

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Daniela Nováková

**Vliv morfinové abstinence na katecholaminergní a  
serotonergní neurotransmiterový systém v mozku potkana**

**The Effect of Morphine Withdrawal on the  
Catecholaminergic and Serotonergic Neurotransmitter  
System in Rat Brain**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Konzultant diplomové práce: doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2021

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

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

V Praze dne 19.8.2021

.....

Daniela Nováková

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá vlivem morfinové abstinence na katecholaminergní a serotoninergní neurotransmiterový systém v mozku potkana. Teoretická část práce shrnuje základní informace o neurotransmisi se zaměřením na katecholaminergní a serotoninergní systém, metabolismus komponent výše zmíněných neurotransmiterových systémů, jejich signalizaci, příslušné receptory, jejich distribuci a především jejich ovlivnění morfinovou závislostí a následnou abstinencí. Stručně se věnuje také opioidní signalizaci a nastiňuje dosavadní poznatky o neurochemické analýze výše zmíněných transmitterových systémů. Experimentální část práce je zaměřená na optimalizaci metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a její následné využití pro stanovení základních komponent katecholaminergního a serotoninergního neurotransmiterového systému ve vzorcích různých částí mozku potkanů ovlivňovaných intraperitoneálním podáváním morfin sulfátu a jeho následným vysazením a odpovídajících neovlivněných kontrolních potkanů. V totožných vzorcích je sledována také exprese vybraných katecholaminergních receptorů. Tato práce úspěšně zavádí do původně izokratické metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí gradient, čímž zvyšuje její účinnost, a dále zavádí do rozpouštědla pro přípravu vzorků mozkové tkáně účinná stabilizační činidla. Výsledky stanovení vybraných neurotransmiterů prokázaly vliv morfinové závislosti na katecholaminergní a serotoninergní neurotransmiterový systém v mozku potkana, který se projevuje statisticky významným nárustem koncentrace dopaminu a serotoninu ve striatu potkanů ovlivněných dlouhodobým intraperitoneálním podáváním morfinu oproti kontrole a statisticky významným nárustem koncentrace noradrenalinu v kůře mozkové obdobně ovlivněných potkanů. Tato práce neprokázala vliv vysazení morfinu na koncentraci vybraných neurotransmiterů a jejich metabolitů ani na expresi příslušných katecholaminergních receptorů, čímž potvrzuje schopnost organismu čelit změnám, které morfin na molekulární úrovni způsobuje, a snahu organismu udržovat stálé vnitřní prostředí.

**Klíčová slova:** morfin, abstinence, katecholaminergní systém, serotoninergní systém, mozek, potkan

## Abstract

The aim of this diploma thesis is to study the effect of morphine withdrawal on catecholaminergic and serotonergic neurotransmitter system in rat brain. Theoretical part of this thesis summarizes basic information known about principles of neurotransmission with focus on the catecholaminergic and serotonergic system, metabolism of its components, their signaling, relevant receptors, their distribution, and especially their effect on morphine dependence and subsequent withdrawal. It also summarizes briefly principles of opioid signaling and outlines the findings yet known about neurochemical analysis of the transmitter systems mentioned above. Experimental part of this thesis is focused on the optimization of the method of high performance liquid chromatography with fluorescence detection and its subsequent use to determine basic components of catecholaminergic and serotonergic neurotransmitter system in samples of different part of brain of rats affected by intraperitoneal administration of morphine sulphate, and its subsequent withdrawal and correspondings unaffected control rats. The expression of selected catecholaminergic receptors in identical samples is also detected. This thesis succesfully implements gradient into the originally isocratic method of high performance liquid chromatography with fluorescence detection, thereby increasing its efficiency, and further introduces effective stabilizing agents into the solvent for the preparation of brain tissue samples. The results of this thesis showed the effect of morphine dependence on the catecholaminergic and serotonergic neurotransmitter system in the rat brain which is manifested by a statistically significant increase in dopamine and serotonin levels in rat striatum affected by long-term intraperitoneal morphine dosage. This work has not proven the effect of morphine withdrawal on the level of selected neurotransmitters and their metabolites or on the expression of relevant catecholaminergic receptors, thus confirming the body's ability to cope with changes caused by morphine at the molecular level and the body's efforts to maintain stable internal conditions.

**Key words:** morphine, withdrawal, catecholaminergic system, serotonergic system, brain, rat

Ráda bych poděkovala svému školiteli, doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc., za ochotu, trpělivost a odborné vedení této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala konzultantovi své diplomové práce, doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za odbornou pomoc a cenné rady. Také bych ráda poděkovala své rodině za podporu po celou dobu mého studia.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>10</b>
2.1 Principy neurotransmise .....	10
2.1.1 Neurotransmitery .....	10
2.1.2 Receptory .....	11
2.2 Katecholaminergní neurotransmiterový systém .....	13
2.2.1 Jednotlivé komponenty katecholaminergního systému, jejich vznik a metabolismus .....	13
2.2.2 Katecholaminergní signalizace, receptory a jejich distribuce .....	13
2.3 Serotoninergní neurotransmiterový systém .....	15
2.3.1 Jednotlivé komponenty serotoninergního systému, jejich vznik a metabolismus .....	15
2.3.2 Serotoninergní signalizace, receptory a jejich distribuce .....	16
2.4 Morfin a opioidy .....	18
2.4.1 Jednotliví zástupci opioidů, metabolismus morfinu .....	18
2.4.2 Opioidní signalizace, receptory a jejich distribuce .....	19
2.5 Molekulární mechanismy vzniku morfinové závislosti a abstinence .....	21
2.5.1 Rozvoj morfinové závislosti .....	21
2.5.2 Rozvoj morfinové abstinence .....	23
2.6 Chemická analýza neurotransmiterových systémů .....	25
<b>3 Cíle diplomové práce</b> .....	<b>26</b>
<b>4 Experimentální část</b> .....	<b>27</b>
4.1 Vzorky mozkové tkáně .....	27
4.2 Chemikálie a přístrojové vybavení .....	28
4.2.1 Chemikálie pro HPLC stanovení vybraných neurotransmiterů ve vzorcích mozkové tkáně .....	28
4.2.1.1 Činidla pro homogenizaci vzorků mozkové tkáně .....	28
4.2.1.2 Standardy analyzovaných neurotransmiterů .....	28
4.2.1.3 Ostatní použité chemikálie .....	28
4.2.2 Přístrojové vybavení pro HPLC stanovení vybraných neurotransmiterů ve vzorcích mozkové tkáně .....	29
4.2.3 Chemikálie pro detekci exprese receptorů ve vzorcích mozkové tkáně .....	29
4.2.3.1 Homogenizace vzorků .....	29

4.2.3.2 Stanovení celkové koncentrace proteinů .....	29
4.2.3.3 Příprava vzorků pro elektroforézu .....	29
4.2.3.4 Elektroforéza.....	29
4.2.3.5 Western blot.....	30
4.2.3.6 Použité protilátky.....	30
4.2.4 Přístrojové vybavení a materiál pro detekci exprese receptorů ve vzorcích mozkové tkáně.....	30
4.3 Postupy měření .....	30
4.3.1 HPLC stanovení vybraných neurotransmiterů ve vzorcích mozkové tkáně.....	30
4.3.2 Detekce exprese receptorů ve vzorcích mozkové tkáně .....	31
4.4 Zpracování dat .....	32
<b>5 Výsledky a diskuze.....</b>	<b>33</b>
5.1 Výsledky .....	33
5.1.1 Optimalizace HPLC–FLD metody stanovení vybraných neurotransmiterů .....	33
5.1.2 Stanovení základních komponent katecholaminergního a serotoninergního neurotransmiterového systému ve vybraných částech mozku potkanů.....	45
5.1.3 Detekce exprese adrenergických a dopaminergních receptorů ve vybraných částech mozku potkana .....	59
5.2 Diskuze .....	63
<b>6 Závěr .....</b>	<b>67</b>
<b>Reference .....</b>	<b>69</b>

## Seznam zkratek a symbolů

cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
COMT	katechol-O-metyltransferasa (z angl. catechol-O-methyltransferase)
CREB	vazebný protein pro cAMP responzivní element (z ang. cAMP response element-binding protein)
Dopamin	DA
DOPAC	3,4-dihydroxyfenylactová kyselina (z angl. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid)
E	adrenalin (z angl. epinephrine)
G-protein	heterotrimerní GTP-vázající protein
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina (z angl. $\gamma$ -aminobutyric acid)
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny (z angl. G-protein coupled receptors)
GTP	guanosintrifosfát
5-HIAA	5-hydroxyindolactová kyselina (z angl. 5-hydroxyindolacetic acid)
HPLC-FLD	vysokoúčinná kapalínová chromatografie s fluorescenční detekcí (z angl. high performance liquid chromatography with fluorescence detection)
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
5-HTP	5-hydroxy-L-tryptofan (z angl. 5-hydroxy-L-tryptophan)
HVA	homovanilová kyselina (z angl. homovanilic acid)
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin (z angl. L-3,4-dihydroxyphenylalanine)
LDR	lineární dynamický rozsah (z ang. linear dynamic range)
LOD	limit detekce (z angl. limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (z angl. limit of quantification)
MAO	monoaminoxidasa
3-MT	3-methoxytyramin
NE	noradrenalin (z angl. norepinephrine)
PKA	proteinkináza A
TBS	Tris-pufrovaný solný roztok
TMES	pufř obsahující Tris, chlorid hořečnatý, kyselinu ethylendiamintetraoctovou a sacharosu
T <sub>r</sub>	retenční čas
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

# 1 Úvod

Morfin, jako hlavní zástupce opioidů, je v klinické praxi hojně využíván k tlumení chronické a středně silné až silné bolesti, dlouhodobé podávání morfinu nicméně vede k rozvoji tolerance a závislosti, která může být po vysazení morfinu následována rozvojem abstinčního syndromu. Mechanizmy, které se podílejí na vzniku a rozvoji morfinové závislosti a abstinence, jsou velmi komplexní a nebyly dosud ještě zcela objasněny. Tyto mechanismy ovlivňují různé části centrální nervové soustavy a mohou indukovat změny v některých nervových signálních drahách. Hlavní roli v jejich rozvoji mohou mít neurotransmitery, které jsou nezbytné pro zajišťování komunikace napříč buňkami. Na molekulárních mechanismech vzniku morfinové závislosti a abstinence se mimo jiné podílejí neurotransmitery katecholaminergního a serotoninergního systému, jejichž vlivem na morfinovou abstinenci se zabývá i tato práce. Pochopení změn indukovaných morfinem na úrovni výše zmíněných neurotransmiterů by mohlo pomoci objasnit některé mechanismy vzniku a rozvoje morfinové závislosti a abstinence.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Principy neurotransmise

#### 2.1.1 Neurotransmitery

Jedním ze základních rysů živého mnohobuněčného organismu je komunikace mezi jednotlivými buňkami. V nervovém systému tuto funkci zastává převážně proces chemické neurotransmise. Neurotransmitery jsou endogenní mediátory, které přenášejí signál z presynaptického neuronu k cílové postsynaptické buňce. Tyto neurotransmitery bývají v neuronu uloženy zpravidla v tzv. vezikulách, ze kterých mohou být působením akčního potenciálu, který spustí příliv vápenatých kationtů do presynaptické štěrbině, exocytózou uvolňovány. Tohoto procesu se účastní mnohé proteiny a proteinové komplexy, mezi které patří například SNARE komplex, tvořený syntaxinem-1, SNAP-25 a synaptobrevinem [1, 2].

Již v roce 1969 Bernard Katz prokázal, že neurotransmitery jsou z buňky uvolňovány v tzv. kvantech, která obsahují až několik tisíc molekul neurotransmiteru [3]. Jedno kvantum odpovídá uvolnění neurotransmiteru z jedné synaptické vezikuly [4].

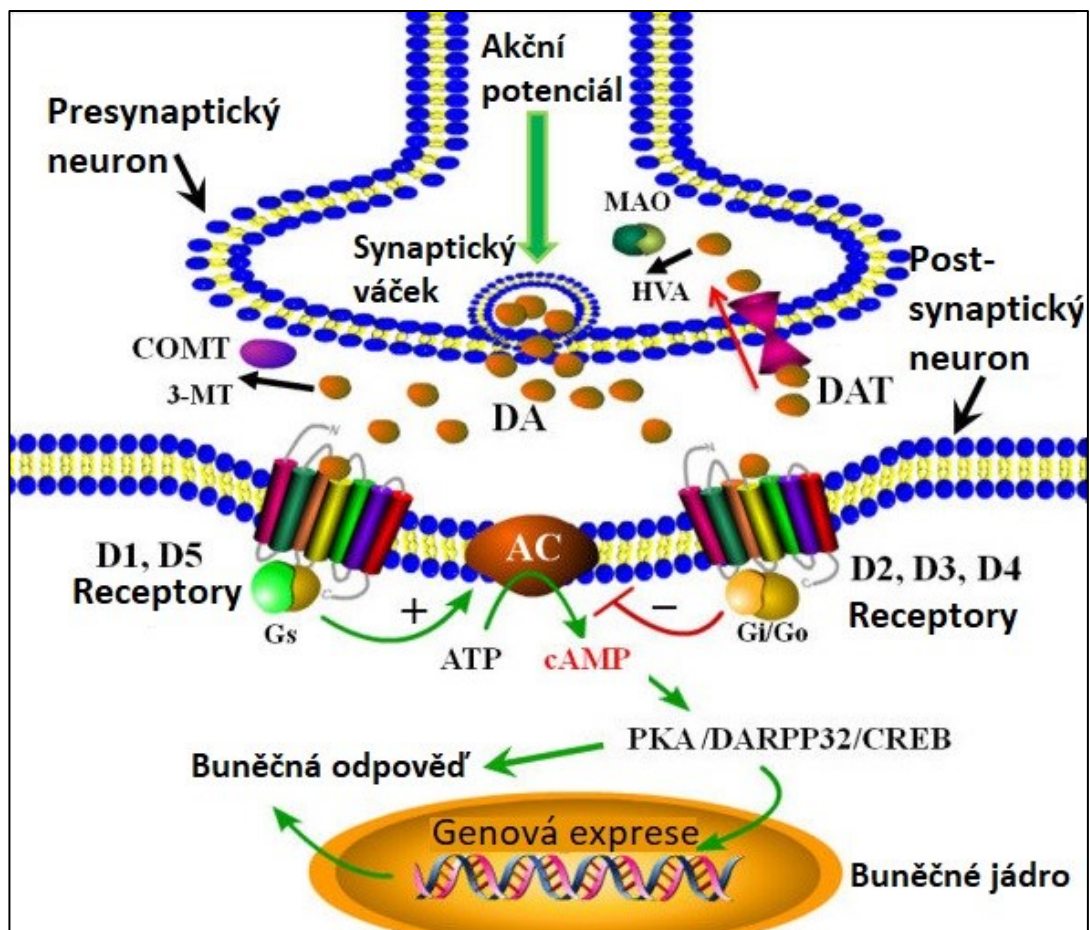
Po výlevu neurotransmiteru z neuronu dochází buď k jeho vazbě na receptor, který poté určuje povahu fyziologického signálu zprostředkovaného daným receptorem, cílové buňky nebo k jeho zpětnému vycytání či degradaci, čehož se účastní příslušné transportéry a mnohé enzymy. Tyto transportéry a degradační enzymy bývají často cíleně ovlivňovány některými léčivy nebo drogami [5]. Schema neurotransmise je znázorněno na obrázku 2.1.

Mezi základní neurotransmitery patří deriváty aminokyselin, jako jsou acetylcholin, který je nezbytný pro ovlivňování neuronální excitability, synaptického přenosu a plasticity,  $\gamma$ -aminomáselná kyselina (GABA), hlavní inhibiční neurotransmiter nebo histamin, případně aminokyseliny samotné, jako je glycin, nebo hlavní excitační neurotransmiter glutamát, dále pak monoaminergní mediátory, kam patří katecholaminy, jejichž chemická struktura je odvozena od molekuly katecholu, mezi něž patří dopamin, noradrenalin a adrenalin a indolaminy (označované také jako tryptaminy), které obsahují indolový strukturní motiv a jsou odvozené od struktury aminokyseliny tryptofanu. Jejich hlavním zástupcem je 5-hydroxytryptamin (serotonin) [6-10].

## 2.1.2 Receptory

V centrální nervové soustavě se neurotransmitery mohou vázat na dva typy receptorů, ionotropní (ligandem řízené receptory) a metabotropní receptory. Iotropní receptory, mezi které patří například GABA<sub>A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, glycinové a nikotinové acetylcholinové receptory, jsou pentamerní komplexy tvořené několika podjednotkami, z nichž každá má extracelulární synaptickou oblast, několik oblastí, které zasahují do buněčné membrány a také intracelulární oblasti. Centrální kanál, kterým procházejí ionty, je pak tvořen  $\alpha$ -helikálními strukturami výše zmíněných podjednotek. Tyto receptory, které jsou za normálních podmínek pro ionty nepropustné, po vazbě příslušného ligandu mění svůj konformační stav, čímž dojde k otevření kanálu, který je schopen propouštět ionty do buňky. Tato konformační změna je pak následovaná přechodem do desenzitizovaného stavu, kdy je iontový kanál uzavřen a receptor nereaguje na další stimulaci. Z tohoto stavu se pak receptor přesouvá do uzavřeného stavu, a je tak připraven k další aktivaci [11, 12],

Jedním z nejvýznamnějších zástupců metabotropních receptorů je superrodina receptorů spřažených s proteiny vázajícími guaninové nukleotidy (GPCRs), označovaných také někdy zkráceně G-proteiny, které jsou tvořeny podjednotkami  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Tyto receptory obsahují N-koncovou extracelulární doménu, C-koncovou intracelulární doménu a transmembránovou doménu tvořenou sedmi  $\alpha$ -helixy. Mechanismem přenosu informace od neurotransmiteru dále do buňky je konformační změna receptoru, ke které dochází po navázání neurotransmiteru do vazebného místa receptoru. Před vazbou ligandu na receptor je na  $\alpha$ -podjednotce G-proteinu navázán dinukleotid guanosindifosfát, který je po vazbě příslušného ligandu nahrazen trinukleotidem guanosintrifosfátem, zároveň dochází k disociaci  $\alpha$ -podjednotky, která váže příslušný nukleotid, od komplexu podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$ , což způsobuje aktivaci daného GPCR. Ačkoliv mají různé receptory spřažené s G-proteiny stejný nebo velmi podobný mechanismus účinku, působí na širokou škálu signálních drah, mezi které patří například adenylylcyklázová signální dráha nebo tyrozinkinázové a fosfolipázové kaskády [11], [13-14].



Obrázek 2.1 Schema dopaminergní neurotransmise; díky akčnímu potenciálu dojde k uvolnění dopaminu z vezikuly do synaptické štěrby, kde může být metabolizován, nebo přenesen transportérem zpět do buňky a dále metabolizován, nebo se může vázat na své receptory na postsynaptickém neuronu a spouštět příslušnou buněčnou odpověď, v tomto případě buď stimulaci nebo inhibici adenylylcyklázy. Upraveno dle [15].

## 2.2 Katecholaminergní neurotransmitterový systém

### 2.2.1 Jednotlivé komponenty katecholaminergního systému, jejich vznik a metabolismus

Jako katecholaminy jsou označovány biogenní aminy, v jejichž chemické struktuře figuruje 3,4-dihydroxyfenyl (catechol). Mezi jejich hlavní zástupce patří dopamin, noradrenalin a adrenalin. Prekurzorem jejich syntézy je L-tyrosin, který je oxidován na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA), jenž je poté pomocí příslušné dekarboxylázy přeměňován na dopamin, ten může poté být enzymem dopamin- $\beta$ -hydroxylázou přeměňován na noradrenalin, ze kterého může být za katalýzy N-methyltransferasou syntetizovaný adrenalin. Dopamin může být dále také enzymem monoaminoxidasou oxidován na 3,4-dihydroxyfenylactovou kyselinu (DOPAC), ze které může působením catechol-O-methyltransferasy vznikat kyselina homovanilová [16-18].

