

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Molekulární mechanismy kardioprotektivního
působení opioidů**

Jitka Škrabalová

Školitel: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2009

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 6. srpna 2009

.....

Jitka Škrabalová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho pomoc a trpělivost při sepisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a přátelům za povzbuzení a mnoho cenných rad.

Abstrakt

Opioidy jsou často považovány za nebezpečné návykové látky. Cílem této práce je nastínit, že tyto látky mohou významně omezovat poškození tkání, které je spojeno s ischemií myokardu. Vzhledem k tomu, že ischemie myokardu postihuje každoročně statisíce lidí a způsobuje poškození a odumírání srdeční tkáně, které vede v některých případech až ke smrti, není potenciální kardioprotektivní působení opioidů zanedbatelným faktem. Jak bylo zjištěno, ke kardioprotektivnímu účinku může dojít po aktivaci opioidních receptorů před ischemií (opioidní preconditioning) nebo před reperfuzí (opioidní postconditioning). V kardioprotekci hraje důležitou roli především aktivace δ_1 opioidního receptoru agonistou BW373U86, TAN-67 a morfinem. Několik studií také prokázalo kardioprotektivní působení aktivovaných κ a δ_2 opioidních receptorů. Kardioprotektivní efekt opioidů, ke kterému dochází po aktivaci opioidních receptorů, je zprostředkován především působením $G_{i/o}$ proteinů, protein kinázy C, mitochondriálních K_{ATP} kanálů, volných radikálů, kináz regulovaných extracelulárním signálem, mitogenem aktivovaných protein kináz a glykogen syntázy kinázy β .

Klíčová slova: Opioidy, opioidní receptory, ischemie myokardu, kardioprotekce, preconditioning, postconditioning

Abstract

Opioids are often considered to be dangerous addictive substances. The aim of this thesis is to demonstrate that these substances can significantly reduce the tissue damage associated with myocardial ischemia. Considering the fact that myocardial ischemia affects thousands of people every year and causes damage and necrosis of heart tissue, which in some cases leads to death, the potential cardioprotective effect of opioids is not a negligible issue. It was discovered that the cardioprotective effect can occur after activation of opioid receptors before ischemia (opioid preconditioning) or before reperfusion (opioid postconditioning). In cardioprotection, especially activation of δ_1 opioid receptors by agonist BW373U86, TAN-67 and morphine plays an important role. Several studies also proved cardioprotective effect of activated κ and δ_2 opioid receptors. The cardioprotective effect arising after activation of opioid receptors is mediated especially via $G_{i/o}$ proteins, protein kinase C, mitochondrial K_{ATP} channels, free radicals, extracellular signal-regulated kinases, mitogenem-activated protein kinases and glycogen synthase kinase β .

Keywords: Opioids, opioid receptors, myocardial ischemia, cardioprotection, preconditioning, postconditioning

Obsah

1. Seznam zkratek.....	6
2. Úvod.....	7
3. Opioidy.....	7
3.1. Základní charakteristika opioidů.....	7
3.2. Klinický význam opioidů a rizika spojená s jejich užíváním.....	8
4. Opioidní receptory.....	10
5. Ischemie myokardu.....	13
5.1. Ischemické poškození.....	13
5.2. Reperfuční poškození.....	14
6. Kardioprotektivní působení opioidů.....	15
6.1. Ischemický preconditioning.....	15
6.2. Uplatnění opioidních receptorů v kardioprotekci.....	16
6.3. Volné radikály.....	17
6.4. Opožděná fáze kardioprotekce.....	18
6.5. Postconditioning.....	20
7. Závěr.....	22
8. Seznam literatury.....	23

1. Seznam zkratek

AC	adenylát cykláza
ATP	adenosintrifosfát
BNTX	7-benzylidinenatrexon
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DAG	diacetyl glycerol
EOPs	endogenní opioidní peptidy
GIRK	G proteinem aktivovaný dovnitř usměrňující kanál
GPCRs	receptory spřažené s G proteiny
GSK β	glykogen syntáza kináza β
GDP	guanosintrifosfát
GTP	guanosindifosfát
I _h	hyperpolarizací aktivovaný kationtový kanál
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfát
IPC	ischemický preconditioning
mPTP	mitochondriální permeabilní přechodné kanály
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
OPC	opioidní preconditioning
OR	opioidní receptor
ORL ₁	sirotčí receptor
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP ₂	fosfatidylinositol-4-5-bisfosfát
PLC	fosfolipáza C
PKC	protein kináza C
POC	postconditioning
POMC	pro-opiomelanokortin
RNS	volné dusíkaté radikály
ROS	volné kyslíkaté radikály
SR	sarkoplazmatické retikulum
TOR	protein TOR (target of rapamycin)
TK	tyrosin kináza

2. Úvod

Opioidy jsou přirozeně se vyskytující alkaloidy, jejich analogy ale nacházíme i v tělech živočichů, kde regulují nespočet fyziologických pochodů. Opioidy extrahované z vlčího máku *Papaver somniferum*, byly dlouhá staletí užívány k tišení bolestí. Opioidy mají výjimečné analgetické vlastnosti a díky tomu se mnohdy stávají jediným možným způsobem utlumení bolestí. Zneužívání některých opioidů, jako například morfinu nebo heroinu, vedlo ke zkreslení pohledu na opioidy jako na nebezpečné návyk navozující látky. Z toho důvodu se někteří lékaři zdráhali předepisování těchto analgetik a někteří pacienti dokonce ze strachu, že by se stali závislími, léčbu opioidy odmítali. Ve své práci, se mimo jiné, pokusím nastínit, že tyto obavy byly neopodstatněné. Hlavním cílem této práce však je, poukázat na kardioprotektivní efekt opioidů. V minulých letech bylo totiž prokázáno, že působení některých opioidů může zmírnit poškození tkání myokardu, ke kterému dochází nejdříve při ucpání koronárních cév - ischemii a posléze při znovuoživení přívodu krevního zásobení – reperfuzi. Ischemie myokardu postihuje značnou část populace především ve vyspělých zemích a patří k jedné z nejčastějších příčin úmrtí. V této bakalářské se proto pokusím shrnout dosavadní poznatky o kardioprotektivním potenciálu opioidů a mechanismech, které tuto kardioprotekci zprostředkovávají.

3. Opioidy

3.1. Základní charakteristika opioidů

Do skupiny opioidů patří látky, které vyvolávají svůj účinek vazbou na opioidní receptory (OR) a zároveň jsou stereospecificky antagonistovány naloxonem. Opioidy můžeme dělit:

A) Podle interakce opioidů s různými receptorovými podtypy:

- 1) Agonisté - mají afinitu pro navázání k buněčným receptorům, čímž indukují změny v buňce, které stimulují fyziologickou aktivitu.
- 2) Antagonisté - nemají pravý farmakologický efekt, ale mohou bránit v působení agonistům. Kompetitivní antagonisté se váží na stejný receptor a kompetují o vazebné místo s agonistou, zatímco nekompetitivní antagonisté blokují působení agonistů jinou cestou.

3) Agonist-antagonisté - na jednom podruhu receptorů působí jako agonisté na jiném jako antagonisté (*Oxford Textbook of Palliative Medicine*, 1998).

B) Podle způsobu/místa jejich vzniku:

1) Endogenní opioidní peptidy (EOPs) – jsou vytvářeny v tělech živočichů včetně člověka. Existují čtyři hlavní třídy EOPs: enkefaliny, dynorfiny, endorfiny a endomorfiny, které se vytváří v tělech živočichů ze čtyř prohormoních prekurzorů: pro-enkefalinu, pro-opiomelanokortinu (POMC), pro-dynorfinu a pro-nociceptinu. EOPs jsou distribuovány srdečními nervy, vnitřními nervy gastrointestinálního svalstva a srdeční svalovinou (Pugsley, 2002; Stefano et al., 2000). V těle se tyto peptidy zapojují do fyziologické kontroly nejrůznějších funkcí: bolesti, analgesie, stresu, učení, paměti, požívání, pití, sexuální aktivity, uvolňování hormonů, těhotenství, vývoje, endokrinologie, mentálních onemocnění, nálady, záchvatů, neurologických poruch, všeobecné aktivity, emocí, gastrointestinálních, ledvinných a jaterních funkcí, kardiovaskulárních odezev, respirace a termoregulace (shrnuto v Bednar, 2008).

