprostředkována pomocí δ OR (Gross a kol., 2009).

Tato studie je však jediná publikovaná studie, zabývající se akutními kardioprotektivními účinky metadonu. O jeho působení při chronickém podávání se dosud více neví, proto jsme se tímto tématem zabývali v experimentech v této diplomové práci.

3. Cíle diplomové práce

Morfin je již řadu let zkoumán v souvislosti s kardioprotektivními účinky na ischemický myokard. Na toto téma existuje řada publikací. Téměř nic se však neví o jiném potenciálně protektivním opioidu, metadonu. Na základě této skutečnosti jsme si dali za cíl zjistit:

- 1) Jak ovlivní 10ti denní podávání vysoké dávky metadonu ischemickou toleranci srdce (velikost infarktu, ischemické a reperfuční arytmie) laboratorních potkanů a porovnat ji s účinky 10ti denního podávání morfinu.
- 2) Jak ovlivní dlouhodobé 28mi denní vysoké dávky metadonu ischemickou toleranci srdce (velikost infarktu, ischemické a reperfuční arytmie) laboratorních potkanů.

4. Materiál a metody

Naše experimenty byly prováděny ve dvou sériích. V obou případech jsme použili dospělé samce potkanů kmene Wistar, kteří měli v době dodání hmotnost v rozmezí 250 – 300 g. V první sérii experimentů zvířata pocházela z chovů společnosti Velaz, v druhé sérii jsme měli k dispozici potkany pocházející z chovů FgÚ AV ČR. Důvody pro změnu původu potkanů v jednotlivých experimentálních sériích jsou vysvětleny ve výsledcích respektive diskuzi. Potkani byli ustájeni v příručním zvěřinci oddělení Vývojové kardiologie FgÚ AV ČR po 3 – 4 jedincích v chovných klecích a měli neomezený přístup k vodě a potravě. V místnosti byla regulována stálá teplota a vlhkost a denní režim byl upraven na 12 h světla a 12 h tmy.

4.1. Experimentální skupiny

Potkani byli rozděleni do následujících skupin:

Série I – 10ti denní podávání opioidů

Kontroly – potkani dostávali denně 0,3 ml sterilního fyziologického roztoku i.m. do stehenního svalu

Morfin 10 - potkani dostávali denně morfin v dávce 10 mg/kg/den (i.m.)

Metadon 10 - potkani dostávali denně metadon v dávce 2 mg/kg/den (i.m.)

Série II – 28mi denní podávání metadonu

Kontroly – potkani dostávali denně 0,3 ml sterilního fyziologického roztoku (i.m.)

Metadon 28 - potkani dostávali denně metadon v dávce 2 mg/kg/den (i.m.)

4.2. Metoda izolovaného perfundovaného srdce

Pro naše experimenty analyzující ischemickou toleranci srdce k ischemii jsme zvolili metodu izolovaného perfundovaného srdce podle Langendorffa. Tato metoda spočívá v přístupu, kdy je srdce vyjmuto z těla zvířete a samotný experiment je

prováděn na srdci *in vitro*, které není inervované, což má za následek mimo jiné zpomalení tepové frekvence.

4.2.1. Přípravná fáze pokusu

Před začátkem pokusu je třeba si každý den připravit nový Krebs-Henseleitův roztok, kterým se v této metodě perfunduje myokard. Složení tohoto roztoku ukazuje tabulka č. 1.

	koncentrace (mmol)
NaCl	118
NaHCO ₃	25
glukóza	11
KCl	4,7
MgSO ₄ x (7H ₂ O)	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂ x (2H ₂ O)	2,5

Tabulka č. 1: Složení Krebs-Henseleitova roztoku pro tento experiment.

Pro přípravu tohoto roztoku jsme použili deionisovanou vodu. Chemikálie pocházely od firmy Penta a byly rozpuštěny v libovolném pořadí, až na CaCl₂ x (2H₂O), který byl do roztoku přidán jako poslední, aby nedošlo k jeho vysrážení. Roztok jsme přefiltrovali přes 1.2 μm filtr (Millipore) a nechali saturovat směsí plynů 95% O₂ a 5% CO₂ po dobu 20 minut. Následně jsme upravili pH perfuzního roztoku, aby jeho výsledná hodnota byla 7,4. Hotový roztok byl nalit do zásobní nádoby Langendorffova perfuzního přístroje, kde se díky dvouplášťové konstrukci pomocí cirkulačního termostatu (Haake DC 1) ohřál na fyziologickou teplotu 37°C při kontinuálním probublávání 95% O₂ a 5% CO₂. Složení Krebs-Henseleitova roztoku je takové, aby stejně jako krev srdce vyživovalo a okysličovalo. Takto ho můžeme přibližně dalších 4 - 6 hod použít k experimentům.

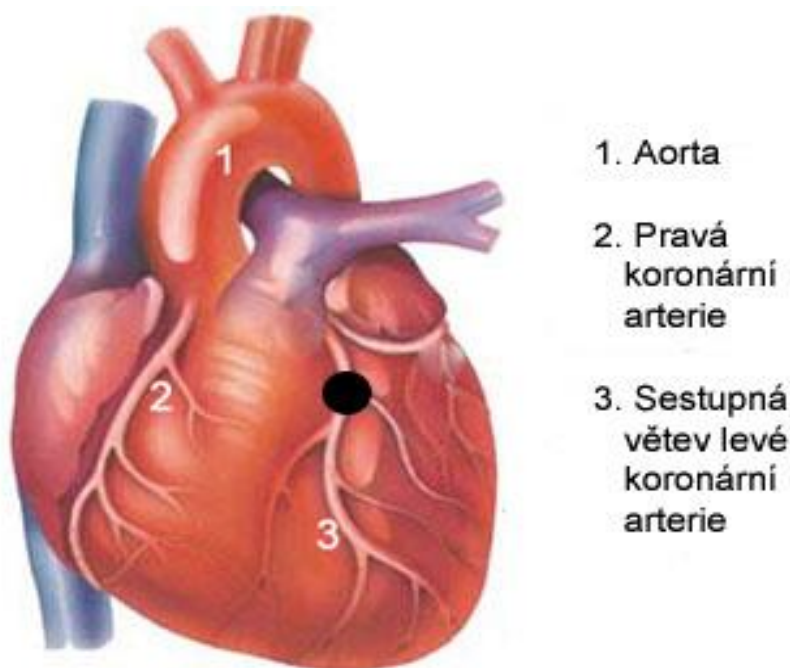
Izolované srdce bylo perfundováno za konstantního průtoku 10 ml/min/g. Hmotnost srdce potkana se lineárně zvyšuje s jeho tělesnou hmotností. Podle hmotnostní tabulky č. 2 byla proto vypočítána velikost myokardu a z ní určen průtok Krebs-Henseleitova roztoku srdcem.

m potkana	m srdce	m potkana	m srdce	m potkana	m srdce
250	642,2	284	733,4	318	825,1
251	644,9	285	736,1	319	827,8
252	647,5	286	738,8	320	830,6
253	650,2	287	741,5	321	833,3
254	652,9	288	744,2	322	836
255	655,6	289	746,9	323	838,7
256	658,2	290	749,6	324	841,4
257	660,9	291	752,3	325	844,1
258	663,6	292	755	326	846,8
259	666,3	293	757,7	327	849,5
260	669	294	760,4	328	852,2
261	671,6	295	763,1	329	854,9
262	674,3	296	765,7	330	857,6
263	677	297	768,4	331	860,3
264	679,7	298	771,1	332	863
265	682,4	299	773,8	333	865,7
266	685,1	300	776,5	334	868,4
267	687,7	301	779,2	335	871,2
268	690,4	302	781,9	336	873,9
269	693,1	303	784,6	337	876,6
270	695,8	304	787,3	338	879,3
271	698,5	305	790	339	882
272	701,2	306	792,7	340	884,7
273	703,9	307	795,4	341	887,4
274	706,5	308	798,1	342	890,1
275	709,2	309	800,8	343	892,8
276	711,9	310	803,5	344	895,6
277	714,6	311	806,2	345	898,3
278	717,3	312	808,9	346	901
279	720	313	811,6	347	903,7
280	722,7	314	814,3	348	906,4
281	725,4	315	817	349	909,1
282	728	316	819,7		
283	730,7	317	822,4		

Tabulka č. 2: Hmotnostní tabulka pro výpočet hmotnosti srdce z váhy potkana.

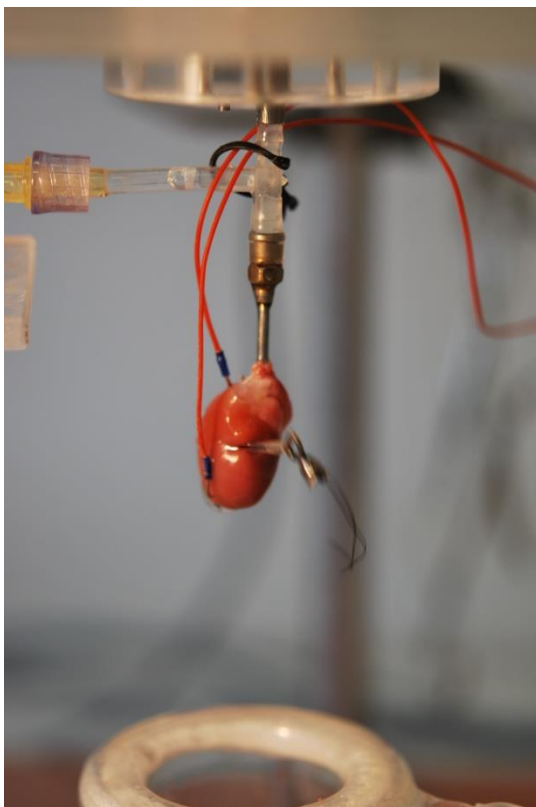
4.2.2. Průběh experimentu

Potkani byli intraperitonálně (i.p.) anestetizováni thiopentalem sodným (60 mg/kg, VUAB Pharma a.s.). Pokud nereagoval na štípnutí do ucha, byl položen na operační stůl, kde mu byla pod posledními žebry nastřížena břišní dutina. Poté jsme přestříhli bránici a rozstříhli hrudník kraniálně po levé i pravé straně. Následně se hrudník odklopil, srdce bylo chyceno mezi prsty a za nimi odstřiženo od velkých cév. Během co nejkratší doby bylo pověšeno za aortu na kanylu Langendorffovy aparatury a uchyceno chirurgickou svorkou. Zbytky okolních tkání byly pro lepší přehlednost odstraněny. Pod svorkou jsme aortu ke kanyle Langendorffovy aparatury upevnili hedvábnou nití a svorku posléze odejmuli. Pro měření povrchového elektrogramu byly k dispozici 2 háčkové elektrody, jednu jsme umístili do apexu myokardu a druhou do pravé síně. Polohu elektrod jsme zvolili tak, aby byl záznam dobře čitelný se snadno rozlišitelným QRS komplexem. Místem, kde srdcem vede LAD koronární artérie, jsme provlékli atraumatickou jehlu s šicí nití z hedvábí (HR 10, Chirmax) tak, abychom měli 2 konce nitě a mezi nimi oblast věnčité tepny. LAD není okem zřetelně viditelná (viz obr. č. 11), její polohu jsme předpokládali podle srdeční vény, kterou lze na povrchu myokardu spatřit a jež prochází paralelně v těsné blízkosti LAD koronární artérie.



Obrázek č. 11: Obrázek koronárních artérií, které vyživují a oksylichují myokard. V místě černého bodu byla provedena okluze LAD koronární artérie.

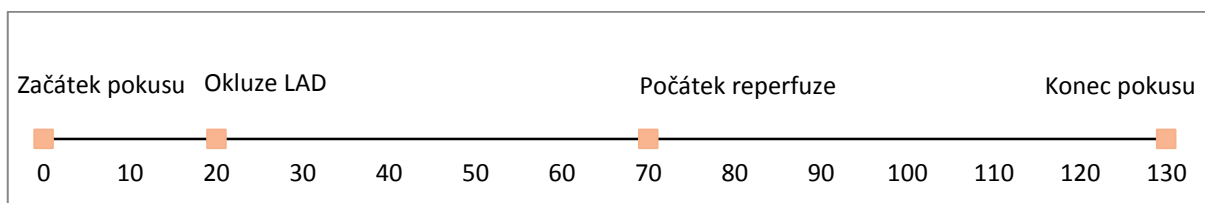
Později byla na oba konce nitě navlečena tenká polyetylenová trubička. Tlakem trubičky proti LAD artérii byla navozena lokální okluze a toto utažení bylo zafixováno malou chirurgickou svorkou (viz obr. č. 12). Při správně provedené okluzi se nám okamžitě zvýšil perfuzní tlak, který byl snímán vnějším tlakovým snímačem. Změna tlaku byla monitorována na obrazovce počítače, ke kterému byly připojené i snímací elektrody. K tomuto účelu byl využit počítačový program CAR, který byl vytvořen Ing. F. Papouškem v FgÚ AV ČR. Tento program nám umožnil zaznamenávat hodnoty tlaku a elektrogram z povrchu srdce pro pozdější analýzu arytmií a srdeční frekvence. Na konci ischemie byla povolena chirurgická svorka. Do koronárních artérií nám znovu začal proudit roztok a došlo tedy k reperfuzi. Tlak v aortě opět klesl, přibližně na původní hodnotu.



Obrázek č. 12: Srdce pověšené za aortu na Langendorffův perfuzní přístroj ve fázi ischemie společně s elektrodami snímajícími elektrogram z povrchu srdce.

4.2.3. Experimentální protokol

Vliv metadonu a morfinu na ischemický myokard potkana jsme analyzovali podle výskytu a závažnosti ischemických a reperfuzních komorových arytmií, a dále podle velikosti infarktu. Po vyjmutí srdce z těla zvířete a po jeho zavěšení na kanylu Langendorffova přístroje jsme jej ponechali ve 20 min stabilizaci. Aby oblast infarktu byla dobře partnerá, ponechali jsme srdce v ischemii po dobu 50 minut. Následovala reperfuze, která trvala 60 minut. Takto dlouhá reperfuze je nutná pro následné úspěšné stanovení velikosti infarktu myokardu pomocí tetrazoliových solí. V průběhu reperfuze dojde buď k částečné reparaci enzymů poškozených buněk a nebo je tento čas potřebný k vyčerpání kofaktorů enzymů redukujících tetrazoliové sole, které by nám jinak mohli ovlivnit výsledné barvení. Průběh pokusu znázorňuje obr. č. 13.



Obrázek č. 13: Schéma experimentálního protokolu. V prvních 20 min bylo srdce stabilizováno, po uplynutí této doby jsme provedli podvaz LAD, ischemie trvala 50 min. V 70. min pokusu byla okluzi LAD povolena, reperfuze probíhala hodinu. Ve 130. min bylo srdce z Langendorffova přístroje odebráno a nabarveno.

4.2.4. Měření EKG a krevního tlaku

Elektrogram z povrchu srdce byl zaznamenáván těsně před okluzí koronární artérie, během celé 50 min ischemie, během prvních 10 min reperfuze a pak po dobu 2 min těsně před ukončením pokusu. Perfuzní tlak byl zaznamenáván po celou dobu experimentu, včetně stabilizace.

4.2.5. Stanovení velikosti infarktu

Po uplynutí hodinové reperfuze jsme opět provedli okluzi LAD. Následně jsme srdce i s kanylou sejmuli z Langendorffovy aparatury. Pomocí injekční stříkačky

nasazené na ústí kanyly jsme ho perfundovali přibližně 2 ml 5% roztoku manganistanu draselného (Lachema), který nám obarvil tu část srdce, která byla normálně perfundována (kromě okludované infarktové oblasti). Tato oblast se díky oxidační reakci zbarvila do hněda, jelikož manganistan se v tkáni redukuje na hnědě zbarvený oxid manganičitý MnO_2 (burel). Následně jsme injekční stříkačku s $KMnO_4$ vyměnili za stříkačku s fyziologickým roztokem, kterým jsme srdce pomalu promývali, dokud z něj nekapala už jen čirá tekutina fyziologického roztoku. Tímto postupem jsme odstranili přebytečný $KMnO_4$.

Srdce jsme sundali z kovové kanyly, povolili podvázání artérie a odstříhli jsme z něj obě síně a aortu tak, aby nám zbyl pouze komorový myokard. Poté jsme ho osušili filtračním papírem a v plastové Petriho misce ho uložili do mrazáku. Přibližně 1 hod stačila k tomu, aby srdce zmrzlo a dostatečně ztuhlo pro následné krájení. Po vyndání z mrazáku jsme ho nechali 2 - 3 min rozmraznout v pokojové teplotě a pak ho pomocí žiletky nakrájeli na 5 - 7 příčných řezů, přibližně 1mm silných. Do lahvičky s 10 ml 1% 2, 3, 5 - trifenyltetrazolium chlorid (TTC, Sigma, USA) ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (0,1 g TTC + 10 ml pufru) jsme tyto řezy vložili a lahvičku jsme ponořili do kádinky s teplou vodou, aby se nám řezy srdce v roztoku s TTC zahřály na 37°C, teplotu nutnou pro ideální fungování enzymatických reakcí (Speechly-Dick a kol., 1994). 10 ml pufru o pH 7,4 jsme připravili smícháním 7,75 ml 0,1 M roztoku Na_2HPO_4 (3,58 g $Na_2HPO_4/100$ ml v deionizované vodě, Penta) a 2,25 ml 0,1 M roztoku NaH_2PO_4 (1,56 g $NaH_2PO_4/100$ ml v deionizované vodě, Penta).

Roztok TTC ve fosfátovém pufru nám označil živé buňky, zatímco mrtvé nekrotické buňky zůstaly neobarvené. Tato metoda je založena na redukci tetrazoliové soli pomocí buněčných dehydrogenáz. Jejich vlivem dojde k otevření heterocyklické struktury tetrazolia, čímž vznikne nerozpustný barevný produkt formazán. K této redukci je nutná přítomnost koenzymů NADH, flavoproteinů. Během ischemie a reperfuze jejich koncentrace prudce klesá. Díky této skutečnosti nám nemůže vzniknout barevný formazán v nekrotickém ložisku, červeně se nám tedy obarví pouze tkáň, která ischemii odolala. Tetrazoliových solí existuje více druhů, nejčastěji se objevuje i námi používaný TTC, který vytváří již zmíněný jasně karmínově červený formazán.