### 2.2.2 Katecholaminergní signalizace, receptory a jejich distribuce

Katecholaminy se vyskytují převážně v centrální a periferní nervové soustavě, je možné je ale nalézt i mimo nervovou soustavu, například ve dřeni nadledvin, kde plní především hormonální funkci. V centrální nervové soustavě jsou neurotransmitery dopamin a noradrenalin produkovány dopaminergními a noradrenergními neurony. Ty se nacházejí v nejrůznějších oblastech mozku s axonálním přesahem do široké škály cílových oblastí mozku, kde hrají klíčovou roli v mnohých funkcích nervového systému. Dopaminergní neurony jsou lokalizovány především v oblasti substantia nigra, odkud inervují oblast caudate-putamen, a tvoří tak nigrostriatální dráhu, ve které hrají významnou roli v řízení motoriky. Dopaminergní neurony se nacházejí také ve ventrální tegmentální oblasti a jejich axony sahají do oblastí mozku, jako je nucleus accumbens, amygdala a prefrontální kortex, čímž tvoří mezolimbickou dráhu, která je zapojena do řízení emocí, motivace, odměny nebo tvorby paměti. Další dopaminergní neurony se nacházejí například v hypothalamu s axonálním přesahem do hypofýzy, jejíž funkci mohou modulovat. Noradrenergní neurony je možné nalézt v oblasti mozku locus coeruleus, odkud inervují prefrontální kortex, amygdalu, hipokampus nebo thalamus. Tyto neurony ovlivňují jak kognitivní funkce (pozornost a paměť) tak vegetativní funkce (neuroendokrinní a autonomní regulace) [19-22].

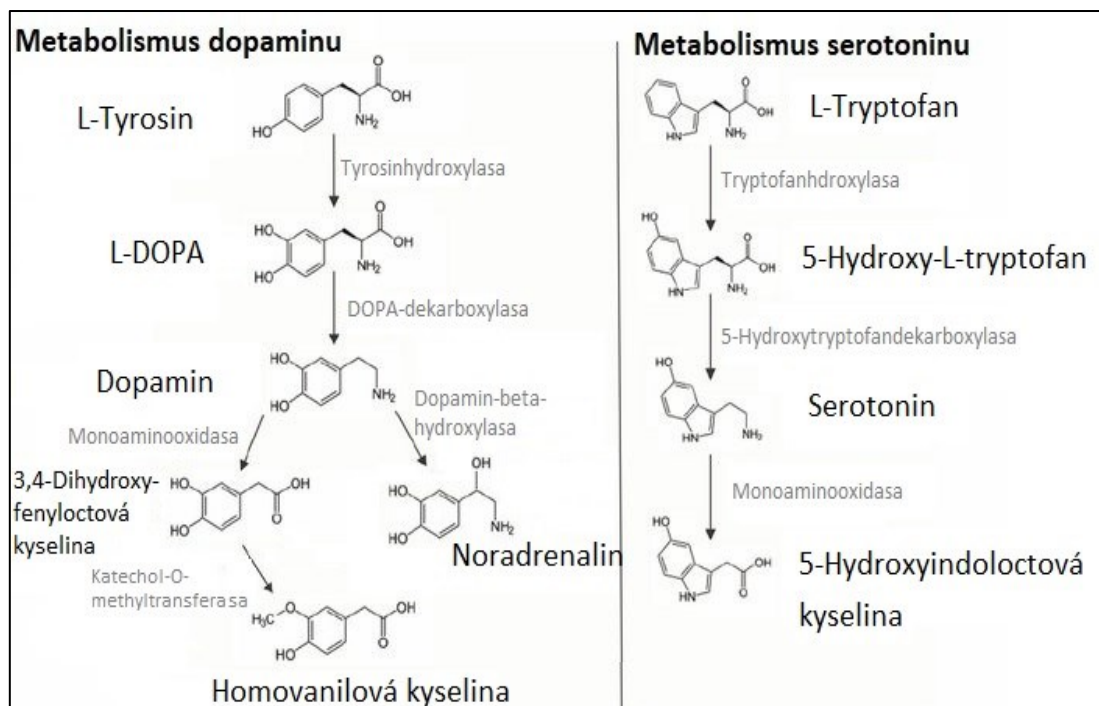
V organismu se katecholaminy vážou na dopaminergní a adrenergní receptory. Dopaminergní receptory, spadající do rodiny receptorů spřažených s GTP vázajícími proteiny, je možné rozdělit do pěti základních typů (D1-D5 receptory), které jsou kódovány odlišnými geny, plnící také odlišné funkce, a které jsou distribuovány v různých částech centrální nervové soustavy. Podle toho, s jakými G-proteiny jsou dopaminergní receptory spřaženy, je možné rozdělit je do dvou skupin. D1 a D5 receptory jsou spřaženy s Gs proteiny, stimulujícími enzym adenylylcyklázu, což má za následek aktivaci sekundárního posla cyklického adenosinmonofosfátu a následnou produkci proteinkinázy A, která dále může ovlivňovat nejrůznější transkripční faktory v buněčném jádře. Kromě adenylylcyklázy tyto podtypy dopaminergních receptorů aktivují také enzym fosfolipázu C, což vede k indukci intracelulárního výlevu vápenatých kationtů (a tím i k ovlivnění výlevu jiných neurotransmiterů) a k aktivaci proteinkinázy C. Receptory D1 a D5 jsou široce distribuovány ve striatu, nucleus accumbens, čichovém bulbu a v oblasti substantia nigra. Tyto receptory hrají klíčovou roli v regulaci systému odměny, motorické aktivity, paměti a učení a také v regulaci některých renálních funkcí [23-25]. D2, D3 a D4 receptory jsou spřaženy s inhibičními G-proteiny, které adenylylcyklázu naopak inhibují a aktivují draselné kanály, mezi jejich funkce patří například ovlivňování některých kognitivních funkcí, pozornosti nebo spánku. Hrají také roli v neuronálním vývoji. Tyto podtypy dopaminergních receptorů se vyskytují hlavně ve striatu, globus pallidus, jádře nucleus accumbens, hipokampu, amygdale a kůře mozkové [24, 26-27].

Také adrenergní receptory patří do rodiny receptorů spřažených s GTP vázajícími proteiny. Adrenergní receptory se dále dělí na  $\alpha$ -adrenergní a  $\beta$ -adrenergní. Receptory obou těchto skupin je možné ještě rozdělit do několika podtypů.  $\alpha$ -adrenergní receptory se dělí na  $\alpha_{1A}$   $\alpha_{1B}$   $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{2A}$   $\alpha_{2B}$  a  $\alpha_{2C}$ . Do  $\beta$ -adrenergních receptorů spadají podtypy  $\beta_1$   $\beta_2$  a  $\beta_3$ . Adrenergní receptory po jejich interakci s příslušným navázaným ligandem pomáhají zprostředkovat činnost sympatického nervového systému, včetně různých odpovědí buňky na aktuální stav organismu, jako je arteriolární kontrakce hladkého svalstva nebo srdeční kontrakce, které hrají klíčovou roli v regulaci srdečních funkcí a homeostázy. V nervové soustavě se adrenergní receptory nacházejí hlavně v kůře mozkové, thalamu, amygdale, mozečku, hipokampu nebo v míše. Noradrenergní systém může modulovat řadu neurologických funkcí, jako je proces učení a paměti, uplatňuje se také při vývoji mozku nebo při spánku, ale i při motorické aktivitě. Ovlivňuje také vznik depresí a úzkostných poruch [28-30].

## 2.3 Serotoninergní neurotransmitterový systém

### 2.3.1 Jednotlivé komponenty serotoninergního systému, jejich vznik a metabolismus

Hlavním zástupcem serotoninergního neurotransmitterového systému je indolamin 5-hydroxytryptamin (serotonin). Prekurzorem jeho syntézy je esenciální aminokyselina L-tryptofan; ten vstupuje do kynureninové metabolické dráhy a je v prvním kroku hydroxylován pomocí tryptofan hydroxylázy, enzymu specifického pro serotoninergní neurony, na intermediát 5-hydroxy-L-tryptofan (5-HTP), který je následně dekarboxylázou aromatických L-aminokyselin přeměněn na 5-hydroxytryptamin. Ten je z velké části metabolizován monoaminoxidasou na 5-hydroxyindolactovou kyselinu, k této deaktivaci 5-hydroxytryptaminu může docházet už v synaptické šterbině. Kyselina 5-hydroxyindolactová, která je pak vyloučena močí, často slouží jako marker neuroendokrinních nádorů produkujících serotonin [31-33]. Zjednodušené schema metabolismu dopaminu a serotoninu je znázorněno na obrázku 2.2.



Obrázek 2.2 Zjednodušené schéma metabolismu dopaminu a serotoninu; v levé části je znázorněna biosyntéza dopaminu z L-tyrosinu a jeho metabolismus na finální produkt kyseliny homovanilovou. V pravé části je znázorněna biosyntéza serotoninu z L-tryptofanu a jeho metabolismus na finální produkt kyseliny 5-hydroxyindolovou. Upraveno dle [34].

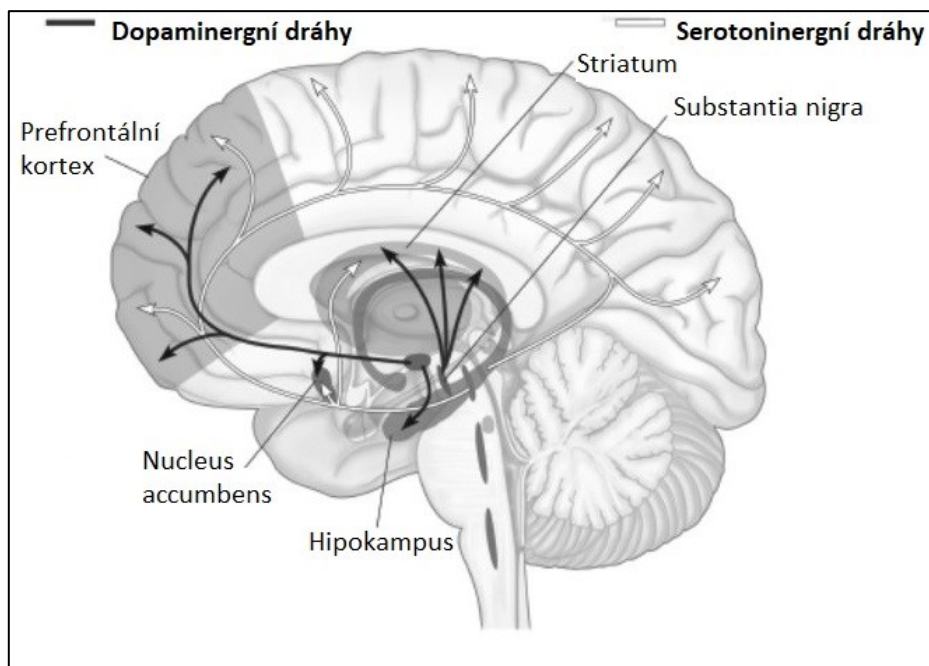
### 2.3.2 Serotoninergní signalizace, receptory a jejich distribuce

Jak již bylo řečeno, specifické enzymy pro syntézu 5-hydroxytryptaminu je možné nalézt v serotoninergních neuronech. Tyto neurony se nacházejí především v oblasti mozku nucleus raphe, s axonálním přesahem do mnoha dalších oblastí mozku, například do kůry mozkové, hypothalamu, amygdaly, ventrální tegmentální oblasti, mozečku, hipokampu, thalamu a mnoho dalších. Kromě nervové soustavy je 5-hydroxytryptamin hojně syntetizován také ve střevě enterochromafinními buňkami. I vzhledem k velké škále oblastí mozku inervovaných serotoninergními neurony, má 5-hydroxytryptamin zásadní vliv na širokou škálu neurálních funkcí, jako je regulace nálady, kognitivních funkcí, agrese nebo spánku, termoregulace, kardiovaskulární regulace, regulace bolesti a dalších [35-36].

Serotonin se v organismu váže na serotoninergní receptory. V současné době je známo více než 15 serotoninergních receptorů, které se na základě svých farmakologických

vlastností a sekvence aminokyselin dělí do sedmi hlavních skupin (5-HT1 až 5-HT7). Receptory těchto skupin se dále dělí do mnoha podtypů. Do skupiny receptorů 5-HT1 patří podtypy 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E a 5-HT1F, tyto podtypy mají obecně schopnost inhibovat adenylylcyklázu. Nacházejí se převážně v oblasti mozku nucleus raphe, hipokampu, striatu a kůře mozkové, mimo centrální nervovou soustavu je možné je nalézt v hladké svalovině nebo například v děloze. Do skupiny 5-HT2 receptorů řadíme podtypy 5-HT2A, 5-HT2B a 5-HT2C, ty se nacházejí například v kůře mozkové, mozečku nebo hypothalamu v rámci centrální nervové soustavy, mimo ni se nacházejí také v hladké svalovině, žaludku nebo v krevních destičkách. Funkcí těchto podtypů serotoninergních receptorů je aktivace fosfolipázy C. Receptor 5-HT3 plní funkci ligandem řízeného kanálu a bylo zjištěno, že může mimo jiné ovlivňovat výlev dalších neurotransmiterů. Nachází se v oblasti mozku area postrema nebo viscerálních aferentních neuronech. Funkcí receptoru 5-HT4 je aktivace adenylylcyklázy a je možné ho nalézt v hipokampu a v gastrointestinálním traktu. Mezi podtypy receptoru 5-HT5 patří 5-HT5A a 5-HT5B, nacházejí se v čichovém bulbu a v habenule. Jejich funkce zatím není zcela objasněná [35, 37-39].

Dopaminergní a serotoninergní dráhy v lidském mozku jsou znázorněny na obrázku 2.3.



Obrázek 2.3 Grafické znázornění dopaminergních a serotonergních drah v lidském mozku. Upraveno dle [40].

## 2.4 Morfin a opioidy

### 2.4.1 Jednotliví zástupci opioidů, metabolismus morfinu

Termín „opioid“ označuje látku, která má schopnost vázat se na opioidní receptory. Termínem „opiát“ je možné označit opioidy, které jsou obsaženy ve šťávě (opiu) máku setého, jedná se hlavně o alkaloidy morfin a kodein. Do opioidů můžeme dále zařadit semi-syntetické opioidy, což jsou látky syntetizované z opiátů. Nejznámějším zástupcem semi-syntetických opioidů je heroin, který možno připravit acylací morfinu. Zástupci čistě syntetických opioidů jsou například fentanyl nebo metadon [41, 42].

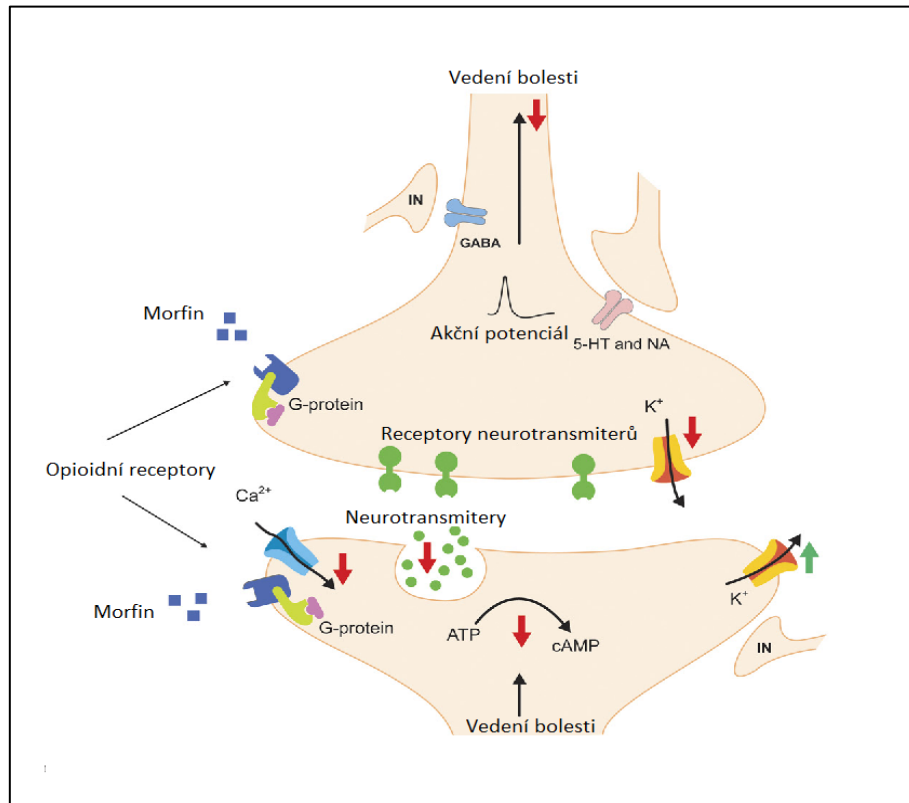
Účinky opioidů silně závisí na jejich vazbě na příslušné opioidní receptory. Obecně jsou jejich účinky analgetické, sedativní až anestetické. Opioidy mají vliv také na gastrointestinální trakt (snižují střevní motilitu, a mohou tak způsobovat zácpu), respirační systém (způsobují útlum dechového centra), imunitní systém nebo kardiovaskulární systém [43].

Nejznámějším a nejhojněji využívaným opioidem je morfin. Systematický název morfinu je (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ )-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,6-diol. Jeho molekula obsahuje strukturní motiv fenanthrenu. Chemicky morfin patří mezi slabé báze. V organismu je při druhé fázi biotransformace metabolizován pomocí enzymu glukuronyltransferasy na morfin-6-glukuronid a morfin-3-glukuronid. Morfin-6-glukuronid je, stejně jako jeho mateřská molekula morfin, agonista  $\mu$ -opioidních receptorů a má také analgetické účinky. Metabolit morfin-3-glukuronid postrádá tuto analgetickou aktivitu, bývá nicméně spojován s některými neuroexcitačními projevy, jako je alodynie, myoklonus nebo záchvatové stavy. Minoritními metabolity morfinu jsou morfin-N-oxid, 3-acetylmorfin, morfin-3-sulfát a nebo morfin-6-sulfát [44, 45].

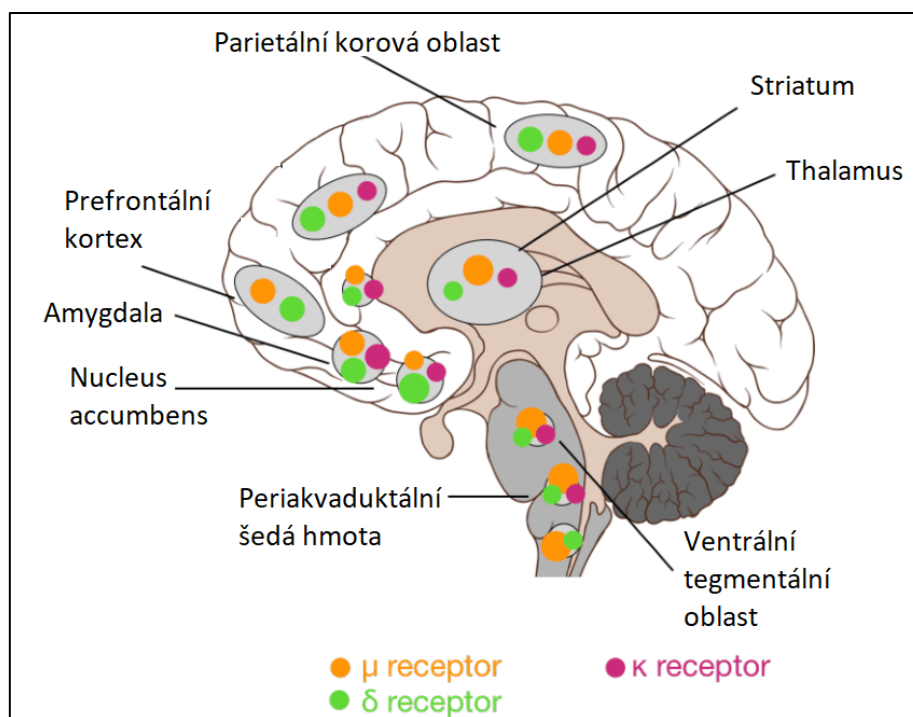
#### 2.4.2 Opioidní signalizace, receptory a jejich distribuce

Jak již bylo zmíněno, opioidy se v organismu vážou na opioidní receptory. Existují  $\mu$ -opioidní receptory,  $\kappa$ -opioidní receptory,  $\delta$ -opioidní receptory a nociceptinové opioidní receptory. Mezi ligandy opioidních receptorů patří také endogenní opioidy enkefaliny, dynorfiny a endorfiny. Aktivací zejména  $\mu$ -opioidních receptorů, které jsou spřaženy s inhibičními GTP-vázajícími proteiny, dochází k supresi adenylylcyklázy, což má za následek inhibici sekundárního posla cyklického adenosinmonofosfátu, a k modulaci iontových kanálů, což vede ke snížení neuronální excitability a k projevu účinků typických pro opioidy jako je analgesie, mióza, bradykardie, sedace, hypotermie a další. Klasickým a velmi důležitým aspektem transdukce opioidních receptorů je schopnost jejich ligandů modulovat vápníkové a draslíkové iontové kanály. Po aktivaci příslušného GTP-vázajícího proteinu dochází k jeho interakci s dovnitř usměřňujícím draslíkovým kanálem typu 3, Kir3. Tento proces způsobuje hyperpolarizaci buňky a inhibuje tonickou neurální aktivitu. Všechny čtyři typy opioidních receptorů také ovlivňují vápníkovou vodivost tím, že po aktivaci receptoru spřaženého s GTP-vázajícím proteinem a následné disociaci  $\alpha$ -podjednotky a  $\beta\gamma$ -komplexu dochází k vazbě právě  $\beta\gamma$ -komplexu přímo do vápníkového kanálu, čímž se zamezí vstupu vápenatých iontů do buňky. Opioidy jsou nechvalně známé hlavně pro svojí schopnost ovlivňovat vnímání bolesti, k tomu dochází právě prostřednictvím ovlivnění vstupu vápenatých iontů do buňky a následné inhibice výlevu neurotransmiterů převážně z výběžků ganglií vedoucích do zadních rohů míšních [43, 46-47]. Schema ovlivnění vedení bolesti pomocí opioidů je znázorněno na obrázku 2.4

Opioidní receptory jsou v nervové soustavě široce exprimovány a nacházejí se také v drahách modulujících bolest, především v oblastech mozku locus coeruleus a v periaqueductální šedé hmotě. Opioidní receptory se nacházejí rovněž v limbické oblasti, mezimozku a kůře mozkové [46]. Grafické znázornění distribuce opioidních receptorů v lidském mozku je uvedeno na obrázku 2.5.