2) Přirozeně se vyskytující opioidy – jsou alkaloidy, získané z pryskyřice vlčího máku *Papaver somniferum*. Mezi nejčastěji se vyskytující patří morfin a kodein (methylmorfin). Někdy jsou tyto alkaloidy spolu se semisyntetickými opioidy nazývány opiáty.

3) Semisyntetické – jsou vytvořené z přirozeně se vyskytujících opioidů, patří sem například: heroin (diacetylmorfin), dihydrokodein, oxycodon.

4) Syntetické – například petidin (meperidin), metadon, fentanyl (*Oxford Textbook of Palliative Medicine*, 1998).

3.2. Klinický význam opioidů a rizika spojená s jejich užíváním

Díky své schopnosti analgesie a tlášení bolesti, jsou opioidy používány již více než tisíc let. Dodnes nebyla nalezena účinnější analgetika, která by odstranila nutnost jejich užívání. Opioidní analgetika tak zůstávají nejefektivnějšími a proto široce užívanými látkami pro léčbu akutních a chronických bolestí, především pak těch, které jsou spojené s rakovinou (Ballantyne, 2008). Opioidy mohou být podávány pacientům několika způsoby: orálně, rektálně, transdermálně, intravenózně, intramuskulárně, epidurálně, intratékálně, intranasálně a transmuskulárně. (Inturrisi, 2002).

Analgetický efekt opioidních antagonistů nemá horní hranici, to znamená, že s rostoucí dávkou, roste analgetický efekt až do okamžiku, kdy se objeví nepříznivý vedlejší efekt zahrnující: zmatenost, uklidnění, nevolnost, zvracení, sníženou ventilaci (hypoventilaci). Účinnost jednotlivých opioidních analgetik u individuálního pacienta, je tedy určena stupněm analgesie, kterou vytvoří stupňující se dávka, až do projevu netolerovatelného nepříznivého vedlejšího efektu. Objevení se tohoto efektu je závislé na mnoha faktorech, jako je například věk pacienta, rozsah jeho onemocnění a případné orgánové dysfunkce, souběžné podání jiného opioidu, dřívější expozice opioidy a způsob jakým jsou opioidy aplikovány (*Oxford Textbook of Palliative Medicine*, 1998).

Chronické užívání opioidů často vede k adaptivním změnám v odpovědi na podnět daného opioidu, a dochází k rozvoji tolerance a závislosti. Tolerance může být definována jako snížení citlivosti organismu na danou látku v důsledku jejího opakovaného užívání. Závislost je absolutní potřeba dané látky pro udržení normální fyziologické funkce (Taylor a Fleming, 2000).

Strach z rozvoje závislosti je hlavní příčinou, která omezuje užívání opioidů. Pacienti, kteří vyžadují určitou léčbu opioidními analgetiky pro potlačení příznaků, nebo průběhu nemoci, jsou ale čistě závislí na terapeutickém působení daného opioidu. Tento jev je možné nazvat terapeutická závislost a může, nebo nemusí vést k rozvoji fyzické závislosti, ale ve skutečnosti není nikdy spojena se závislostí ve smyslu narkomanie.

Narkomanie je stav charakterizovaný psychickou závislostí, při které dochází k neustálému bažení po opioidu, které se projevuje nutkavou tendencí vyhledávat, získávat a užívat danou látku. Termín narkomanie tedy nemůže být zaměnitelný s fyzickou závislostí, což dokazuje i fakt, že fyzická závislost a tolerance se mohou objevit i u jiných terapeutických látek, které nejsou návykové (nevedou k narkomanii).

Pokud se u pacienta rozvinula fyzická závislost, dojde po náhlém přerušení podávání daného opioidního agonisty, nebo po podání opioidního antagonisty k projevu abstinčních příznaků. K nástupu příznaků dochází do 12 h po přerušení podávání opioidu a jejich intenzita se odráží na velikosti dávky a délce podávání daného agonisty. Nástup je charakteristický pocitem úzkosti, nervozitou, podrážděností a střídáním zimnic s horkými návaly. Při vyvrcholení intenzity příznaků abstinence dochází k nevolnosti, zvracení, křečím břicha, nespavosti a někdy dokonce i k třesu. Abstinčním příznakům lze účinně zabránit pomalým a postupným snižováním dávky až do úplného přerušení podávání daného opioidu (*Oxford Textbook of Palliative Medicine*, 1998).

4. Opioidní receptory

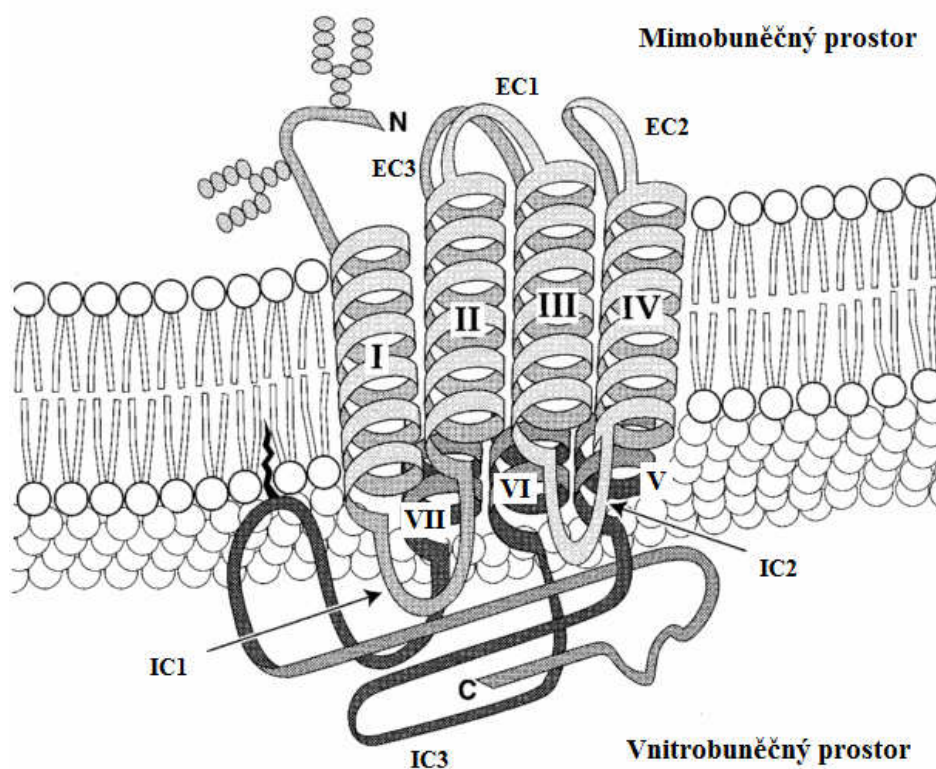
Opioidní receptory lze rozdělit na tři hlavní skupiny receptorů: μ (mí), κ (kappa) a δ (delta), které se od sebe liší svou distribucí, vazbou ligandů a funkcí. Podle farmakologických studií, má navíc každý hlavní typ OR dva až tři receptorové podtypy (μ_1 - μ_3 , κ_1 - κ_3 a δ_1 - δ_2) (Minami a Satoh, 1995; Jordan et al., 2000).