Za 30 minut jsme obsah lahviček s TTC vylili a nahradili jsme ho vodným roztokem 10 % neutrálního formaldehydu. Lahvičky jsme uložili na 2 - 3 dny do lednice. Po uplynutí této doby jsme z řezů odstříhli pravou komoru a rozložili jsme je do Petriho misky s formaldehydem. Misku jsme osvětlily laboratorní lampou a z obou stran nafotili digitálním fotoaparátem s makroobjektivem (Nikon). Z fotografií jsme později v počítačovém programu Ellipse stanovili velikost infarktu.

4.2.6. Vyhodnocení experimentálně získaných dat

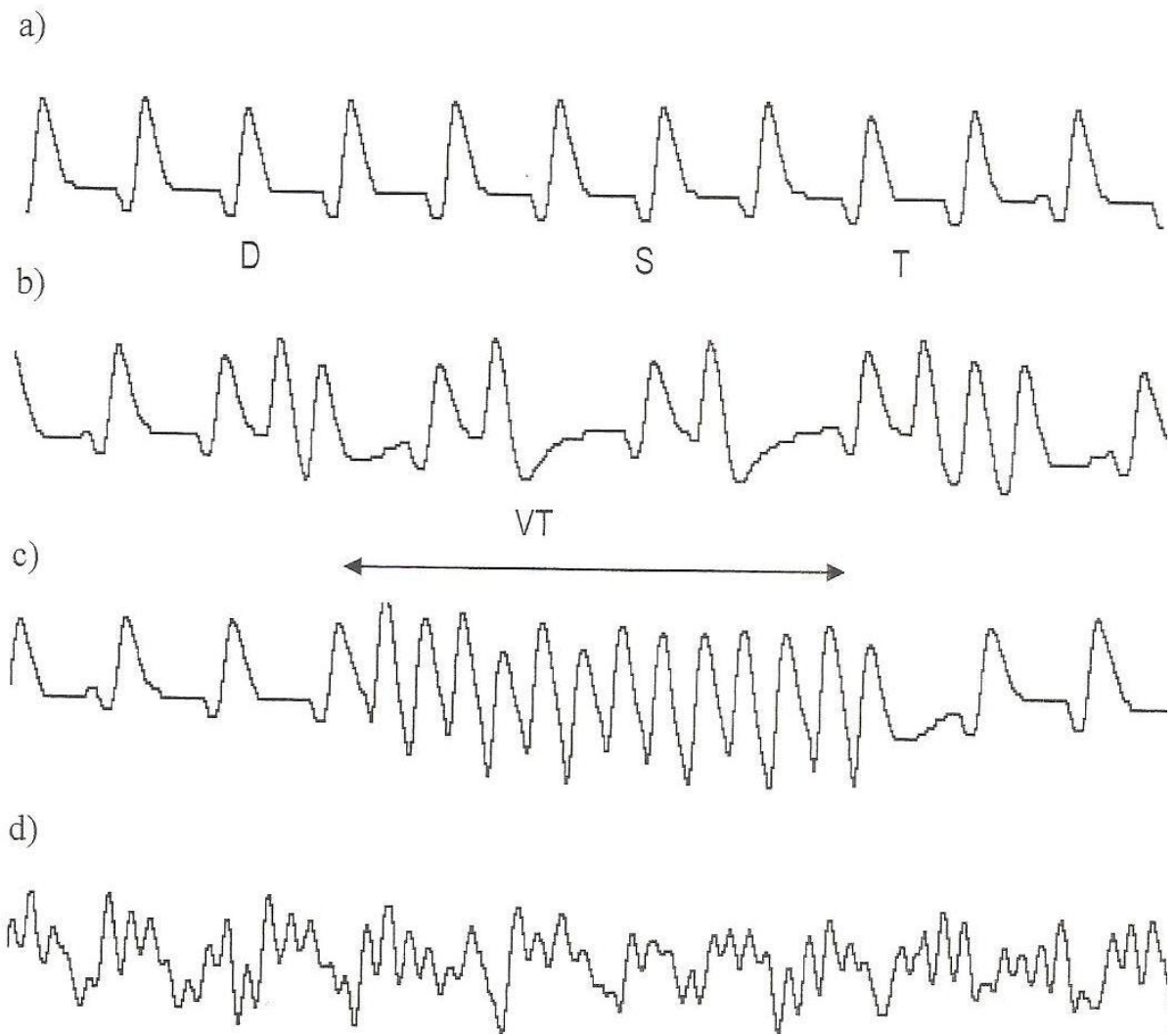
4.2.6.1. Vyhodnocení ischemických a reperfuzních arytmií

Komorové arytmie jsme sledovali během celé 50 min ischemie a v prvních 10 min reperfuze. V případě, že se arytmie objevily ještě před okluzí LAD, vyřadili jsme toto zvíře z pokusu.

Podle EKG záznamu jsme hodnotili těchto 5 typů komorových arytmií (viz obr. č. 14):

- a) singly (S) - jednoduché předčasné komorové stahy
- b) doublets (D) - dvojité předčasné komorové stahy, tj. dva po sobě následující
- c) triplets (T) - trojitě předčasné komorové stahy, tj. tři těsně po sobě následující
- d) komorové tachykardie (VT) - sled minimálně čtyř po sobě jdoucích předčasných komorových stahů
- e) komorové fibrilace (VF) - heterogenní, rychlá a nekoordinovaná elektrická aktivita myokardu.

Dvojitě a trojitě předčasné komorové stahy (D + S) byly souhrnně označeny jako salvy.



Obrázek č. 14: EKG záznam bez arytmii i s arytmii:

- a) normální srdeční rytmus**
- b) jednoduché (S), dvojité (D) a trojité (T) předčasné komorové stahy**
- c) komorové tachykardie (VT)**
- d) komorové fibrilace (VF).**

V průběhu experimentu se záznamy elektrogramu z povrchu srdce jednotlivých zvířat ukládaly do počítače, abychom je mohli později vyhodnotit. Pro hodnocení jsme použili program CAAV, který byl vytvořen na Oddělení vývojové kardiologie na FgÚ AV ČR. Postupně jsme prošli celý záznam pokusu a určili jednotlivé typy komorových arytmii. Způsob hodnocení ischemických a reperfučních arytmii byl proveden v souladu s Lambethskou konvencí z roku 1988 (Walker a kol., 1988). Finálním výsledkem hodnocení ischemických a reperfučních arytmii byla

tabulka, vytvořená programem, která nám dala informace o výskytu a závažnosti arytmií v jednotlivých minutách experimentu a o jejich celkovém počtu.

Podle Curtise a Hearse (1989) jsme v závislosti na výskytu jednotlivých typů ischemických a reperfuzních arytmií ke každému pokusu přiřadili hodnotu skóre ischemických respektive reperfuzních arytmií (viz tabulka č. 3).

Typ arytmií	Skóre
bez předčasných komorových stahů	0
jednoduché předčasné komorové stahy (S)	1
dvojité (D) a trojité (T) předčasné komorové stahy	2
komorové tachykardie (VT)	3
dočasné komorové fibrilace (VF), < 2 min	4
trvalé komorové fibrilace, > 2 min	5

Tabulka č. 3: Skóre - bodové hodnocení arytmií (upraveno podle Curtis a Hearse, 1989)

4.2.6.2. Hodnocení velikosti infarktu

Velikost infarktu jsme analyzovali z příčných řezů srdcí. Vyfotografovali jsme všech 5 - 7 řezů najednou, z apikální i bazální strany. Fotografie jsme vložili do počítače, kde jsme je pomocí programu Adobe Photoshop 7.0 doostřili a postupně jsme každý řez vyřízli z fotografie tak, abychom měli 5 - 7 samostatných řezů - souborů.

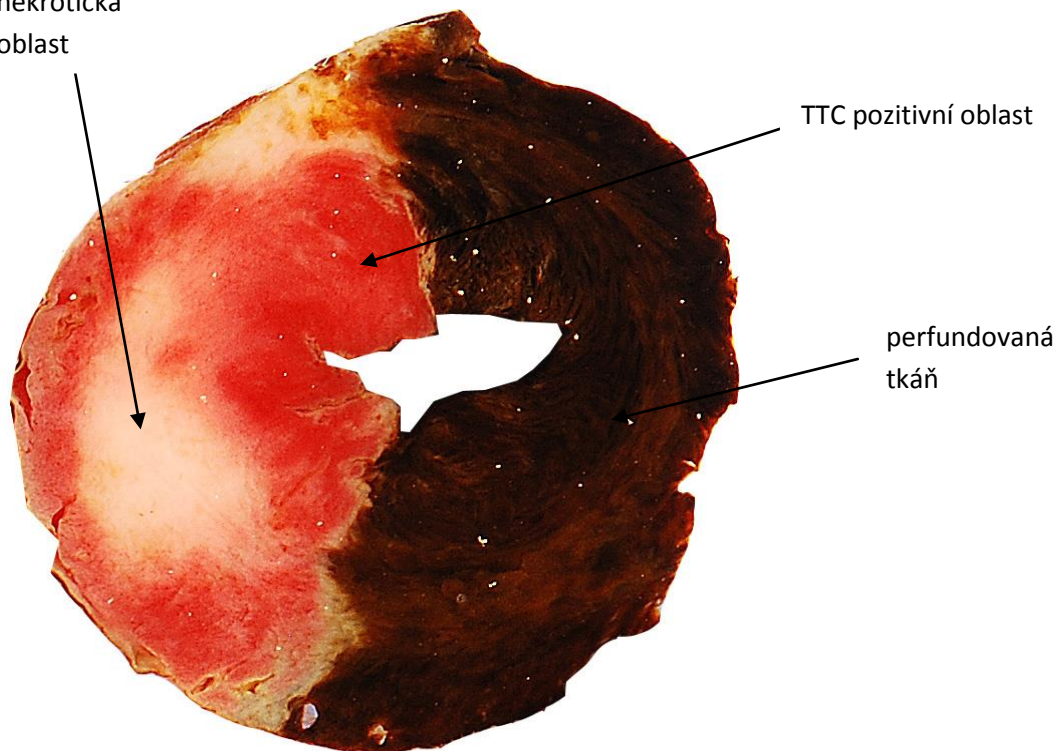
Perfuze manganistanem draselným a následné obarvení v roztoku TTC nám způsobilo barevné rozlišení jednotlivých oblastí řezu myokardem (viz obr. č. 15):

a) hnědá plocha - oblast srdce, která byla při okluzi LAD koronární artérie normálně perfundovaná, nebyla zasažena ischemií a následně byla obarvena manganistanem

b) červená plocha - oblast, která nebyla v důsledku podvázání LAD perfundována, ale ischemii přežila (proto se obarvila působením TTC)

c) béžová až bílá plocha - oblast, která nebyla v důsledku podvázání LAD perfundována a ischemii nepřežila (TTC negativní), nekrotická tkáň.

TTC negativní
nekrotická
oblast



Obrázek č. 15: Fotografie příčného řezu potkaním myokardem. Hnědá oblast - normálně perfundovaná tkáň, obarvena KMnO_4 . Červená oblast - podvázaná část myokardu, která odolala ischemicko-reperfuznímu poškození, obarvena TTC. Béžová až bílá oblast - podvázaná část myokardu, která poškození neodolala, nekrotická tkáň.

Barevné odlišení jednotlivých částí řezu jsme využili v počítačovém programu Ellipse, kde jsme pomocí planimetrické metody zjistili poměrné zastoupení jednotlivých ploch vůči celému řezu. Vytvořili jsme tři sítě bodů (40 x 40 bodů), které jsme postupně aplikovali na všechny srdeční řezu. V první síti jsme označili všechny body, ležící v řezu. Tímto jsme zjistili celkovou plochu levé komory LV. V druhé síti jsme označili všechny body ležící pouze v hnědé, tudíž infarktem nezasažené, oblasti. Odečtením této normálně perfundované oblasti od celkové plochy levé komory LV dostaneme velikost oblasti zasažené ischemií AR. Ve třetí síti jsme

označili pouze body ležící v červené oblasti levé komory. Tímto jsme zjistili plochu srdce, která byla ischemií zasažena, ale přežila. Odečtením této plochy od velikosti oblasti zasažené infarktem AR zjistíme velikost infarktové oblasti IS. Z těchto údajů jsme mohli vypočítat poměrné zastoupení jednotlivých oblastí a vyjádřit je v procentech:

- a) AR/LV - velikost ohrožené oblasti vztažená na celou levou komoru
- b) IS/AR - velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti
- c) IS/LV - velikost infarktu vztažená na celou levou komoru.

4.3. Statistické hodnocení naměřených dat

Pro účely statistického a grafického zpracování naměřených výsledků (výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm střední chyba průměru) jsme použili program GraphPad Prism 5.00. Rozdíl mezi dvěma experimentálními skupinami v počtu a délce trvání arytmií (nenormální rozložení dat) byl hodnocen pomocí Mann-Whitney testu, mezi třemi experimentálními skupinami pomocí Kruskal-Wallis testu s následným Dunn testem. Pro porovnání velikosti infarktu (normální rozložení dat) byl pro dvě experimentální skupiny použit nepárový t - test, pro tři skupiny jednocestná analýza variance (ANOVA) s následným Newmann-Keuls testem. Za statisticky významné jsme považovali rozdíly při $P < 0,05$.

5. Výsledky

Metodou izolovaného perfundovaného srdce jsme zkoumali vliv dlouhodobé stimulace OR (10 a 28 dní) morfinem a metadonem na výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií u laboratorního potkana, a dále vliv těchto látek na velikost infarktu myokardu. Výsledky jsme rozdělily do 2 částí, a to podle doby podávání opioidů.

5.1. Série I – 10ti denní podávání opioidů

V rámci série experimentů analyzujících vliv 10ti denního podávání opioidů na ischemickou toleranci srdce bylo použito celkem 48 potkanů kmene Wistar, pocházejících z chovů společnosti Velaz. Ze skupiny kontrol byli 4 jedinci vyřazeni ještě před započítáním experimentu z důvodu komorových arytmií ve stabilizaci, nulového nárůstu perfuzního tlaku při okluzi a chybné pověšení na kanylu Langendorffovy aparatury. Z morfinové skupiny bylo vyřazeno 1 zvíře kvůli ucpanému filtru v Langendorffově perfuzním přístroji. Z toho důvodu byl vyřazen i 1 potkan ze skupiny metadonu. Další 2 měli závažné fibrilace již v počátcích ischemie. Velikost jednotlivých skupin a počty experimentů dokládá tabulka č. 4.

Skupina	Počet zvířat	Ischemické arytmie	Reperfuzní arytmie	Velikost infarktu
Kontrola	20	16	13	9
Morfin 10	13	12	12	9
Metadon 10	15	12	10	10

Tabulka č. 4: Počet potkanů před zahájením experimentů, počet provedených pokusů na ischemické a reperfuzní arytmie a na analýzu velikosti infarktu u jednotlivých experimentálních skupin.

V tabulce č. 4 chybí 5 měření reperfuzních arytmií. Důvodem vyřazení 3 potkanů ze skupiny kontrol a 2 potkanů z metadonové skupiny byly trvalé komorové fibrilace (buď na konci ischemie nebo na začátku reperfuze), způsobené pravděpodobně rozsáhlým ischemickým poškozením. Na analýzu velikosti infarktu

bylo použito o 4 potkany ze skupiny kontrol a o 3 potkany ze skupiny morfin 10 méně, jelikož tato srdce nebyla zdařile obarvena pomocí manganistanu draselného a TTC.

Jedním ze základních parametrů, které jsme sledovali, byla tepová frekvence (HR) a perfuzní tlak. Průměrné hodnoty HR jsme analyzovali ve 3 fázích pokusu, ve stabilizaci, na konci ischemie a na konci reperfuze. Naměřené hodnoty HR se významně nelišily v průběhu pokusu u skupiny kontrol a morfinu 10 (viz tabulka č. 5). Skupina metadon 10 měla ve všech třech měření v průběhu experimentu vyšší HR než skupina kontrol, nicméně rozdíl nedosáhl hranice statistické významnosti. V tabulce č. 6 jsou uvedeny průměrné hodnoty perfuzních tlaků. Nárůst perfuzního tlaku byl v ischemické fázi oproti stabilizační u všech experimentálních skupin signifikantní, což svědčí o správném provedení okluze LAD koronární artérie.

Skupina	Tepová frekvence (min ⁻¹)		
	HR1	HR2	HR3
Kontrola	197,4 ± 6,4	208,3 ± 8	204,5 ± 9,4
Morfin 10	201,6 ± 14,9	210,3 ± 15,5	223,5 ± 15
Metadon 10	220 ± 10,6	230,7 ± 10	238,9 ± 7,3

Tabulka č. 5: Tepová frekvence ve vybraných časových intervalech u jednotlivých experimentálních skupin (HR1 – ve fázi stabilizace, HR2 – na konci ischemie, HR3 – na konci reperfuze). Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

Skupina	Perfuzní tlak (mm Hg)		
	T1	T2	T3
Kontrola	40,3 ± 1,8	70 ± 3,5*	49 ± 2,3
Morfin 10	38 ± 3	60 ± 3,5*	43,3 ± 1,4
Metadon 10	41,2 ± 0,9	72,4 ± 5*	42,9 ± 2,9

Tabulka č. 6: Hodnoty perfuzních tlaků ve vybraných časových intervalech u jednotlivých experimentálních skupin (T1 – ve fázi stabilizace, T2 – na začátku ischemie, T3 – na konci ischemie). Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

* P < 0,05 vs. stabilizace

5.1.1. Ischemické a reperfuční arytmie

Pokud se ve fázi stabilizace vyskytovaly komorové arytmie, byla tato zvířata z pokusu vyřazena (viz kapitola 5.1). Ischemické arytmie se při použití metody izolovaného perfundovaného srdce vyskytovaly přibližně mezi 10. a 25. minutou ischemie, reperfuční arytmie se objevily ihned po uvolnění podvazu artérie a vymizely přibližně po 10 minutách.