Obrázek 2.4 Schema opioidního ovlivnění vedení bolesti; morfin se váže na opioidní receptory spřažené s G–proteiny, které na presynaptickém neuronu inhibují adenylycyklázu, což zabraňuje syntéze cAMP, dochází také k inhibici vstupu vápenatých kationtů do buňky, což inhibuje výlev neurotransmiterů. Na postsynaptickém neuronu dochází k inhibici výlevu draselných iontů, což snižuje excitabilitu buňky a zabraňuje vedení bolesti. Upraveno dle [48].



Obrázek 2.5 Grafické znázornění distribuce  $\mu$ -,  $\kappa$ - a  $\delta$ -opioidních receptorů v lidském mozku. Upraveno dle [49].

## 2.5 Molekulární mechanismy vzniku morfinové závislosti a abstinence

### 2.5.1 Rozvoj morfinové závislosti

Opioidy jsou pro své analgetické a euforizující účinky užívány po tisíce let. V tomto a minulém století nicméně došlo k masivnímu nárustu užívání těchto látek, jejichž nadužívání může vést k rozvoji závislosti. V současné době se v souvislosti s rozvojem morfinové závislosti zavádí termín *porucha užívání opioidů*. Porucha užívání opioidů je chronická porucha, která je způsobována aktivací center odměny v centrální nervové soustavě a následným zvyšujícím se zapojováním tzv. center anti-odměn, což může vést k nepříznivým emočním stavům a k relapsu. Uvádí se, že celosvětově trpí poruchou užívání opioidů až 16 milionů osob [49]. Diagnóza poruchy užívání opioidů bývá stanovována na základě splnění dvou nebo více z kritérií, mezi která můžeme zařadit například zvyšování dávky užívaných opioidů, nadměrný čas strávený získáváním nebo užíváním opioidů, silná touha užívat opioidy, potřeba zvyšovat dávku opioidů, rozvoj

abstinenčních příznaků při snížení dávky, pokračování v užívání opioidů i přes psychické nebo fyzické problémy nebo užívání opioidů i v životně ohrožujících situacích [50, 51].

Cesta k rozvoji morfinové závislosti začíná už vazbou morfinu na opioidní receptor. Při chronickém užívání morfinu může docházet k downregulaci opioidních receptorů, k jejich desenzitizaci a k odpojení od signálních drah, které za normálních okolností spouštějí. Bylo zjištěno, že chronické užívání morfinu zvyšuje v buňce hladinu cyklického adenosinmonofosfátu. Toto zvýšení není pravděpodobně důsledkem odpojení opioidního receptoru od příslušné signální dráhy, ale mohlo by odrážet adaptační změny buňky, jako například upregulaci adenylylcyklázy, proteinkinázy A a CREB. Právě tato indukovaná regulace cAMP dráhy bývá dávána do souvislosti s rozvojem morfinové tolerance a závislosti [52, 53].

Bylo zjištěno, že chronické užívání opioidů ovlivňuje také některé neurotransmiterové systémy. Dlouhodobé užívání morfinu zvyšuje uvolňování dopaminu tím, že zvyšuje aktivitu dopaminergních neuronů ve ventrální tegmentální oblasti. Předpokládá se, že mechanismus výše zmíněného ovlivnění dopaminové mezolimbické dráhy spočívá v aktivaci  $\mu$ -opioidních receptorů nacházejících se na GABAergních neuronech ve ventrální tegmentální oblasti a oblasti substantia nigra pars reticulata, které mají významný podíl na regulaci aktivity výše zmíněných dopaminergních neuronů. Proto hraje mezolimbická dráha významnou roli v ovlivňování chování spojeného s pocitem odměny po užití opioidů a rozvojem závislosti [54, 55]. Se zvyšováním hladiny dopaminu v některých částech mozku souvisí i zvyšování hladiny jeho metabolitů 3,4-dihydroxyfenyloctové a homovanilové kyseliny [56].

Společně s ovlivňováním hladiny neurotransmiterů samotných ovlivňuje morfin i jejich receptory. Chronická expozice morfinu ovlivňuje mRNA expresi některých dopaminergních receptorů. Dle Spanglera a kol. [57] po dlouhodobém podávání morfinu potkanům došlo v oblasti mozku caudate putamen, substantia nigra a ve ventrální tegmentální oblasti ke snížení exprese mRNA dopaminergních D2 receptorů a ke zvýšení exprese mRNA D3 receptorů a k upregulaci těchto receptorů, které přispívají k negativní modulaci mezolimbické dopaminové dráhy, což bývá spojováno s ovlivňováním centra odměny (které souvisí i s rozvojem drogové závislosti), mimo jiné prostřednictvím stimulace  $\mu$ -opioidních receptorů [58].

Na rozvoj tolerance a závislosti mají pravděpodobně vliv i morfinem indukované změny v noradrenergním a serotoninergním neurotransmitterovém systému. Je známo, že analgetický účinek opioidů je z části způsobován stimulací serotoninergního systému [59, 60]. Bylo zjištěno, že podávání morfinu způsobuje zvýšený výlev serotoninu, s čímž souvisí i zvýšení jeho syntézy a metabolismu v různých oblastech mozku, mimo jiné také v kůře mozkové a striatu [56]. S tím pravděpodobně souvisí i zjištění, že při dlouhodobém podávání morfinu dochází k upregulaci 5-HT<sub>2</sub> serotoninergních receptorů.

Byla zjištěna také úzká spojitost mezi opioidními a adrenergními receptory. Některé ligandy opioidních receptorů, například morfin, mohou mít afinitu k adrenergním receptorům a naopak ligandy adrenergních receptorů, jako je adrenalin, noradrenalin nebo dopamin, se mohou vázat na opioidní receptory [61]. Mimo to byl po podávání morfinu pozorován zvýšený výlev noradrenalinu v nervové soustavě a s tím související zvýšená exprese adrenergních receptorů [62, 63].

## 2.5.2 Rozvoj morfinové abstinence

Morfinová abstinence nebo abstinenční syndrom je souborem příznaků, následujících po náhlém vysazení morfinu a je také jedním z hlavních projevů morfinové závislosti. Mezi tyto příznaky patří zvýšená nervozita, úzkost, svalový třas případně křeče, nebo průjem. Tyto negativní psychické i fyzické aspekty abstinenčního syndromu přispívají k dalšímu zneužívání návykových látek [64].

Molekulární mechanismy vzniku morfinové abstinence nejsou ještě zcela objasněny, díky rozvoji na poli biologických a chemických věd a zdokonalování metod sloužících k bližšímu pochopení některých buněčných procesů, bylo zjištěno, že při rozvoji morfinové abstinence a abstinenčního syndromu by se mohly mimo jiné uplatňovat neurotransmitterové systémy, jejichž souvislost s podáváním morfinu byla popisována v předchozích podkapitolách. Bylo zjištěno, že rozvoj morfinové abstinence souvisí se superaktivací adenylylcyklázového signálního systému [64]. Předpokládá se také souvislost se supresí dopaminergního a serotoninergního neurotransmitterového systému, na čemž se podílela studie [65]. Ta prokázala snížení hladiny serotoninu v mozku a s tím související snížení hladiny jeho prekurzoru, tryptofanu mezi devátým a třináctým dnem po vysazení morfinu. Dále prokázala zvýšení hladiny noradrenalinu v kůře mozkové a hypothalamu při chronickém podávání morfinu a jeho následné snížení po vysazení

morfinu. Rozvoj abstinenciho příznaku může mimo jiné také souviset se zjištěním, že po vysazení morfinu dochází k upregulaci 5-HT1 receptorů [66].

Prokázán byl také vliv morfinové abstinence na adrenergní receptory. Bylo zjištěno, že po vysazení morfinu dochází u potkanů v kůře mozkové k upregulaci  $\alpha_{2A}$  adrenergních receptorů, což bývá spojováno také s upregulací adenylylcyklázového a cAMP signálního systému a také s rozvojem morfinové abstinence [67, 68].

Dle Dumonta a kol. [69] se na rozvoji morfinové závislosti podílejí i  $\alpha_1$  a  $\beta$  adrenergní receptory, které jsou aktivovány právě výše zmíněným zvýšeným výlevem noradrenalinu. Vysazení morfinu má vliv také na zvýšenou expresi GABA<sub>A</sub> receptorů, které je způsobeno jak aktivací  $\beta$  adrenergních receptorů, tak aktivací adenylylcyklázy, proteinkinázy A a také  $\alpha_1$  adrenergních receptorů.

Po vysazení dlouhodobého podávání morfinu může dle Diany a kol. [70] také docházet ke snížení výlevu dopaminu, což může napomáhat manifestaci negativních projevů abstinenciho syndromu. S rozvojem morfinové abstinence patrně souvisí i D2 dopaminové receptory, jejichž blokáda spouští abstinenciho chování u jedinců závislých na morfinu [71].

## 2.6 Chemická analýza neurotransmitterových systémů

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu nejrůznějších analytů ve vzorcích mozkové tkáně byly zavedeny a optimalizovány nejrůznější analytické metody. Pro separaci jednotlivých analytů ve vzorku se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (mezi další využívané analytické metody patří například kapilární elektroforéza nebo cyklická pulzní voltametrie), pro následnou detekci a identifikaci se po dlouhou dobu používala detekce elektronového záchytu. V posledních letech se přechází při takovýchto neurochemických analýzách ke hmotnostní detekci, hlavně kvůli její vysoké citlivosti. Je možné také využít fluorescenční detekci, případně kombinaci fluorescenční detekce a hmotnostní identifikace [72, 73].

Problém při neurochemických analýzách představuje nízká stabilita analytů, proto samotné separaci a detekci analytů předchází příprava vzorků mozkové tkáně, spočívající buď v odstranění látek z matrice (například použitím metody extrakce na pevné fázi), které by mohly analyty degradovat, nebo v přidání stabilizačních činidel, případně použitím derivatizačního činidla, které do molekuly analytu vnese novou funkční skupinu, která zvyšuje stabilitu nově vzniklé molekuly [74, 75].

### **3 Cíle diplomové práce**

Tato diplomová práce má dva cíle. Prvním cílem byla optimalizace metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a její následné použití ke stanovení základních komponent katecholaminergního a serotoninergního neurotransmitterového systému v různých částech mozku potkanů po podávání morfinu a jeho následném vysazení. Druhým cílem byla detekce exprese příslušných receptorů výše zmíněných neurotransmitterových systémů metodou western blot v totožných vzorcích.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Vzorky mozkové tkáně

Předmětem analýz byly vzorky jednotlivých částí mozku (kůra mozková, striatum, hipokampus a mozeček) tří skupin samců potkanů kmene Wistar, z nichž každá skupina obsahovala jedince, kterým byly po dobu 10 dnů intraperitoneálně podávány stupňující se dávky morfin sulfátu, jedince takto ovlivněné morfinem po vysazení dva měsíce a odpovídající kontrolní neovlivněné jedince. Přesné dávkování morfin sulfátu je uvedeno v tabulce 4.1, označení vzorků je uvedeno v tabulce 4.2

Tabulka 4.1 Časové schéma intraperitoneálního podávání morfin sulfátu potkanům kmene Wistar

Den	Dávka morfin sulfátu (i.p.) [mg kg <sup>-1</sup> den <sup>-1</sup> ]
1. a 2.	10
3. a 4.	15
5. a 6.	20
7. a 8.	30
9.	40
10.	50

Tabulka 4.2 Označení jednotlivých skupin potkanů ovlivněných podáváním morfinu a potkanů kontrolních

Označení vzorku	Ovlivnění
Kontrola	Ne
Morfin stupňované podání	10denní podávání zvyšujících se dávek morfin sulfátu (i.p.)
Kontrola 2 měsíce	Ne
Morfin vysazení 2 měsíce	10denní podávání zvyšujících se dávek morfin sulfátu (i.p.) následované 2 měsíci bez morfinu

## 4.2 Chemikálie a přístrojové vybavení

### 4.2.1 Chemikálie pro HPLC stanovení vybraných neurotransmiterů ve vzorcích mozkové tkáně

#### 4.2.1.1 Činidla pro homogenizaci vzorků mozkové tkáně

Kyselina chloristá 70 % (Sigma-Aldrich), L-cystein (97 %, Sigma-Aldrich), disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (Penta) a L-askorbová kyselina (Sigma-Aldrich).

#### 4.2.1.2 Standardy analyzovaných neurotransmiterů

Dopamin hydrochlorid (analytický standard), 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (98 %), homovanilová kyselina (analytický standard), serotonin (analytický standard), 5-hydroxyindoloctová kyselina (> 98 %) a L-noradrenalin hydrochlorid (> 98 %), vše Sigma-Aldrich.

#### 4.2.1.3 Ostatní použité chemikálie

Methanol pro HPLC (VWR Chemicals), kyselina octová 99 % (Sigma-Aldrich), disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (Penta), hydroxid sodný (Penta).

#### 4.2.2 Přístrojové vybavení pro HPLC stanovení vybraných neurotransmiterů ve vzorcích mozkové tkáně

Sonikátor (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik), centrifuga (Mikro 200R, Hettich), analytické váhy (Sartorius R 200 D), pH metr (Jenway 3510), vysokoúčinný kapalinový chromatograf UHPLC s fluorescenční detekcí (Nexera XR, Shimadzu) s kolonou Supelco Supelcosil LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm).

#### 4.2.3 Chemikálie pro detekci exprese receptorů ve vzorcích mozkové tkáně (vše Sigma-Aldrich, Penta a Serva, pokud není uvedeno jinak)

##### 4.2.3.1 Homogenizace vzorků

TMES pufr (20 mmol dm<sup>-3</sup> Tris, 3 mmol dm<sup>-3</sup> chlorid hořečnatý, 1 mmol dm<sup>-3</sup> ethylendiamintetraoctová kyselina, 250 mmol dm<sup>-3</sup> sacharosa), inhibitory Complete a PhosStop.

##### 4.2.3.2 Stanovení celkové koncentrace proteinů

Reagent A (8% monohydrát uhličitanu sodného, 1,6% vinan sodný, pH = 11,25), reagent B (4% bicinchoninová kyselina), reagent C (4% pentahydrát síranu měďnatého), hovězí sérový albumin.

##### 4.2.3.3 Příprava vzorků pro elektroforézu

Laemmliho pufr (0,24 mol dm<sup>-3</sup> Tris, 10% glycerol, 28 mmol dm<sup>-3</sup> dodecylsírán sodný, 2 mmol dm<sup>-3</sup> ditiotritol, 0,145 mmol dm<sup>-3</sup> bromfenolová modř).

##### 4.2.3.4 Elektroforéza

Pufr 1 (1,5 mol dm<sup>-3</sup> Tris, pH = 8,8), pufr 2 (0,5 mol dm<sup>-3</sup> Tris, pH = 6,8), 30% akrylamid, 0,8% *N,N'*-methylenbisakrylamid, 10% peroxodisírán sodný, 10% dodecylsírán sodný, tetramethylethylendiamin, elektrodový pufr (0,25 mol dm<sup>-3</sup> Tris, 2 mol dm<sup>-3</sup> glycin, 35 mmol dm<sup>-3</sup> dodecylsírán sodný), standard proteinů o známých molekulových hmotnostech (26,6 kDa, 36,5 kDa, 48,5 kDa, 58,0 kDa, 90,0 kDa, 116,0 kDa, 180 kDa).

#### 4.2.3.5 Western Blot

Přenosový pufr (25 mmol dm<sup>-3</sup> Tris, 190 mmol dm<sup>-3</sup> glycin, 20% methanol), TBS pufr (150 mmol dm<sup>-3</sup> chlorid sodný, 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris, pH=8,0), Ponceau červeně, blokovací pufr (10% TBS pufr, 5% sušené mléko, 0,1% tween 20), ředící pufr (10% TBS pufr, 1% sušené mléko, 0,1% tween 20), promývací pufr (10% TBS pufr, 0,3% tween 20), substrát SuperSignal<sup>TM</sup> West Dura (Thermo Scientific).

#### 4.2.3.6 Použité protilátky

Primární polyklonální králičí protilátky proti  $\alpha_{2A}$  adrenergnímu receptoru (ředěné 3000 $\times$ ) primární polyklonální králičí protilátky proti  $\beta_1$  adrenergnímu receptoru (ředěné 3000 $\times$ ), (oboje Santa-Cruz), primární polyklonální králičí protilátky proti D2 dopaminovému receptoru (ředěné 1000 $\times$ ), (EMD Millipore Corporation), anti-králičí sekundární protilátky značené křenuvou peroxidasou (ředěné 40000 $\times$ ), (GE Healthcare).

#### 4.2.3 Přístrojové vybavení a materiál pro detekci exprese receptorů ve vzorcích mozkové tkáně

Potter–Elvehjemův sklo–teflonový homogenizátor, centrifuga Hettich Universal R30), termoblok (Techne Dri–block), spektrofotometr (Synergy HT), souprava pro elektroforézu a western blot (Bio–Rad), nitrocelulósová membrána, třepačka (STR6, Stuart Scientific), fotocitlivé filmy CP–BU NEW (AGFA), vyvolávací přístroj OPTIMAX (Fomei).

### 4.3 Postupy měření

#### 4.3.1 HPLC stanovení vybraných neurotransmiterů ve vzorcích mozkové tkáně

Analyzované vzorky mozkové tkáně o hmotnosti okolo 30 mg byly zváženy přesně a následně z nich byly sonikací (tři desetisekundové pulsy se 40% účinností) ve směsi rozpouštědla připraveného smíšením vodného roztoku (obsahujícího 0,4 mol dm<sup>-3</sup> kyseliny chloristé, 6 mmol dm<sup>-3</sup> cysteinu, 0,54 mmol dm<sup>-3</sup> disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny, 1 mmol dm<sup>-3</sup> L-askorbové kyseliny) s methanolem v poměru 1:1 připraveny za stálého chlazení ledem 10% homogenáty (striatum a hipokampus) a 40% homogenáty (kůra mozková a mozeček). Vzorky byly poté odstředovány při 4 °C a 12 000 $\times$ g po dobu deseti minut. Následně byl ze stočených

homogenátů odebrán supernatant, který v temnu a chladu přenesen na následnou analýzu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD).

Analýza probíhala za podmínek uvedených v tabulce 5.2 na koloně Supelco Supelcosil LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu při průtoku 1,3 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a teplotě 35 °C. Objem nástřiku byl 10 μl, excitace probíhala při vlnové délce 279 nm a emise při 320 nm. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky standardů neurotransmiterů o koncentraci 10 mg dm<sup>-3</sup> v rozpouštědle 0,2 mol dm<sup>-3</sup> kyseliny choristé, 3 mmol dm<sup>-3</sup> cysteinu, 0,27 mmol dm<sup>-3</sup> disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny a 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> L-askorbové kyseliny. Z takto připravených zásobních roztoků byla připravena kalibrační řada v rozmezí koncentrací 0,1–10,0 mol dm<sup>-3</sup> pro noradrenalin, dopamin a 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu, 0,05–4,00 mol dm<sup>-3</sup> pro homovanilovou kyselinu a 5-hydroxyindolooctovou kyselinu a 0,2–10,0 mol dm<sup>-3</sup> pro 5-hydroxytryptamin.