Výskyt všech typů OR je dobře zmapován především v centrální nervové soustavě, ale jejich přítomnost byla zjištěna i v dalších tkáních: tenkém střevu, tlustém střevu, nadledvinách, ledvinách, plicích, slezině, varlatech, vaječnících a děloze. V žaludku a myokardu byla zjištěna přítomnost δ a κ OR, v játrech μ a δ OR (Wittert et al., 1996).

Klonování komplementární deoxyribonukleové kyseliny (cDNA) OR a následné analýzy jejich aminokyselinových sekvencí ukázaly, že tyto receptory patří do rodiny receptorů vázajících G-proteiny (GPCRs) (Minami a Satoh, 1995; Jordan et al., 2000).

Kódování cDNA sirotčího (orphan) receptoru zjistilo, že dosahuje vysokého stupně homologie (>60%) vůči OR, což je stejné procento homologie, kterého mezi sebou dosahují tři hlavní skupiny OR. Sirotčí receptor je označován ORL₁ (opioid receptor-like = „podobný jako opioidní receptor“) a na základě strukturální homologie je řazen ke klasickému typu OR. Doposud známé EOPs se na tento receptor vázaly s velmi malou nebo žádnou afinitou, nicméně byl izolován nový EOP nociceptin/orphanin- FQ. Nociceptin vzniká z prohormonního prekurzoru pro-nociceptinu a z OR má afinitu pouze k ORL₁ (Corbett et al., 2006).

Všechny GPCRs včetně OR, mají sedm hydrofobních šroubovicových transmembránových domén, které leží ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčné membrány. První transmembránová doména má N-konec (obvykle N-glykosylovaný) vybíhající do extracelulárního prostoru. Poslední sedmá doména má C-konec vybíhající do cytoplazmy. Jednotlivé transmembránové domény jsou mezi sebou propojené extracelulárními a intracelulárními smyčkami různé délky, které vytváří tři extracelulární segmenty a tři intracelulární segmenty. Extracelulární segmenty hrají roli v rozlišování signálu a vazbě ligandu. Intracelulární segmenty mají funkci přenášení signálu k heterotrimernímu G proteinu, který je k nim navázaný (Morris a Malbon, 1999), viz obr. 1.



Obr. 1: Schéma organizace GPCR. I-VII - transmembránové domény, C - cytoplazmatický C-konec, N - extracelulární N-konec, IC1-IC3 - intracelulární smyčky, EC1-EC3 - extracelulární smyčky (upraveno podle Morris a Malbon, 1999).

G proteiny jsou heterotrimery skládající se z α podjednotky s GTPázovou aktivitou (schopností vázat a hydrolyzovat guanosintrifosfát - GTP) a $\beta\gamma$ dimeru. Pokud je na $G\alpha$ podjednotku navázán guanosindifosfát (GDP), je tato podjednotka asociovaná s $G\beta\gamma$ dimerem a tvoří neaktivní heterotrimer. Po stimulaci ligandem mění receptor svou konformaci a mechanicky aktivuje G proteinu. Aktivací G proteinu dojde ke snížení afinity $G\alpha$ podjednotky pro GDP, který v důsledku toho disociuje a je nahrazen GTP. Po navázání GTP zaujme α podjednotka aktivní konformaci a disociuje jak od receptoru tak od $\beta\gamma$ dimeru. Aktivovaný stav setrvává, dokud není GTP hydrolyzováno vnitřní GTPázovou aktivitou α podjednotky, potom α podjednotka a $\beta\gamma$ dimer znovu asociují a připojí se zpět ke svému receptoru (Hamm a Gilchrist, 1996).

Opioidní receptory váží pertussis toxin-senzitivní G_i nebo G_o heterotrimerní proteiny. Nejčastěji popisované působení aktivovaných podjednotek G_i/G_o proteinů je:

A) Inhibice adenylát cyklázy (AC). Po inhibici AC dojde k poklesu cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) v buňce. Cyklické AMP reguluje například aktivaci hyperpolarizací

aktivovaného kationtového kanálu (Ih). Tento kanál zajišťuje kationtově neselektivní dovnitř usměrněný tok. Pokud poklesne hladina cAMP, dochází k inhibici Ih a tím k poklesu excitability buňky.

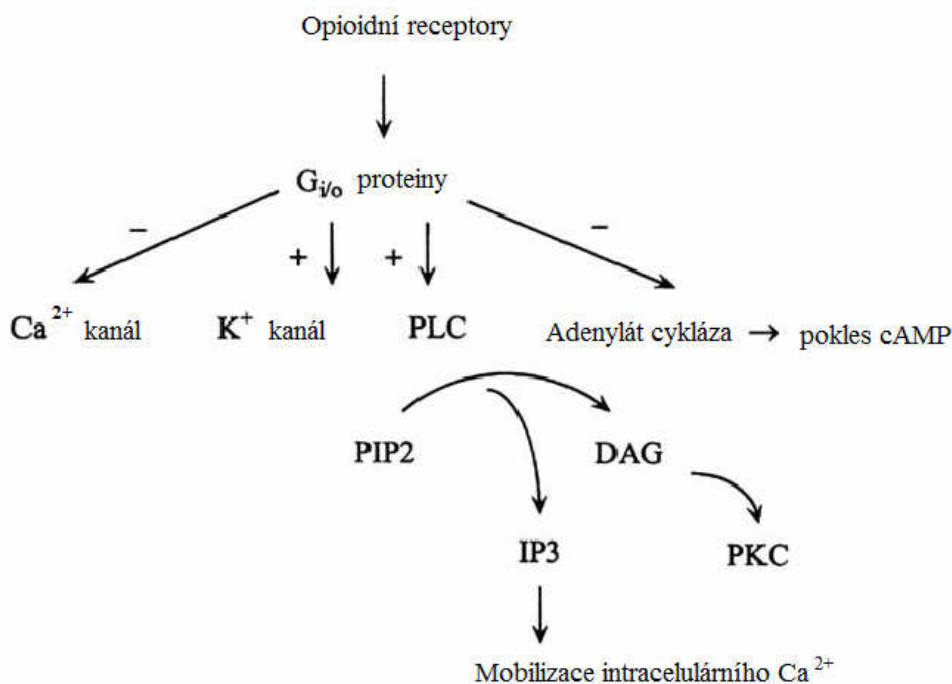
B) Aktivace draselných kanálů. Opioidy aktivují nejméně tři různé K^+ kanály, z nichž nejznámějším je G-proteinem aktivovaný dovnitř usměrňující kanál (GIRK).

C) Inhibice napětově ovládaných vápenatých (Ca^{2+}) kanálů.

V důsledku aktivace K^+ kanálů a inhibice napětově ovládaných vápenatých kanálů, dochází k inhibici uvolňování neurotransmiterů a redukci buněčné excitability.

D) Aktivace fosfolipázy $C\beta 2$ (PLC).

Aktivovaná PLC vytváří diacylglycerol (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfát (IP_3) z fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP_2). IP_3 uvolňuje Ca^{2+} z vnitrobuněčných zásobáren a DAG aktivuje protein kinázu C (PKC) (Minami a Satoh 1995; Jordan a Devi, 1998; Williams et al., 2001) viz obr. 2.



Obr. 2: Schéma signální transdukce po aktivaci OR. PLC - fosfolipáza C, cAMP - cyklický adenosin monofosfát, PIP_2 - fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, DAG - diacylglycerol, IP_3 - inositol 1,4,5-trifosfát, PKC - protein kináza C, + aktivace, - inhibice (upraveno podle Barry a Zuo 2005).