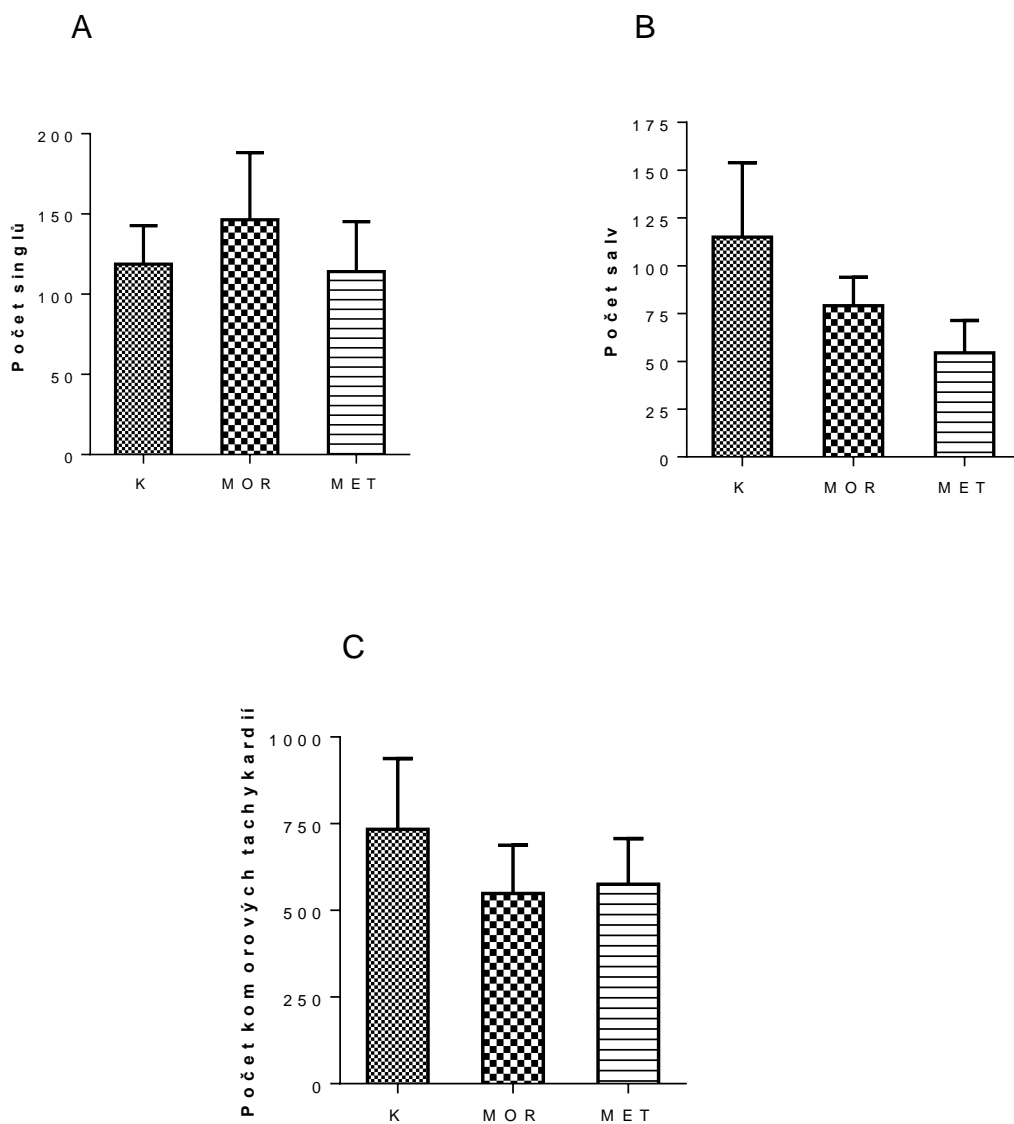
5.1.1.1. Ischemické arytmie

Graf č. 1 ukazuje typové zastoupení jednotlivých ischemických arytmií – (A) počet jednoduchých předčasných komorových stahů, tzv. singlů (B) salv a (C) komorových tachykardií (jednoduché: *kontroly* - $118,7 \pm 24,1$; *morfin 10* - $146,4 \pm 41,8$; *metadon 10* - $114,1 \pm 31,2$; salvy: *kontroly* - $115 \pm 38,9$; *morfin 10* - $79,2 \pm 14,8$; *metadon 10* - $54,5 \pm 16,7$; VT: *kontroly* - $733,9 \pm 204,2$; *morfin 10* - $548,8 \pm 139,4$; *metadon 10* - $575,7 \pm 131,5$). V žádném z analyzovaných parametrů ischemické arytmogeneze jsme nezjistili statisticky významný rozdíl mezi experimentálními skupinami (viz graf č. 1). Zřetelný pokles je patrný v počtu salv u zvířat, kterým byl po dobu 10 dnů podáván metadon oproti kontrolám (pokles o cca 54 %), nicméně díky vysoké heterogenitě ve skupině kontrol nebyl tento rozdíl statisticky významný.

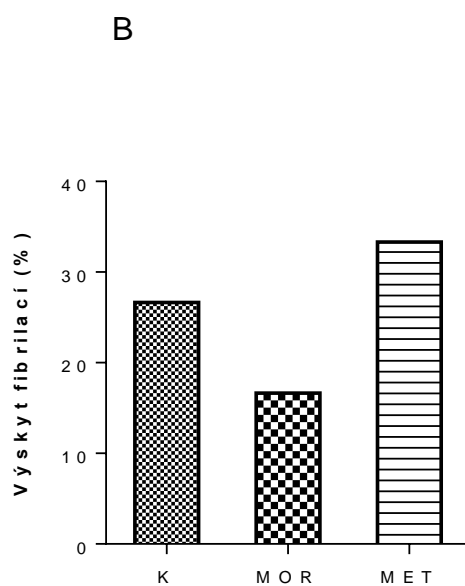
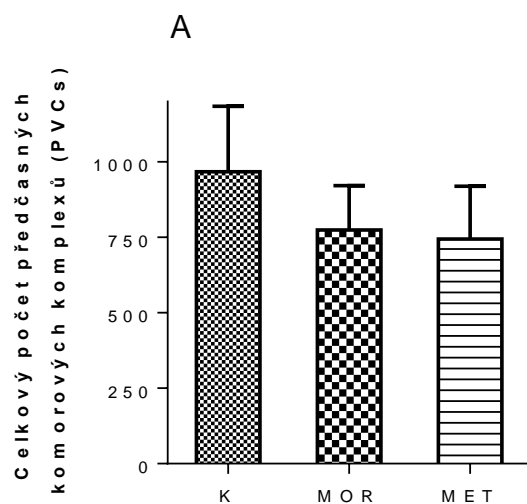
Další parametry ischemické arytmogeneze, které jsme hodnotili, jsou znázorněny v grafu č. 2. Je to (A) celkový počet předčasných komorových komplexů (PVCs) a (B) procentuální výskyt komorových fibrilací (PVCs: *kontroly* - $967,5 \pm 217,3$; *morfin 10* - $774,3 \pm 147,2$; *metadon 10* - $744,3 \pm 174,7$; VF: *kontroly* – 26,7 %; *morfin 10* – 16,7 %; *metadon 10* – 33,3 %). V žádném z těchto parametrů nebyl zjištěn významný rozdíl. Je zde vidět pouze nepatrný trend ve snížení počtu PVCs u skupin vystavených opioidům. Poloviční zastoupení fibrilací u skupiny morfin 10 oproti metadonové skupině nedosáhlo signifikantní hladiny.

Dále jsme analyzovali dobu trvání tachyarytmií (fibrilací a tachykardií) a hodnotu ischemického skóre (viz graf č. 3A, B). V obou případech byly naměřené hodnoty všech skupin velmi podobné (tachyarytmie: *kontroly* – $86 \pm 19,7$ s; *morfin 10* – $73,5 \pm 13,9$ s; *metadon 10* – $79,3 \pm 16,6$ s; skóre: *kontroly* - $3,5 \pm 0,2$; *morfin 10* -

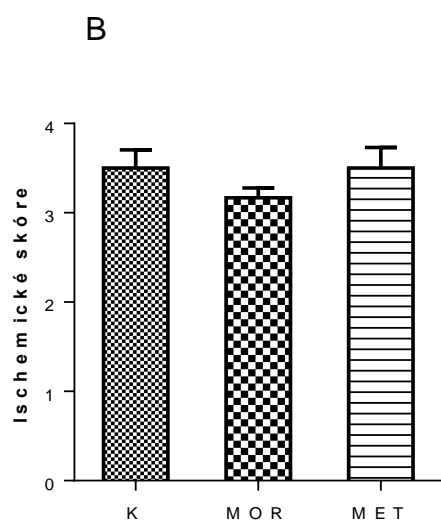
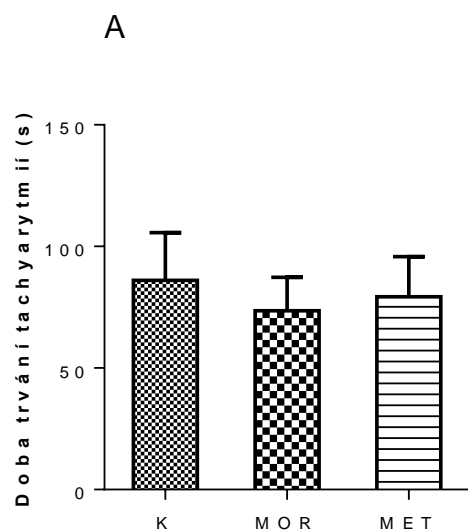
$3,2 \pm 0,1$; *metadon 10* - $3,5 \pm 0,2$). Bodové hodnocení srdcí se téměř nelišilo, jelikož se u všech vyskytovaly tachykardie nebo dočasné fibrilace.



Graf č. 1: Ischemické arytmie. A – počet jednoduchých předčasných komorových komplexů (singlů), B – počet salv, C – počet komorových tachykardií u experimentálních skupin. K – kontroly, MOR – 10 dnů podávaný morfin, MET – 10 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.



Graf č. 2: Ischemické arytmie. A – celkový počet předčasných komorových komplexů, B – procentuální výskyt fibrilací u experimentálních skupin. K – kontroly, MOR – 10 dnů podávaný morfin, MET – 10 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru.



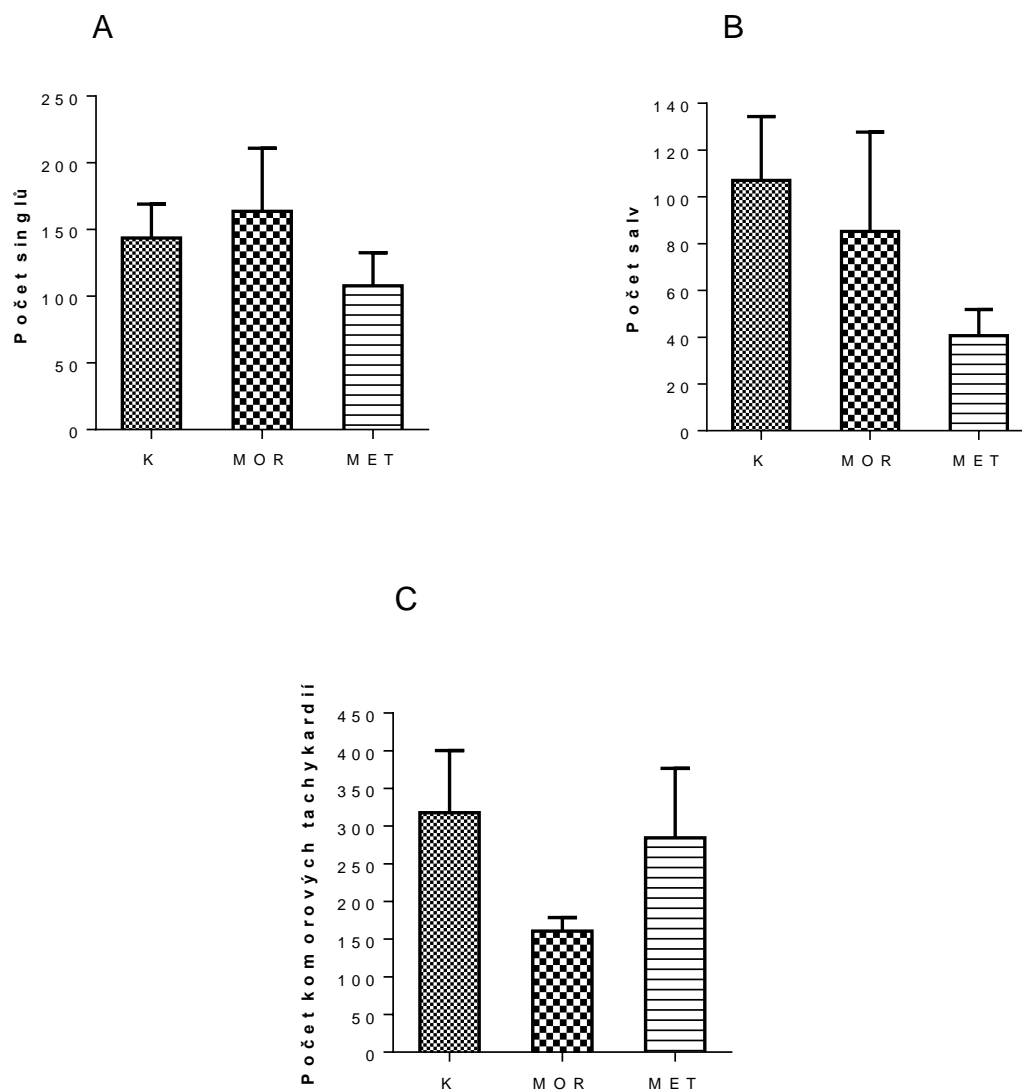
Graf č. 3: Ischemické arytmie. A – doba trvání tachyarytmií (fibrilací + tachykardií), B – ischemické skóre u jednotlivých experimentálních skupin. K – kontroly, MOR – 10 dnů podávaný morfin, MET – 10 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

5.1.1.2. Reperfuzní arytmie

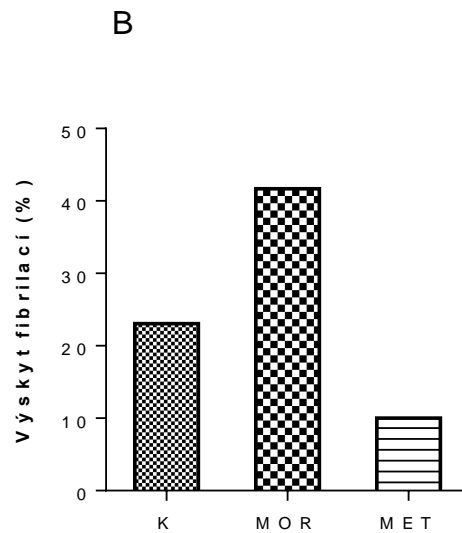
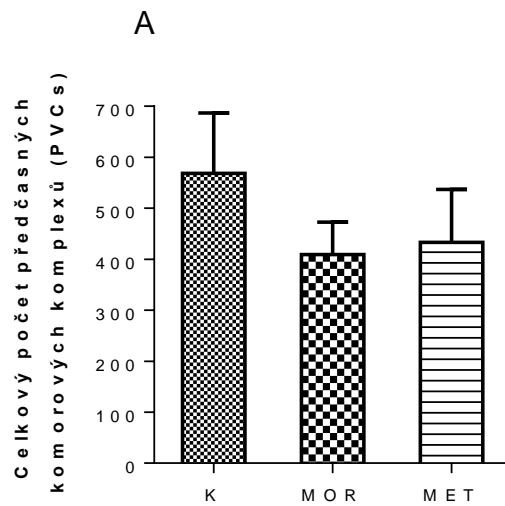
U reperfuzních arytmií jsme vyhodnocovali stejné parametry jako v případě ischemických arytmií, jak je patrné z grafů č. 4-6. Graf č. 4 ilustruje (A) počet singlů, (B) salv a (C) komorových tachykardií (singly: *kontroly* - $143,7 \pm 25,5$; *morfin 10* - $163,6 \pm 47,5$; *metadon 10* - $107,8 \pm 24,8$; salvy: *kontroly* - $107,1 \pm 27,3$; *morfin 10* - $85,2 \pm 42,5$; *metadon 10* - $40,7 \pm 11,2$; VT: *kontroly* - $317,8 \pm 82,5$; *morfin 10* - $160,6 \pm 18,2$; *metadon 10* - $284,5 \pm 92,2$). Jednotlivé experimentální skupiny se nelišily v počtu reperfuzních singlů. Po 10ti denním podávání metadonu je viditelná velká (ačkoliv nesignifikantní) redukce počtu salv (pokles o 62 %) v porovnání s kontrolami. Podávání morfinu po stejně dlouhou dobu výrazně snížilo počet komorových tachykardií (o 50 %), i když také nesignifikantně.

Mírný pokles počtu celkových předčasných komorových komplexů u obou opioidních skupin v porovnání s kontrolami ukazuje graf č. 5A (v důsledku patrné redukce salv resp. tachykardií; viz graf 4B, C). Dále ilustruje opětovnou velkou heterogenitu v rámci skupin, co se týče výskytu komorových fibrilací (B). Rozdíl mezi žádnou skupinou není signifikantní, přestože procentuální zastoupení fibrilací u metadonu 10 je 4krát menší než u potkanů, kteří dostávali morfin. Průměr jednotlivých skupin byl - PVCs: *kontroly* - $568,6 \pm 118,2$; *morfin 10* - $409,3 \pm 63,3$; *metadon 10* - $433 \pm 104,1$; VF: *kontroly* - 23,1 %; *morfin 10* - 41,7 %; *metadon 10* - 10 %).