Poté byly na základě retenčních časů standardů analytů a rovnic regresní závislosti získaných ze závislosti plochy píku na koncentraci standardů neurotransmiterů identifikovány a kvantifikovány analyty v analyzovaných vzorcích mozkové tkáně.

Jelikož soubor vzorků mozkové tkáně obsahoval vždy tři stejně ovlivněné a neovlivněné skupiny a opakovatelnost měření byla více než 97 %, byl každý vzorek změřen jednou, a statistické zpracování dat bylo poté prováděno na základě výsledů získaných analýzou vzorků jednotlivých stejně ovlivněných a neovlivněných skupin.

#### 4.3.2 Detekce exprese receptorů ve vzorcích mozkové tkáně

Vzorky mozkové tkáně o hmotnosti okolo 100 mg byly zváženy přesně a byly z nich homogenizací sklo-teflonovým homogenizátorem v TMES pufru připraveny 10% homogenáty. Ty byly poté pomocí centrifugy odstředovány při 2100 otáčkách za minutu a při 4 °C po dobu deseti minut. Vzniklý supernatant byl odebrán a uskladněn v -80 °C. V takto připravených vzorcích byla následně metodou bicinchoninové kyseliny stanovena celková koncentrace proteinů. Poté byly ze všech vzorků supernatantu připraveny ředěním v Laemmliho pufru vzorky pro elektroforézu o celkové koncentraci proteinů 2 g l<sup>-1</sup>, které byly následně inkubovány po dobu dvou minut při 90 °C.

Poté byl připraven 10% rozdělovací gel (na přípravu dvou rozdělovacích gelů je potřeba 8 ml destilované vody, 5 ml pufru 1, 6,7 ml 30% bis-akrylamidu, 90  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného, 200  $\mu$ l 10% dodecylsíranu sodného a 8  $\mu$ l tetramethylethylendiaminu), který byl převrstven směsí butanolu a vody v poměru 3:1 a ponechán polymerovat po dobu jedné hodiny. Poté byla směs butanolu a vody odstraněna, gel byl omyt a osušen a byl na něj aplikován 4% zaostřovací gel (na přípravu dvou zaostřovacích gelů je potřeba 6 ml destilované vody, 2,5 ml pufru 2, 1,3 ml 30% bis-akrylamidu, 90  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného, 100  $\mu$ l 10% dodecylsíranu sodného a 8  $\mu$ l tetramethylethylendiaminu), do kterého byl umístěn hřebínek vyznačující pozdější jamky, do kterých byl nanášen vzorek. Zaostřovací gel byl ponechán polymerovat 30 minut. Poté byly do jednotlivých jamek gelu nanášeny vzorky o objemu 20  $\mu$ l. Elektroforéza poté probíhala v prostředí elektrodového pufru při napětí 200 V po dobu jedné hodiny. Separované proteiny z gelů byly poté přenášeny na nitrocelulóзовou membránu v prostředí přenosového pufru při napětí 100 V po dobu jedné hodiny. Nitrocelulóзовé membrány s navázanými proteiny byly poté obarveny Ponceau červení a oskenovány pro pozdější normalizaci dat. Membrány byly poté jednu hodinu inkubovány v blokovacím pufru, následně omyty vodou a inkubovány přes noc v ředicím pufru s příslušnými primárními protilátkami.

Druhý den byly membrány třikrát promývány promývacím roztokem vždy po dobu deseti minut a inkubovány po dobu jedné hodiny v ředicím pufru obsahujícím příslušné sekundární protilátky. Poté byly membrány opět třikrát deset minut promývány promývacím roztokem. Na membrány byl poté nanesen substrát a po přiložení fotocitlivého filmu a jeho následném vyvolání v temné komoře byly získány výsledky detekce exprese vybraných receptorů.

#### 4.4 Zpracování dat

Získaná data byla zpracována a převedena do grafické podoby v programech Origin Pro 8, GraphPad Prism, ImageJ a ImageLab. Statistické zpracování dat bylo prováděno v programu GraphPad Prism Studentovým *t*-testem s použitím hodnoty hladiny významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Výsledky

#### 5.1.1 Optimalizace HPLC-FLD metody stanovení vybraných neurotransmiterů

Při optimalizaci HPLC metody jsem vycházela z práce [76], která popisuje metodu pro stanovení vybraných neurotransmiterů ve vzorcích hlodavčího mozku, jejíž parametry jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Tabulka 5.1 Parametry metody pro stanovení vybraných neurotransmiterů dle [76].

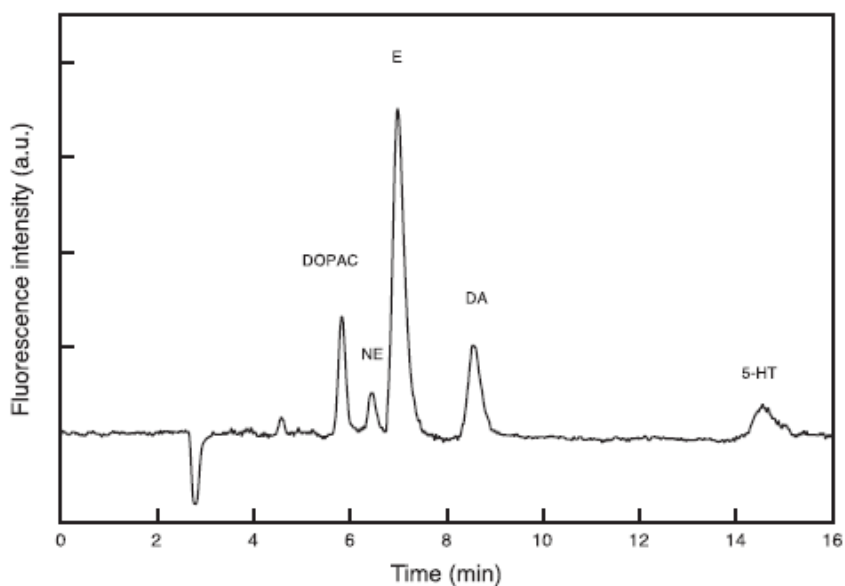
Analyty	dopamin, 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, noradrenalin a serotonin
Kolona	Microsorb-MV 100-5 C18 (250×4,6 mm, 5μm)
Mobilní fáze A.	methanol
Mobilní fáze B	octanový pufr (pH = 3,5, 12 mmol dm <sup>-3</sup> kyselina octová, 0,26 mmol dm <sup>-3</sup> disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny)
Poměr mobilních fází A:B	14:86 (v/v)
Průtok [cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> ]	1,0
Teplota kolony [°C]	35
DAD-λ [nm]	190–800
FLDem-λ [nm]	320
FLDex-λ [nm]	279
Objem nástřiku [μl]	20
Rozpouštědlo vzorků mozkové tkáň	0,2 mol dm <sup>-3</sup> kyselina chloristá a 3 mmol dm <sup>-3</sup> cystein

Analyty, které jsou stanovány výše uvedenou metodou (3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, noradrenalin, dopamin a serotonin) ve studii De Benedetta a kol. [76], jsem rozšířila o homovanilovou a 5-hydroxyindoloctovou kyselinu. Rovněž jsem do původně izokratické metody zavedla gradient a do rozpouštědla, ve kterém byly vzorky homogenizovány, jsem přidala stabilizační činidla L-askorbovou kyselinu, disodnou sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny a methanol. Parametry optimalizované metody jsou uvedeny v tabulce 5.2.

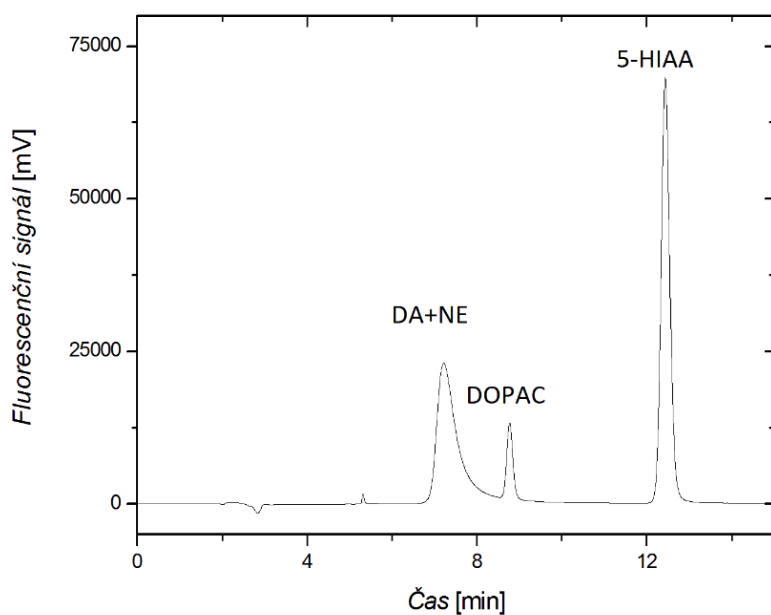
Tabulka 5.2 Parametry metody pro stanovení vybraných neurotransmiterů po optimalizaci provedené v této práci.

Analyty	dopamin, 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, homovanilová kyselina, noradrenalin, serotonin a 5-hydroxyindoloctová kyselina
Kolona	Supelco Supelcosil LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm)
Mobilní fáze A	methanol
Mobilní fáze B	octanový pufr (pH = 3,5, 12 mmol dm <sup>-3</sup> kyselina octová, 0,26 mmol dm <sup>-3</sup> disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny)
Gradientová eluce	průběh viz obr. 5.3
Průtok [cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> ]	1,3
Teplota kolony [°C]	35
DAD-λ [nm]	190–800
FLDem-λ [nm]	320
FLDex-λ [nm]	279
Objem nástřiku [μl]	10
Rozpouštědlo vzorků mozkové tkáň	vodná složka (0,4 mol dm <sup>-3</sup> kyselina chloristá, 6 mmol dm <sup>-3</sup> cystein, 0,54 mmol dm <sup>-3</sup> disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny, 1 mmol dm <sup>-3</sup> L-askorbová kyselina) a methanol v poměru 1:1 (v/v)

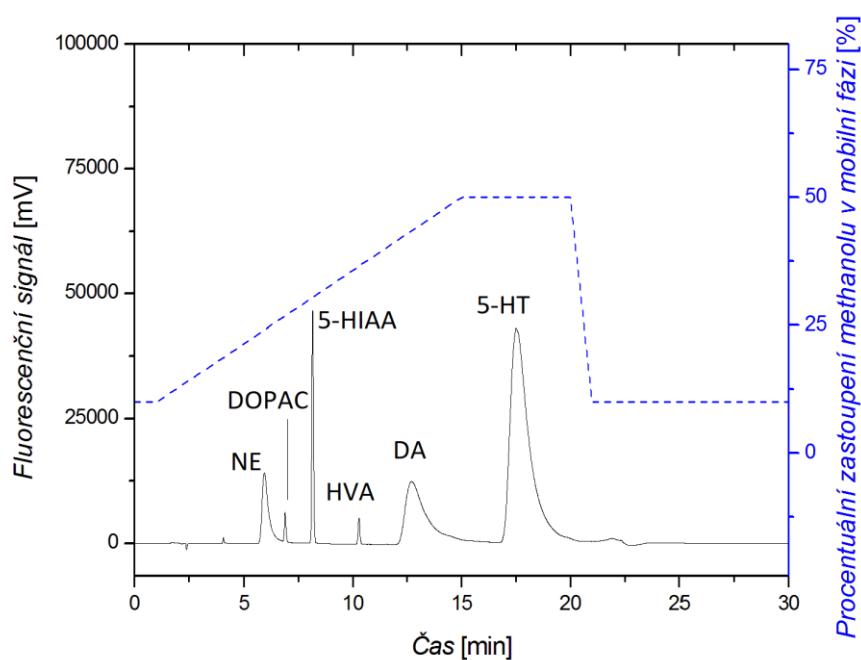
Na obrázku 5.1 je zobrazen chromatogram směsného vzorku standardů analytů uvedený ve studii De Benedetta a kol. [76], na obrázku 5.2 je uveden chromatogram směsného vzorku standardů analytů získaný za podmínek uvedených v tabulce 5.1. Na obrázku 5.3 je zobrazen chromatogram směsného vzorku standardů analytů po optimalizaci parametrů HPLC metody, které jsou uvedeny v tabulce 5.2 včetně použitého gradientu mobilních fází.



Obrázek 5.1 HPLC-FLD chromatogram analytů 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (DOPAC), noradrenalinu (NE), adrenalinu (E), dopaminu (DA) a serotoninu (5-HT) ve vzorku směsného standardu. Separace probíhala na koloně Microsorb-MV 100-5 LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) při izokratické eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu v poměru 86:14, při průtoku 1,0 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a teplotě 35 °C. Objem nástřiku byl 20 μl, excitace probíhala při vlnové délce 279 nm a emise při 320 nm. Převzato z [76].



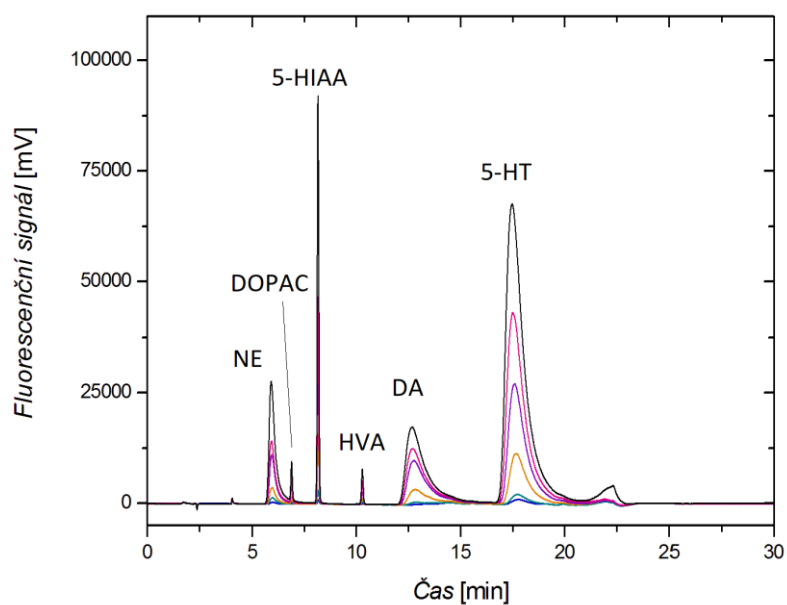
Obrázek 5.2 HPLC-FLD chromatogram analytů dopaminu (DA), 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (DOPAC), homovanilové kyseliny (HVA), noradrenalinu (NE), serotoninu (5-HT) a 5-hydroxyindoloctové kyseliny (5-HIAA) ve vzorku směšného standardu získaný metodou uvedenou v [76]. Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) při izokratické eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu v poměru 86:14, při průtoku 1,0 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a teplotě 35 °C. Objem nástriku byl 20 μl, excitace probíhala při vlnové délce 279 nm a emise při 320 nm.



Obrázek 5.3 HPLC-FLD chromatogram analytů dopaminu (DA), 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (DOPAC), homovanilové kyseliny (HVA), noradrenalinu (NE), serotoninu (5-HT) a 5-hydroxyindolactové kyseliny (5-HIAA) ve vzorku směsného standardu, získaný použitím optimalizované metody a křivka znázorňující procentuální zastoupení methanolu v mobilní fázi během gradientové eluce. Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku 1,3 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a teplotě 35 °C. Objem nástřiku byl 10 μl, excitace probíhala při vlnové délce 279 nm a emise při 320 nm.

Na obrázku 5.4 je znázorněn chromatogram standardů analytů neurotransmiterů v jednotlivých sadách kalibračních řad v koncentračním rozmezí 0,1–10,0 mol dm<sup>-3</sup> pro noradrenalin, dopamin a 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu, 0,05–4,00 mol dm<sup>-3</sup> pro homovanilovou kyselinu a 5-hydroxyindolactovou kyselinu a 0,2–10,0 mol dm<sup>-3</sup> pro 5-hydroxytryptamin.

V tabulce 5.3 jsou uvedeny výkonnostní parametry optimalizované HPLC-FLD metody.

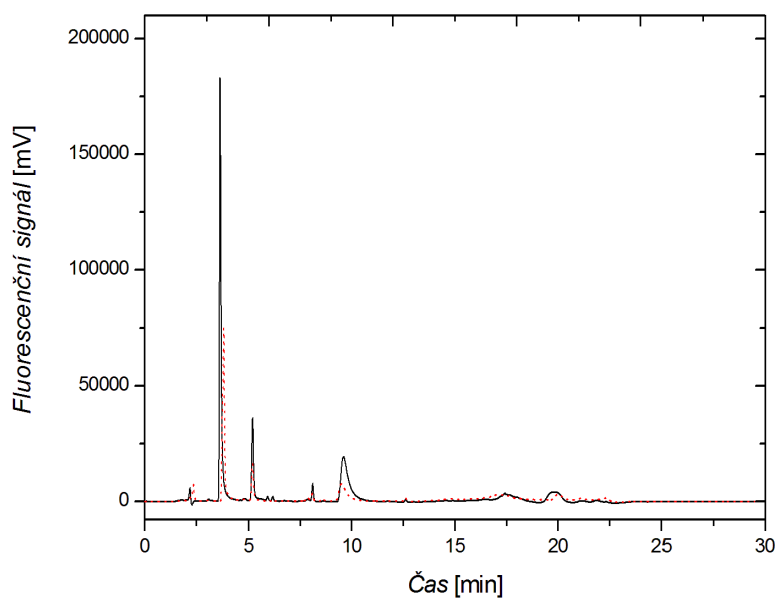


Obrázek 5.4 HPLC-FLD chromatogramy analytů dopaminu (DA), 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (DOPAC), homovanilové kyseliny (HVA), noradrenalinu (NE), serotoninu (5-HT) a 5-hydroxyindoloctové kyseliny (5-HIAA) v jednotlivých sadách kalibračních řad. Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku 1,3 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> a teplotě 35 °C. Objem nástřiku byl 10 μl, excitace probíhala při vlnové délce 279 nm a emise při 320 nm.

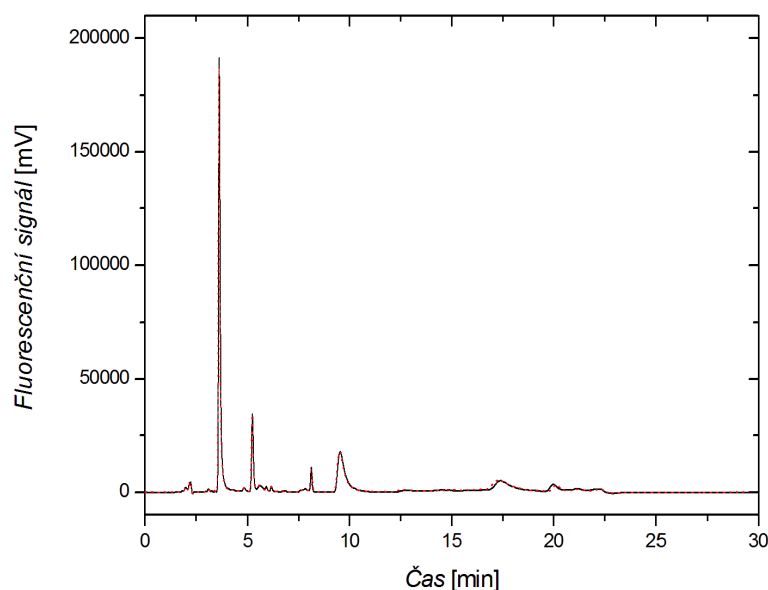
Tabulka 5.3 Výkonnostní parametry optimalizované HPLC-FLD metody.