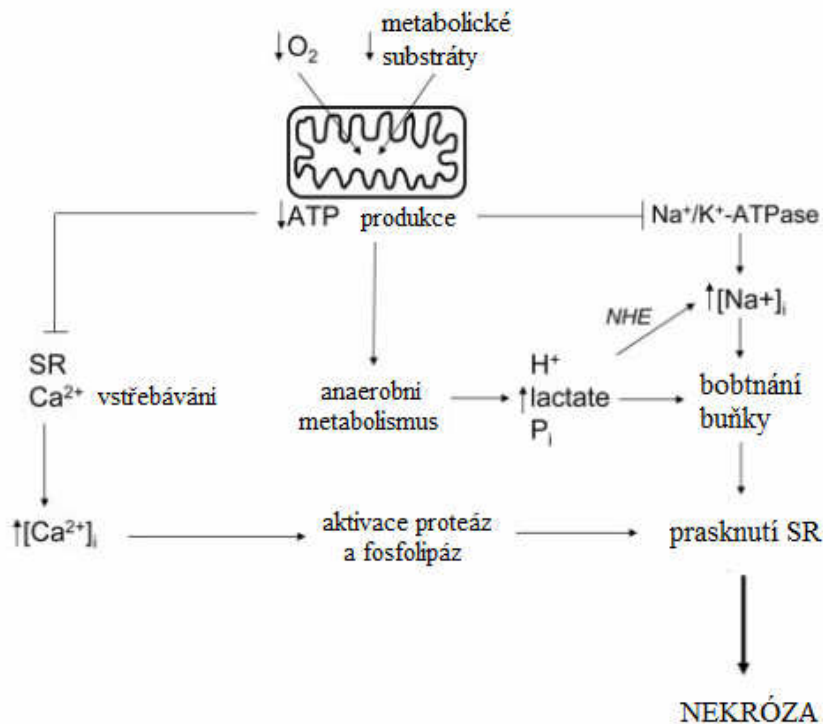
5. Ischemie myokardu

Ischemická choroba srdeční je nejčastější příčinou úmrtí v industrializovaném světě. Rozvíjí se v důsledku mnoha rizikových faktorů, přičemž vždy se vyskytuje s jinými chorobami, jako například: zvýšený arteriální krevní tlak, hyperlipidémie, ateroskleróza, diabetes, srdeční selhání a stárnutí. K ischemii dochází při omezení průtoku krve v koronárních cévách, s čímž je spojeno především nedostatečné zásobení tkání kyslíkem (hypoxií) a živinami.

Ihned po začátku ischemie dochází ke strukturálním změnám buněk. Pokud ale dojde k včasnému obnovení krevního toku - reperfuzi, jsou tyto změny reverzibilní. K nekróze dochází až při déletrvajícím ischemii (bez kolaterálního, nebo zbytkového proudění), když strukturální změny přestávají být reverzibilní. Odumírání tkáně v důsledku nekrózy buněk, tedy infarkt je doprovázen klinickými příznaky jako je arytmie a ztráta myokardiální kontraktility. Pro zachránění srdeční tkáně je tedy nezbytně nutná reperfuze, nicméně i ta přináší další poškození buněk.

5.1. Ischemické poškození

V důsledku nedostatku molekulárního kyslíku a metabolických substrátů nedochází v mitochondriích k oxidativní fosforylaci – tedy k tvorbě vysokoenergetického adenosintrifosfátu (ATP). Namísto toho anaerobní metabolismus produkuje anorganický fosfát, laktát a vodíkové (H^+) ionty, které se akumulují uvnitř buňky a způsobují acidózu. Acidóza aktivuje sodno/draselný (Na^+/H^+) transportér a dochází k vniku sodných iontů (Na^+) do buňky. V důsledku nedostatku ATP dochází, ale k přerušení funkce Na^+/K^+ -ATPázy transportovat Na^+ pryč z buňky. Sarkoplazmatické retikulum (SR) ze stejného důvodu ztrácí schopnost vstřebávat Ca^{2+} . Zvyšující se intracelulární koncentrace Ca^{2+} a Na^+ iontů, vytváří hypertonické prostředí, do buňky začíná pronikat voda a buňka začíná bobtnat. Bobtnání způsobuje lámání nebo dokonce protržení SR. Poškození SR je navíc zhoršeno aktivací proteáz a fosfolipáz závislých na Ca^{2+} . Pokud nedojde k obnovení krevního zásobení dostatečně brzy, SR praská a dochází k nekontrolované buněčné smrti – nekróze, viz obr. 3.

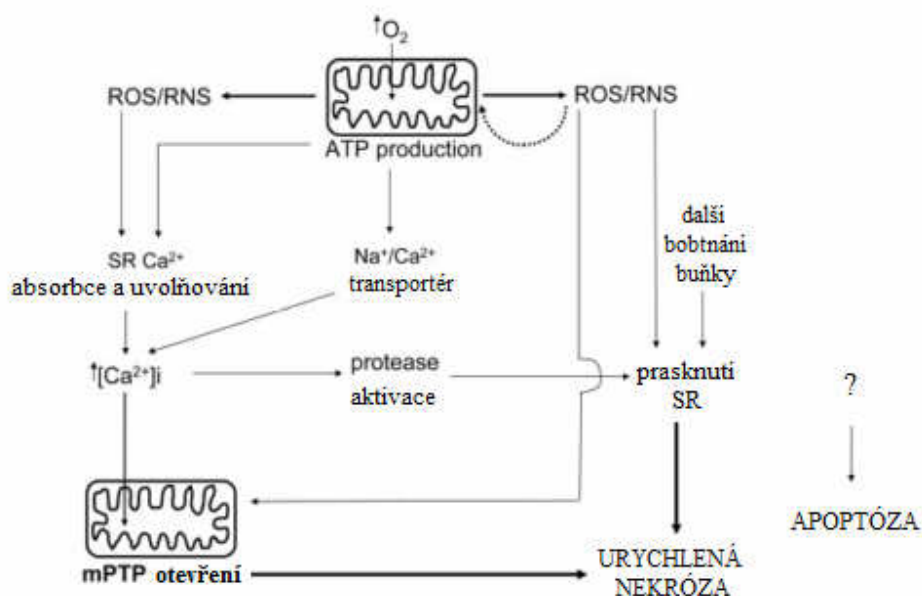


Obr. 3: Znárodnění hlavních buněčných procesů při ischemii. SR - sarkoplazmatické retikulum, P_i - anorganický fosfát, NHE - sodno/draselný (Na^+/H^+) transportér (upraveno podle Ferdinandy et al., 2007).

5.2. Reperfuční poškození

Při reperfuzi dochází k náhlému navrácení kyslíku a živin. Kyslík reaktivuje mitochondrie, které začnou v elektron-transportním řetězci masivně produkovat volné kyslíkaté radikály (ROS). ROS stimulují další uvolňování ROS a v přítomnosti oxidu dusnatého (NO) generují volné dusíkaté radikály (RNS). Oba typy těchto volných radikálů nevratně poškozují buněčné struktury jako je SR. Z poškozeného SR se uvolňuje Ca^{2+} do cytosolu a poté putuje do mitochondrií. Vzrůstající hladinu vápníku umocňuje obnovení funkce na ATP závislém Na^+/Ca^+ transportéru. Kombinace vzrůstající hladiny Ca^{2+} v mitochondriální matrix, aktivita ROS/RNS, a zvyšující se pH v důsledku odplavování H^+ , podporuje otevírání mitochondriálních permeabilních přechodných kanálů (mPTP) (shrnují Ferdinandy et al., 2007). Otevřený mPTP mění svou konformaci a rozpřahuje mitochondrii, ve které začne převažovat hydrolýza nad syntézou. To vede ke ztrátě iontové rovnováhy a nekróze, ke které ještě přispívá další bobtnání buněk spojené s poškozením ER. Rozsah reperfuční nekrózy je přitom závislý především na závažnosti poškození buněk, ke kterému

došlo při ischemii. Při reperfuzi dochází také u části buněk k programované buněčné smrti - apoptóze. Mechanismus vedoucí buňky k apoptóze není zatím známý (Halestrap et al., 2004; Ferdinandy et al., 2007), viz obr. 4.



