

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Daniela Nováková

Vliv morfinové abstinence na adenylycyklázový signální
systém v mozku potkana

The effect of morphine withdrawal on the adenylyl
cyclase signaling system in rat brain

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2019

Prohlášení

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. srpna 2019

.....

Daniela Nováková

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem morfinové abstinence na adenylylcyklázový signální systém v mozku potkana. Teoretická část práce shrnuje základní informace o opioidech a jejich předním zástupci morfinu, molekulárních mechanismech jeho působení v organismu a doposud zjištěné poznatky o působení morfinové závislosti a následné abstinence na organismus a především na centrální nervovou soustavu. Přesné mechanismy rozvoje morfinové závislosti a abstinence stále zůstávají neobjasněny. V této práci je také stručně popsán princip metody Western blot použité při samotné analýze vlivu morfinové abstinence na expresi vybraných proteinů adenylylcyklázového signálního systému. Experimentální část této práce se věnuje detekci exprese základních komponent tohoto systému ve vybraných částech mozku potkanů po dlouhodobém podávání zvyšujících se dávek morfinu a jejich následném vysazení. Výsledky této práce neodhalily statisticky významné rozdíly v expresi komponent adenylylcyklázového signálního systému mezi abstinujícími a odpovídajícími kontrolními skupinami zvířat, což potvrzuje již prokázanou vysokou schopnost organismu čelit podávaným dávkám morfinu a vracet se po jeho vysazení do fyziologické normy.

Klíčová slova: Morfin, abstinence, adenylylcyklázový signální systém, G-proteiny, mozek, potkan

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to study the effect of morphine withdrawal on the adenylyl cyclase signal system in the rat brain. Theoretical part of this thesis summarizes basic information known about opioids and its leading representative morphine, molecular mechanisms of its effect on the organism and yet determined knowledge about effects of morphine addiction and subsequent withdrawal on the organism and above all on the central nervous system. There is still much unknown about exact mechanism of development of morphine addiction and withdrawal. This thesis also summarizes briefly the Western blot method used in analysing the effect of morphine withdrawal on selected proteins of the adenylyl cyclase signal system in the rat brain. Experimental part of this thesis is based on the detection of expression of key components of the adenylyl cyclase pathway in selected regions of the rat brain after long-term administration and subsequent withdrawal of increasing doses of morphine. Results of this study did not reveal statistically significant differences in the expression of adenylyl cyclase signaling system components between the withdrawal and the corresponding control groups of animals, confirming high ability of the organism to withstand morphine administration and to return to physiological standard after withdrawal of the drug, which was demonstrated earlier.

Key words: Morphine, withdrawal, adenylyl cyclase signaling system, G-proteins, brain, rat

Velmi ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc., za jeho velkou pomoc a trpělivost při sepisování této práce a jeho kolegům ze Skupiny membránových receptorů a buněčné signalizace za vřelé přijetí a pomoc při zvládnutí experimentální metody použité v této práci. Děkuji také svým rodičům za podporu a povzbuzení při studiu.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část.....	2
2.1. Opioidy.....	2
2.1.1. Chemická podstata opioidů.....	2
2.1.2. Historie opioidů.....	3
2.1.3. Účinky opioidů.....	4
2.1.4. Morfin.....	4
2.2. Molekulární mechanismy působení morfinu.....	6
2.2.1. Opioidní receptory.....	6
2.2.2. Receptory spřažené s G-proteiny.....	7
2.2.3. G-proteiny.....	8
2.2.4. Adenylylcyklázový signální systém.....	9
2.3. Morfinová závislost a abstinence.....	12
2.3.1. Morfinová závislost.....	12
2.3.2. Morfinová abstinence.....	13
2.4. Metoda Western blot.....	15
3. Experimentální část.....	19
3.1. Materiál.....	19
3.1.1. Reagencie.....	19
3.1.2. Přístrojové vybavení a materiál.....	20
3.1.3. Vzorky.....	20
3.2. Pracovní postup.....	20
4. Výsledky a diskuze.....	24
4.1. Výsledky.....	24
4.2. Diskuze.....	40
5. Závěr.....	44
Použitá literatura.....	45