	NE	DOPAC	5-HIAA	HVA	DA	5-HT
$t_r$ [min]	5,9	6,9	8,2	10,3	12,8	17,7
$a$ [mmol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> mV]	60861	6924	61447	11114	113818	375708
$b$ [mV]	4185	785	3213	491	19981	3132
$LDR$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	0,1–10,0	0,1–10,0	0,05–4,00	0,05–4,00	0,1–10,0	0,2–10,0
$LOD$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	0,035	0,04	0,018	0,033	0,07	0,02
$LOQ$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	0,117	0,139	0,06	0,110	0,24	0,08
$R^2$	0,9993	0,9990	0,9998	0,9994	0,9971	0,9997

Kvůli značné nestabilitě analytů jak ve vzorcích směsného standardu tak ve vzorcích mozkové tkáně jsem upravila složení rozpouštědla, ve kterém jsou vzorky mozkové tkáně homogenizovány, přidavkem 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> L-askorbové kyseliny a 0,27 mmol dm<sup>-3</sup> disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny. Na obrázku 5.5 je znázorněno porovnání chromatogramů vzorku mozkové tkáně homogenizovaného v rozpouštědle 0,2 mol dm<sup>-3</sup> kyseliny chloristé a 3 mmol dm<sup>-3</sup> cysteinu v čase. Vzorek byl po analýze ponechán 5 hodin v temnu při laboratorní teplotě a poté byl opětovně analyzován. Na obrázku 5.6 je znázorněno porovnání chromatogramů vzorku mozkové tkáně v čase po přidavku 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> L-askorbové kyseliny a 0,27 mmol dm<sup>-3</sup> disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny.



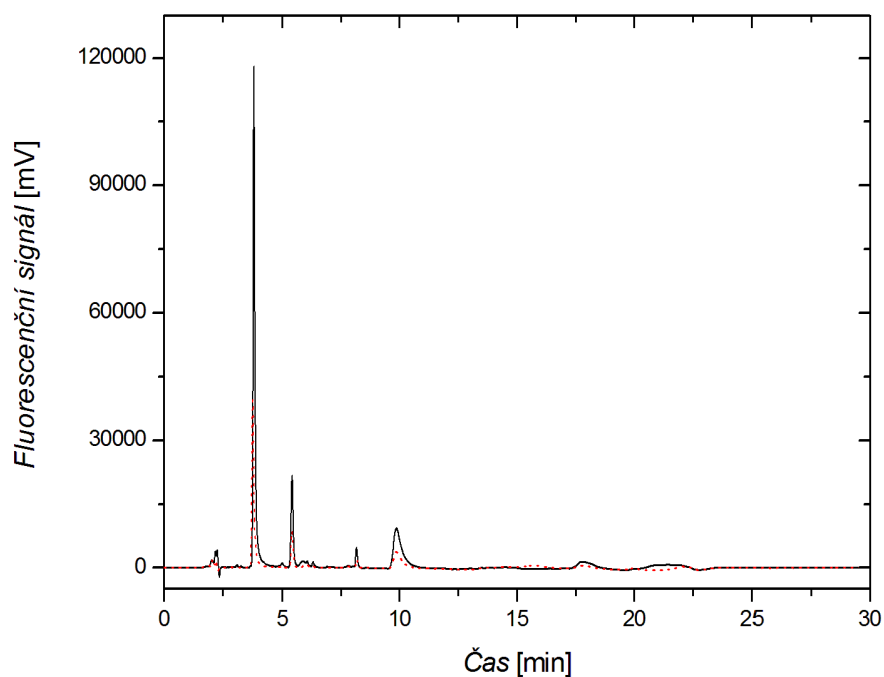
Obrázek 5.5 Porovnání HPLC-FLD chromatogramu vzorku mozkové tkáně připraveného v rozpouštědle  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  kyseliny chloristé a  $3 \text{ mmol dm}^{-3}$  cysteinu, černá křivka znázorňuje vzorek analyzovaný krátce po jeho přípravě, červená křivka znázorňuje totožný vzorek, který byl ponechán 5 hodin v temnu při laboratorní teplotě. Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku  $1,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  a teplotě  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku byl  $10 \mu\text{l}$ , excitace probíhala při vlnové délce  $279 \text{ nm}$  a emise při  $320 \text{ nm}$ .



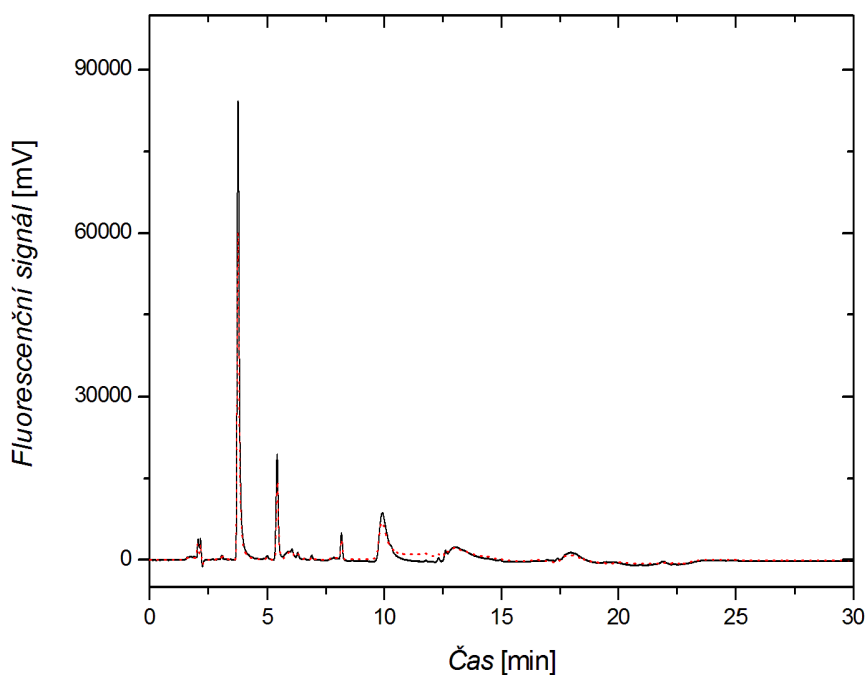
Obrázek 5.6 Porovnání HPLC-FLD chromatogramu vzorku mozkové tkáně připraveného v rozpouštědle  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  kyseliny chloristé a  $3 \text{ mmol dm}^{-3}$  cysteinu s přidavkem  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  L-askorbové kyseliny a  $0,27 \text{ mmol dm}^{-3}$  disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny, černá křivka znázorňuje vzorek analyzovaný krátce po jeho přípravě, červená křivka znázorňuje totožný vzorek, který byl ponechán 5 hodin v temnu při laboratorní teplotě. Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku  $1,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  a teplotě  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku byl  $10 \mu\text{l}$ , excitace probíhala při vlnové délce  $279 \text{ nm}$  a emise při  $320 \text{ nm}$ .

Vzhledem k velkému počtu najednou analyzovaných vzorků mozkové tkáně a také nemožnosti připravovat vzorky přímo na místě analýzy jsem byla nucena vzorky před analýzou zamrazit. Jelikož docházelo u zamrazených vzorků ke změnám koncentrace neurotransmiterů, optimalizovala jsem složení rozpouštědla, ve kterém jsou vzorky připravovány, přidavkem methanolu. Vzorky byly připravovány v rozpouštědle obsahujícím vodnou složku ( $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$  kyselina chloristá,  $6 \text{ mmol dm}^{-3}$  cystein,  $0,54 \text{ mmol dm}^{-3}$  disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny,  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  L-askorbová kyselina) a methanol v poměru 1:1 (v/v).

Na obrázku 5.7 je znázorněno porovnání vzorku mozkové tkáně připraveného homogenizací v rozpouštědle 0,2 mol dm<sup>-3</sup> kyseliny chloristé, 3 mmol dm<sup>-3</sup> cysteinu, 0,27 mmol dm<sup>-3</sup> disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny a 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> L-askorbové kyseliny a totožného vzorku zamrazeného a uchovaného do druhého dne v -20 °C. Na obrázku 5.8 je znázorněno porovnání vzorku mozkové tkáně připraveného homogenizací v rozpouštědle obsahujícím vodnou složku ( 0,4 mol dm<sup>-3</sup> kyselina chloristá, 6 mmol dm<sup>-3</sup> cystein, 0,54 mmol dm<sup>-3</sup> disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny, 1 mmol dm<sup>-3</sup> L-askorbová kyselina) a methanol v poměru 1:1 (v/v).



Obrázek 5.7 Porovnání HPLC-FLD chromatogramu vzorku mozkové tkáně připraveného v rozpouštědle  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  kyseliny chloristé,  $3 \text{ mmol dm}^{-3}$  cysteinu,  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  L-askorbové kyseliny a  $0,27 \text{ mmol dm}^{-3}$  disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny, černá křivka znázorňuje vzorek analyzovaný krátce po jeho přípravě, červená křivka znázorňuje totožný vzorek, který byl po přípravě zmrazen a do druhého dne uskladněn při  $-20^\circ\text{C}$ . Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku  $1,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  a teplotě  $35^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku byl  $10 \mu\text{l}$ , excitace probíhala při vlnové délce  $279 \text{ nm}$  a emise při  $320 \text{ nm}$ .

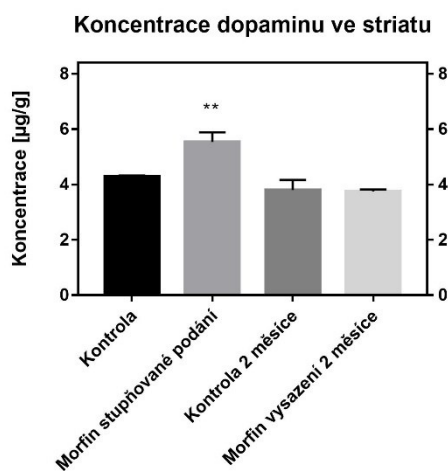


Obrázek 5.8 Porovnání HPLC-FLD chromatogramu vzorku mozkové tkáně připraveného ve směsi rozpouštědla  $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$  kyseliny chloristé,  $6 \text{ mmol dm}^{-3}$  cysteinu,  $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  L-askorbové kyseliny a  $0,54 \text{ mmol dm}^{-3}$  disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny a methanolu v poměru 1:1, černá křivka znázorňuje vzorek analyzovaný krátce po jeho přípravě, červená křivka znázorňuje totožný vzorek, který byl po přípravě zmrazen a do druhého dne uskladněn v  $-20^\circ\text{C}$ . Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku  $1,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  a teplotě  $35^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku byl  $10 \mu\text{l}$ , excitace probíhala při vlnové délce  $279 \text{ nm}$  a emise při  $320 \text{ nm}$ .

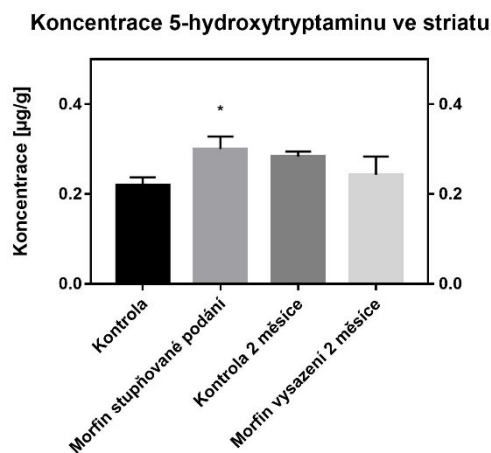
### 5.1.2 Stanovení základních komponent katecholaminergního a serotoninergního neurotransmiterového systému ve vybraných částech mozku potkanů

Výsledky studia vlivu morfinové závislosti a abstinence na koncentraci dopaminu, 3,4-dihydroxyfenylactové kyseliny, homovanilové kyseliny, noradrenalinu, serotoninu a 5-hydroxyindolactové kyseliny ve striatu, kůře mozkové, hipokampu a mozečku potkanů ovlivněných intraperitoneálním stupňovaným podáváním morfin sulfátu jsou prezentovány v obrázcích 5.9-5.30, jejich statistické vyhodnocení je uvedeno v tabulkách 5.4-5.23. Součástí jsou i reprezentativní chromatogramy vzorků striata a kůry mozkové jedinců ovlivněných morfinem a kontrolních jedinců prezentované v obrázcích 5.15 a 5.16.

Koncentrace jednotlivých analytů v mozkové tkáni je uváděna v jednotkách  $\mu\text{g}/\text{gram}$  mozkové tkáně. Statisticky zpracované výsledky jsou uváděny jako medián  $\pm$  směrodatná odchylka, doplněné o hodnotu hladiny významnosti P v porovnávaných skupinách (porovnávána byla vždy skupina Kontrola se skupinou Morfin stupňované podání a skupina Kontrola 2 měsíce se skupinou Morfin vysazení 2 měsíce). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami.



Obrázek 5.9 Koncentrace dopaminu ve striatu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů



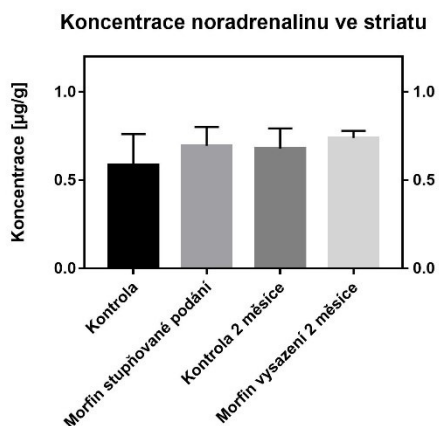
Obrázek 5.10 Koncentrace 5-hydroxytryptaminu ve striatu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Tabulka 5.4 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení dopaminu ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

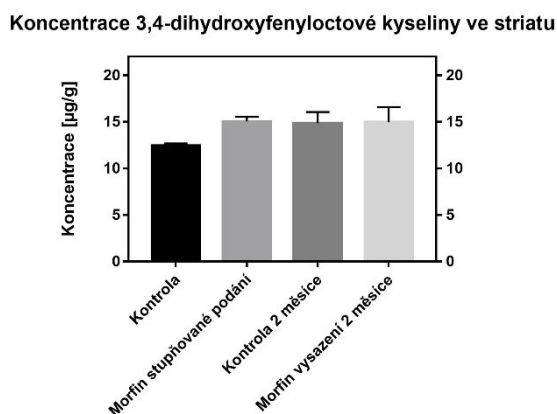
Skupina	Koncentrace dopaminu ve striatu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	4,28 ± 0,02	0,0036 **
Morfin stupňované podání	5,5 ± 0,20	
Kontrola 2 měsíce	3,8 ± 0,2	0,8247
Morfin vysazení 2 měsíce	3,75 ± 0,04	

Tabulka 5.5 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 5-hydroxytryptaminu ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace 5-hydroxytryptaminu ve striatu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,22 ± 0,01	0,027 *
Morfin stupňované podání	0,30 ± 0,02	
Kontrola 2 měsíce	0,28 ± 0,01	0,1746
Morfin vysazení 2 měsíce	0,24 ± 0,02	



Obrázek 5.11 Koncentrace noradrenalinu ve striatu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů



Obrázek 5.12 Koncentrace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny ve striatu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

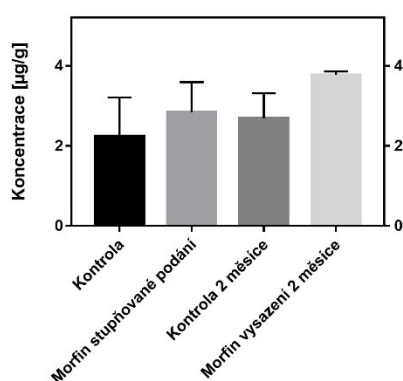
Tabulka 5.6 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení noradrenalinu ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace noradrenalinu ve striatu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,6 ± 0,1	0,5290
Morfin stupňované podání	0,70 ± 0,08	
Kontrola 2 měsíce	0,68 ± 0,08	0,4345
Morfin vysazení 2 měsíce	0,74 ± 0,02	

Tabulka 5.7 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

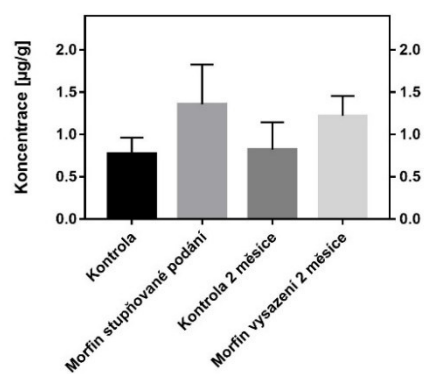
Skupina	Koncentrace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny ve striatu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	12,4 ± 0,2	0,0039
Morfin stupňované podání	15,01 ± 0,4	
Kontrola 2 měsíce	14,9 ± 0,9	0,9506
Morfin vysazení 2 měsíce	15 ± 1	

Koncentrace homovanilové kyseliny ve striatu



Obrázek 5.13 Koncentrace homovanilové kyseliny ve striatu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Koncentrace 5-hydroxyindoloctové kyseliny ve striatu



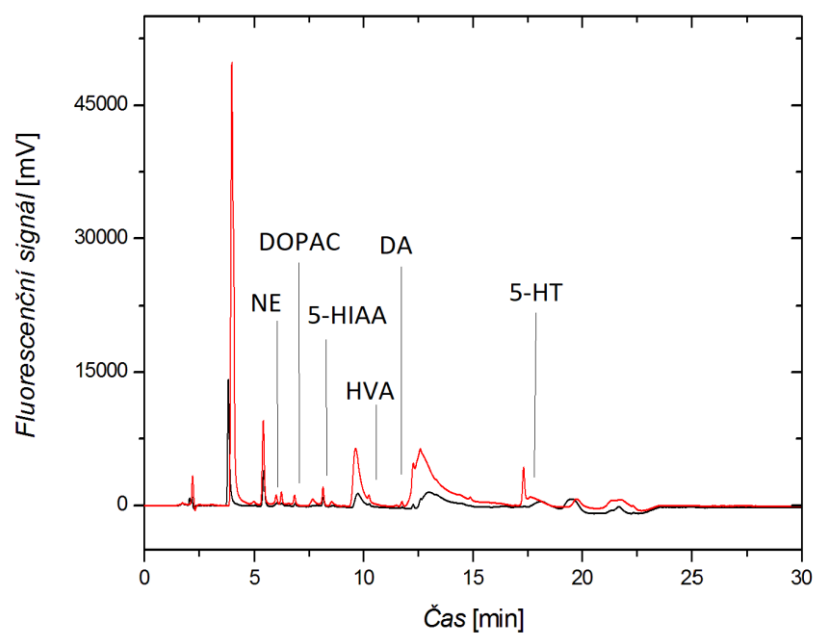
Obrázek 5.14 Koncentrace 5-hydroxyindoloctové kyseliny ve striatu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Tabulka 5.8 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení homovanilové kyseliny ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

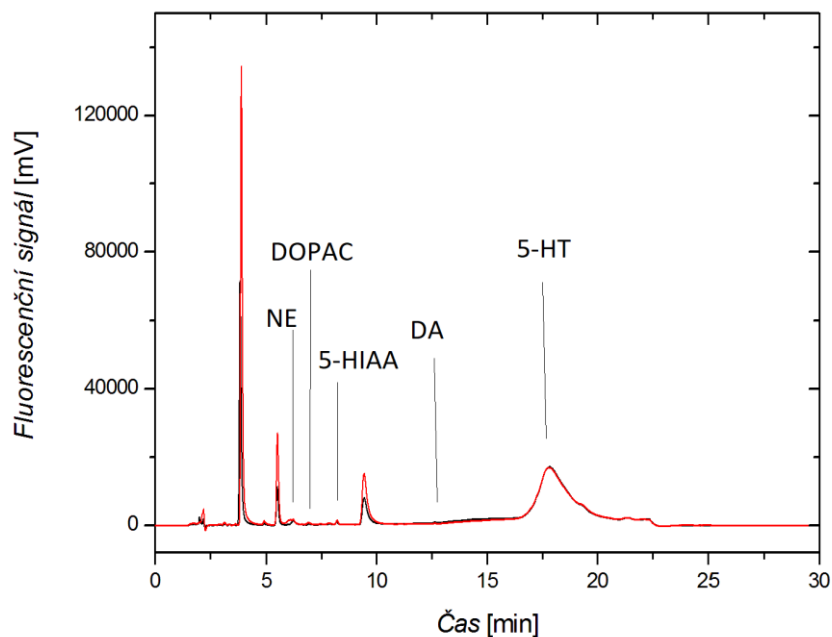
Skupina	Koncentrace homovanilové kyseliny ve striatu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	2,2 ± 0,6	0,5177
Morfin stupňované podání	2,8 ± 0,5	
Kontrola 2 měsíce	2,7 ± 0,4	0,4010
Morfin vysazení 2 měsíce	3,8 ± 0,1	

Tabulka 5.9 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 5-hydroxyindoloctové kyseliny ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

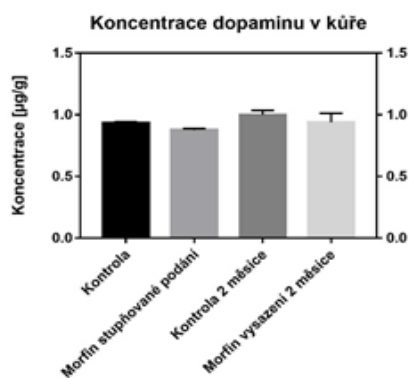
Skupina	Koncentrace 5-hydroxyindoloctové kyseliny ve striatu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,8 ± 0,1	0,1311
Morfin stupňované podání	1,4 ± 0,3	
Kontrola 2 měsíce	0,8 ± 0,2	0,2018
Morfin vysazení 2 měsíce	1,2 ± 0,1	



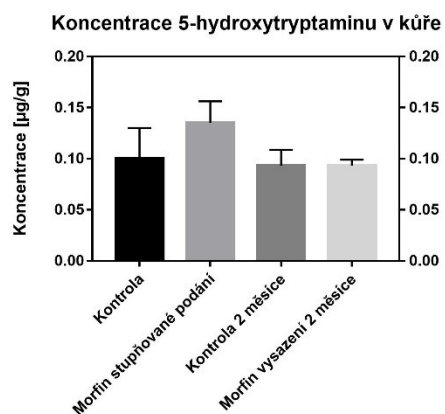
Obrázek 5.15 Porovnání HPLC-FLD chromatogramu vzorku striata Kontroly (černá křivka) a Morfin stupňované podání (červená křivka), s noradrenalinem (NE), 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinou (DOPAC), 5-hydroxyindoloctovou kyselinou (5-HIAA), homovanilovou kyselinou (HVA), dopaminem (DA) a 5-hydroxytryptaminem (5-HT). Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku  $1,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  a teplotě  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku byl  $10 \text{ } \mu\text{l}$ , excitace probíhala při vlnové délce 279 nm a emise při 320 nm.