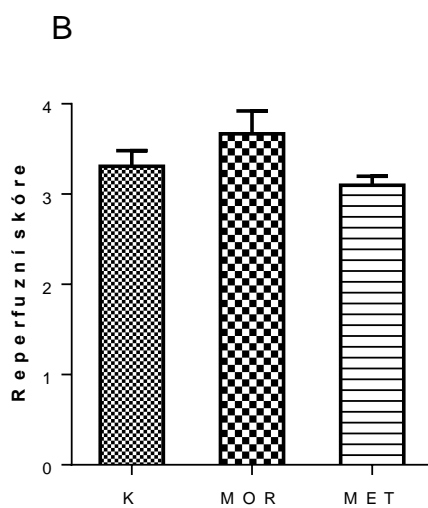
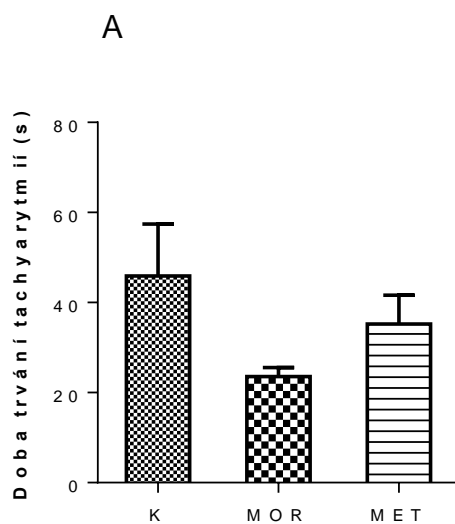
Jak je patrné z grafu č. 6, všechna srdce v průběhu reperfuze měla, stejně jako v ischemii, arytmie ve formě tachykardií nebo fibrilací, proto je hodnota reperfuzního skóre napříč skupinami téměř totožná (B). Oproti tachyarytmiím v ischemii je v reperfuzi viditelný výrazný pokles při 10ti denní aplikaci morfinu, který ale také není signifikantní. Průměrné hodnoty experimentálních skupin byly rovny - tachyarytmie: *kontroly* - $50,1 \pm 11,8$ s; *morfin 10* - $23,6 \pm 2$ s; *metadon 10* - $35,2 \pm 6,5$ s; skóre: *kontroly* - $3,3 \pm 0,2$; *morfin 10* - $3,7 \pm 0,3$; *metadon 10* - $3,1 \pm 0,1$).



Graf č. 4: Reperfuzní arytmie. A – počet jednoduchých předčasných komorových stahů (singlů), B – počet salv, C – počet komorových tachykardií u jednotlivých experimentálních skupin. K – kontroly, MOR – 10 dnů podávaný morfin, MET – 10 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.



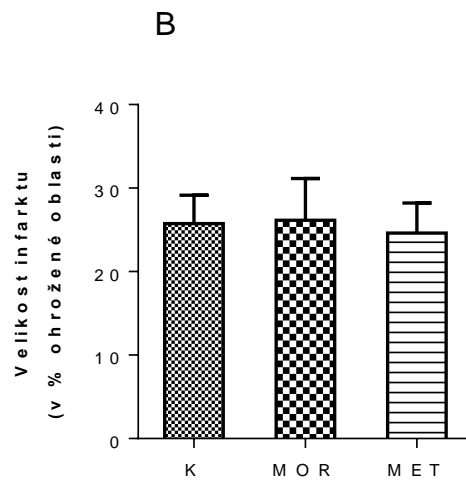
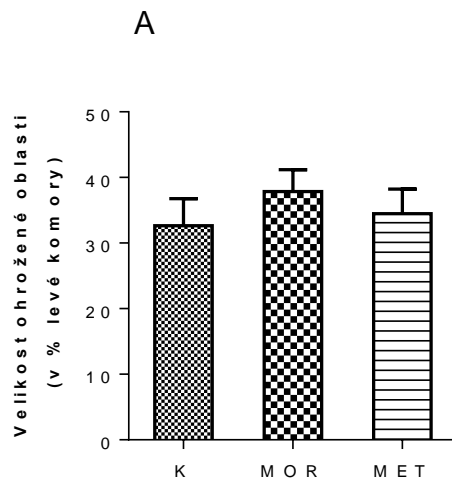
Graf č. 5: Reperfuční arytmie. A – celkový počet předčasných komorových komplexů, B – procentuální výskyt komorových fibrilací u jednotlivých experimentálních skupin. K – kontroly, MOR – 10 dnů podávaný morfin, MET – 10 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru.



Graf č. 6: Reperfuzní arytmie. A – doba trvání tachyarytmií, B – hodnota reperfuzního skóre u jednotlivých experimentálních skupin. K – kontroly, MOR – 10 dnů podávaný morfin, MET – 10 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru.

5.1.2. Velikost infarktu

Graf č. 7 znázorňuje relativní velikosti ohrožených oblastí vztažených na velikost levé komory (AR/LV) u jednotlivých experimentálních skupin (A). Díky tomu, že se hodnoty AR/LV mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišily (*kontroly* – $32,7 \pm 4,1\%$; *morfin 10* – $37,9 \pm 3,3 \%$; *metadon 10* – $34,5 \pm 3,7 \%$), mohli jsme bez zkreslení výsledků porovnat průměrné hodnoty relativních velikostí infarktu (IS/AR; viz graf č. 7B). Velikost infarktu byla vztažena na velikost ohrožené oblasti (IS/AR) u jednotlivých skupin (*kontroly* – $25,7 \pm 3,4 \%$; *morfin 10* – $26,2 \pm 5 \%$; *metadon 10* – $24,6 \pm 3,6 \%$). Průměrná velikost infarktu byla velmi podobná jak u kontrol, tak u obou skupin, kterým byly podávány opioidy, a statisticky se významně nelišila.



Graf č. 7: Velikost infarktu. A – velikost ohrožené oblasti levé komory, B – velikost infarktu, vztažená na velikost ohrožené oblasti u jednotlivých experimentálních skupin. K – kontroly, MOR – 10 dnů podávaný morfin, MET – 10 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru.

5.2. Série II – 28mi denní podávání metadonu

Následující série experimentů analyzovala vliv 28mi denního podávání metadonu na výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií a na velikost infarktu myokardu. K dispozici jsme měli celkem 16 potkanů kmene Wistar, pocházejících z chovů FgÚ AV ČR. Ke změně dodavatele laboratorních zvířat došlo v důsledku veterinárních nedostatků v chovu společnosti Velaz, které vedly k zákazu dovozu experimentálních zvířat do FgÚ AV ČR. Z experimentů provedených na těchto potkanech jeden jedinec ze skupiny kontrol uhynul ještě před započítáním experimentu v důsledku anestezie thiopentalem sodným. Další jedinec zemřel během 28mi denní aplikace metadonu (pravděpodobně jeho vlivem) a u dalších 2 jsme pozorovali arytmiie již ve fázi stabilizace. Velikost jednotlivých skupin a počty experimentů dokládá tabulka č. 7.

Skupina	Počet zvířat	Ischemické arytmiie	Reperfuzní arytmiie	Velikost infarktu
Kontrola	6	5	2	2
Metadon 28	10	7	4	3

Tabulka č. 7: Počet potkanů před zahájením experimentů, počet provedených pokusů na ischemické a reperfuzní arytmiie a na analýzu velikosti infarktu u jednotlivých experimentálních skupin.

Analýza reperfuzních arytmií se neprováděla u 3 zvířat z obou skupin, v důsledku přetrvávajících komorových fibrilací na konci ischemie nebo v počátcích reperfuze. Jeden potkan ze skupiny metadonu 28 nebyl použit pro stanovení velikosti infarktu kvůli dlouhodobé fibrilaci později v reperfuzi.

I u těchto skupin jsme měřili tepovou frekvenci a perfuzní tlak. HR byla opětovně zprůměrována ve fázi stabilizace, na konci ischemie a na konci reperfuze. Naměřené hodnoty HR (viz tabulka č. 8) se v průběhu pokusu téměř nelišily u kontrol. Potkani, kterým byl po dobu 28 dnů aplikován metadon, měli (stejně jako potkani, kterým byl metadon podáván pouze po dobu 10 dnů) nesignifikantně vyšší tepovou frekvenci v reperfuzi oproti stabilizaci. V tabulce č. 9 jsou uvedeny průměrné

hodnoty perfuzních tlaků. Nárůst perfuzního tlaku byl v ischemické fázi u obou experimentálních skupin signifikantní.

Skupina	Tepová frekvence (min ⁻¹)		
	HR1	HR2	HR3
Kontrola	200 ± 19,7	193 ± 10,8	190 ± 20,0
Metadon 28	223 ± 12,2	223 ± 10,9	246 ± 5,9

Tabulka č. 8: Tepová frekvence ve vybraných časových intervalech u jednotlivých experimentálních skupin (HR1 – ve fázi stabilizace, HR2 – na konci ischemie, HR3 – na konci reperfuze). Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

Skupina	Perfuzní tlak (mm Hg)		
	T1	T2	T3
Kontrola	41,3 ± 1,8	71,2 ± 3,5*	49,6 ± 3,0
Metadon 28	42,2 ± 1,2	73,6 ± 5*	47,1 ± 2,5

Tabulka č. 9: Hodnoty perfuzních tlaků ve vybraných časových intervalech u jednotlivých experimentálních skupin (T1 – ve fázi stabilizace, T2 – na začátku ischemie, T3 – na konci ischemie). Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

* P < 0,05 vs. stabilizace

5.2.1. Ischemické a reperfuzní arytmie

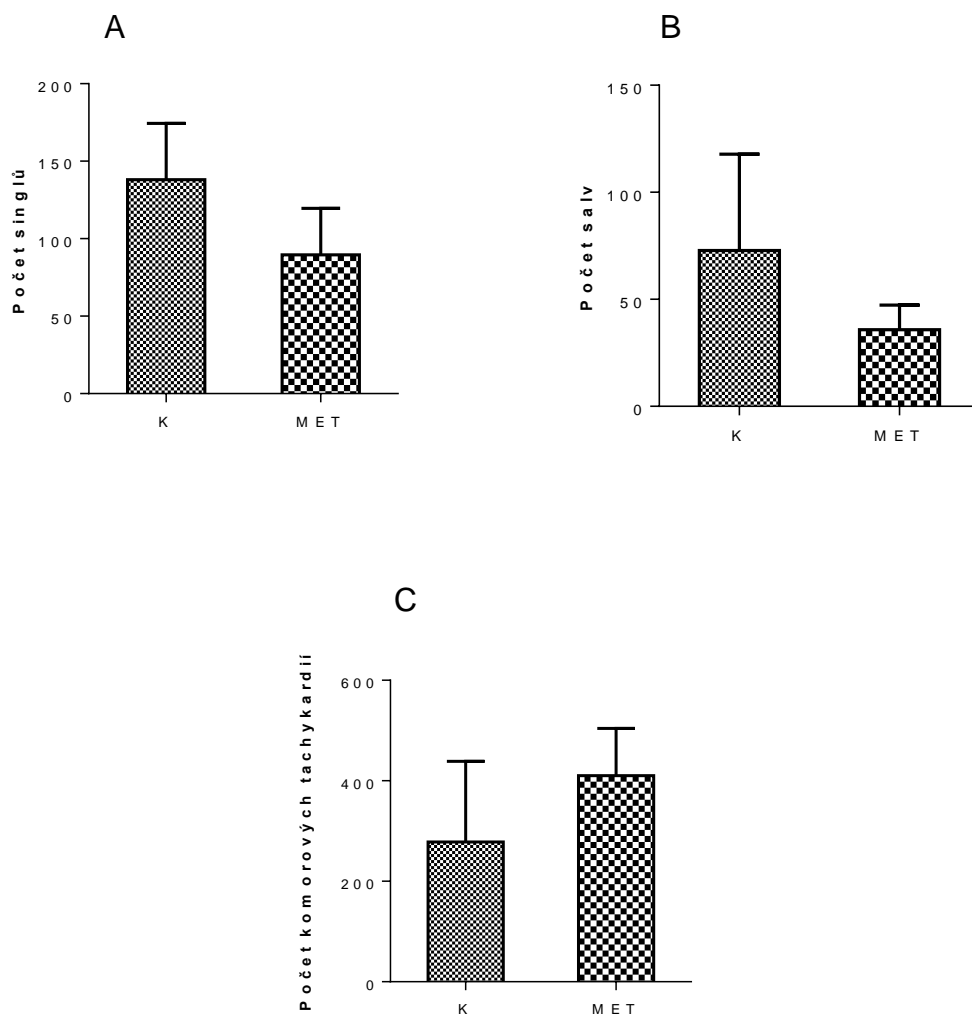
Použili jsme stejný experimentální protokol jako u série I a zaměřili jsme se na hodnocení stejných parametrů, abychom výsledky mohli porovnat s potkany, kterým byl metadon podáván pouze po dobu 10 dnů.

5.2.1.1. Ischemické arytmie

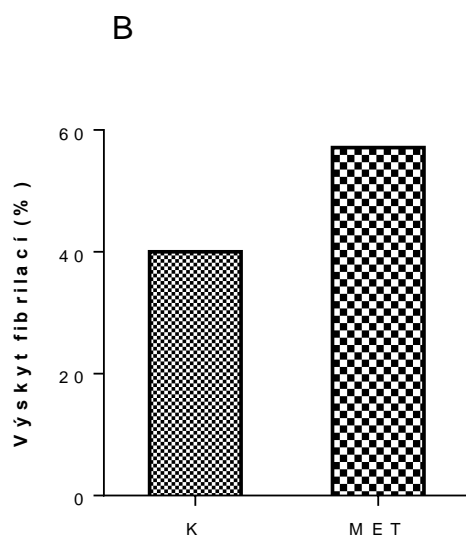
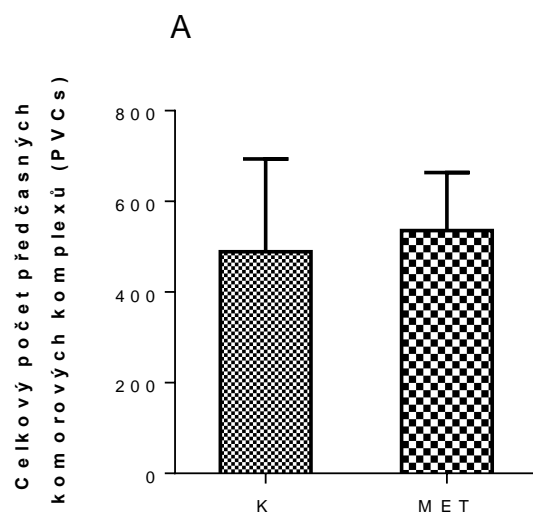
Graf č. 8 znázorňuje počet jednotlivých typů předčasných komorových stahů – (A) singlů, (B) salv a (C) komorových tachykardií. Zjistili jsme, že nedošlo k žádnému významnému poklesu ani nárůstu oproti kontrolám, pouze u singlů a salv došlo k malému poklesu jejich počtu u metadonové skupiny, zatímco u komorových tachykardií tomu bylo přesně naopak. Průměrné hodnoty skupin jsou tyto – singly: *kontroly* - $138 \pm 36,5$; *metadon 28* - $89,7 \pm 30$; salvy: *kontroly* - $72,8 \pm 45$; *metadon 28* - $35,8 \pm 11,5$; VT: *kontroly* - $278,3 \pm 160,3$; *metadon 28* - $410,3 \pm 93,8$.

Téměř totožný u obou skupin byl celkový počet předčasných komorových komplexů (*kontroly* - 489 ± 205 ; *metadon 28* - 536 ± 128), jak je vidět z grafu č. 9A. U kontrolních potkanů se vyskytovalo méně komorových fibrilací (*kontroly* – 40 %; *metadon 28* – 57,1 %), avšak díky nízkému počtu zvířat v obou skupinách nebyl tento rozdíl statisticky významný (viz graf č. 9B).

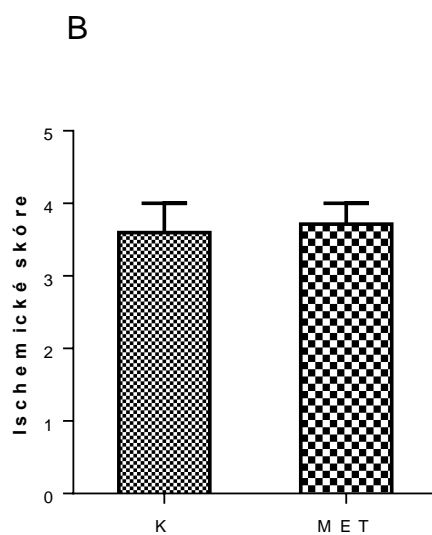
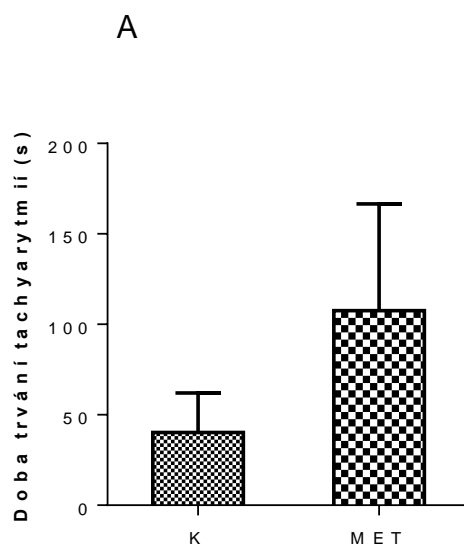
Doba trvání tachyarytmií byla u jedinců ze skupiny metadon 28 velmi individuální (viz graf č. 10A). Oproti nim byla kontrolní zvířata homogennější a doba trvání tachyarytmií u nich byla kratší (*kontroly* – $40,3 \pm 21,8$ s; *metadon 28* – $107,5 \pm 59$ s), ale signifikantní hladiny nedosáhla. Hodnoty ischemického skóre byly u obou skupin stejné (*kontroly* - $3,6 \pm 0,4$; *metadon 28* - $3,7 \pm 0,3$), u všech zvířat se vyskytovaly tachykardie a často i fibrilace (viz graf č. 10B).