Seznam zkratk a použitých symbolů

AC	adenylylcykláza
Ac-Bis	směs akrylamidu a bisakrylamidu
APS	ammoniumpersulfát
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CREB	vazebný protein pro cAMP responzivní element
DOR	δ opioidní receptor
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
G-protein	heterotrimerní GTP-vázající protein
GDP	guanosintrifosfát
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
GTP	guanosintrifosfát
KOR	κ opioidní receptor
MOR	μ opioidní receptor
NOP	nociceptinový opioidní recept
PKA	proteinkináza A
SDS	dodecylsírán sodný
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
TBS	Tris-pufrovaný solný roztok
TMES	pufř obsahující Tris, chlorid hořečnatý, kyselinu ethylendiamintetraoctovou a sacharózu
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

1. Úvod

Morfin, jakožto hlavní zástupce opioidů, lidstvo od pradávna využívá zejména pro své analgetické, zklidňující a euforické účinky. Původně se morfin obsažen v opiové směsi používal převážně jako zklidňující prostředek pro děti či při zmírnění bolesti pacientů. Právě tyto účinky morfinu sebou bohužel nesou i riziko jeho zneužívání či nadužívání.

Užívání morfinu a dalších látek z řad opioidů může způsobovat vznik drogové závislosti a s ní spojené abstinенční příznaky, což má nepříznivý vliv jak na fyzickou tak i na psychickou schránku člověka. Příčina vzniku drogové závislosti a abstinенčního syndromu ani jejich působení na molekulární úrovni nejsou dodnes zcela známy. Stále však probíhají studie zabývající se principy jejich vzniku a působení na buněčné úrovni.

Morfin se v organismu a především v centrální nervové soustavě specificky váže na opioidní receptory, které jsou spřaženy s G-proteiny, zprostředkujícími přenos informace o navázané droze přes početné signální dráhy v popředí s adenylcyklázovou signální drahou. Právě tyto signální dráhy jsou dnes předmětem mnoha výzkumů. Objasnění výše zmíněných mechanismů účinku drogy a s tím souvisejících procesů probíhajících v signálních drahách buňky by mohlo pomoci lépe pochopit drogovou problematiku a přispět k prohloubení pochopení abstinенčního syndromu a případné léčbě závislosti.

Cílem této práce je zkoumání vlivu morfinové abstinence na adenylcyklázový signální systém v mozku potkana.

2. Teoretická část

2.1. Opioidy

2.1.1. Chemická podstata opioidů

Opioidy jsou látky, které jsou schopny se v biologických systémech vázat na opioidní receptory. Podle své chemické struktury a místa vzniku se opioidy mohou dělit do následujících čtyř skupin:

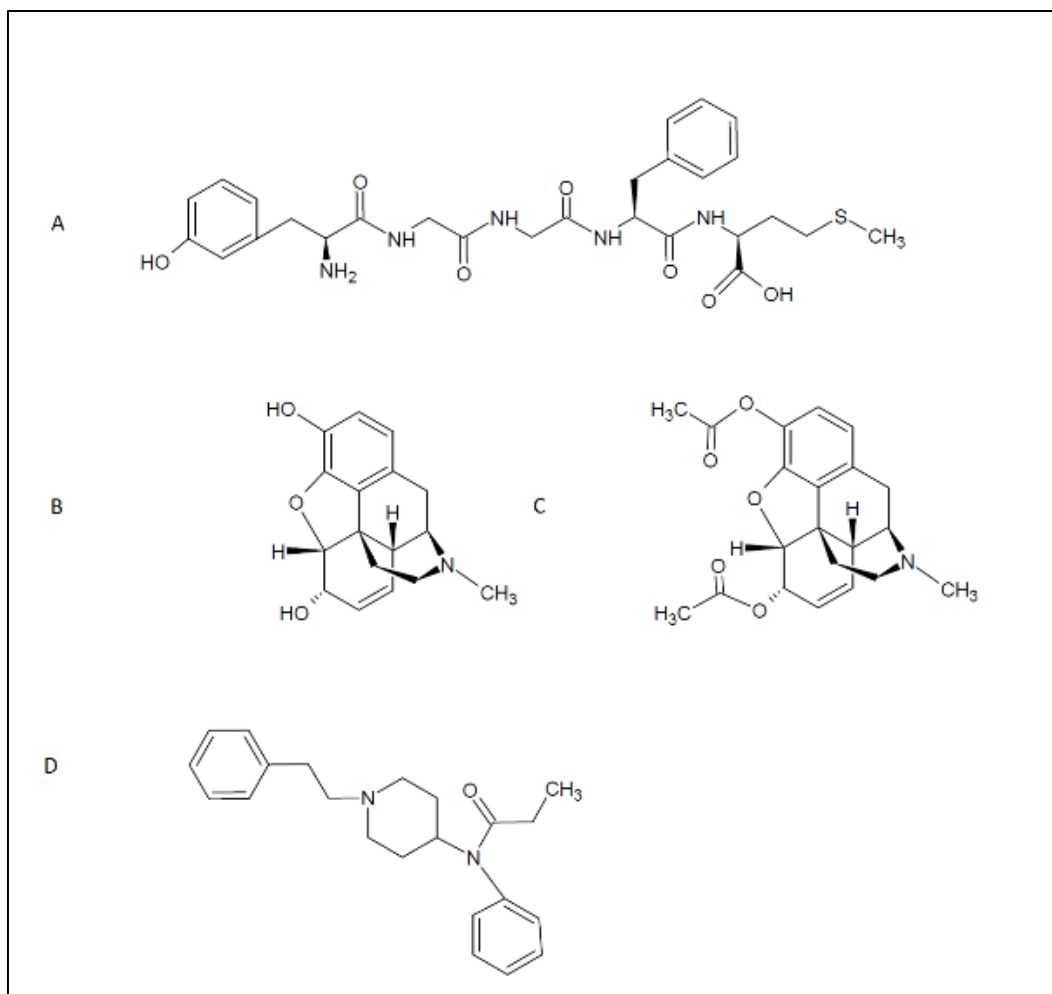
1. Endogenní opioidy, které svojí chemickou strukturou spadají mezi polypeptidy a mezi jejichž zástupce řadíme methionin-enkefalin a leucin-enkefalin z řad enkefalinů, beta-endorfin, dynorfin a endomorfiny.

2. Opiové alkaloidy (opiáty), mezi jejichž nejznámější představitele můžeme zařadit morfin a kodein a které se získávají z opia přirozeně se vyskytujícího v máku setém (*Papaver somniferum*). Strukturálním motivem těchto alkaloidů je molekula fenanthrenu.

3. Semi-syntetické opioidy, což jsou v podstatě chemicky modifikované formy přírodního morfinu, např. hojně zneužívaný diacetylmorfin (známější pod označením heroin).

4. Syntetické opioidy, které svojí strukturou nekorespondují s morfinem, spadající převážně do fenylypiperidinové (např. fentanyl) či metadonové (metadon) strukturální skupiny [1,2].

Chemické struktury vybraných opioidů z výše uvedených skupin jsou zobrazeny na Obrázku 1.



Obrázek 1. Chemické struktury opioidů methionin-enkefalinu (A), morfinu (B), heroinu (C) a fentanylu (D) vytvořené pomocí programu ChemSketch.

2.1.2. Historie opioidů

Opioidy jsou díky svým analgetickým účinkům používány od pradávna jako přípravky zklidňující a tišící bolest. První zmínky o pěstování máku („rostliny štěstí“) sumerskými národy za účelem získání opia pocházejí již v pátého století př.n.l. O využití opia pro jeho zklidňující účinky hovoří i Eberský papyrus sepsaný ve starém Egyptě kolem roku 1500 př.n.l., ve kterém je předepisována směs opia a dalších substancí (například mušinců) pro utišení plačících dětí. Účinky opia znali i staří Řekové a Římané, kteří jej používali při lékařských zákrocích pro zmírnění bolesti [3,4].