Obrázek 5.16 Porovnání HPLC-FLD chromatogramu vzorku kůry mozkové Kontroly (černá křivka) a Morfin stupňované podání (červená křivka), s našimi analyty noradrenalinem (NE), 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinou (DOPAC), 5-hydroxyindolactovou kyselinou (5-HIAA), dopaminem (DA) a 5-hydroxytryptaminem (5-HT). Separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 (250×4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku  $1,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  a teplotě  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku byl  $10 \mu\text{l}$ , excitace probíhala při vlnové délce 279 nm a emise při 320 nm.



Obrázek 5.17 Koncentrace dopaminu v kůře mozkové v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů



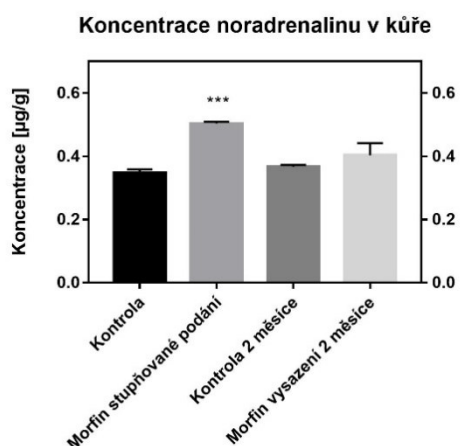
Obrázek 5.18 Koncentrace 5-hydroxytryptaminu v kůře mozkové v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Tabulka 5.10 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení dopaminu v kůře mozkové kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

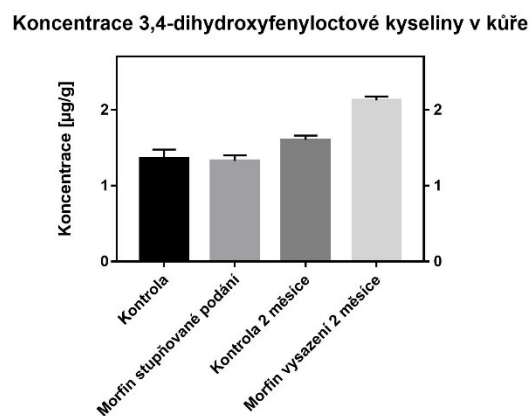
Skupina	Koncentrace dopaminu v kůře mozkové [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,93 ± 0,01	0,3090
Morfin stupňované podání	0,88 ± 0,01	
Kontrola 2 měsíce	1,00 ± 0,02	0,2889
Morfin vysazení 2 měsíce	0,94 ± 0,04	

Tabulka 5.11 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 5-hydroxytryptaminu v kůře mozkové kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace 5-hydroxytryptaminu v kůře mozkové [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,10 ± 0,02	0,2560
Morfin stupňované podání	0,14 ± 0,02	
Kontrola 2 měsíce	0,09 ± 0,01	>0,9999
Morfin vysazení 2 měsíce	0,09 ± 0,01	



Obrázek 5.19 Koncentrace noradrenalinu v kůře mozkové v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů



Obrázek 5.20 Koncentrace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v kůře mozkové v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

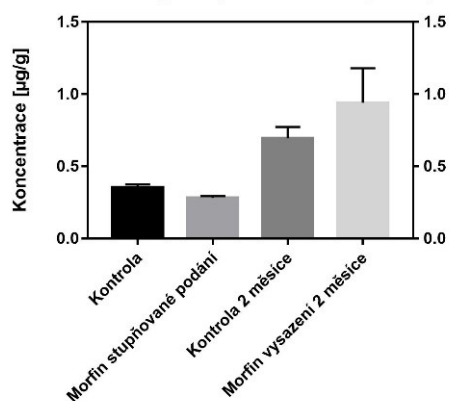
Tabulka 5.12 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení noradrenalinu v kůře mozkové kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace noradrenalinu v kůře mozkové [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,35 ± 0,01	0,0001 ***
Morfin stupňované podání	0,503 ± 0,003	
Kontrola 2 měsíce	0,367 ± 0,003	0,1726
Morfin vysazení 2 měsíce	0,40 ± 0,02	

Tabulka 5.13 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v kůře mozkové kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v kůře mozkové [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	1,36 ± 0,09	0,7577
Morfin stupňované podání	1,33 ± 0,04	
Kontrola 2 měsíce	1,60 ± 0,06	0,1070
Morfin vysazení 2 měsíce	2,13 ± 0,08	

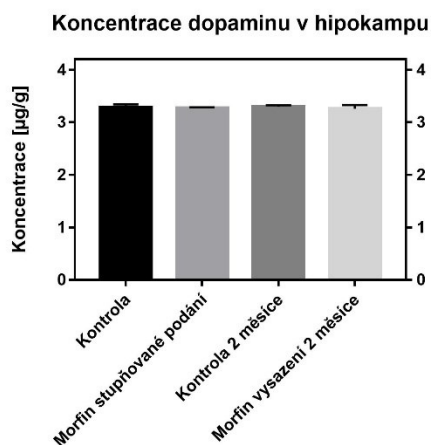
Koncentrace 5-hydroxyindoloctové kyseliny v kůře



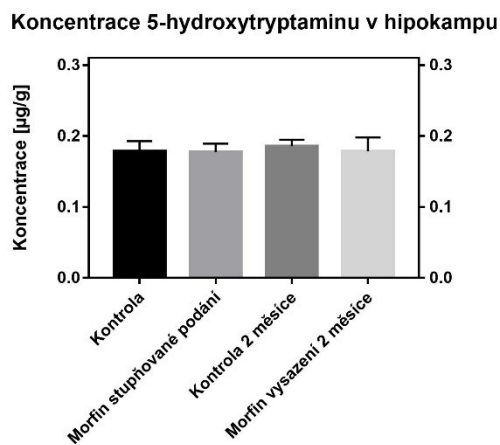
Obrázek 5.21 Koncentrace 5-hydroxyindoloctové kyseliny v kůře mozkové v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Tabulka 5.14 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 5-hydroxyindoloctové kyseliny v kůře mozkové kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace 5-hydroxyindoloctové kyseliny v kůře mozkové [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,36 ± 0,02	0,0532
Morfin stupňované podání	0,28 ± 0,01	
Kontrola 2 měsíce	0,70 ± 0,06	0,3039
Morfin vysazení 2 měsíce	0,9 ± 0,2	



Obrázek 5.22 Koncentrace dopaminu v hipokampu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů



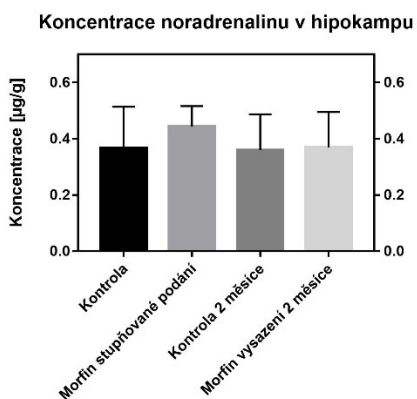
Obrázek 5.23 Koncentrace 5-hydroxytryptaminu v hipokampu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Tabulka 5.15 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení dopaminu v hipokampu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

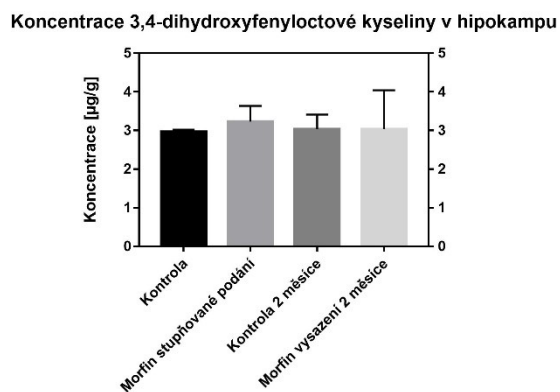
Skupina	Koncentrace dopaminu v hipokampu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	3,29 ± 0,03	0,5993
Morfin stupňované podání	3,28 ± 0,01	
Kontrola 2 měsíce	3,30 ± 0,02	0,4031
Morfin vysazení 2 měsíce	3,26 ± 0,04	

Tabulka 5.16 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 5-hydroxytryptaminu v hipokampu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace 5-hydroxytryptaminu v hipokampu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,18 ± 0,01	0,9090
Morfin stupňované podání	0,18 ± 0,01	
Kontrola 2 měsíce	0,19 ± 0,01	0,6726
Morfin vysazení 2 měsíce	0,18 ± 0,01	



Obrázek 5.24 Koncentrace noradrenalinu v hipokampu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů



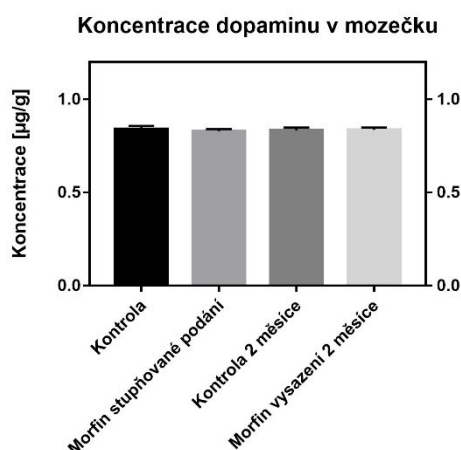
Obrázek 5.25 Koncentrace 3,4-dihydroxyfenylactové kyseliny v hipokampu v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Tabulka 5.17 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení noradrenalinu v hipokampu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

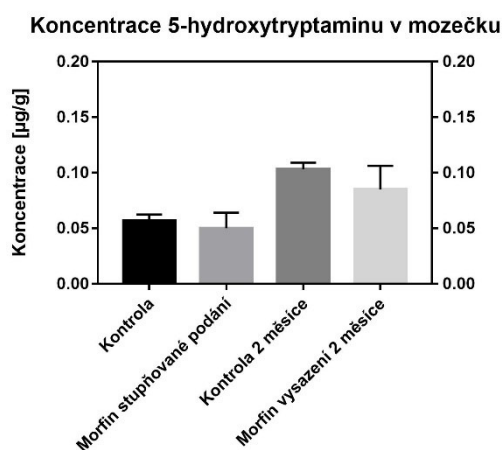
Skupina	Koncentrace noradrenalinu v hipokampu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,40 ± 0,10	0,4778
Morfin stupňované podání	0,44 ± 0,04	
Kontrola 2 měsíce	0,36 ± 0,07	0,9276
Morfin vysazení 2 měsíce	0,37 ± 0,07	

Tabulka 5.18 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 3,4-dihydroxyfenylactové kyseliny v hipokampu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace 3,4-dihydroxyfenylactové kyseliny v hipokampu [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	2,97 ± 0,03	0,3211
Morfin stupňované podání	3,2 ± 0,2	
Kontrola 2 měsíce	3,0 ± 0,2	>0,9999
Morfin vysazení 2 měsíce	3,0 ± 0,6	



Obrázek 5.26 Koncentrace dopaminu v mozečku v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů



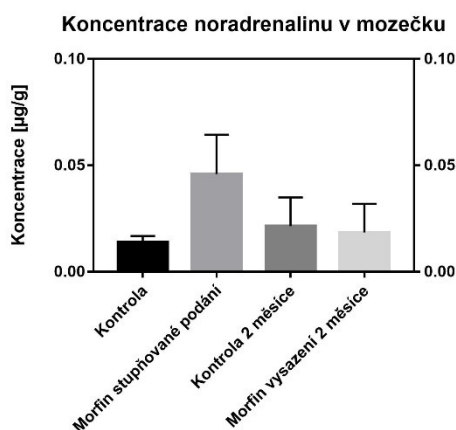
Obrázek 5.27 Koncentrace 5-hydroxytryptaminu v mozečku v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Tabulka 5.19 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení dopaminu v mozečku kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

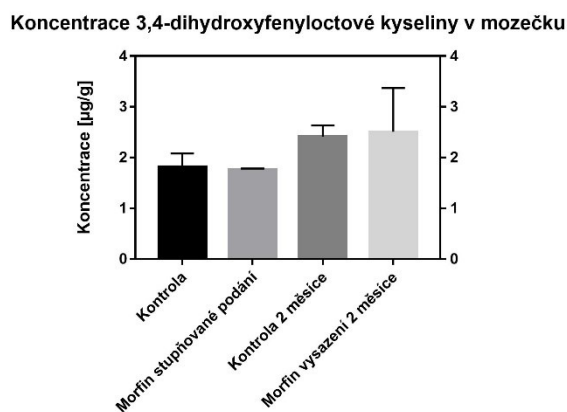
Skupina	Konzentrace dopaminu v mozečku [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,84 ± 0,01	0,4353
Morfin stupňované podání	0,83 ± 0,01	
Kontrola 2 měsíce	0,83 ± 0,01	0,7780
Morfin vysazení 2 měsíce	0,84 ± 0,01	

Tabulka 5.20 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 5-hydroxytryptaminu v mozečku kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Konzentrace 5-hydroxytryptaminu v mozečku [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,06 ± 0,01	0,4960
Morfin stupňované podání	0,05 ± 0,01	
Kontrola 2 měsíce	0,10 ± 0,01	0,2234
Morfin vysazení 2 měsíce	0,09 ± 0,02	



Obrázek 5.28 Koncentrace noradrenalinu v mozečku v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů



Obrázek 5.29 Koncentrace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v mozečku v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

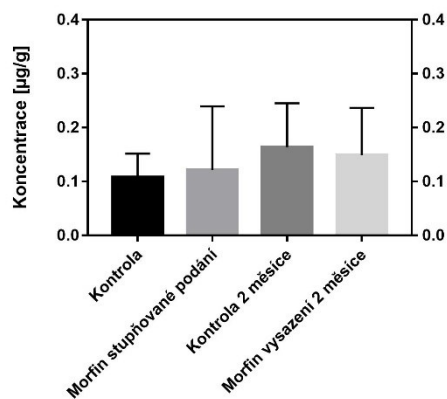
Tabulka 5.21 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení noradrenalinu v mozečku kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace noradrenalinu v mozečku [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,014 ± 0,002	0,1355
Morfin stupňované podání	0,05 ± 0,01	
Kontrola 2 měsíce	0,02 ± 0,01	0,8440
Morfin vysazení 2 měsíce	0,02 ± 0,01	

Tabulka 5.22 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v mozečku kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

Skupina	Koncentrace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v mozečku [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	1,8 ± 0,2	0,7819
Morfin stupňované podání	1,8 ± 0,2	
Kontrola 2 měsíce	2,4 ± 0,2	0,9939
Morfin vysazení 2 měsíce	2,5 ± 0,6	

Koncentrace 5-hydroxyindolactové kyseliny v mozečku



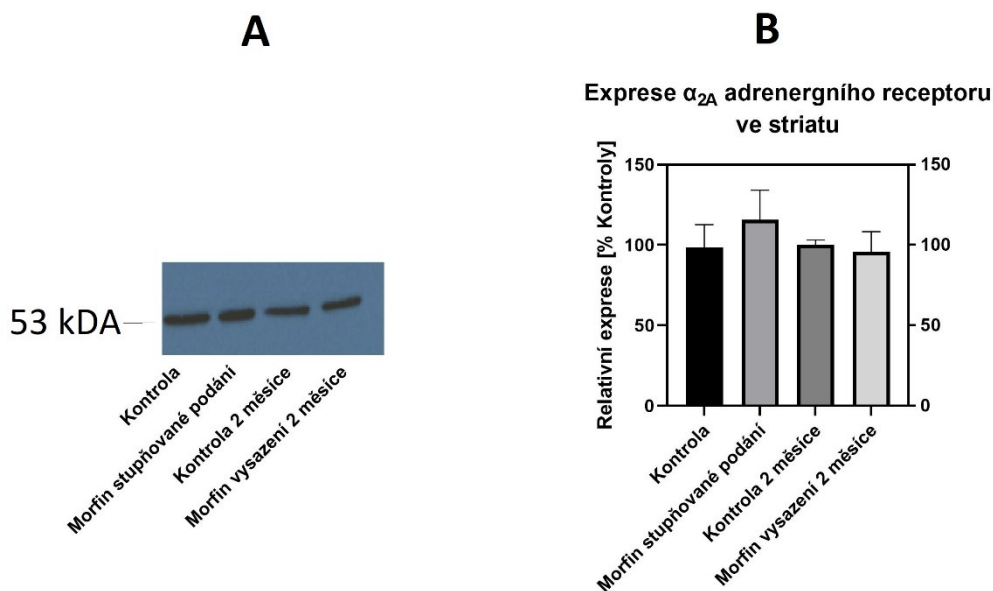
Obrázek 5.30 Koncentrace 5-hydroxyindolactové kyseliny v mozečku v kontrolních a morfinem ovlivněných skupinách potkanů

Tabulka 5.23 Statistické vyhodnocení výsledků stanovení 5-hydroxyindolactové kyseliny v mozečku kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů.