Obr. 4: Znázornění hlavních buněčných procesů vedoucích k reperfuznímu poškození. ROS - volné kyslíkaté radikály, RNS - volné dusíkaté radikály, SR - sarkoplazmatické retikulum, (upraveno podle Ferdinandy et al., 2007).

6. Kardioprotektivní účinek opioidů

6.1. Ischemický preconditioning

V roce 1986 popsal Murry et al. kardioprotektivní fenomén ischemického preconditioningu (IPC). Během IPC dochází k několika krátkým okluzím koronárních tepen, které ale nejsou natolik závažné, aby způsobily poškození buněk. Tyto krátce navozené opakované ischemie, působící před dlouhodobým ischemickým záchvatem, vyvolávají ischemickou toleranci a zabraňují letálnímu buněčnému poškození a zpomalují rychlost vyčerpávání ATP (Murry et al, 1986). Po IPC se objevují dvě fáze kardioprotekce - akutní a opožděná. Akutní fáze se dostavuje okamžitě a trvá několik hodin. Opožděná fáze začíná působit několik hodin po IPC a může trvat až několik dní (Yellon a Baxter 1995).

V dalších letech byla věnována fenoménu IPC a především pak mechanismům, díky kterým dochází ke kardioprotekci, velká pozornost. V roce 1995 Schultz et al., zjistil, že při přidání neselektivního opioidního antagonisty naloxonu před nebo po IPC vyvolaném v intaktním krysím srdci dochází ke zrušení kardioprotektivního efektu. Tímto jako první dokázal, že aktivace OR může hrát důležitou roli v IPC vyvolané kardioprotekci (Schultz et al, 1995). Podobných poznatků, které rovněž podpořili roli OR při IPC, dosáhli na králičím modelu (Chien a VanWinkle, 1996).

Schutz et al. (1996) na krysím srdci dokázal, že při podávání morfinu před dlouhodobou ischemií (opioidní preconditioning - OPC), dochází ke snížení velikosti infarktu, podobně jako je tomu při IPC, a že je tento ochranný efekt způsoben otevřením ATP senzitivních K^+ (K_{ATP}) kanálů (stejně tak jako μ a δ receptor přenášejí analgesii skrze otevření K_{ATP}). Kardioprotektivní roli morfinového OPC potvrdil Miki et al. (1998) na izolovaném králičím srdci. Zároveň se mu podařilo prokázat, že OPC vyvolané morfinem v králičím srdci je přenášené protein kinázou C (PKC).

Liang a Gross přišli v roce 1999 s přímým důkazem, že morfinem indukované OPC působí i na úrovni izolovaných kuřecích srdečních ventrikulárních myocytů, z čehož vyplývá, že kardioprotektivní efekt vyvolaný morfinovým OPC je přinejmenším z části přenášen i na úrovni jednotlivých buněk (ne pouze koronárními cévami). Ve stejném pokusu rovněž zjistili, že při použití selektivního inhibitoru (5- hydroxydecanoické kyseliny- 5-HD) mitochondriálních K_{ATP} kanálů dochází ke zrušení kardioprotektivního efektu a tak se dá předpokládat, že ke kardioprotekci dochází v důsledku aktivace mitochondriálního K_{ATP} kanálu (Liang a Gross, 1999).

Role PKC v kardioprotektivní signální dráze při OPC byla prokázána i v dalších studiích (Huh et al., 2001; Zhang et al., 2002), stejně tak jako role mitochondriálních K_{ATP} kanálů (Huh et al., 2001; McPherson a Yao, 2001), je tedy pravděpodobné, že se v signální dráze kardioprotekce navzájem ovlivňují. Například poznatky Light et al. (1996) dokazují, že PKC může aktivovat K_{ATP} kanály při IPC.

6.2. Uplatnění opioidních receptorů v kardioprotekci

Za pomoci specifických neselektivních antagonistů pro μ , κ , δ_1 a δ_2 OR se Schultz et al. (1998a) pokusil prokázat roli těchto receptorů v IPC v intaktním krysím srdci. Podařilo se mu to prokázat pouze u δ_1 OR, jehož selektivní antagonist (7-benzylidinenatrexon - BNTX) blokoval kardioprotektivní účinek IPC. V jiné studii tento autor ještě prokázal,

že δ_1 OR vyvolává kardioprotektivní efekt aktivací $G_{i/o}$ proteinů (Schultz et al., 1998b). Působení δ_1 OR při IPC bylo poté potvrzeno například v lidském srdečním svalu (Bell et al., 2000), u ventrikulárních myocytů kuřecího embrya (Huh et al., 2001) a na psím srdci (Peart et al., 2003).

Ačkoli Schutz et al. v roce 1998 neprokázal roli κ OR v IPC, v roce 2001 přišel Wang et al. s prvním důkazem o tom, že aktivace κ OR v izolovaném krysím srdci zprostředkovává kardioprotektivní efekt IPC. Jeho studie také ukázala, že aktivace κ OR navíc zmírňuje projev arytmie. Příznivý účinek byl přitom zprostředkován PKC a K_{ATP} kanály (Wang et al., 2001).

V roce 2004 prokázal Peart et al., kardioprotektivní roli κ OR při OPC. Pokud byl κ OR aktivován jakýmkoli ze tří podaných selektivních agonistů (U50,488, ICI204,488 nebo BRL52537) docházelo ke zmírnění následků dlouhodobé ischemie. Podání selektivního agonisty U50,488 nebo BRL52537 navíc redukovalo dopad arytmie (Peart et al., 2004). Ačkoli se kardioprotektivní účinek κ OR při OPC podařilo prokázat i v dalších studiích, (Ho et al., 2000; Cao et al., 2003), existují i studie poukazující na zhoršení ischemicko/reperfuzního poškození, ke kterému došlo při aktivaci κ OR agonistou bremazocinem (Aitchison et al., 2000) a pentazocinem (Coles et al., 2003).

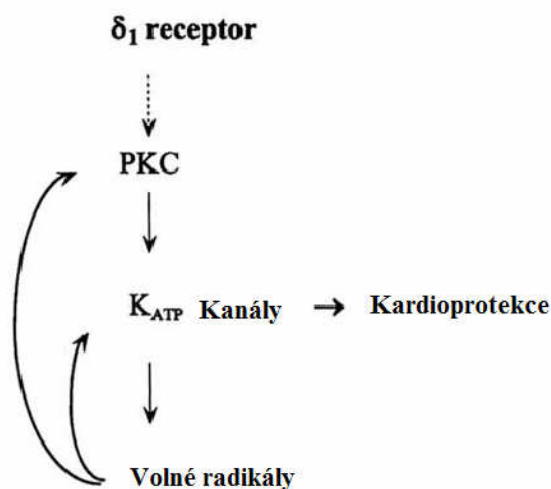
V nedávné studii Lishmanov et al. (2009) prokázal kardioprotektivní působení periferních δ_2 OR při OPC. Aktivace δ_2 OR deltophinem II snížila ischemické poškození a zamezila rozvoji arytmie.

6.3. Volné radikály

Ačkoli jsou kyslíkaté volné radikály považovány za škodlivé a přispívají k poškození tkáně po ischemické reperfuzi, malé množství volných radikálů může hrát důležitou roli zprostředkovatele kardioprotekce při IPC (shrnuto v Ambrosio et al., 1995).

Na základě předchozího tvrzení McPherson a Yao (2001) prokázali, že aktivace selektivním agonistou BW373U86 δ_1 OR kuřecích ventrikulárních myocytů stimuluje uvolňování intracelulárních volných radikálů skrze aktivaci mitochondriálních K_{ATP} kanálů. V roce 2002 Zhang et al. doplnil, že uvedená stimulace δ_1 OR agonistou BW373U86, aktivuje syntázu oxidu dusnatého (NOS), která začne produkovat oxid dusnatý (NO). NO pak aktivuje PKC δ , buď přímo, nebo přes volné kyslíkové radikály. V obou případech docházelo ke kardioprotekci (Zhang et al., 2002). Vzhledem k tomu, že PKC může zřejmě

aktivovat K_{ATP} kanál, můžeme z předchozích poznatků vyvodit již určitou signální dráhu - viz obr. 5.