V novodobé historii jsou opioidy pro své zklidňující a euforické účinky, bohužel, stále častěji zneužívány. Chronické zneužívání opioidů má řadu nepříznivých účinků, které mohou vést k závislosti či dokonce ke smrti. Ve Spojených státech amerických ročně zemře na předávkování opioidy přes 19 000 osob. V současnosti se v souvislosti s nadužíváním těchto látek hovoří o tzv. „Opioidové krizi“ [5].

2.1.3. Účinky opioidů

Výsledný účinek opioidu silně závisí na jeho interakci s opioidním receptorem. Opioidy mohou být jak agonisty, tak antagonisty těchto receptorů. Důležitou roli v účinku opioidu hrají také jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je stupeň ionizace a lipofilita, což ovlivňuje jeho přesun do místa účinku. Opioidy jsou zpravidla slabé báze (pKa 6,5-8,7), a v biologickém systému se tudíž mohou vyskytovat ve své disociované i nedisociované podobě v závislosti na pH systému [6,7].

Opioidy jsou v klinické praxi využívány zejména pro své analgetické účinky (útlum středně silné až silné bolesti), antitusické a protiprůjmové i obstipační účinky. Nesmíme opomenout ani jejich nežádoucí účinky, mezi kterými dominuje útlum dechové činnosti, nauzea a zvracení, a jejich nežádoucí vliv na kognitivní funkce, který může vyústit až v delirium nebo demenci [7,8,9].

Mezi další účinky opioidů patří modulace nálady a euforie. Tyto vlastnosti opioidů se významně podílejí na jejich zneužívání, které vede ke vzniku tolerance a fyzické závislosti na těchto látkách [10].

2.1.4. Morfin

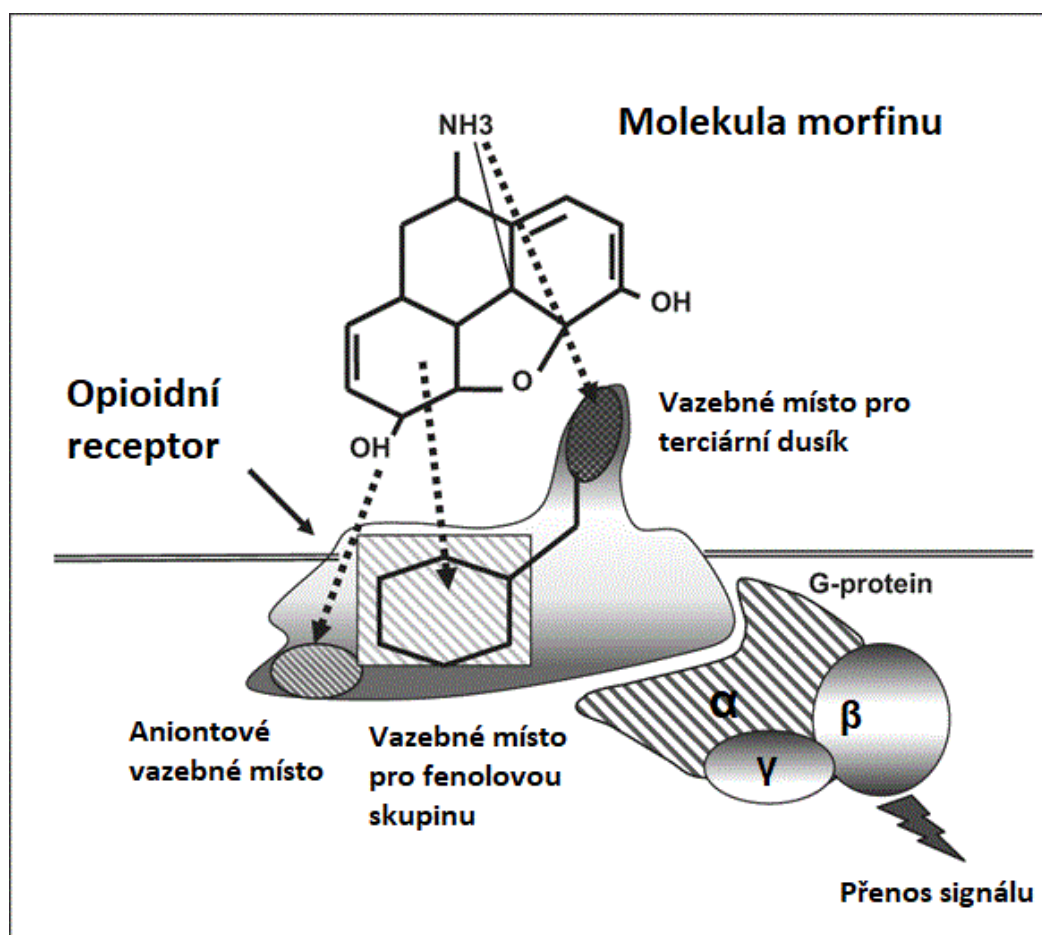
Patrně nejznámějším a nejhojněji využívaným opioidem je morfin. Morfin je dokonce považován za „zlatý standard“ v klinickém využívání analgetik. Jeho výskyt byl kromě máku potvrzen např. i ve zvířecím a lidském mozkomíšním moku, nervové tkáni nebo játrech. Uměle dodaný morfin je totiž v játrech konjugován glukoronidy, zvyšujícími hydrofilitu vzniklých metabolitů (morfin-3-glukuronid a