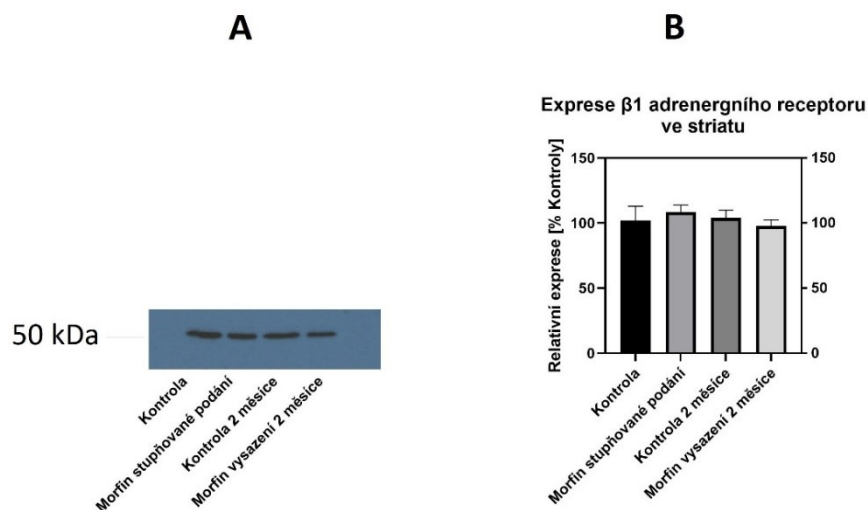
Skupina	Koncentrace 5-hydroxyindolactové kyseliny v mozečku [µg/g]	Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P
Kontrola	0,11 ± 0,03	0,8935
Morfin stupňované podání	0,12 ± 0,09	
Kontrola 2 měsíce	0,16 ± 0,05	0,8588
Morfin vysazení 2 měsíce	0,15 ± 0,06	

### 5.1.3 Detekce exprese adrenergických a dopaminergních receptorů ve vybraných částech mozku potkana

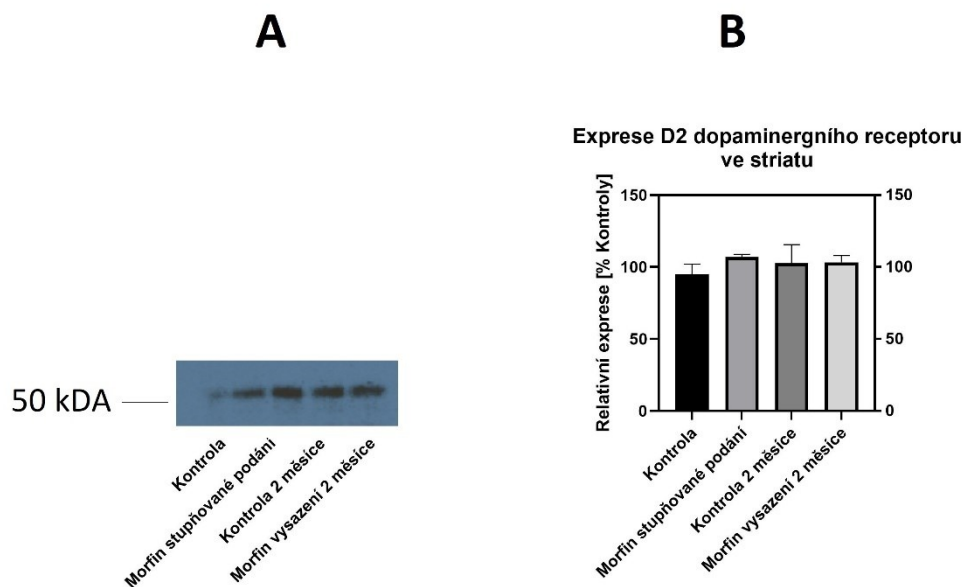
Výsledky studia vlivu morfinové závislosti a abstinence na expresi  $\alpha_{2A}$  adrenergního receptoru,  $\beta_1$  adrenergního receptoru a D2 dopaminergního receptoru ve striatu a kůře mozkové potkanů ovlivněných intraperitoneálním stupňovaným podáváním morfin sulfátu jsou prezentovány v obrázcích 5.31-5.36, součástí každého obrázku je část A, kde je zobrazen reprezentativní blot příslušného neurotransmiteru, v části B pak jeho grafické vyhodnocení. Statistické vyhodnocení je uvedeno v tabulkách 5.24 a 5.25.



Obrázek 5.31 V části A je zobrazen reprezentativní blot exprese  $\alpha_{2A}$  adrenergního receptoru ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů, v části B je zobrazeno vyhodnocení naměřených dat, která jsou vztažena na hodnotu Kontroly (100%).



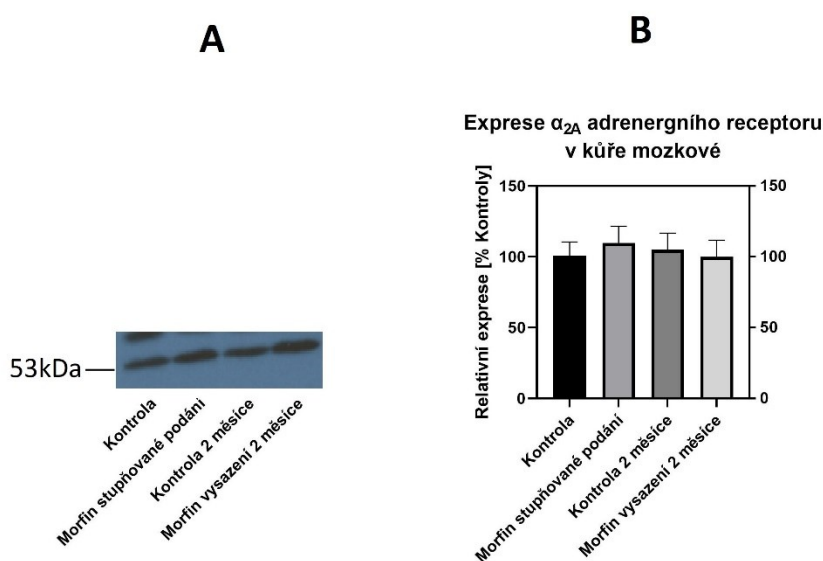
Obrázek 5.32 V části **A** je zobrazen reprezentativní blot exprese  $\beta 1$  adrenergního receptoru ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů, v části **B** je zobrazeno vyhodnocení naměřených dat, která jsou vztažena na hodnotu Kontroly (100%).



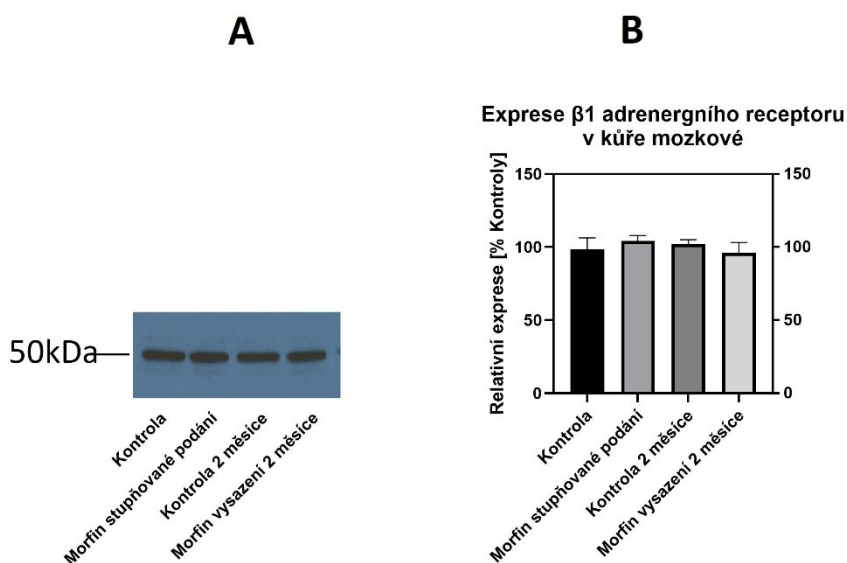
Obrázek 5.33 V části **A** je zobrazen reprezentativní blot exprese D2 dopaminergního receptoru ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů, v části **B** je zobrazeno vyhodnocení naměřených dat, která jsou vztažena na hodnotu Kontroly (100%).

Tabulka 5.24 Statistické vyhodnocení výsledků detekce exprese vybraných receptorů ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných potkanů.

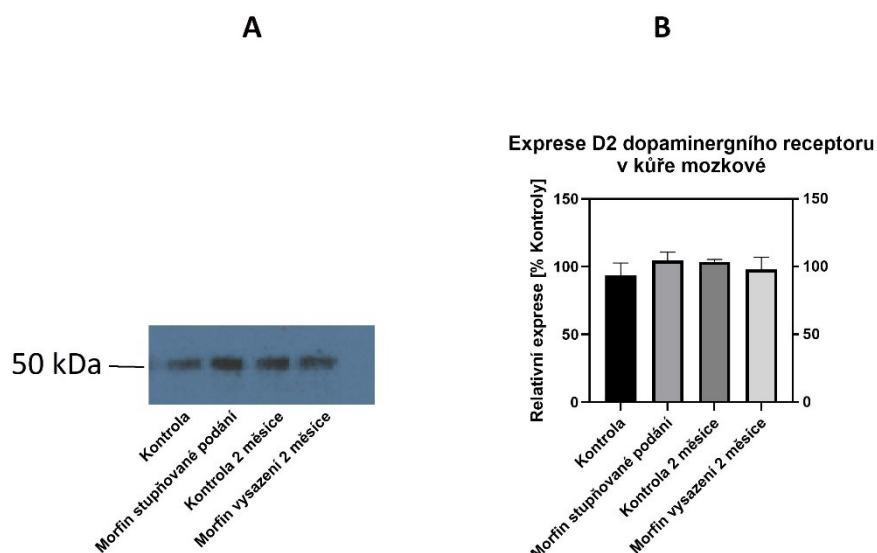
Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P			
Skupina	Expresa $\alpha_2A$ adrenergního receptoru ve striatu	Expresa $\beta_1$ adrenergního receptoru ve striatu	Expresa D2 dopaminergního receptoru ve striatu
Kontrola			
Morfin stupňované podání	0,2619	0,4145	0,1436
Kontrola 2 měsíce			
Morfin vysazení 2 měsíce	0,5572	0,2244	0,9431



Obrázek 5.34 V části **A** je zobrazen reprezentativní blot exprese  $\alpha_{2A}$  adrenergního receptoru v kůře mozkové kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů, v části **B** je zobrazeno vyhodnocení naměřených dat, která jsou vztažena na hodnotu Kontroly (100%).



Obrázek 5.35 V části **A** je zobrazen reprezentativní blot exprese  $\beta 1$  adrenergního receptoru v kůře mozkové kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů, v části **B** je zobrazeno vyhodnocení naměřených dat, která jsou vztažena na hodnotu Kontroly (100%).



Obrázek 5.36 V části **A** je zobrazen reprezentativní blot exprese D2 dopaminergního receptoru v kůře mozkové kontrolních a morfinem ovlivněných skupin potkanů, v části **B** je zobrazeno vyhodnocení naměřených dat, která jsou vztažena na hodnotu Kontroly (100%).

Tabulka 5.25 Statistické vyhodnocení výsledků detekce exprese vybraných receptorů ve striatu kontrolních a morfinem ovlivněných potkanů.

Hladina významnosti rozdílů v porovnávaných skupinách P			
Skupina	Expresa $\alpha_{2A}$ adrenergního receptoru v kůře mozkové	Expresa $\beta_1$ adrenergního receptoru v kůře mozkové	Expresa D2 dopaminergního receptoru v kůře mozkové
Kontrola			
Morfin stupňované podání	0,2384	0,2367	0,2991
Kontrola 2 měsíce			
Morfin vysazení 2 měsíce	0,6243	0,3596	0,4749

## 5.2 Diskuze

Prvním cílem této diplomové práce byla optimalizace vhodné HPLC-FLD metody a její následné použití ke stanovení vybraných komponent katecholaminergního a serotoninergního neurotransmitterového systému v mozku skupin potkanů ovlivněných podáváním a následným vysazením morfinu a skupin kontrolních. Při optimalizaci HPLC-FLD metody jsem vycházela z práce De Benedetta a kol. [76], která zavádí metodu pro stanovení dopaminu, noradrenalinu, serotoninu a 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny ve vzorcích striata. Parametry této metody jsou uvedeny v tabulce 5.1. Separace touto izokratickou metodou nebyla dostatečně účinná pro analýzu výše zmíněných neurotransmitterů, které jsem doplnila o metabolity dopaminu a serotoninu; homovanilovou a 5-hydroxyindoloctovou kyselinu. Dle Segury a kol. [77] je možné v některých případech zvýšit účinnost separace zavedením gradientové eluce. Místo izokratické eluce za použití mobilních fází methanolu a pufru kyseliny octové v poměru 14:86, jsem pro analýzu neurotransmitterů použila gradientovou eluci, za postupného zvyšování eluční síly mobilní fáze změnou poměru jejích složek; pufru kyseliny octové a methanolu v čase. Výše uvedený gradient je popsán v tabulce 5.2 a znázorněn na obrázku 5.3.

Neurotransmitery ve vzorcích mozkové tkáně jsou velmi náchylné k oxidaci, a vykazují tak značnou nestabilitu [78], proto bylo dalším optimalizovaným parametrem složení rozpouštědla, ve kterém byly vzorky mozkové tkáně pro HPLC-FLD analýzu homogenizovány. Dle studie Thorrého a kol. [78] je možné zvýšit stabilitu především dopaminu, serotoninu a jejich metabolitů pomocí disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny a L-askorbové kyseliny. Tato stabilizační činidla jsem přidala do rozpouštědla, ve kterém byly vzorky mozkové tkáně homogenizovány, a při měření vzorků v čase tak ověřila jejich účinnost. Porovnání analýzy vzorků v čase bez přidavku stabilizačních činidel a s přidavkem stabilizačních činidel je znázorněn na obrázcích 5.5 a 5.6.

Jelikož vzorky mozkové tkáně vykazovaly po zamrazení úbytek koncentrace neurotransmiterů, bylo vzhledem k jejich velkému počtu a délce analýz, což vyžadovalo vzorky před analýzou uchovávat zamrazené, nutné vzorky ještě více stabilizovat. Zhao a kol. [83] zavádí přidavek methanolu ke vzorkům standardů neurotransmiterů pro neurochemické analýzy za účelem zvýšení stability při jejich zamrazení. Toto zvýšení stability vzorků mozkové tkáně po přidavku methanolu a následném zamrazení při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jsem ověřila porovnáním výsledků analýzy vzorku mozkové tkáně bez přidavku methanolu a s přidavkem methanolu v čase, které jsou uvedeny v obrázcích 5.7 a 5.8.

Metodou, jejíž optimalizované parametry jsou uvedené výše, jsem stanovila koncentraci noradrenalinu, dopaminu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny, homovanilové kyseliny, serotoninu a 5-hydroxyindolactové kyseliny ve vzorcích striata neovlivněných kontrolních skupin potkanů. Naměřené výsledky jsou v rozmezí hodnot uvedených ve studiích [65, 79-80], což dokazuje účinnost optimalizace parametrů této metody. Dále jsem stanovila koncentraci noradrenalinu, dopaminu, 3,4-dihydroxyindolactové kyseliny, serotoninu a 5-hydroxyindolactové kyseliny ve vzorcích kůry mozkové a mozečku neovlivněných kontrolních skupin potkanů. Získané výsledky opět odpovídají výsledkům získaných studiemi [65, 75]. Homovanilová kyselina nebyla stanovena, protože se nacházela pod limitem detekce, pro její stanovení je možné využít metodu s detekcí o vyšší citlivostí, jako je například HPLC s hmotnostní detekcí [75]. Ve vzorcích hipokampu neovlivněných kontrolních potkanů jsem stanovila koncentraci dopaminu, noradrenalinu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny a serotoninu, které odpovídají koncentracím stanoveným studiemi [75, 80]. Homovanilová kyselina se nacházela pod limitem detekce a 5-hydroxyindolactová kyselina se nacházela pod limitem kvantifikace. Jejich koncentraci by bylo možné stanovit opět například pomocí HPLC s hmotnostní detekcí [75].

Výše uvedená zjištění potvrzují účinnost této metody při stanovení noradrenalinu, dopaminu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny, homovanilové kyseliny, serotoninu a 5-hydroxyindoloctové kyseliny ve striatu potkana, noradrenalinu, dopaminu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny, serotoninu a 5-hydroxyindoloctové kyseliny v kůře mozkové a mozečku potkana a noradrenalinu, dopaminu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny a serotoninu v hipokampu potkana.

Tuto optimalizovanou metodu jsem následně použila pro stanovení výše uvedených neurotransmiterů ve vzorcích mozku potkanů po desetidenním podávání morfin sulfátu (i.p.) a po jeho následném vysazení po dobu dvou měsíců. Ve striatu potkanů po desetidenním podávání morfinu jsem objevila statisticky významný nárůst koncentrace dopaminu oproti odpovídající kontrole. To podporuje prokázaný vliv morfinové závislosti na dopaminergní neurotransmiterový systém [54]. Mezi koncentrací dopaminu ve striatu potkanů po dvouměsíčním vysazení morfinu a odpovídajícím kontrolním potkanům není statisticky významný rozdíl, to značí schopnost organismu vracet se po změnách indukovaných morfinem do původního stavu [82]. Mezi koncentracemi metabolitů dopaminu; 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinou a homovanilovou kyselinou ve striatu morfinem ovlivněných potkanů a odpovídajících kontrol jsem nenalezla statisticky významné rozdíly, to může značit vliv morfinové závislosti na aktivitu enzymů účastnících se přeměny dopaminu na výše zmíněné metabolity [81]. Tato diplomová práce prokázala také vliv morfinové závislosti na serotoninergní neurotransmiterový systém. Ve striatu potkanů po desetidenním podávání morfinu jsem objevila statisticky významný nárůst koncentrace serotoninu oproti odpovídající kontrole. Koncentrace metabolitu serotoninu, 5-hydroxyindoloctové kyseliny, nejsou podáváním morfinu ovlivněny, pravděpodobně důsledkem schopnosti organismu čelit změnám způsobovaným podáváním a vysazením morfinu. Tato práce neodhalila vliv morfinové závislosti nebo abstinence na koncentraci noradrenalinu ve striatu potkanů, na rozdíl od práce Gromova a kol. [65], která ale uvádí vyšší dávku podávaného morfinu, delší časový úsek jeho podávání a také kratší dobu jeho vysazení.

Tato práce naopak prokázala statisticky významný nárůst koncentrace noradrenalinu v kůře mozkové potkanů po desetidenním podávání morfin sulfátu (i.p.) oproti kontrolním potkanům. To může souviset se zapojením signálních drah, souvisejících s rozvojem morfinové závislosti a abstinence, které vedou od adrenergních neuronů do korových oblastí [58]. Ostatní analyzované komponenty v kůře mozkové potkanů podáváním

morfinu ovlivněny nebyly, což potvrzuje teorii, že se organismus brání změnám indukovaným drogou a snaží se udržovat stálé vnitřní prostředí [82].

Tato práce neodhalila vliv morfinové závislosti ani abstinence na katecholaminergní ani serotoninergní neurotransmiterový systém v hipokampu ani v mozečku potkana. Jedním z možných důvodů může být nevelké zapojení těchto oblastí do signálních drah spojovaných s rozvojem morfinové závislosti a abstinence [58].

Dále tato práce zkoumala vliv morfinové závislosti a abstinence na expresi  $\alpha_{2A}$  a  $\beta_1$  adrenergních receptorů a D2 dopaminergních receptorů. Žádný vliv morfinové závislosti ani abstinence na tyto receptory tato práce neprokázala, na rozdíl od studií [67, 69, 71], které prokázaly zvýšenou expresi mRNA výše zmíněných receptorů, to může být dáno použitím odlišné metodiky a také modelu podávání morfinu.

Je ovšem možno konstatovat, že změny v neurotransmiterových systémech indukované morfinem nejsou trvalé a po jeho vysazení odeznívají.

## 6 Závěr

V této práci byla optimalizována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD), pomocí níž byl poté studován vliv morfinové abstinence na hladiny základních neurotransmiterů katecholaminergního neurotransmitterového systému a serotonergního neurotransmitterového systému ve vzorcích různých částí mozku potkanů. Bylo nalezeno vhodné složení rozpouštědla doplněného o stabilizační činidla pro přípravu vzorků mozkové tkáně a do původně izokratické metody byl zaveden gradient. Vzorky byly připravovány ve směsi rozpouštědla  $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$  kyseliny chloristé,  $6 \text{ mmol dm}^{-3}$  cysteinu,  $0,54 \text{ mmol dm}^{-3}$  disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny,  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  L-askorbové kyseliny a methanolu v poměru 1:1. Následná separace probíhala na koloně Supelco Supelcosil LC-18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) při gradientové eluci za použití mobilní fáze pufru kyseliny octové a methanolu, při průtoku  $1,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  a teplotě  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku byl  $10 \mu\text{l}$ , excitace probíhala při vlnové délce  $279 \text{ nm}$  a emise při  $320 \text{ nm}$ .

Výše uvedenou metodou jsem stanovila koncentraci dopaminu, noradrenalinu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny, homovanilové kyseliny, serotoninu a 5-hydroxyindoloctové kyseliny ve striatu potkanů ovlivněných dlouhodobým podáváním morfinu a jeho následným vysazením a odpovídajících neovlivněných kontrolních potkanů. Dále jsem stanovila koncentraci dopaminu, noradrenalinu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny, serotoninu a 5-hydroxyindoloctové kyseliny v obdobných vzorcích kůry mozkové a mozečků potkanů. Touto metodou s podařilo stanovit také koncentraci dopaminu, noradrenalinu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny a serotoninu ve vzorcích hipokampu potkana.