Obr. 5: Schéma signální dráhy opioidem indukované kardioprotekce. PKC - protein kináza C, přerušovaná čára znázorňuje, že mediátor přenosu není ještě znám (upraveno podle Barry a Zuo, 2005).

6.4. Opožděná fáze kardioprotekce

V roce 1994 Baxter et al. demonstroval opožděnou fázi kardioprotekce, která se objevila 24-48 hodin po předchozím IPC. K opožděné fázi kardioprotekce došlo i po podání agonisty adenosinového A_1 receptoru (Baxter et al., 1994). Později bylo určeno, že opožděná fáze kardioprotekce je zprostředkovaná aktivací PKC (Baxter et al., 1995) a tyrosin kinázy (TK) (Imagawa et al., 1997).

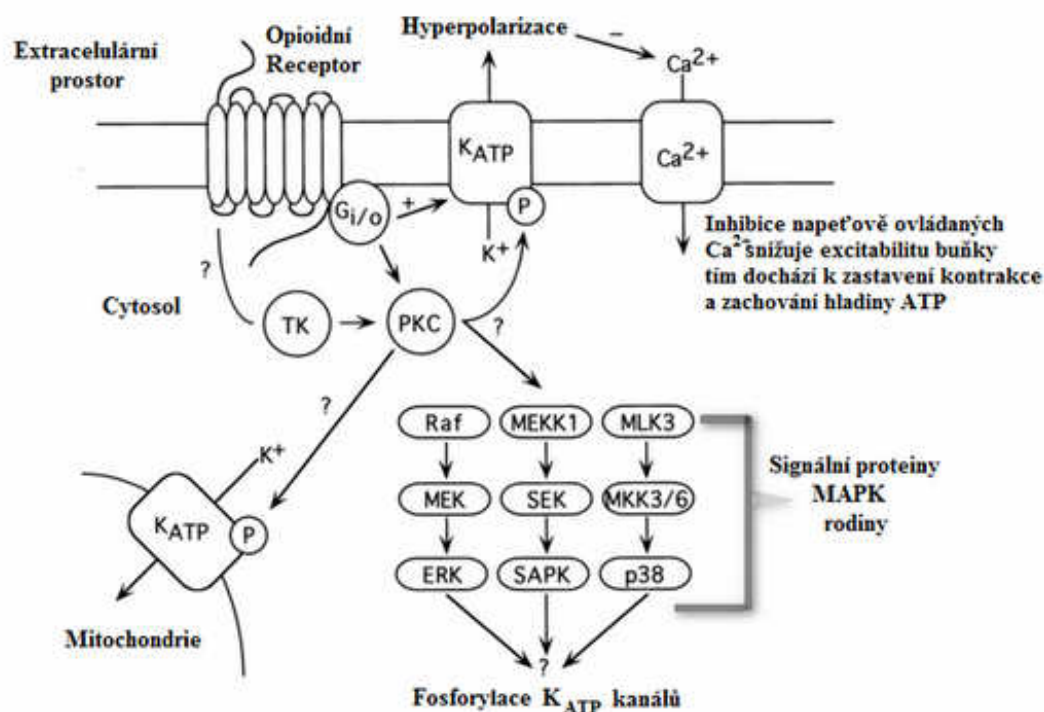
Yellon a Baxter navrhli hypotézu, že k opožděné kardioprotekci může docházet v důsledku translokace PKC do jádra, kde zesiluje transkripci a následující syntézu kardioprotektivních proteinů, jako jsou stresové proteiny, endogenní antioxidantní enzymy (Yellon a Baxter, 1995) a proteiny tepelného šoku - heat shock protein, hsp27 (Qian et al., 1998).

V době, kdy ještě nebyla prokázána opožděná kardioprotekce způsobená opioidy, Ventura et al. (1998) předvedl, že při aktivaci κ OR ventrikulárních srdečních buněk křečka endogenním opioidním agonistou (dynorfinem β), dochází k aktivaci PKC, která poté putuje do jádra a zvyšuje transkripci opioidních peptidů. EOPs mohou hrát tedy roli v regulaci genové transkripce při běžném, ale i patologickém stavu buňky.

Na základě předchozích poznatků se Fryer et al. (1999) rozhodl vyzkoušet možnost případné role OPC v opožděné fázi kardioprotekce, když selektivním agonistou TAN-67 stimulovali δ_1 OR. Pokud byl agonista podán 12 h před ischemickou poruchou, nedocházelo k žádnému příznivému účinku. Pokud ale došlo k aktivaci receptorů 24-48 h před ischemickou poruchou, dostavil se opožděný kardioprotektivní efekt. Tento efekt nastal v důsledku aktivace mitochondriálních K_{ATP} kanálů (Fryer et al., 1999), kináz regulovaných extracelulárním signálem (ERK) a mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) p38 (Fryer et al., 2001), viz obr. 6.

V roce 2001 Patel et al. ukázal, že při aktivaci δ OR agonistou BW373U86 dochází k opožděné kardioprotekci skrze uvolňování volných radikálů. Ve stejné práci poukázal však i na to, že δ_1 OR zřejmě není výhradně odpovědný za opožděnou kardioprotekci, protože při použití BNTX - specifického antagonisty pro δ_1 receptor, nedochází k úplnému zrušení kardioprotektivního efektu (Patel et al., 2001).

V opožděné fázi kardioprotekce může podle Wu et al. (1999) hrát roli i κ OR ventrikulárních krysích myocytů. Po stimulaci receptoru agonistou U50,488H se kardioprotektivní efekt objevil za 16-20 hodin a v jeho zprostředkování hrála roli PKC.



Obr. 6: Schéma některých důležitých signálních drah zprostředkovávajících opioidy indukovanou kardioprotekci. PKC - protein kináza C, TK – tyrosin kináza, MAPK – mitogenem aktivovaná protein kináza (Schultz a Gross, 2001).

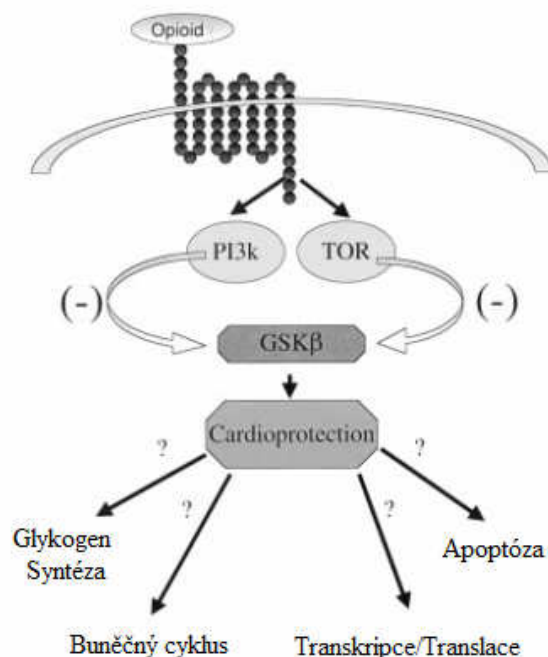
6.5. Postconditioning

Ischemický i opioidní preconditioning sice úspěšně zmírňuje následky ischemie, nicméně jejich použití jako klinické kardioprotektivní strategie pro zmírnění následků ischemického a reperfučního poškození, je limitováno nemožností předpovídat počátek ischemie. Provedení kardioprotektivní terapie v čase reperfúze, je oproti tomu klinicky uskutečnitelné, jelikož zahájení reperfúze je předpověditelná událost, ke které navíc většinou dochází pod klinickou kontrolou (Zhao et al., 2003). Postconditioning (POC) je definován jako rychlé střídavé přerušování krevního toku, ke kterému dochází v časných fázích reperfúze (Zhao a Vinten-Johansen, 2006).