morfin-6-glukuronid), které poté hůře pronikají hematoencefalickou bariérou, což podporuje lokální syntézu morfinu v organismu [11,12].

Morfin byl poprvé izolován z opia na počátku 19. století teprve jednadvacetiletým Wilhelmem Sertürnerem, který izolovanou sloučeninu pojmenoval podle řeckého boha snů Morpheia. Následné objasnění a odvození chemické struktury morfinu vyneslo jejímu objeviteli, siru Robertu Robinsonovi v roce 1947 Nobelovu cenu za chemii [13].

Jak již bylo řečeno, morfin je alkaloid fenanthrenového typu, a právě jeho struktura, respektive disociovaná -OH funkční skupina, fenolová jádra fenanthrenu a terciární dusík, je zodpovědná za jeho interakci s opioidním receptorem [14].

Interakce morfinu s opioidním receptorem je uvedena na Obrázku 2.



Obrázek 2. Interakce morfinu s opioidním receptorem probíhající na základě rozpoznání jednotlivých funkčních skupin molekuly morfinu příslušnými vazebnými místy opioidního receptoru. Upraveno dle [14].

2.2. Molekulární mechanismy působení morfinu

2.2.1. Opioidní receptory

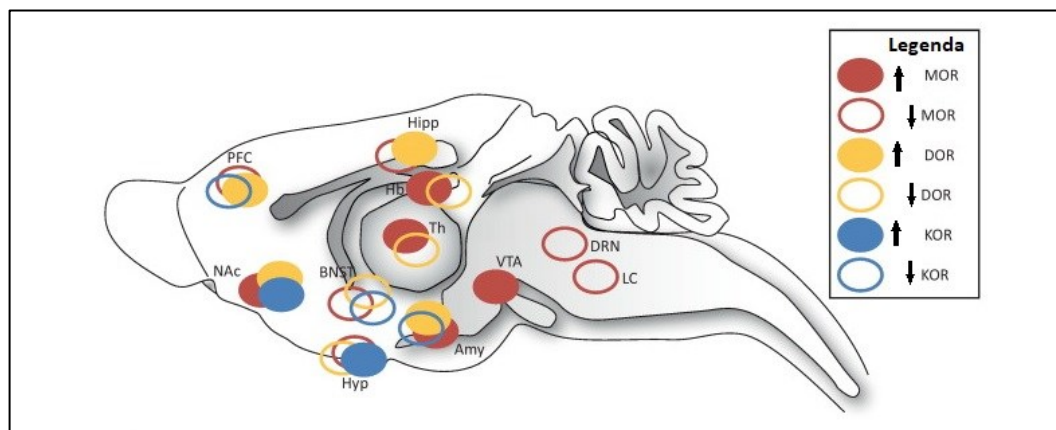
Opioidní receptory, respektive jejich různé typy, které mají odlišnou afinitu k jednotlivým druhům opioidů, byly objeveny v roce 1976 W. R. Martinem a jeho kolegy [15].