Tato práce prokázala statisticky významný nárůst koncentrace dopaminu a serotoninu ve striatu potkanů ovlivněných desetidenním podáváním morfin sulfátu (i.p) oproti odpovídajícím kontrolním neovlivněným jedincům a statisticky významný nárůst koncentrace noradrenalinu v kůře mozkové potkanů ovlivněných desetidenním podáváním morfin sulfátu (i.p.) oproti odpovídajícím kontrolním neovlivněným jedincům, čímž potvrdila vliv morfinové závislosti na katecholaminergní a serotonergní neurotransmitterový systém v mozku potkana. Nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v koncentraci komponent výše zmíněných neurotransmitterových systémů ve striatu, kůře mozkové, mozečku a hipokampu po dvouměsíčním vysazení

morfin sulfátu oproti odpovídající kontrole, čímž tato práce potvrzuje schopnost organismu vracet se po změnách indukovaných morfinem do původního stavu.

Tato práce nezjistila statisticky významné rozdíly v expresi  $\alpha_{2A}$  a  $\beta_1$  adrenergických ani D2 dopaminergních receptorů ve vzorcích striata a kůry mozkové skupin potkanů ovlivněných morfinem a odpovídajících kontrolních skupin, a prokazuje tak schopnost organismu čelit podávání morfinu ve snaze udržovat stálé vnitřní prostředí.

## Reference

- [1] Rizo J.: Mechanizm of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Science* **27**:8, 1364–1391 (2018) doi: 10.1002/pro.3445.
- [2] Südhof T. C.: Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* **80**:3, 675–690 (2013) doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.022.
- [3] Katz B.; Miledi R.: Spontaneous and evoked aktivty of motor nerve endings in calcium Ringer. *The Journal of Physiology* **203**:3, 689–706 (1969) doi: 10.1113/jphysiol.1969.sp008887
- [4] Heuser J. E.: Review of electron microscopic evidence favouring vesicle exocytosis as the structural basis for quantal release during synaptic transmission. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* **74**:7, 1051–1069 (1989) doi: 10.1113/expphysiol.1989.sp003333.
- [5] Fon E. A.; Edwards R. H.: Molecular mechanizms of neurotransmitter release. *Muscle & Nerve* **24**:5, 581–601 (2001) doi: 10.1002/mus.1044.
- [6] Kawai H.; Lazar R.; Metherate R.: Nicotinic control of axon excitability regulates thalamocortical transmission. *Nature Neuroscience* **10**:9, 1168–1175 (2007) doi: 10.1038/nm1956.
- [7] Bowery N. G.; Smart T. G.: GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British Journal of Pharmacology* **147**:1, 109–119 (2006) doi: 10.1038/sj.bjp.0706443.
- [8] Werman R.; Davidoff R. A.; Aprison M. H.: Inhibition of motoneurones by iontophoresis of glycine. *Nature* **214**:5089, 681–683 (1967) doi: 10.1038/214681a0.
- [9] Ko J. H.; Strafella A. P.: Dopaminergic neurotransmission in the human brain: New lessons from perturbation and imaging. *Neuroscientist* **18**:2, 149–168 (2012) doi: 10.1177/1073858411401413.
- [10] Rapport M. M.; Green A. A.; Page I. H.: Serum vasoconstrictor (Serotonin). *Journal of Biological Chemistry* **176**:3, 1243–1251 (1948) doi: 10.1016/S0021-9258(18)57137-4.
- [11] Uings I. J.; Farrow S. N.: Cell receptors and cell signalling. *Journal of Molecular Pathology* **53**:6, 295–299 (2000) doi: 10.1136/mp.53.6.295.
- [12] Anand R.; Conroy W. G.; Schoepfer R.; Whiting P.; Lindstrom J.: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *Journal of Biological Chemistry* **266**:17, 11192–11198 (1991) doi: 10.1016/S0021-9258(18)99147-7.

- [13] Gether U.; Lin S.; Kobilka B. K.: Fluorescent labeling of purified  $\beta$ 2 adrenergic receptor: Evidence for ligand-specific conformational changes. *Journal of Biological Chemistry* **270**:47, 28268–28275 (1995) doi: 10.1074/jbc.270.47.28268.
- [14] Gurevich V. V.; Gurevich E. V.: Molecular mechanisms of GPCR signaling: A Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences* **18**:12, 2519–2536 (2017) doi: 10.3390/ijms18122519.
- [15] Dichter G.; Damiano C.; Allen J.: Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: Animal models and clinical findings. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* **4**:19 (2012) doi: 10.1186/1866-1955-4-19.
- [16] Levin E. Y.; Levenberg B.; Kaufman S.: The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *Journal of Biological Chemistry* **235**:7, 2080–2086 (1960) doi: 10.1016/S0021-9258(18)69366-4.
- [17] Lovenberg W.; Weissbach H.; Udenfriend S.: Aromatic l-amino acid decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry* **237**:1, 89–93 (1962) doi: 10.1016/S0021-9258(18)81366-7.
- [18] Nagatsu T.: The catecholamine system in health and disease —Relation to tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. *Proceedings of Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences* **82**:10, 388–415 (2006) doi: 10.2183/pjab.82.388
- [19] Kobayashi K.: Role of catecholamine signaling in brain and nervous system functions: New insights from mouse molecular genetic study. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **6**:1, 115–121 (2001) doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.00011.x.
- [20] Gerfen C. R.: The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Journal of Neural Transmission. Supplementa* **36**, 43–59 (1992) doi: 10.1007/978-3-7091-9211-5\_4.
- [21] Moal M. L.; Simon H.: Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological Reviews* **71**:1, 155–234 (1991) doi: 10.1152/physrev.1991.71.1.155.
- [22] Grimm J.; Mueller A.; Hefti F.; Rosenthal A.: Molecular basis for catecholaminergic neuron diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:38, 13891–13896 (2004) doi: 10.1073/pnas.0405340101.

- [23] Brown J. H.; Makman M. H.: Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal homogenates and of adenosine-3':5'-cyclic monophosphate formation in intact retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**:3, 539–543 (1972) doi: 10.1073/pnas.69.3.539.
- [24] Jaber M.; Robinson S. W.; Missale C.; Caron M. G.: Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* **35**:11, 1503–1519 (1996) doi: 10.1016/S0028-3908(96)00100-1.
- [25] Bueschbell B.; Manga P.; Penner E.; Schiedel A. C.: Evidence for Protein–Protein Interaction between Dopamine Receptors and the G Protein–Coupled Receptor. *International Journal of Molecular Sciences* **22**:15, 8328–8344 (2021) doi: 10.3390/ijms22158328.
- [26] Lacey M. G.; Mercuri N. B.; North R. A.: Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *The Journal of Physiology* **92**, 397–416 (1987) doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016787.
- [27] Salvi R.; Steigleder T.; Schlachetzki J.C.M.; Waldmann E.; Schwab S.; Winner B.; Winkler J.; Kohl Z.: Distinct effects of chronic dopaminergic stimulation on hippocampal neurogenesis and striatal doublecortin expression in adult mice. *Frontiers in Neuroscience* **10**:77 (2016) doi: 10.3389/fnins.2016.00077.
- [28] Ahlquist R. P.: A study of the adrenotropic receptors. *American Journal of Physiology* **153**:3, 586–600 (1948) doi: 10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586.
- [29] Strosberg A. D.: Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science* **2**:8, 1198–1209 (1993) doi: 10.1002/pro.5560020802.
- [30] Perez D. M.:  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptors in Neurotransmission, Synaptic Plasticity, and Cognition. *Frontiers in Pharmacology* **11**, 1563–1585 (2020) doi: 10.3389/fphar.2020.581098.
- [31] Joh T. H.; Hwang O.; Abate C.: Phenylalanine Hydroxylase, Tyrosine Hydroxylase, and Tryptophan Hydroxylase. Neurotransmitter Enzymes. 5th ed. Totowa, Humana Press 1986
- [32] Höglund E.; Øverli Ø.; Winberg S.: Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. *Frontiers in Endocrinology* **10**, 158–169 (2019) doi: 10.3389/fendo.2019.00158.
- [33] Adaway J. E.: Serum and plasma 5-hydroxyindoleacetic acid as an alternative to 24-h urine 5-hydroxyindoleacetic acid measurement. *Annals of Clinical Biochemistry* **53**:5, 554–560 (2016) doi: 10.1177/0004563215613109.

- [34] Beauchaine T.; Klein D.; Crowell S.; Derbidge C.; Gatzke–Kopp L.: Multifinality in the development of personality disorders: A Biology × Sex × Environment interaction model of antisocial and borderline traits. *Development and Psychopathology* **21**, 735–770 (2009) doi: 10.1017/S0954579409000418.
- [35] Cao L.; Hu R.; Xu T.; Zhang Z. N.; Li W.; Lu J.: Characterization of induced pluripotent stem cell–derived human serotonergic neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **11**, 131–138 (2017) doi: 10.3389/fncel.2017.00131.
- [36] Charnay Y.; Leger L.: Brain serotonergic circuitries. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **12**:4, 471–487 (2010)
- [37] Pithadia A. B.; Jain S. M.: 5-hydroxytryptamine receptor subtypes and their modulators with therapeutic potentials. *Journal of Clinical Medicine Research* **1**:2, 72–80 (2009) doi: 10.4021/jocmr2009.05.1237.
- [38] Alhaider A. A.; Lei S. Z.; Wilcox G. L.: Spinal 5–HT<sub>3</sub> receptor–mediated antinociception: possible release of GABA. *Journal of Neuroscience* **11**:7, 1881–1888 (1991) doi: 10.1523/JNEUROSCI.11–07–01881.1991.
- [39] Costall B.; Domeney A. M.; Naylor R. J.; Tyers M. B.: Effects of the 5–HT<sub>3</sub> receptor antagonist, GR38032F, on raised dopaminergic activity in the mesolimbic system of the rat and marmoset brain. *British Journal of Pharmacology* **92**:4, 881–894 (1987) doi: 10.1111/j.1476–5381.1987.tb11394.x.
- [40] Sirgy M.: Positive balance: a hierarchical perspective of positive mental health. *Quality of Life Research* **28**:7, 1921–1930 (2019) doi: 10.1007/s11136–019–02145–5.
- [41] Rosenblum A.; Marsch L. A.; Joseph H.; Portenoy R. K.: Opioids and the treatment of chronic pain: controversies, current status, and future directions. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* **16**:5, 405–416 (2008) doi: 10.1037/a0013628.
- [42] McDonald J.; Lambert D. G.: Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* **17**:9, 464–468 (2016) doi: 10.1016/j.mpaic.2016.06.012.
- [43] Jordan B.; Devi L. A.: Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *British Journal of Anaesthesia* **81**:1, 12–19 (1998) doi: 10.1093/bja/81.1.12.
- [44] Coffman B. L.; King C. D.; Rios G. R.; Tephly T. R.: The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metabolism & Disposition* **26**:1, 73–77 (1998)

- [45] Frölich N.; Dees Ch.; Paetz Ch.; Ren X.; Lohse M.J.; Nikolaev V.O.; Zenk M.H.: Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at Gi-protein and  $\beta$ -arrestin signaling pathways activated by the human  $\mu$ -opioid receptor. *Biochemical Pharmacology* **81**:10, 1248–1254 (2011) doi: 10.1016/j.bcp.2011.03.001.
- [46] Al-Hasani R.; Bruchas M. R.: Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* **115**:6, 1363–1381 (2011) doi: 10.1097/ALN.0b013e318238bba6.
- [47] Del Vecchio G.; Spahn V.; Stein C.: Novel opioid analgesics and side effects. *ACS Chemical Neuroscience* **8**:8, 1638–1640 (2017) doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00195.
- [48] Olesen A.; Andresen T.; Staahl C.; Drewes A.: Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. *Pharmacological Reviews* **64**:3, 722–779 (2012) doi: 10.1124/pr.111.005447.
- [49] Corder G.; Castro D. C.; Bruchas M. R.; Scherrer G.: Endogenous and exogenous opioids in pain. *Annual Review of Neuroscience*, **41**, 453–473 (2018) doi: 10.1146/annurev-neuro-080317-061522.
- [50] Azadfard M.; Huecker M. R.; Leaming J. M.: Opioid Addiction. *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing (2021)
- [51] Pergolizzi J. V.; Raffa R. B.; Rosenblatt M. H.: Opioid withdrawal symptoms, a consequence of chronic opioid use and opioid use disorder: Current understanding and approaches to management. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **45**:5, 892–903 (2020) doi: 10.1111/jcpt.13114.
- [52] Dang V. C.; Christie M. J.: Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *British Journal of Pharmacology* **165**:6, 1704–1716 (2012) doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01482.x.
- [53] Matsuoka I.; Maldonado R.; Defer N.; Noël F.; Hanoune J.; Roques B.-P.: Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* **268**:2, 215–221 (1994) doi: 10.1016/0922-4106(94)90191-0.
- [54] E. Galaj Han X.; Shen H. Jordan Ch. J.; He Y.; Humburg B.; Bi G. H.; Xi Z. X.: Dissecting the Role of GABA Neurons in the VTA versus SNr in Opioid Reward. *Journal of Neuroscience* **40**:46, 8853–8869 (2020) doi: 10.1523/JNEUROSCI.0988-20.2020.

- [55] Galaj E.; Xi Z.-X.: Progress in opioid reward research: From a canonical two-neuron hypothesis to two neural circuits. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **200**, 173072–173084 (2021) doi: 10.1016/j.pbb.2020.173072.
- [56] Spampinato U.; Esposito E.; Romandini S.; Samanin R.: Changes of serotonin and dopamine metabolism in various forebrain areas of rats injected with morphine either systemically or in the raphe nuclei dorsalis and medianus. *Brain Research* **328**:1, 89–95 (1985) doi: 10.1016/0006-8993(85)91326-5.
- [57] Spangler R.; Goddard N. L.; Avena N. M.; Hoebel B. G.; Leibowitz S. F.: Elevated D3 dopamine receptor mRNA in dopaminergic and dopaminoceptive regions of the rat brain in response to morphine. *Molecular Brain Research* **111**:1–2, 74–83 (2003) doi: 10.1016/s0169-328x(02)00671-x.
- [58] Narita M. Mizuo K.; Mizoguchi H.; Sakata M.; Narita M.; Tseng L. F.; Suzuki T.: Molecular evidence for the functional role of dopamine D3 receptor in the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion. *Journal of Neuroscience* **23**:3, 1006–1012 (2003) doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-03-01006.2003.
- [59] Nemmani K. V. S.; Mogil J. S.: Serotonin-GABA interactions in the modulation of mu- and kappa-opioid analgesia. *Neuropharmacology* **44**:3, 304–310 (2003) doi: 10.1016/S0028-3908(02)00374-X.
- [60] Nayeibi A. R. M.; Charkhpour M.: Role of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of dorsal and median raphe nucleus in tolerance to morphine analgesia in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **83**:2, 203–207 (2006) doi: 10.1016/j.pbb.2006.01.008.
- [61] Root-Bernstein R.; Churchill B.; Turke M.; Subhramanyam U. K. T.; Labahn J.: Mutual enhancement of opioid and adrenergic receptors by combinations of opioids and adrenergic ligands is reflected in molecular complementarity of ligands: Drug Development Possibilities. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:17, s. 4137–4158 (2019) doi: 10.3390/ijms20174137.
- [62] Bouaziz H.; Tong C.; Yoon Y.; Hood D. D.; Eisenach J. C.: Intravenous opioids stimulate norepinephrine and acetylcholine release in spinal cord dorsal horn: Systematic Studies in Sheep and an Observation in a Human. *Anesthesiology* **84**:1, 143–154 (1996) doi: 10.1097/00000542-199601000-00017.
- [63] Mattio T. G.; Kirby M. L.: Effects of chronic morphine administration on catecholamines and beta-adrenergic receptors of the superior cervical ganglion and iris of the rat. *Life Sciences* **30**:17, 1435–1442 (1982) doi: 10.1016/0024-3205(82)90557-4.

- [64] Rehni A. K.; Jaggi A. S.; Singh N.: Opioid withdrawal syndrome: emerging concepts and novel therapeutic targets. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets* **12**:1, 112–125 (2013) doi: 10.2174/1871527311312010017.
- [65] Gromov L. A.; Filonenko M. A.: Neurotransmitter and neuropeptide mechanisms responsible for the development of a withdrawal syndrome in morphine-dependent animals. *Neurophysiology* **31**:2, 115–120 (1999) doi: 10.1007/BF02515049.
- [66] Gulati A.; Bhargava H. N.: Cerebral cortical 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors of morphine tolerant-dependent rats. *Neuropharmacology* **27**:12, 1231–1237 (1988) doi: 10.1016/0028-3908(88)90025-1.
- [67] Busquets X.; Ventayol P.; García-Sevilla J. A.: Naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats increases the expression of  $\alpha$ 2a-adrenoceptor mRNA in brain. *Molecular Brain Research* **45**:1, 154–158 (1997) doi: 10.1016/S0169-328X(96)00307-5.
- [68] Ammon-Treiber S.; Höllt V.: Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addiction Biology* **10**:1, 81–89 (2005) doi: 10.1080/13556210412331308994.
- [69] Dumont É. C.; Williams J. T.: Noradrenaline triggers GABA<sub>A</sub> inhibition of bed nucleus of the stria terminalis neurons projecting to the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience* **24**:38, 8198–8204 (2004) doi: 10.1523/JNEUROSCI.0425-04.2004.
- [70] Diana M.; Pistis M.; Muntoni A.; Gessa G.: Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **272**:2, 781–785 (1995)
- [71] Funada M.; Shippenberg T. S.: Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the expression of morphine withdrawal signs in rats. *Behavioural Pharmacology* **7**:5, 448–453 (1996)
- [72] Tareke E.; Bowyer J. F.; Doerge D. R.: Quantification of rat brain neurotransmitters and metabolites using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry and comparison with liquid chromatography/electrochemical detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**:23, 3898–3904 (2007) doi: 10.1002/rcm.3295.
- [73] Xu D.; Marchionni K.; Hu Y.; Zhang W.; Sosic Z.: Quantitative analysis of a biopharmaceutical protein in cell culture samples using automated capillary electrophoresis (CE) western blot. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **145**, 10–15 (2017) doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.025.

- [74] Zhao X.-E.; Suo Y.-R.: Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat endbrain tissues by pre-column derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification. *Talanta* **76**:3, 690–697 (2008) doi: 10.1016/j.talanta.2008.04.032.
- [75] Zhang L.-H.: Simultaneous determination of multiple neurotransmitters and their metabolites in rat brain homogenates and microdialysates by LC-MS/MS. *Analytical Methods* **7**:9, 3929–3938 (2015) doi: 10.1039/C5AY00308C.
- [76] De Benedetto G. E.; Fico D.; Pennetta A.; Malitesta C.; Nicolardi G.; Lofrumento D.D.; De Nuccio F.; La Pesa V.: A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **98**, 266–270 (2014) doi: 10.1016/j.jpba.2014.05.039.
- [77] Segura A.; Cabo-Calvet E.; Baeza-Baeza J. J.; García-Alvarez-Coque M. C.: Study of the column efficiency using gradient elution based on Van Deemter plots. *Journal of Chromatography A*, **1584**, 126–134 (2019) doi: 10.1016/j.chroma.2018.11.042.
- [78] Thorré K.; Pravda M.; Sarre S.; Ebinger G.; Michotte Y.: New antioxidant mixture for long term stability of serotonin, dopamine and their metabolites in automated microbore liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **694**:2, 297–303 (1997) doi: 10.1016/S0378-4347(97)00126-6.
- [79] Yoshitake T.; Kehr J.; Yoshitake S.; Fujino K.; Nohta H.; Yamaguchi M.: Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. *Journal of Chromatography B*, **807**:2, 177–183 (2004) doi: 10.1016/j.jchromb.2004.03.069.
- [80] Lakshmana M. K.; Raju T. R.: An isocratic assay for norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine using their native fluorescence by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection in discrete brain areas of rat. *Analytical Biochemistry*, **246**:2, 166–170 (1997) doi: 10.1006/abio.1996.9997.
- [81] Yong Z.; Yan L.; Wang X.; Su R.; Gong Z.: Up-regulation of monoamine oxidase activity in the striatum of rats following chronic treatment of thienorphine. *European Journal of Pharmacology*, **713**:1, 44–46 (2013) doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.041.

- [82] Kosten T. R.; George T. P.: The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. *Science&Practice Perspectives*. **1**:1, 13–20 (2002) doi: 10.1151/spp021113
- [83] Zhao H.-X.; Mu H.; Bai Y.-H.; Yu H.; Hu Y.-M.: A rapid method for the determination of dopamine in porcine muscle by pre-column derivatization and HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **1**:3, 208–212 (2011) doi: 10.1016/j.jpha.2011.04.003.