Zhao et al. (2003) jako první demonstroval kardioprotektivní efekt ischemického POC na psím modelu. Výsledky tohoto pokusu ukázaly, že ischemický POC zmírňuje následky ischemického poškození stejně efektivně jako IPC.

Některé studie posledních let se proto začaly zabývat otázkou, zdali podávání opioidů při reperfúzi bude také zmírňovat ischemické poškození srdce. To se záhy podařilo prokázat, když Gross et al. (2004a, 2004b, 2005) dokázal, že podání morfinu (neselektivní opioidní agonista), BW373U86 (δ selektivní opioidní agonista), nebo fentanythiocyanátu- FIT (ireverzibilní δ agonista) těsně před reperfúzí snižuje závažnost infarktu.

Tentýž autor navíc v roce 2004 poprvé demonstroval, že opioidy indukovaná kardioprotekce se objevuje skrze působení fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) a proteinu TOR (target of rapamycin). Aktivace OR aktivuje PI3K a TOR, kteří fosforylují glykogen syntázu kinázu β (GSK β) na serinovém zbytku Ser⁹ a tím ji inaktivují. Tato inaktivace může mít vliv na dalším buněčné signální dráhy a události, které nakonec vytváří kardioprotektivní efekt (Gross et al., 2004a), viz obr. 7.



Obr. 7: Předpokládané mechanismy opioidy indukované kardioprotekce. Pro jejich popsání je zapotřebí dalších studií. PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza, TOR – protein TOR (target of rapamycin), GSKβ: glykogen syntáza kináza β (upraveno podle Gross et al., 2004).

Testování účinku κ OR, který byl aktivován svým specifickým agonistou U50,488 při reperfuzi, nejdříve neprokázalo kardioprotektivní účinek (Gross a Gross, 2006). Nicméně Peart et al. (2008) dokázal, že aktivace κ OR agonistou U50,488 při POC na krysím i myším modelu vede ke kardioprotekci. K aktivaci κ OR musí ale dojít těsně před reperfuzí, pokud dojde k podání agonisty až během reperfuze kardioprotektivní účinek nevzniká.

Příznivé kardioprotektivní působení opioidního POC, konkrétně morfinu, bylo prokázáno i na lidech. Morfin je běžně podáván pacientům během akutního infarktu, aby pacientům ulevil od bolesti. Gross et al. (2004b) jako první vyzkoušel podávat morfin pacientům i během reperfuze, což vedlo ke snížení ischemicko/reperfuzního poškození.

7. Závěr

Opioidy mají doposud nezastupitelnou roli v tišení prudkých bolestí, a jak napovídají studie posledních let, mohly by mít další klinické využití při zmírňování nepříznivých dopadů ischemie na myokard. Významnou roli v kardioprotekci se podařilo prokázat především u opioidního receptoru δ_1 , jehož aktivace před ischemií nebo před reperfuzí pomáhá výrazně zmírnit jejich následky. Díky možnosti predikce reperfuze má do budoucna velký potenciál především podávání opioidních agonistů těsně před reperfuzí (opioidní postconditioning). Ačkoli bude nutné další studium pro lepší pochopení působení signálních drah vedoucích od aktivovaného opioidního receptoru k produkci kardioprotektivního účinku, již dnes přináší experimentální terapie u pacientů s akutním infarktem slibné výsledky a je tedy možné, že se některé opioidy v blízké budoucnosti stanou látkami běžně využívanými v klinické praxi nejen pro své dosud dobře známé analgetické účinky.

8. Seznam použité literatury

Aitchison, K. A., Baxter, G. F., Awan, M. M., Smith, R. M., Yellon, D. M., Opie, L. M. (2000) Opposing Effects on Infarction of Delta and Kappa Opioid Receptor Activation in the Isolated Rat Heart: Implications for Ischemic Preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 95, 1-10.

Ambrosio, G., Tritto, I., Chiariello, M. (1995) The Role of Oxygen Free Radicals in Preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27, 1035-1039.

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

Barry, U. & Z. Zuo (2005) Opioids: Old Drugs for Potential New Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 1343-1350.

Baxter, G. F., Goma, F. M., Yellon, D. M. (1995) Involvement of Protein Kinase C in the Delayed Cytoprotection Following Sublethal Ischemia in Rabbit Myocardium. *British Journal of Pharmacology*, 115, 222-224.

Baxter, G. F., Marber, M. N., Patel, V. C. (1994) Adenosine Receptor Involvement in a Delayed Phase of Myocardial Protection 24 hours After Ischemic Preconditioning. *Circulation*, 90, 2993-3000.

Bell, S. P., Sack, M. N., Patel, A., Opie, L. H., Yellon, D. M. (2000) Delta Opioid Receptor Stimulation Mimic Ischemic Preconditioning in Human Heart Muscle. *Journal of American College of Cardiology*, 36, 2296-2302

Bodnar, R. J. (2008) Endogenous Opiates and Behaviour: 2007. *Peptides*, 29, 2292-2375.

Cao, Z., Liu, L., VanWinkle, D. M. (2003) Activation of δ - and κ - Opioid Receptor by Opioid Peptides Protect Cardiomyocytes via K_{ATP} Channels. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285, H1032-H1039.

Chien, G. L., VanWinkle, D. M. (1996) Naloxone Blockade of Myocardial Ischemic Preconditioning is Stereoselective. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28, 1895-1900.

Coles, J. A., Sigg, D. C., Iaizz, P. A. (2003) Role of κ -Opioid Receptor Activation in Pharmacological Preconditioning of Swine. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284, H2091-H2099.

Corbett, A. D., Henderson, G., McKnight, A. T., Patison, S. J. (2006) 75 Years of Opioid Research: the Exciting but Vain Quest for the Holy Grail. *British Journal of Pharmacology*, 147, S153-S162.

Ferdinandy, P., Schultz, R., Baxter, G. F. (2007) Interaction of Cardiovascular Risk Factor with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacological Reviews*, 59, 418-458.

Fryer, R. M., Hsu, A. K., Eells, J. T., Nagase, H., Gross, G. J. (1999) Opioid-Induced Second Window of Cardioprotection - Potential Role of Mitochondrial K-ATP Channels. *Circulation Research*, 84, 846-851.

Fryer, R. M., Hsu, A. K., Gross, G. J. (2001) ERK and p38 MAP Kinase Activation are Components of Opioid-Induced Delayed Cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 96, 136-142.

Gross, E. R., Gross, G. J. (2006) Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular Research*, 70, 212-221.

Gross, E. R., Hsu, A. K., Gross, G. J. (2004a) Opioid-Induced Cardioprotection Occurs via Glycogen Synthase Kinase β Inhibition During Reperfusion in Intact Rat Hearts. *Circulation Research*, 94, 960-966.

Gross, E. R., Hsu, A. K., Gross, G. J. (2004b) Acute Aspirin Treatment Abolished, whereas Acute Ibuprofen Treatment Enhances Morphine-Induced Cardioprotection: Role of 12-Lipoxygenase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310, 185-191.

Gross, E. R., Peart, J. N., Hsu, A. K., Auchampach, J. A., Gross, G. J. (2005) Extending the Cardioprotective Window Using a Novel δ -Opioid Agonist Fentanyl Isothiocyanate via the PI3-Kinase Pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 288, H2744-H2749.

Halestrap, A. P., Clarke, S. J., Javadov, S. A. (2004) Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening During Myocardial Reperfusion- a Target for Cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 61, 372-385.

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

Ho, J. C. S., Wu, S., Kam, K. W. L., Sham, J. S. K., Wong, T. M. (2002) Effect of Pharmacological Preconditioning with U50488H on Calcium Homeostasis in Rat Ventricular Myocytes Subjected to Metabolic Inhibition and Anoxia. *British Journal of Pharmacology*, 137, 739-748.