Graf č. 8: Ischemické arytmie. A – počet předčasných jednoduchých komorových stahů, B – počet salv, C – počet komorových tachykardií u obou experimentálních skupin. K – kontrola, MET – 28 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.



Graf č. 9: Ischemické arytmie. A – celkový počet předčasných komorových komplexů, B – procentuální výskyt komorových fibrilací u obou experimentálních skupin. K – kontrola, MET – 28 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru.



Graf č. 10: Ischemické arytmie. A – doba trvání tachyarytmií, B – hodnota ischemického skóre u obou experimentálních skupin. K – kontrola, MET – 28 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

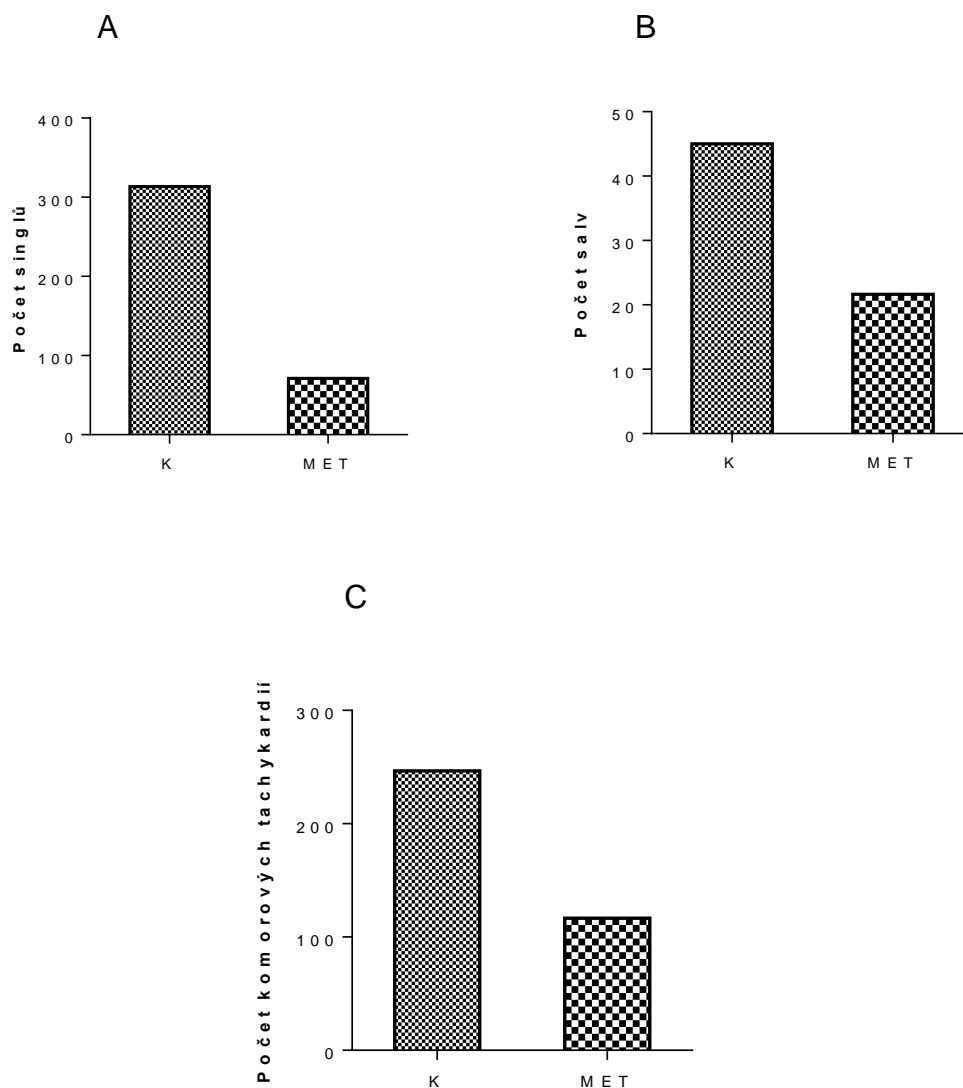
5.2.1.2. Reperfuzní arytmie

Vzhledem k nízkému počtu potkanů, kteří odolali akutní ischemii (viz tabulka č. 7) ukazují grafy v této a následující kapitole 5.2.2. pouze průměry jednotlivých sledovaných parametrů. Zda-li byl v některých parametrech reperfuzní arytmogeneze rozdíl signifikantní nelze určit. Zdůvodnění ne zcela úspěšné série II je komentováno v diskusi.

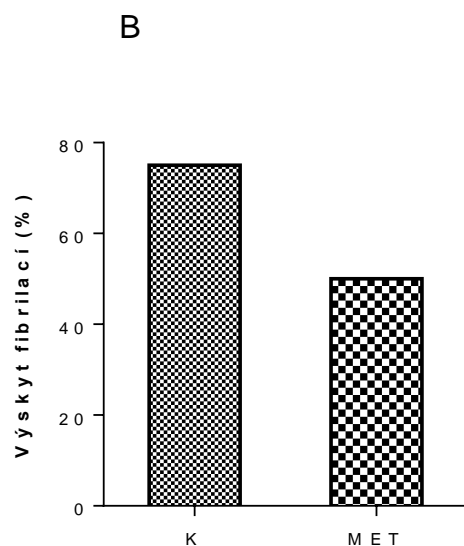
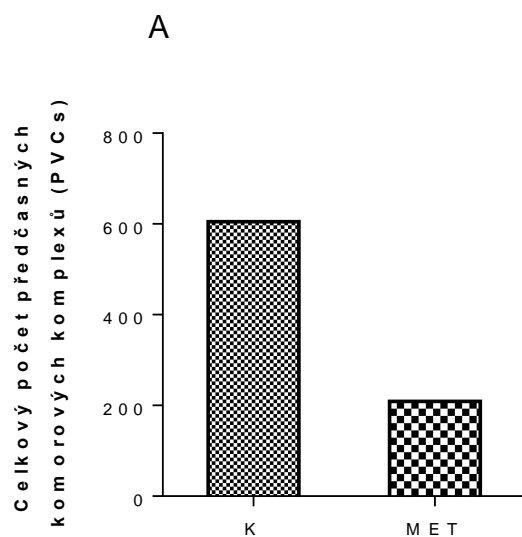
Z grafu č. 11 je viditelný trend ve snižování jak (A) jednoduchých předčasných komorových stahů, tak (B) salv i (C) komorových tachykardií v reperfuzi u skupiny, která byla vystavena působení metadonu. Průměrné hodnoty v těchto parametrech byly – singly: *kontroly* - 313,5; *metadon 28* - 71; salvy: *kontroly* - 45; *metadon 28* - 21,7; VT: *kontroly* - 246,5; *metadon 28* - 116,7.

Jelikož potkani, kteří dostávali metadon, měli oproti kontrolám méně singlů, salv i komorových tachykardií, byl tedy i celkový počet předčasných komorových komplexů redukován (*kontroly* - 605; *metadon 28* - 209,3), jak ukazuje graf č. 12A. Fibrilace v reperfuzi byly více zastoupeny u kontrolní skupiny (viz graf č. 12B). Průměr hodnot byl roven - *kontroly* - 75 %; *metadon 28* – 50 %.

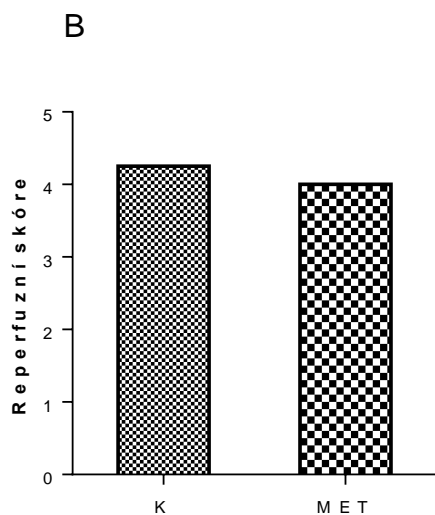
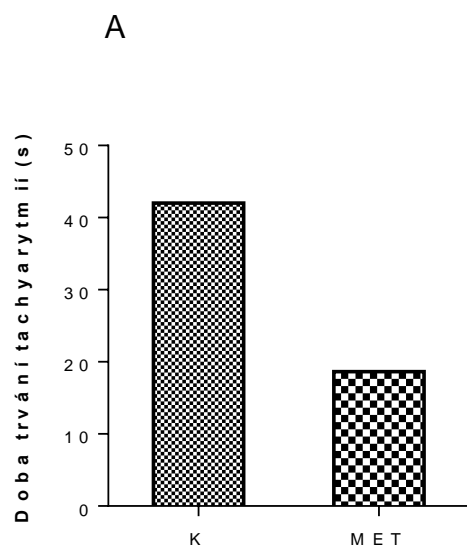
Tím, že ve skupině metadon 28 byly méně zastoupeny fibrilace doba trvání tachyarytmií v této skupině byla menší než u kontrol (*kontroly* – 42 s; *metadon 28* – 18,7 s) (viz graf č. 13A). Reperfuzní skóre (viz graf č. 13B) bylo i u těchto dvou skupin velmi podobné (*kontroly* - 4,3; *metadon 28* - 4), což napovídá o vysokém výskytu přetrvávajících fibrilací.



Graf č. 11: Reperfuční arytmie. A – počet předčasných jednoduchých komorových komplexů, B – počet salv, C – počet komorových tachykardií u obou experimentálních skupin. K – kontrola, MET – 28 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr.



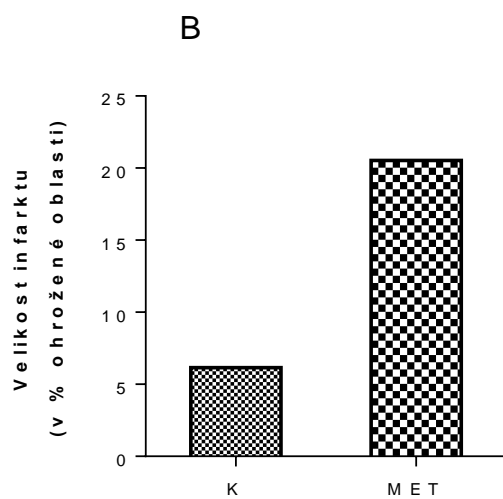
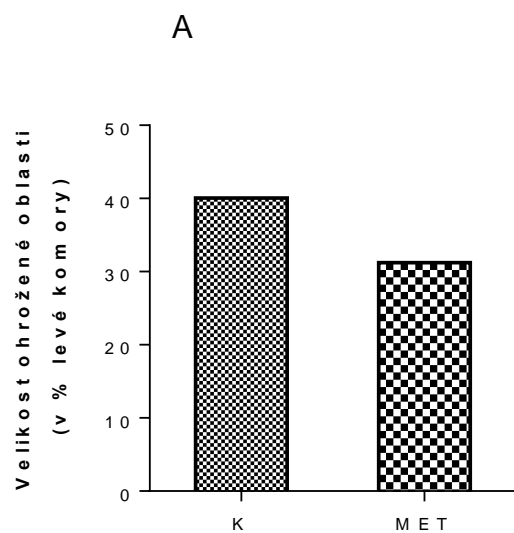
Graf č. 12: Reperfuční arytmie. A – celkový počet předčasných komorových komplexů, B – procentuální výskyt komorových fibrilací u obou experimentálních skupin. K – kontrola, MET – 28 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr.



Graf č. 13: Reperfuční arytmie. A – doba trvání tachyarytmií, B – hodnota reperfučního skóre u obou experimentálních skupin. K – kontrola, MET – 28 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr.

5.2.2. Velikost infarktu

Graf č. 14 znázorňuje porovnání relativních velikostí ohrožených oblastí vztažených na velikost levé komory (AR/LV) u obou experimentálních skupin (A). Vypočtené hodnoty mezi skupinami se výrazně nelišily (*kontroly* – 40,1 %; *metadon 28* – 31,2 %), Relativní velikost infarktu vztažena na velikost ohrožené oblasti (IS/AR) byla u obou skupin - *kontroly* – 6,2 %; *metadon 28* – 20,5 % (viz graf č. 14B).



Graf č. 14: Velikost infarktu. A – velikost ohrožené oblasti levé komory, B – velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti u obou experimentálních skupin. K – kontrola, MET – 28 dnů podávaný metadon. Hodnoty jsou uváděny jako průměr.

5.3. Kontroly

Jak je patrné z porovnání experimentů série I a II, u zvířat z chovu FgÚ AV ČR se velmi často objevovaly přetrvávající tachykardie, kvůli kterým nebylo možno dokončit většinu experimentů. Rozhodli jsme se proto otestovat ischemickou toleranci těchto potkanů za podmínek, kdy bylo srdce perfundováno poloviční koncentrací iontů Ca^{2+} (1,25 mmol) (viz tabulka č. 10). Opět jsme analyzovali ischemické a reperfuzní arytmie a velikost infarktu a výsledky jsme porovnali s kontrolami ze série II.

	koncentrace (mmol)
NaCl	118
NaHCO₃	25
glukóza	11
KCl	4,7
MgSO₄ x (7H₂O)	1,2
KH₂PO₄	1,2
CaCl₂ x (2H₂O)	1,25

Tabulka č. 10: Složení Krebs-Henseleitova roztoku pro pokus na kontrolách, lišící se od experimentů se sérií I a sérií II poloviční koncentrací vápníku.

K dispozici jsme měli celkem 12 potkanů kmene Wistar, pocházejících z chovů FgÚ AV ČR. Jeden jedinec zemřel ještě před započítáním experimentu z důvodu anestezie thiopentalem sodným, druhý byl vyřazen kvůli poruchám kontraktility. V důsledku fibrilace na počátku reperfuze chybí jedno měření reperfuzních arytmií. Velikost jednotlivých skupin a počty experimentů dokládá tabulka č. 11.

Skupina	počet zvířat	ischemické arytmie	reperfuzní arytmie	velikost infarktu
kontroly	6	5	2	2
nové kontroly	12	10	9	9

Tabulka č. 11: Počet potkanů před zahájením experimentu, počet provedených pokusů na ischemické a reperfuzní arytmie a na analýzu velikosti infarktu u obou experimentálních skupin. Kontroly – kontrolní potkani ze série II, nové kontroly – kontrolní potkani, kteří byli perfundováni Krebs-Henseleitovým roztokem s poloviční koncentrací Ca^{2+} .

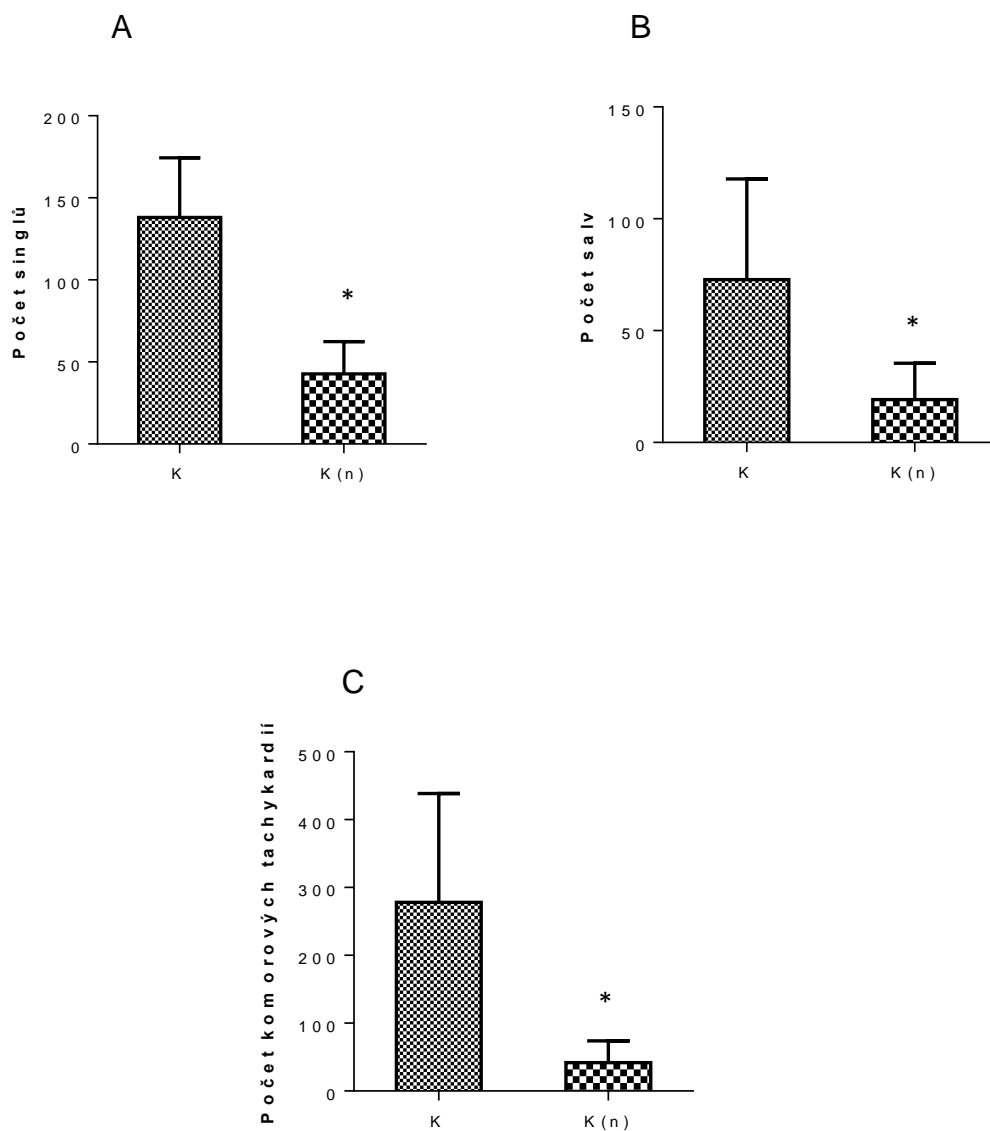
5.3.1. Ischemické a reperfuzní arytmie

5.3.1.1. Ischemické arytmie

Snížením koncentrace Ca^{2+} u „nových kontrol“ (ti potkani, kterým bylo srdce perfundováno Krebs-Henseleitovým roztokem s poloviční koncentrací vápenatých iontů) signifikantně poklesly všechny 3 typy arytmií, (A) jednoduché předčasné komorové stahy, (B) salvy i (C) komorové tachykardie (viz graf č. 15). Průměrné hodnoty byly – (singly: *kontroly* - $138 \pm 36,5$; *nové kontroly* - $42,8 \pm 19,6$; salvy: *kontroly* - $72,8 \pm 45$; *nové kontroly* - $19,2 \pm 16,2$; VT: *kontroly* - $278,3 \pm 160,3$; *nové kontroly* - $41,7 \pm 32,4$).