Huh, J., Gross, G. J., Nagase, H., Liang, B. T. (2001) Protection of Cardiac Myocytes via δ_1 -Opioid Receptors, Protein Kinase C, and Mitochondrial K_{ATP} Channels. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 280, H377-H381.

Imagawa, J., G. F. Baxter & D. M. Yellon (1997) Genistein, a Tyrosine Kinase Inhibitor, Blocks the "Second Window of Protection" 48 h after Ischemic Preconditioning in the Rabbit. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29, 1885-1893.

Inturrisi, Ch. E. (2002) Clinical Pharmacology of Opioids for Pain. *The Clinical Journal of Pain*, 18, (4 Suppl): S3-13.

Jordan, B. A., Cvejic, S., Devi, L. A. (2000) Opioids and their Complicated Receptor Complexes. *Neuropsychopharmacology*, 23, S5-S18.

Jordan, B. A., Devi, L. A. (1998) Molecular Mechanisms of Opioid Receptor Signal Transduction. *British Journal of Anaesthesia*, 81, 12-19.

Liang, B. T., Gross, G. J. (1999) Direct Preconditioning of Cardiac Myocytes via Opioid Receptors and K-ATP Channels. *Circulation Research*, 84, 1396-1400.

Light, P. E., Sabir, A. A., Allen, B. G., Walsh, M. P., French, R. J. (1996) Protein Kinase-C-Induces Changes in the Stoichiometry of ATP Binding Activite Cardiac ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Circulation Research*, 79, 399-406.

Lishmanov, Y. B., Maslov, L. N., Barzakh, E. I., Krylatov, A. V., Oltgen, P. R., Browne, S. A., Govindashvami, M. (2009) Effects of activation of mu-, kappa(1)-, delta(1)-, delta(2)-, and ORL1-receptors on heart resistance to the pathogenic action of delayed ischemia and reperfusion. *Biology Bulletin*, 36, 354-362.

McPherson, B. C., Yao, Z. (2001) Morphine Mimic Preconditioning via Free Radical Signals and Mitochondrial K_{ATP} Channels in Myocytes. *Circulation*, 103, 290-295.

Miki, T., Cohen, M. V., Downey, J. M. (1998) Opioid Receptor Contributes to Ischemic Preconditioning Through Protein Kinase C Activation in Rabbits. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 186, 3-12.

Minami, M., Satoh, M. (1995) Molecular - Biology of the Opioid Receptors - Structures, Functions and Distributions. *Neuroscience Research*, 23, 121-145.

Morris, A. J., Malbon, C. C. (1999) Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling. *Physiological Reviews*, 79, 1373-1430.

Murry, C. E., Jennings, R. B., Reiner, K. A., (1986) Preconditioning with Ischemia: a Delay of Lethal Cell Injury in Ischemic Myocardium. *Circulation*, 74, 1124-1136.

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

Patel, H. H., Hsu A., Moore, J., Gross, G. J. (2001) BW373U86, a δ Opioid Agonist, Partially Mediates Delayed Cardioprotection via a Free Radical Mechanism that is Independent of Opioid Receptor Stimulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33, 1455-1465.

Peart, J. N., Gross, E. R., Gross, G. J. (2004) Effect of Exogenous Activation in Rat Model of Myocardial Infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 43, 410-415.

Peart, J. N., Gross, E. R., Reichelt, M. E., Hsu, A., Headrick, J. P., Gross, G. J. (2008) Activation of Kappa-Opioid Receptors at Reperfusion Affords Cardioprotection in Both Rat and Mouse Hearts. *Basic Research in Cardiology*, 103, 454-463.

Peart, J. N., Patel, H. H., Gross, G. J. (2003) δ – Opioid Receptor Activation Mimic Ischemic Preconditioning in the Canine Heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 42, 78-81.

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

Quian, Y. Z., Shipley, J. B., Levasseur, J. E., Kukreja, R. C. (1998) Disociation of Heat Shock Proteins Expression with Ischemic Tolerance by Whole Body Hyperthermia in Rat Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30, 1163-1172.

Schultz, J. E., Gross, G. J. (2001) Opioids and Cardioprotection. *Pharmacology & Therapeutics*, 89, 123-137.

Schultz, J. E., Hsu, A. K., Gross, G. J. (1996) Morphine Mimic the Cardioprotective Effect of Ischemic Preconditioning via a Glibenclamide-Sensitive Mechanism in the Rat Heart. *Circulation Research*, 78, 1100-1104

Schultz, J. E., Hsu, A. K., Gross, G. J. (1998a) Ischemic Preconditioning in the Intact Rat Heart Is Mediated by δ_1 But Not μ - or κ -Opioid Receptors. *Circulation*, 97, 1282-1289.

Schultz, J. E., Hsu, A. K., Nagase, H., Gross, G. J. (1998b) TAN-67, a δ_1 -Opioid Receptor Agonist, Reduces Infarct Size via Activation of Gi/o Proteins and K_{ATP} Channels. *American Journal of Physiology*, 274, H909-H914.

Schulz, J. E., Rose, E., Yao, Z., Gross, G. J. (1995) Evidence for Involvement of Opioid Receptors in Ischemic Preconditioning in Rat Hearts. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 268, H2157-H2161.

Stefano, G. B., Y. Goumon, F. Casares, P. Cadet, G. L. Fricchione, C. Rialas, D. Peter, D. Sonetti, M. Guarna, I. D. Welters & E. Bianchi (2000) Endogenous morphine. *Trends in Neurosciences*, 23, 436-442.

Taylor, D. A., Fleming, W. W. (2000) Unifying Perspectives of the Mechanisms Underlying the Development of Tolerance and Physical Dependence to Opioids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297, 11-18.

Ventura, C., Mailoli, M., Pintus, G., Posadino, A. M., Tabolini, B. (1998) Nuclear Opioid Receptors Activate Opioid Peptide Gene Transcription in Isolated Myocardial Nuclei. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 13383-13386.

Wang, G-Y., Wu, S., Pei, J-M., Yu, X-Ch., Wong, T-M. (2001) Opioid Receptors Mediate Effects of Ischemic Preconditioning on Both Infarct and Arrhythmias in Rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 280, H384-H391.

Williams, J. T., M. J. Christie & O. Manzoni (2001) Cellular and Synaptic Adaptations Mediating Opioid Dependence. *Physiological Reviews*, 81, 299-343.

Wittert, G., Hope, P., Pyle, D. (1996) Tissue Distribution of Opioid Receptor Gene Expression in the Rat, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218, 877-881.

Wu, S., Li, H. Y., Wong, T. M. (1999) Cardioprotection of Preconditioning by Metabolic Inhibition in the Rat Ventricular Myocyte. Involvement of κ -Opioid Receptor. *Circulation Research*, 84, 1388-1395.

Yellon, D. M. & G. F. Baxter (1995) A "Second Window of Protection" or Delayed Preconditioning Phenomenon: Future Horizons for Myocardial Protection? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27, 1023-1034.

Zhang, H. Y., McPherson, B. C., Liu, H. P., Baman, T., McPherson, S. S., Rock, P., Yao, Z. H. (2002) Role of Nitric-Oxide Synthase, Free Radicals, and Protein Kinase C delta in Opioid-Induced Cardioprotection. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301, 1012-1019.

Zhao, Z-Q., Corvera, J. S., Halas, M. E., Kerendi, F., Wang, N. P., Guyton, R. A., Vinten-Johansen, F. (2003) Inhibition of Myocardial Injury by Ischemic Postconditioning During Reperfusion: Comparison with Ischemic Preconditioning. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285, H579-H588.

Zhao, Z-Q., Vinten-Johansen, F. (2006) Postconditioning: Reduction of Reperfusion-Induced Injury. *Cardiovascular research*, 70, 200-211