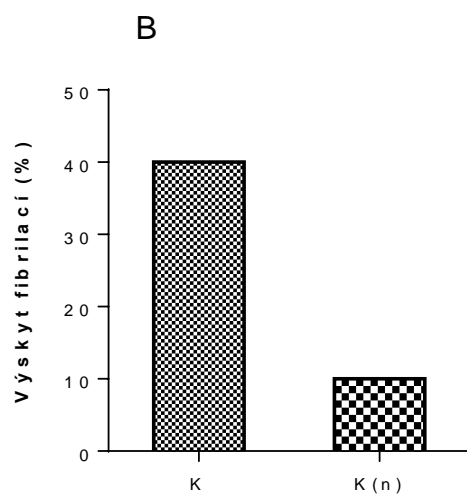
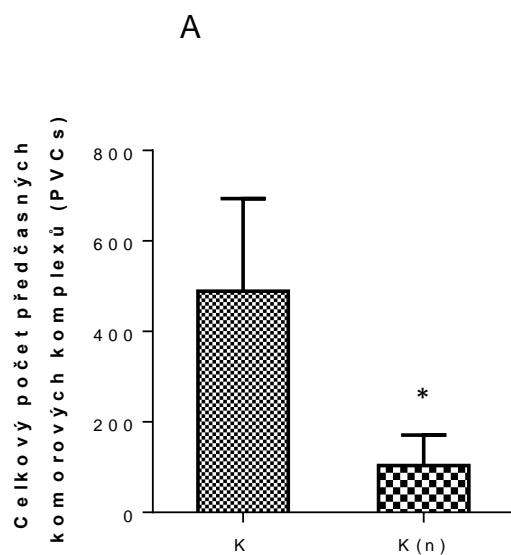
Jelikož jsme pozorovali významné snížení jednotlivých typů komorových arytmií u nových kontrol (viz graf č. 15), statisticky významného poklesu dosáhl i celkový počet předčasných komorových komplexů (viz graf č. 16A). Co se týče procentuálního výskytu fibrilací (B), zde nebyl signifikantní pokles zaznamenán i přesto, že je zde patrné výrazné snížení u nových kontrol (PVCs: *kontroly* - $489 \pm 204,6$; *nové kontroly* - $103,7 \pm 67,1$; VF: *kontroly* – 40 %; *nové kontroly* – 10 %).

Graf č. 17 ilustruje dobu trvání tachyarytmií (A) a hodnotu ischemického skóre (B). U kontrol s nižší koncentrací Ca^{2+} se v menší míře vyskytovaly závažnější formy komorových arytmií (tachykardie a fibrilace), proto i hodnota ischemického skóre byla signifikantně nižší, než u kontrol s vyšší hladinou vápníku (*kontroly* - $3,6 \pm 0,4$; *nové kontroly* - $1,6 \pm 0,3$). S redukcí tachykardií a fibrilací souvisí i znatelně nižší doba trvání tachyarytmií (*kontroly* – $40,3 \pm 21,8$ s; *nové kontroly* – $18,5 \pm 17$ s).



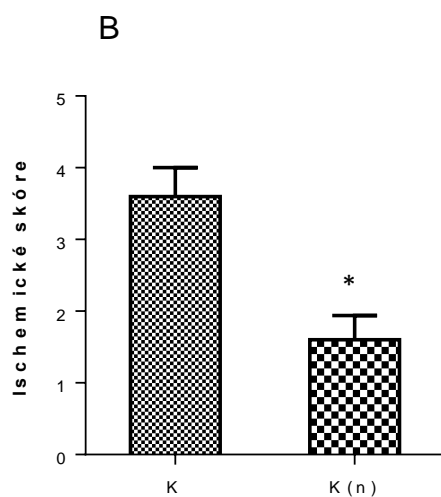
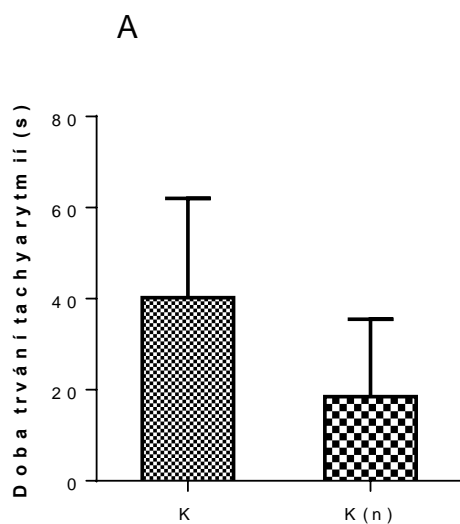
Graf č. 15: Ischemické arytmie. A – počet jednoduchých předčasných komorových stahů, B – počet salv, C – počet komorových tachykardií u obou experimentálních skupin. K – kontroly, Kn – nové kontroly, s poloviční koncentrací Ca^{2+} v Krebs-Henseleitově roztoku. Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru.

***P < 0,05 vs. kontroly**



Graf č. 16: Ischemické arytmie. A – celkový počet předčasných komorových komplexů, B – procentuální výskyt komorových fibrilací v obou experimentálních skupinách. K – kontroly, Kn – nové kontroly, s poloviční koncentrací Ca^{2+} v Krebs-Henseleitově roztoku. Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru.

***P < 0,05 vs. kontroly**



Graf č. 17: Ischemické arytmie. A – doba trvání tachyarytmii, B – hodnota ischemického skóre u obou experimentálních skupin. K – kontroly, Kn – nové kontroly, s poloviční koncentrací Ca^{2+} v Krebs-Henseleitově roztoku. Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru.

*P < 0,05 vs. kontroly

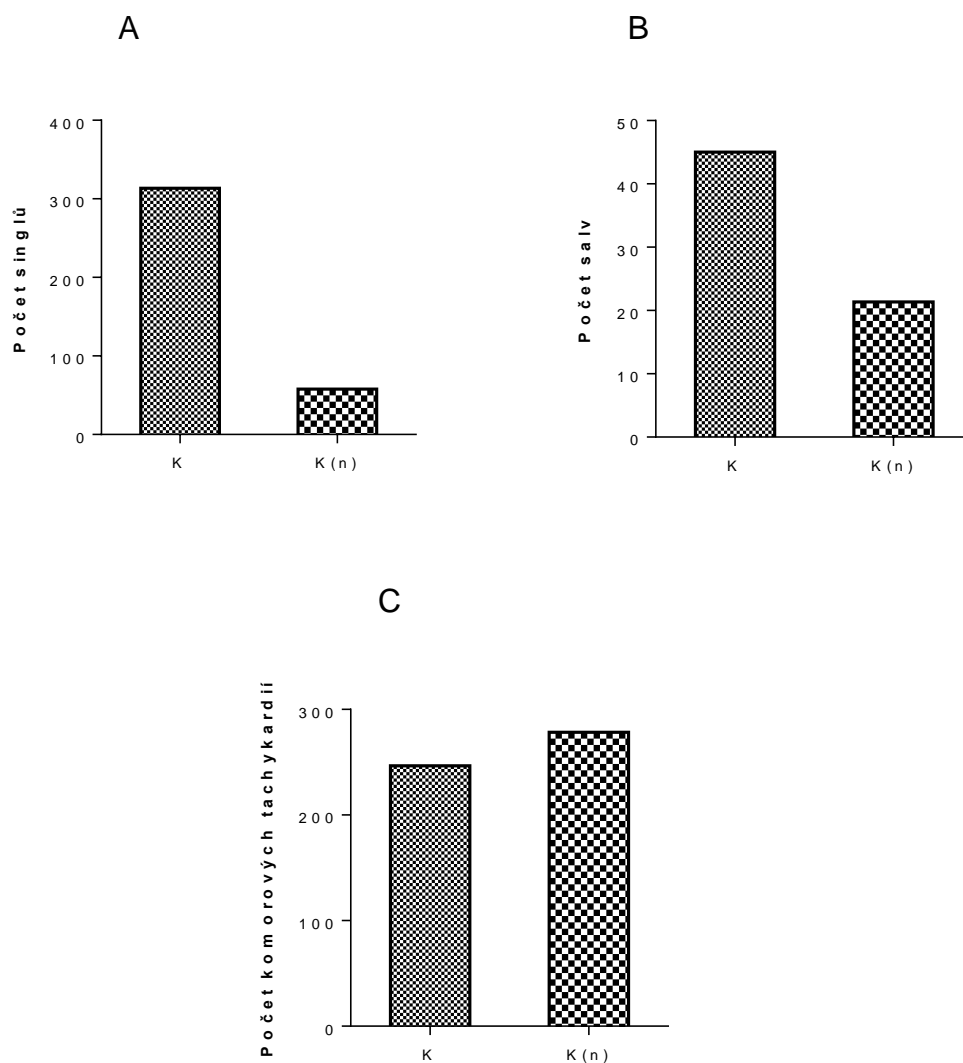
5.3.1.2. Reperfuzní arytmie

Protože jsme porovnávali reperfuzní arytmie s kontrolami ze série II, vzniká zde stejný problém jako v kapitole 5.2.1.2. Pro nedostatek potkanů, kteří odolali akutní ischemii, budou v této a následující kapitole 5.3.2. uváděny pouze průměry jednotlivých parametrů bez střední chyby průměru. Z tohoto důvodu nemůžeme určit, zda-li byl v některém parametru reperfuzní arytmogeneze a velikosti infarktu rozdíl signifikantní.

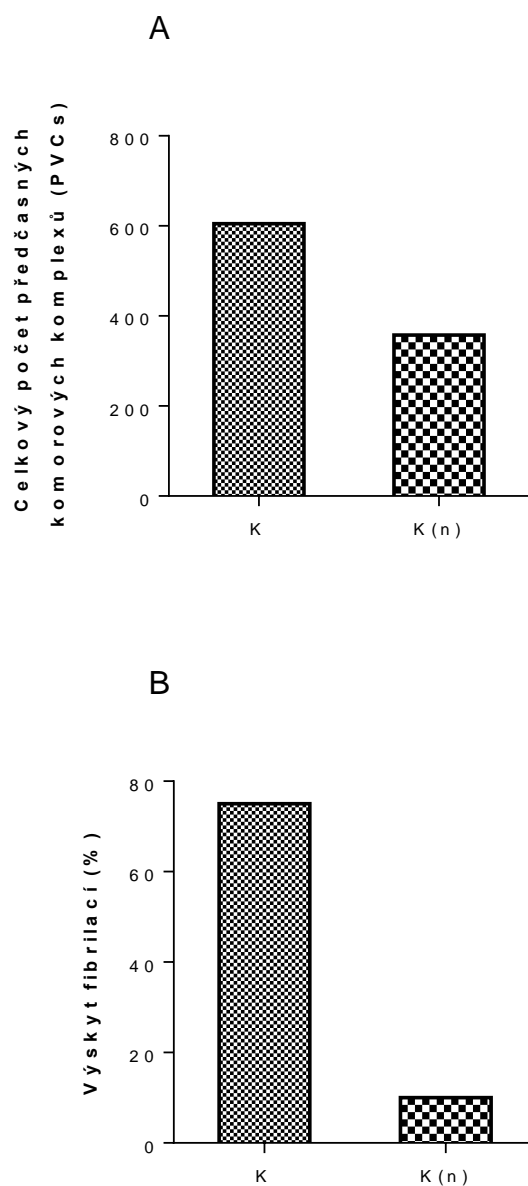
Podobně jako v případě ischemických arytmii (viz graf č. 15), i u reperfuzních singlů (A) a salv (B) je z grafu č. 18 patrný trend ve snižování jejich počtu u nových kontrol (singly: *kontroly* - 313,5; *nové kontroly* – 57,9; salvy: *kontroly* - 45; *nové kontroly* - 21,3). Komorové tachykardie (C) se v reperfuzi objevovaly u obou skupin téměř ve stejném množství (*kontroly* - 246,5; *nové kontroly* – 278,4).

Z důvodu menšího výskytu singlů a salv u nových kontrol (viz graf č. 18), byl i celkový počet předčasných komorových komplexů redukován (*kontroly* - 605; *nové kontroly* – 357,7), jak ukazuje graf č. 19A. Fibrilace v reperfuzi se objevily u kontrolní skupiny v daleko větší míře, než u nových kontrol (viz graf č. 19B). Průměr jejich hodnot byl roven - *kontroly* – 75 %; *nové kontroly* – 10 %.

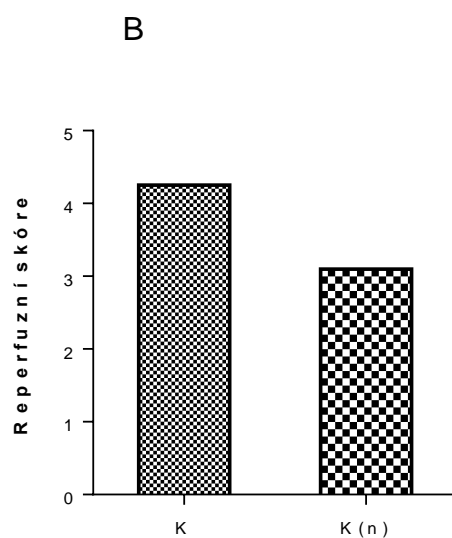
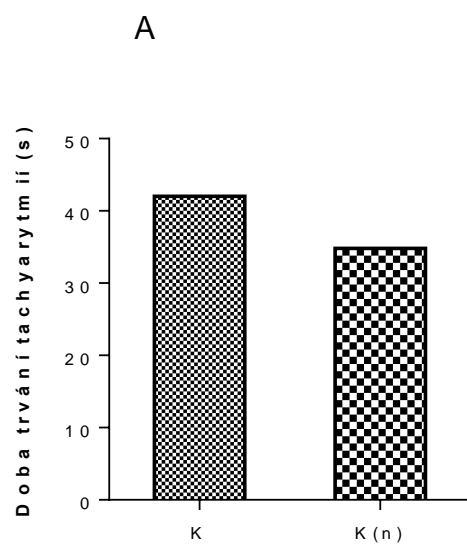
Graf č. 20 ukazuje, že doba trvání tachyarytmii (A) byla u obou skupin podobná, došlo jen k nevýraznému snížení u skupiny nových kontrol (*kontroly* – 42 s; *nové kontroly* – 34,8 s). Reperfuzní skóre (viz graf č. 20B) bylo u nových kontrol přibližně o 1 bod nižší (*kontroly* - 4,3; *nové kontroly* – 3,1), což napovídá o menším výskytu fibrilací v této skupině.



Graf č. 18: Reperfuzní arytmie. A – počet předčasných jednoduchých komorových stahů, B – počet salv, C – počet komorových tachykardií u obou experimentálních skupin. K – kontroly, Kn – nové kontroly, s poloviční koncentrací Ca^{2+} v Krebs-Henseleitově roztoku. Hodnoty jsou uváděny jako průměr.



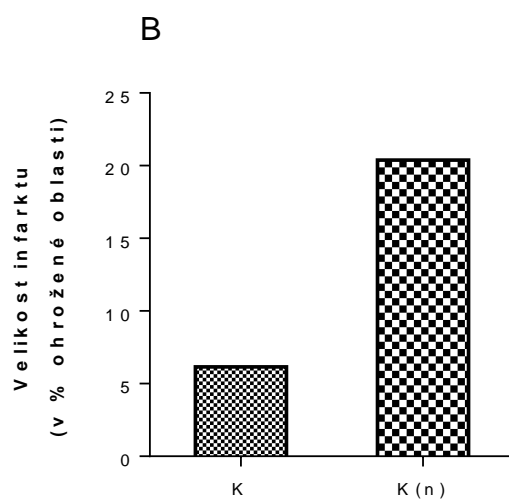
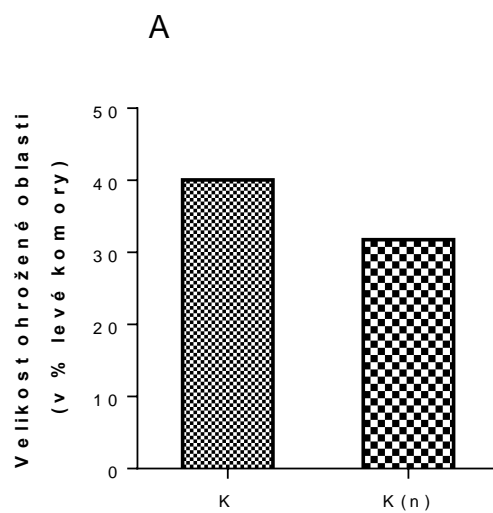
Graf č. 19: Reperfuční arytmie. A – celkový počet předčasných komorových komplexů, B – procentuální výskyt komorových fibrilací u obou experimentálních skupin. K – kontroly, Kn – nové kontroly, s poloviční koncentrací Ca^{2+} v Krebs-Henseleitově roztoku. Hodnoty jsou uváděny jako průměr.



Graf č. 20: Reperfuční arytmie. A – doba trvání tachyarytmií, B – hodnota reperfučního skóre u obou experimentálních skupin. K – kontroly, Kn – nové kontroly, s poloviční koncentrací Ca^{2+} v Krebs-Henseleitově roztoku. Hodnoty jsou uváděny jako průměr.

5.3.2. Velikost infarktu

Graf č. 21 znázorňuje porovnání relativních velikostí ohrožených oblastí vztažených na % velikosti levé komory (AR/LV) u obou experimentálních skupin (A). Vypočtené hodnoty mezi skupinami se výrazně nelišily (*kontroly* – 40,1 %; *nové kontroly* – 31,8 %). Relativní velikost infarktu (IS/AR) vztažena na velikost ohrožené oblasti byla u obou skupin - (*kontroly* – 6,2 %; *nové kontroly* – 20,4 %), viz graf č. 21B. Průměrné hodnoty týkající se měřených parametrů v rámci analýzy velikosti infarktu vyšly pro tento experiment téměř totožné s experimentem se sérií II.



Graf č. 21: Velikost infarktu. A – velikost ohrožené oblasti levé komory, B – velikost infarktu vztažena na velikost ohrožené oblasti u obou experimentálních skupin. K – kontroly, Kn – nové kontroly, s poloviční koncentrací Ca^{2+} v Krebs-Henseleitově roztoku. Hodnoty jsou uváděny jako průměr.

6. Diskuze

6.1. Shrnutí výsledků

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální kardioprotektivní účinky podávání morfinu a metadonu laboratorním potkanům po dobu 10 a 28 dnů. V experimentu, kdy jsme podávali morfin a metadon potkanům po dobu 10 dnů nedošlo k žádné signifikantní změně v porovnání s kontrolními jedinci. Pozorovali jsme některé výrazné změny v arytmogenezi, nicméně v důsledku vysoké heterogenity statisticky nevýznamné (snížení počtu salv v průběhu ischemie respektive reperfuze o 54 % a o 62% u skupiny metadon 10; snížení počtu reperfuzních komorových tachykardií o 50% u zvířat, kterým byl 10 dní podáván morfin, což vedlo k poklesu průměrné doby trvání reperfuzních tachyarytmií téměř o polovinu, poloviční procentuální výskyt ischemických komorových fibrilací u skupiny morfin 10 oproti metadonu 10, v reperfuzi byl však výskyt fibrilací u metadonové skupiny čtvrtinový, oproti skupině, které byl podáván morfin).

V experimentu analyzující vliv 28mi denního podávání metadonu jsme mohli statisticky hodnotit pouze ischemické arytmie (důvody jsou uvedeny v kapitole 6.4.), kde k žádným významným změnám nedošlo. Bylo pozorováno jen lehké zvýšení procentuálního výskytu ischemických fibrilací a prodloužení doby trvání tachyarytmií u skupiny potkanů, kterým byl podáván metadon.

Co se týká pokusu pouze na kontrolách, zde jsme také mohli statisticky vyhodnotit pouze ischemické arytmie (viz kapitola 6.4.). Signifikantní snížení se projevilo u všech druhů ischemických komorových arytmí u kontrol, které byly perfundovány Krebs-Henseleitovým roztokem s poloviční koncentrací Ca^{2+} (tzv. nové kontroly). S tím souvisí i signifikantní snížení ischemického skóre oproti kontrolám ze série II. Ačkoliv procentuální výskyt ischemických fibrilací nedosáhl statistické významnosti, u nových kontrol byl tento výskyt 4krát menší než u kontrol ze série II.

6.2. Protektivní úloha opioidů

Morfin a metadon patří do skupiny opioidů, látek působící na OR. I přes odlišnou chemickou strukturu mají velmi podobné vlastnosti. O opioidech obecně je již několik let známo, že mají vliv na kardiovaskulární systém. Před téměř 20 lety se zjistilo, že podání opioidu před okluzí koronární artérie snižuje velikost infarktu myokardu (Schultz a kol., 1995). Později bylo prokázáno, že tento efekt je zprostředkován převážně δ_1 OR (Schultz a kol., 1998), i když v určité míře se na kardioprotekci mohou podílet všechny 3 typy OR (Wu a kol., 2004). Jedním z opioidů, u kterého bylo zjištěno, že signifikantně snižuje velikost poškození srdce, je právě morfin (Schultz a kol., 1996). V signální dráze kardioprotekce vyvolané opioidy se uplatňuje hlavně PKC, mitochondriální K_{ATP} kanály, MAP kinázy a tyrozin kinázy (Schultz a Gross, 2001). Podání morfinu nebo jiných opioidů má protektivní účinky na myokard nejen, pokud jsou podány těsně před ischemií, ale i bezprostředně před reperfuzí (Chen a kol., 2008). Všechny tyto studie byly zaměřeny na akutní podávání opioidů. Nás ale spíše zajímaly účinky jejich dlouhodobé aplikace.

V našem experimentu jsme zkoumali vliv 10ti denního podávání morfinu na ischemickou citlivost srdce. Jak bylo prezentováno ve výsledkové části, v důsledku chronického podávání morfinu nedošlo k signifikantní změně, ať už u ischemických a reperfuzních arytmií nebo u velikosti infarktu myokardu. Tyto výsledky se shodují s předchozí prací, kdy podávání stejné dávky morfinu potkanům po dobu 10 dnů také nemělo významný vliv na velikost infarktu myokardu na modelu anestezovaného uměle ventilovaného potkana (Skrabalova a kol., 2012). Na rozdíl od našeho pokusu bylo pozorováno v této studii snížení výskytu a počtu ischemických arytmií. Zdá se tedy, že rozdílné metodické přístupy (izolované perfundované srdce vs. srdce *in situ*) ke studiu ischemických a reperfuzních arytmií mohou hrát významnou roli při studiu citlivosti srdce potkana k ischemickým a reperfuzním arytmiím. K podobným závěrům dospěla např. studie Asemu a kol. (2000), analyzující ischemické arytmie na obou experimentálních modelech u potkanů adaptovaných na chronickou intermitentní hypoxii různé intenzity.

Jiná studie se věnovala tématu, zda-li dlouhodobá aplikace morfinu změní expresi proteinů v potkaním srdci. Potkani dostávali vysoké dávky morfinu (10 mg/kg/den) po dobu 10 dnů. Výrazně změněné hladiny exprese byly nalezeny u 9

proteinů. Jednalo se o signální nebo stavební proteiny (Drastichova a kol., 2011). Stejná skupina vědců o rok později publikovala studii porovnávající expresi proteinů na konci 10 denního podávání a dále 3 a 6 dní po skončení stimulace opioidy. Zjistili, že až 237 proteinů má změněnou expresi v důsledku léčby morfinem nebo po jeho vysazení. K většině změn došlo na úrovni myokardiálních cytosolických proteinů po 3 denní abstinenci. Výrazně také vzrostla hladina tzv. heat shock proteinů. Další změny se týkaly pro- a anti-apoptotických proteinů (Drastichova a kol., 2012).

Další experimenty analyzující vliv chronického podávání morfinu byly udělány v rámci diplomové práce Bartoňové (2011), kdy bylo zjištěno, že podávání morfinu po dobu 28 dní má protektivní vliv na velikost infarktu myokardu na modelu srdce *in situ*, zatímco na arytmiie nemá vliv žádný. Zdá se tedy, že v ischemické toleranci srdce potkana za podmínek chronického působení morfinu hraje také významnou úlohu doba jeho působení. S tímto experimentem jsou ale v rozporu výsledky pokusu Chan a kol. (1987), kde byl morfin podáván potkanům v pitné vodě po dobu 3 týdnů. U těchto potkanů došlo ke snížení výskytu časných komorových arytmií, zatímco u potkanů, kterým byl v tomto experimentu podán morfin akutně, k žádné významné změně v incidenci arytmií nedošlo.

Jiná publikace ukazuje, že dlouhodobé podávání vysokých dávek morfinu podstatně mění funkci adenylát cyklázové signalizace, regulované myokardiálními G-proteiny. Např. množství adenylát cyklázové izoformy V/VI se stimulací morfinem po dobu 10 dnů téměř zdvojnásobilo (Skrabalova a kol., 2012).

Peart a Gross (2004) prováděli pokusy s chronickým morfinem na myších, který jim byl podáván po dobu 5 dnů. Jejich výsledky ukázaly, že zvýšená tolerance k ischemii vyvolaná touto dlouhodobou aplikací morfinu je dokonce větší než protekce vyvolaná akutním podáním. Kromě toho objevili, že tato ochrana přetrvává ještě 48 h po ukončení aplikace morfinu. Ještě ten samý rok tito vědci přišli s otázkou, jestli je míra kardioprotekce vyvolaná morfinem srovnatelná u mladých a starých jedinců, když je známo, že odolnost k ischemii se s věkem snižuje. Zjistili, že při chronickém podávání metadonu (v tomto případě opět 5 dní) je velikost infarktu snížena jak u mláďat, tak u dospělých myší, zatímco při akutním podání je zvýšená odolnost myokardu k ischemii patrná pouze u mladých jedinců (Peart a Gross, 2004). Tato

studie naznačuje, že u starých jedinců je třeba intenzivnější a dlouhodobá stimulace k aktivaci kardioprotekce.

Tyto výsledky ukazují komplexní pohled na kvantitativní změny v myokardiálním proteomu a ischemické toleranci srdce v důsledku léčby nebo odnětí přísunu morfinu. Ukazují tak, že vliv morfinu na myokard nespočívá pouze v jeho kardioprotektivním působení na velikost infarktu, které se nám ale při 10ti denní aplikaci v souladu s dostupnou literaturou nepodařilo prokázat. Zvýšená tolerance srdce v důsledku aplikace morfinu je podle všeho závislá na délce podávání této látky.

6.3. Vliv metadonu na srdce

Studii týkající se morfinu je celá řada, zatímco o působení jiného opioidu, metadonu, na myokard není známo téměř nic. O jeho akutním účinku vyšla jen jediná publikace, která navíc srovnává kardioprotektivní působení metadonu a morfinu, stejně jako jsme provedli my u experimentů se sérií I. V této publikaci bylo největšího snížení velikosti infarktu dosaženo v dávce 0,3 mg/kg u obou opioidů, pokud byli podáni 30 min před ischemií nebo 5 min před reperfuzí a pokud ischemie trvala pouze 30 min (Gross a kol., 2009).

O jeho vlivu na myokard při dlouhodobém podávání není v literatuře žádná zmínka, proto jsme se rozhodli provést experiment týkající se této problematiky. Účinky metadonu na potkaní myokard jsme chtěli porovnat s výsledky pro morfin (jako Gross ve svém experimentu), proto jsme ho aplikovali po dobu 10 a 28 dnů, tedy stejně dlouho, jako předchozí studie zabývající se vlivem morfinu. Podobně jako u morfinu 10, tak ani u metadonu 10 nedošlo k žádnému statisticky významnému rozdílu u výskytu a závažnosti ischemických a reperfuzních arytmií, ani u velikosti plochy zasažené infarktem. Jak již bylo řečeno, v experimentu na podávání morfinu po dobu 28 dnů neměl morfin vliv na výskyt arytmií (Bartoňová 2011), což naše výsledky ukazují i při aplikaci metadonu (alespoň u ischemických arytmií, u kterých bylo možné zjišťovat statisticky významné rozdíly).

Jeden z nejprozkoumanějších účinků metadonu na lidský myokard byl popsán jako prodloužení QT intervalu v elektrokardiogramu (Vallecillo a kol., 2013). Jiná

publikace se zabývala tím, že mnoho případů komorových arytmií a srdečních zástav u lidí je spojeno s léčbou metadonem. Větší riziko arytmií bylo pozorováno v případech, kdy se kombinoval metadon s antiretrovirotiky u pacientů nakažených HIV (Kao a kol., 2013). Dále je známo, že užívání diazepamů nebo jiných benzodiazepinů v metadonové substituční léčbě může zvyšovat riziko náhlé smrti, pravděpodobně v důsledku výskytu závažných komorových arytmií (Kuryshv a kol., 2010). Tyto studie naznačují zvýšené riziko maligních forem komorových arytmií v důsledku léčby metadonem, nicméně v našem experimentálním uspořádání jsme jednoznačné výsledky potvrzující změny v citlivosti srdce k arytmiím nepozorovali.

Jiná studie se zabývala rozdílem mezi metadonem a morfinem aplikovaným bdělým psům na kardiorespirační funkce. Účinek metadonu je koncentračně závislý, ale má silnější účinky na snížení kardiorespiračních funkcí než morfin (snížení parciálního tlaku kyslíku a srdeční frekvence) (Maiante a kol., 2009). Je možné, že tyto účinky má metadon i na lidské kardiorespirační funkce, čímž by mohl některým jedincům na substituční metadonové léčbě přivodit zdravotní potíže.

Jak je vidět, metadon může mít na srdce negativní i pozitivní účinky, závislé na mnoha okolnostech. Nelze tedy vyvozovat jednoznačné závěry, jestli je podávání metadonu pro srdce spíše přínosem nebo ne. Studium jeho kardioprotektivních účinků je v samém začátku, ale jelikož experiment Grosse a kol. (2009) poukazuje na redukci velikosti infarktu vlivem metadonu, stálo by za to se tímto tématem dále zabývat. Navíc díky své podobnosti s účinky morfinu se zde nabízí otázka, na kterou jsme hledali odpověď: jestli podobně jako morfin může i aplikace metadonu po dobu 28 dnů zmenšit velikost infarktu. Tímto směrem by se tedy mohly ubírat další experimenty zaměřené na téma opioidů v kardioprotekci.

6.4. Metodické problémy se sérií II

Jak již bylo uvedeno ve výsledcích, nebylo možné statisticky vyhodnotit všechny experimenty, a to reperfuzní arytmiie a velikost infarktu u série II. Při plánování pokusu se sérií II nastaly komplikace s dodávkou potkanů. Oddělení Vývojové kardiologie FgÚ AV ČR již řadu let odebírá laboratorní potkany kmene Wistar z chovu společnosti Velaz. V důsledku genetického kontaminování chovu

potkanů a infekční nákaze, která v této firmě propukla, jsme byli nuceni změnit dodavatele. K dispozici jsme měli potkany kmene Wistar z chovů FgÚ AV ČR. Na začátku reperfuze v experimentu se sérií II nám polovina potkanů zemřela v důsledku přetrvávajících fibrilací, ačkoliv průběh ischemie byl v pořádku, srovnatelný se sérií I. Tyto fibrilace se vyskytovaly jak u skupiny kontrol, tak u skupiny, která dostávala metadon, tudíž se vliv dlouhodobého podávání metadonu na zvětšený výskyt komorových fibrilací jeví jako nepravděpodobný. Přitom zvířata z obou sérií byla chována za stejných podmínek a krmena stejnou dietou. Experimentální protokol byl také totožný. Pokusy se sérií I jsme prováděli v únoru, se sérií II v květnu, nelze tedy zcela vyloučit, že odlišné roční období mělo nějaký vliv na arytmogenezi v důsledku akutní ischemie a reperfuze. Dále je zde fakt, že potkani ze série II byli o něco starší (přibližně o 14 dnů - 3 týdny) a vážili průměrně o 150 g víc než potkani ze série I. I toto vysvětlení není příliš pravděpodobné, neboť dřívější pokusy na Oddělení Vývojové kardiologie FgÚ AV ČR neprokázaly odlišnou citlivost srdcí laboratorních potkanů k ischemickým arytmiím ve věkovém rozmezí 3 - 6 měsíců (Neckár a kol., 2004). Jako nejpravděpodobnější důvod se ale jeví změna dodavatelské firmy, ze které jsme potkany nakupovali. Ačkoliv šlo v obou případech o kmen Wistar a byli chováni stejným způsobem, rozdíly mezi nimi byly evidentní.

Pro další experimenty bylo nutné, aby zvířata akutní ischemii přeživala. Jako jedno řešení, které jsme se rozhodli vyzkoušet, bylo snížení koncentrace Ca^{2+} v perfuzním Krebs-Henseleitově roztoku, kterým bylo srdce v průběhu pokusu perfundováno. Zlepšení přežívání bylo patrné už v průběhu pokusů, jen jeden jedinec byl díky přetrvávající reperfuze fibrilaci z experimentu vyřazen. Signifikantní snížení arytmogeneze se projevilo u všech druhů ischemických komorových arytmií u nových kontrol. S tím souvisí i signifikantní snížení ischemického skóre oproti kontrolám ze série II. Je tedy patrné, že snížení koncentrace Ca^{2+} mělo antiarytmický efekt, patrně v důsledku snížení excitability myocytů a omezení vzniku Ca^{2+} -indukovaných arytmií. Pro další experimenty na izolovaném perfundovaném srdci s potkany z chovu FgÚ AV tedy bude lepší používat Krebs-Henseleitův roztok s poloviční koncentrací Ca^{2+} , abychom z pokusů získali dostatečné množství dat a experimenty byly více efektivní.

7. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vlivem dlouhodobého podávání metadonu (10 a 28 dnů) na výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií a na velikost infarktu na potkaním myokardu ve srovnání s morfinem. Na základě provedených experimentů jsme došli k těmto závěrům:

1) Podávání metadonu potkanům po dobu 10 dnů nemělo významný vliv na výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií ani neovlivnilo velikost infarktu myokardu.

2) Podávání metadonu potkanům po dobu 28 dnů nemělo významný vliv na ischemické arytmie. Jeho vliv na reperfuzní arytmie a velikost infarktu myokardu jsme nemohli prokázat vzhledem k vysokému výskytu přetrvávajících komorových fibrilací.

8. Použitá literatura

Arroyo, C. M., J. H. Kramer, B. F. Dickens and W. B. Weglicki (1987). "Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO." FEBS Lett **221**(1): 101-104.

Asemu, G., J. Neckár, O. Szárszoi, F. Papousek, B. Ostádal and F. Kolar (2000). "Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats." Physiol Res **49**(5): 597-606.

Asemu, G., F. Papousek, B. Ostádal and F. Kolár (1999). "Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel." J Mol Cell Cardiol **31**(10): 1821-1831.

Baines, C. P., M. Goto and J. M. Downey (1997). "Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium." J Mol Cell Cardiol **29**(1): 207-216.

Barrère-Lemaire, S., N. Combes, C. Sportouch-Dukhan, S. Richard, J. Nargeot and C. Piot (2005). "Morphine mimics the antiapoptotic effect of preconditioning via an Ins(1,4,5)P3 signaling pathway in rat ventricular myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(1): H83-88.

Bartoňová, I. (2011). Vliv morfinu na expresi a distribuci alfa a beta podjednotek trimerních G-proteinů v myokardu potkana. Diplomová práce PŘF UK, Praha.

Bolli, R., M. O. Jeroudi, B. S. Patel, O. I. Aruoma, B. Halliwell, E. K. Lai and P. B. McCay (1989). "Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury." Circ Res **65**(3): 607-622.

Bolli, R., M. O. Jeroudi, B. S. Patel, C. M. DuBose, E. K. Lai, R. Roberts and P. B. McCay (1989). "Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(12): 4695-4699.

Bolli, R., B. S. Patel, M. O. Jeroudi, E. K. Lai and P. B. McCay (1988). "Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron." J Clin Invest **82**(2): 476-485.

Braunwald, E. and R. A. Kloner (1982). "The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction." Circulation **66**(6): 1146-1149.

Chan, M. Y., S. Dai and W. W. Ko (1987). "Effects of morphine on cardiovascular responses to acute myocardial ischaemia in rats." Br J Pharmacol **90**(3): 537-543.

Charlat, M. L., P. G. O'Neill, C. J. Hartley, R. Roberts and R. Bolli (1989). "Prolonged abnormalities of left ventricular diastolic wall thinning in the "stunned" myocardium in

conscious dogs: time course and relation to systolic function." J Am Coll Cardiol **13**(1): 185-194.

Chen, Z. L., T. Z. Li and B. X. Zhang (2008). "Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts." Journal of Surgical Research **145**(2): 287-294.

Cohen, M. V. and J. M. Downey (2011). "Ischemic Postconditioning: From Receptor to End-Effector." Antioxidants & Redox Signaling **14**(5): 821-+.

Crestanello, J. A., D. M. Lingle, J. Kamelgard, J. Millili and G. J. Whitman (1996). "Ischemic preconditioning decreases oxidative stress during reperfusion: a chemiluminescence study." J Surg Res **65**(1): 53-58.

Curtis, M. J. and D. J. Hearse (1989). "Reperfusion-induced arrhythmias are critically dependent upon occluded zone size: relevance to the mechanism of arrhythmogenesis." J Mol Cell Cardiol **21**(6): 625-637.

Das, D. K., N. Maulik, M. Sato and P. S. Ray (1999). "Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart." Mol Cell Biochem **196**(1-2): 59-67.

Dickinson, B. C., D. Srikun and C. J. Chang (2010). "Mitochondrial-targeted fluorescent probes for reactive oxygen species." Curr Opin Chem Biol **14**(1): 50-56.

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

Drastichova, Z., J. Skrabalova, P. Jedelsky, J. Neckar, F. Kolar and J. Novotny (2012). "Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal." PLoS One **7**(10): e47167.

Drastichova, Z., J. Skrabalova, J. Neckar, F. Kolar and J. Novotny (2011). "Prolonged morphine administration alters protein expression in the rat myocardium." J Biomed Sci **18**: 89.

Evans, P. and B. Halliwell (1999). "Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria." Ann N Y Acad Sci **884**: 19-40.

Fleet, W. F., T. A. Johnson, C. A. Graebner and L. S. Gettes (1985). "Effect of serial brief ischemic episodes on extracellular K⁺, pH, and activation in the pig." Circulation **72**(4): 922-932.

Forbes, R. A., C. Steenbergen and E. Murphy (2001). "Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism." Circ Res **88**(8): 802-809.

Forkel, J., X. Chen, S. Wandinger, F. Keser, A. Duschin, U. Schwanke, S. Frede, P. Massoudy, R. Schulz, H. Jakob and G. Heusch (2004). "Responses of chronically hypoxic rat hearts to ischemia: KATP channel blockade does not abolish increased RV tolerance to ischemia." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(2): H545-551.

Fralix, T. A., E. Murphy, R. E. London and C. Steenbergen (1993). "Protective effects of adenosine in the perfused rat heart: changes in metabolism and intracellular ion homeostasis." Am J Physiol **264**(4 Pt 1): C986-994.

Fryer, R. M., A. K. Hsu, J. T. Eells, H. Nagase and G. J. Gross (1999). "Opioid-induced second window of cardioprotection - Potential role of mitochondrial K-ATP channels." Circulation Research **84**(7): 846-851.

Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.

Griffiths, E. J., C. J. Ocampo, J. S. Savage, G. A. Rutter, R. G. Hansford, M. D. Stern and H. S. Silverman (1998). "Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes." Cardiovasc Res **39**(2): 423-433.

Griffiths, E. J., C. J. Ocampo, J. S. Savage, M. D. Stern and H. S. Silverman (2000). "Protective effects of low and high doses of cyclosporin A against reoxygenation injury in isolated rat cardiomyocytes are associated with differential effects on mitochondrial calcium levels." Cell Calcium **27**(2): 87-95.

Gross, E. R., A. K. Hsu and G. J. Gross (2004). "Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts." Circulation Research **94**(7): 960-966.

Gross, E. R., A. K. Hsu and G. J. Gross (2004). "Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts." Circ Res **94**(7): 960-966.

Gross, E. R., A. K. Hsu and G. J. Gross (2009). "Acute methadone treatment reduces myocardial infarct size via the delta-opioid receptor in rats during reperfusion." Anesth Analg **109**(5): 1395-1402.

Hanlon, P. R., P. Fu, G. L. Wright, C. Steenbergen, M. O. Arcasoy and E. Murphy (2005). "Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling." FASEB J **19**(10): 1323-1325.

Hausenloy, D. J., M. R. Duchon and D. M. Yellon (2003). "Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury." Cardiovasc Res **60**(3): 617-625.

Hausenloy, D. J., M. M. Mocanu and D. M. Yellon (2004). "Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning." Cardiovasc Res **63**(2): 305-312.

Hausenloy, D. J., A. Tsang and D. M. Yellon (2005). "The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning." Trends Cardiovasc Med **15**(2): 69-75.

Heusch, G., A. Büchert, S. Feldhaus and R. Schulz (2006). "No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice." Basic Res Cardiol **101**(4): 354-356.

Hurtado, A. (1960). "Some clinical aspects of life at high altitudes." Ann Intern Med **53**: 247-258.

Imahashi, K., C. Pott, J. I. Goldhaber, C. Steenbergen, K. D. Philipson and E. Murphy (2005). "Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury." Circ Res **97**(9): 916-921.

Imahashi, K., M. D. Schneider, C. Steenbergen and E. Murphy (2004). "Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury." Circ Res **95**(7): 734-741.

Jennings, R. B., C. Murry and K. A. Reimer (1990). "Myocardial effects of brief periods of ischemia followed by reperfusion." Adv Cardiol **37**: 7-31.

Jeroudi, M. O., F. J. Triana, B. S. Patel and R. Bolli (1990). "Effect of superoxide dismutase and catalase, given separately, on myocardial "stunning"." Am J Physiol **259**(3 Pt 2): H889-901.

Jurkovicová, O. and S. Cagán (1998). "[Reperfusion arrhythmias]." Bratisl Lek Listy **99**(3-4): 162-171.

Kao, D., B. Bucher Bartelson, V. Khatri, R. Dart, P. S. Mehler, D. Katz and M. J. Krantz (2013). "Trends in reporting methadone-associated cardiac arrhythmia, 1997-2011: an analysis of registry data." Ann Intern Med **158**(10): 735-740.

Karmazyn, M. (1988). "Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na⁺-H⁺ exchange." Am J Physiol **255**(3 Pt 2): H608-615.

Kevin, L. G., A. K. Camara, M. L. Riess, E. Novalija and D. F. Stowe (2003). "Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(2): H566-574.

Kim, J. S., Y. Jin and J. J. Lemasters (2006). "Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(5): H2024-2034.

King, L. M. and L. H. Opie (1996). "Does preconditioning act by glycogen depletion in the isolated rat heart?" J Mol Cell Cardiol **28**(12): 2305-2321.

Kloner, R. A., S. G. Ellis, R. Lange and E. Braunwald (1983). "Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage." Circulation **68**(2 Pt 2): 18-15.

- Kloner, R. A. and R. B. Jennings (2001). "Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications - Part 1." Circulation **104**(24): 2981-2989.
- Klíčková, K. (2007). Vliv morfinu na G - proteiny řízenou signalizaci a jeho potenciální kardioprotektivní účinek. Diplomová práce PŘF UK, Praha.
- Kopecky, M. and S. Daum (1958). "[Adaptation of the myocardium to altitude anoxia]." Cesk Fysiol **7**(3): 218-219.
- Kuryshev, Y. A., A. Bruening-Wright, A. M. Brown and G. E. Kirsch (2010). "Increased cardiac risk in concomitant methadone and diazepam treatment: pharmacodynamic interactions in cardiac ion channels." J Cardiovasc Pharmacol **56**(4): 420-430.
- Lesnefsky, E. J., Q. Chen, S. Moghaddas, M. O. Hassan, B. Tandler and C. L. Hoppel (2004). "Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria." J Biol Chem **279**(46): 47961-47967.
- Liang, B. T. and G. J. Gross (1999). "Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and K-ATP channels." Circulation Research **84**(12): 1396-1400.
- Lishmanov, I. B., N. V. Naryzhnaia, L. N. Maslov and G. J. Gross (2003). "[The opiate link between the antiarrhythmic effect of adaptation and hypoxia in the model of ischemia and reperfusion in vivo]." Patol Fiziol Eksp Ter(1): 19-21.
- Lukas, A. and M. W. Botsford (1997). "Cardioprotection induced by ischemic preconditioning in the mammalian heart: effects on arrhythmogenesis." Can J Physiol Pharmacol **75**(4): 316-325.
- Maiante, A. A., F. J. Teixeira Neto, S. L. Beier, J. E. Corrente and C. E. Pedrosa (2009). "Comparison of the cardio-respiratory effects of methadone and morphine in conscious dogs." J Vet Pharmacol Ther **32**(4): 317-328.
- Maslov, L. N., N. V. Naryzhnaia, S. Y. Tsibulnikov, F. Kolar, Y. Zhang, H. Wang, A. M. Gusakova and Y. B. Lishmanov (2013). "Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia." Life Sci.
- McDonough, J. L., D. K. Arrell and J. E. Van Eyk (1999). "Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury." Circ Res **84**(1): 9-20.
- McPherson, B. C. and Z. Yao (2001). "Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K(ATP) channels in myocytes." Circulation **103**(2): 290-295.
- Misra, M. K., M. Sarwat, P. Bhakuni, R. Tuteja and N. Tuteja (2009). "Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes." Med Sci Monit **15**(10): RA209-219.

- Morrison, R. R., X. L. Tan, C. Ledent, S. J. Mustafa and P. A. Hofmann (2007). "Targeted deletion of A2A adenosine receptors attenuates the protective effects of myocardial postconditioning." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(4): H2523-2529.
- Murphy, E., M. Perlman, R. E. London and C. Steenbergen (1991). "Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium." Circ Res **68**(5): 1250-1258.
- Murphy, E. and C. Steenbergen (2008). "Ion transport and energetics during cell death and protection." Physiology (Bethesda) **23**: 115-123.
- Murphy, E. and C. Steenbergen (2008). "Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury." Physiol Rev **88**(2): 581-609.
- Murry, C. E., R. B. Jennings and K. A. Reimer (1986). "Preconditioning with ischemia - a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." Circulation **74**(5): 1124-1136.
- Murry, C. E., V. J. Richard, K. A. Reimer and R. B. Jennings (1990). "Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode." Circ Res **66**(4): 913-931.
- Neckár, J., I. Marková, F. Novák, O. Nováková, O. Szárszoi, B. Ost'ádal and F. Kolár (2005). "Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(4): H1566-1572.
- Neckár, J., B. Ostádal and F. Kolár (2004). "Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery." Physiol Res **53**(6): 621-628.
- Neckár, J., F. Papousek, O. Nováková, B. Ost'ádal and F. Kolár (2002). "Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive." Basic Res Cardiol **97**(2): 161-167.
- Oldroyd, K. G., K. Harvey, C. E. Gray, G. H. Beastall and S. M. Cobbe (1992). "Beta-endorphin release in patients after spontaneous and provoked acute myocardial-ischemia." British Heart Journal **67**(3): 230-235.
- Ostadal, B. and F. Kolar (2007). "Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects." Respir Physiol Neurobiol **158**(2-3): 224-236.
- Ostadal, B., I. Ostadalova and N. S. Dhalla (1999). "Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects." Physiol Rev **79**(3): 635-659.
- Oš'ádal, B., Vízek, M. a kol. (2003). *Patologická fyziologie srdce a cév*. Karolinum, Praha.
- Peart, J. N. and G. J. Gross (2004). "Chronic exposure to morphine produces a marked cardioprotective phenotype in aged mouse hearts." Experimental Gerontology **39**(7): 1021-1026.

Peart, J. N. and G. J. Gross (2004). "Morphine-tolerant mice exhibit a profound and persistent cardioprotective phenotype." Circulation **109**(10): 1219-1222.

Peart, J. N. and G. J. Gross (2006). "Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment are mediated via different signaling pathways." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(4): H1746-1753.

Philipp, S., X. M. Yang, L. Cui, A. M. Davis, J. M. Downey and M. V. Cohen (2006). "Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade." Cardiovasc Res **70**(2): 308-314.

Przyklenk, K. and R. A. Kloner (1986). "Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned myocardium"." Circ Res **58**(1): 148-156.

Pugsley, M. K. (2002). "The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system." Pharmacol Ther **93**(1): 51-75.

Qin, F., C. Yan, R. Patel, W. Liu and E. Dong (2006). "Vitamins C and E attenuate apoptosis, beta-adrenergic receptor desensitization, and sarcoplasmic reticular Ca²⁺ ATPase downregulation after myocardial infarction." Free Radic Biol Med **40**(10): 1827-1842.

Rizvi, A., X. L. Tang, Y. Qiu, Y. T. Xuan, H. Takano, A. K. Jadoon and R. Bolli (1999). "Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): H874-884.

Schultz, J. E. and G. J. Gross (2001). "Opioids and cardioprotection." Pharmacol Ther **89**(2): 123-137.

Schultz, J. E., A. K. Hsu and G. J. Gross (1998). "Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta(1)- but not mu- or kappa-opioid receptors." Circulation **97**(13): 1282-1289.

Schultz, J. E. J., A. K. Hsu and G. J. Gross (1996). "Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart." Circulation Research **78**(6): 1100-1104.

Schultz, J. E. J., E. Rose, Z. H. Yao and G. J. Gross (1995). "Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **268**(5): H2157-H2161.

Shi, Y., J. E. Baker, C. Zhang, J. S. Tweddell, J. Su and K. A. Pritchard (2002). "Chronic hypoxia increases endothelial nitric oxide synthase generation of nitric oxide by increasing heat shock protein 90 association and serine phosphorylation." Circ Res **91**(4): 300-306.

Skrabalova, J., J. Neckar, L. Hejnova, I. Bartonova, F. Kolar and J. Novotny (2012). "Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats." Pharmacol Rep **64**(2): 351-359.

Soares, P. R., C. P. de Albuquerque, V. P. Chacko, G. Gerstenblith and R. G. Weiss (1997). "Role of preischemic glycogen depletion in the improvement of postischemic metabolic and contractile recovery of ischemia-preconditioned rat hearts." Circulation **96**(3): 975-983.

Speechly-Dick, M. E., M. M. Mocanu and D. M. Yellon (1994). "Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat." Circ Res **75**(3): 586-590.

Steenbergen, C., M. E. Perlman, R. E. London and E. Murphy (1993). "Mechanism of preconditioning. Ionic alterations." Circ Res **72**(1): 112-125.

Strnisková, M., T. Ravingerová, J. Neckár, F. Kolár, S. Pastoreková and M. Barancík (2006). "Changes in the expression and/or activation of regulatory proteins in rat hearts adapted to chronic hypoxia." Gen Physiol Biophys **25**(1): 25-41.

Takasaki, Y., R. A. Wolff, G. L. Chien and D. M. Van Winkle (1999). "Met(5)-enkephalin protects isolated adult rabbit cardiomyocytes via delta-opioid receptors." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **277**(6): H2442-H2450.

Taylor, D. A. and W. W. Fleming (2001). "Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **297**(1): 11-18.

Tsang, A., D. J. Hausenloy, M. M. Mocanu and D. M. Yellon (2004). "Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway." Circ Res **95**(3): 230-232.

Tso, P. H. and Y. H. Wong (2003). "Molecular basis of opioid dependence: Role of signal regulation by G-proteins." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **30**(5-6): 307-316.

Vallecillo, G., S. Mojal, A. Roquer, D. Martinez, P. Rossi, F. Fonseca, R. Muga and M. Torrens (2013). "Risk of QTc prolongation in a cohort of opioid-dependent HIV-infected patients on methadone maintenance therapy." Clin Infect Dis.

Vanwinkle, D. M., J. D. Thornton, D. M. Downey and J. M. Downey (1991). "The natural-history of preconditioning - cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to subsequent ischemia." Coronary Artery Disease **2**(5): 613-619.

Ventura, C., L. Bastagli, P. Bernardi, C. M. Caldarera and C. Guarnieri (1989). "Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma - effect of phenylephrine and isoproterenol." Biochimica Et Biophysica Acta **987**(1): 69-74.

Walker, M. J., M. J. Curtis, D. J. Hearse, R. W. Campbell, M. J. Janse, D. M. Yellon, S. M. Cobbe, S. J. Coker, J. B. Harness and D. W. Harron (1988). "The Lambeth

Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion." Cardiovasc Res **22**(7): 447-455.

Wittert, G., P. Hope and D. Pyle (1996). "Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat." Biochemical and Biophysical Research Communications **218**(3): 877-881.

Wu, S., M. C. Wong, M. Chen, C. H. Cho and T. M. Wong (2004). "Role of opioid receptors in cardioprotection of cold-restraint stress and morphine." J Biomed Sci **11**(6): 726-731.

Yang, X. M., J. B. Proctor, L. Cui, T. Krieg, J. M. Downey and M. V. Cohen (2004). "Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways." J Am Coll Cardiol **44**(5): 1103-1110.

Zhao, Z. Q., J. S. Corvera, M. E. Halkos, F. Kerendi, N. P. Wang, R. A. Guyton and J. Vinten-Johansen (2003). "Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(2): H579-588.