Prvním objeveným typem receptoru byl μ opioidní receptor (MOR) pojmenován podle své afinity k molekule morfinu, který je čistým agonistou tohoto receptoru, následován κ opioidním receptorem (KOR) citlivým na ketocyklazocin. O rok později byl do této skupiny receptorů přiřazen ještě nově objevený δ opioidní receptor (DOR). Dnes je kromě těchto tří hlavních typů opioidních receptorů a jejich podtypů znám ještě nociceptinový opioidní receptor (NOP) [15,16,17].

Opioidní receptory jsou přítomny jak v centrálním, tak i v periferním nervovém systému, ale jejich výskyt byl prokázán například i v gastrointestinálním traktu, srdci nebo imunitním systému [18]. Rozdílná distribuce jednotlivých opioidních receptorů v centrálním nervovém systému se významně podílí na výsledném účinku zprostředkovaném příslušným opioidem [19].

Co se intracelulární signalizace týče, spadají opioidní receptory do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs) [20].

Distribuce jednotlivých typů opioidních receptorů v různých částech hlodavčího mozku je znázorněna na Obrázku 3.



Obrázek 3. Distribuce jednotlivých typů opioidních receptorů v hlodavčím mozku. Vyplněná barevná oblast značí vyšší distribuci daného typu receptoru, zatímco nevyplněný barevný obrys značí jeho nízkou distribuci. Červeně jsou označeny μ , žlutě δ a modře κ opioidní receptory. Jednotlivé části mozku jsou označovány následovně: PFC (prefrontální kortex), Hipp (hipokampus), Hb (habenula), Th (thalamus), NAc (nucleus accumbens), BNST (jádro lůžka stria terminalis), Hyp (hypothalamus), Amy (amygdala), VTA (ventrální tegmentální oblast), DRN (dorsální nukleus raphe), LC (locus coeruleus). Upraveno dle [19].

2.2.2. Receptory spřažené s G-proteiny

Receptory spřažené s G-proteiny (angl. G-protein-coupled receptors; GPCRs) tvoří největší skupinu membránových proteinů, zprostředkujících buněčnou odpověď. Savčí receptory spřažené s G-proteiny se zpravidla dále dělí na základě své sekvence a strukturní podobnosti do pěti následujících skupin: rhodopsinová, sekretinová, glutamátová, adhezní a frizzled skupina. [21].

Tyto receptory se skládají ze sedmi transmembránových domén obsahujících α helikální segmenty a oblasti extracelulárních a intracelulárních smyček prostupujících buněčnou membránou a jsou asociovány s heterotrimerními proteiny vázajícími guaninové nukleotidy (tzv. G-proteiny), sestávajícími se z α , β a γ podjednotek. Po navázání ligandu na extracelulární části receptoru dochází ke konformačním změnám tohoto receptoru a k aktivaci spřaženého G-proteinu, což následně vyvolá příslušný sled biochemických reakcí ústících v buněčnou odpověď na přítomnost ligandu vázaného na receptor. Tyto intracelulární reakce regulují celou řadu fyziologických procesů, jako je čich, chuť, zrak, neurotransmise, buněčná diferenciaci a růst nebo imunitní odezva [21,22].

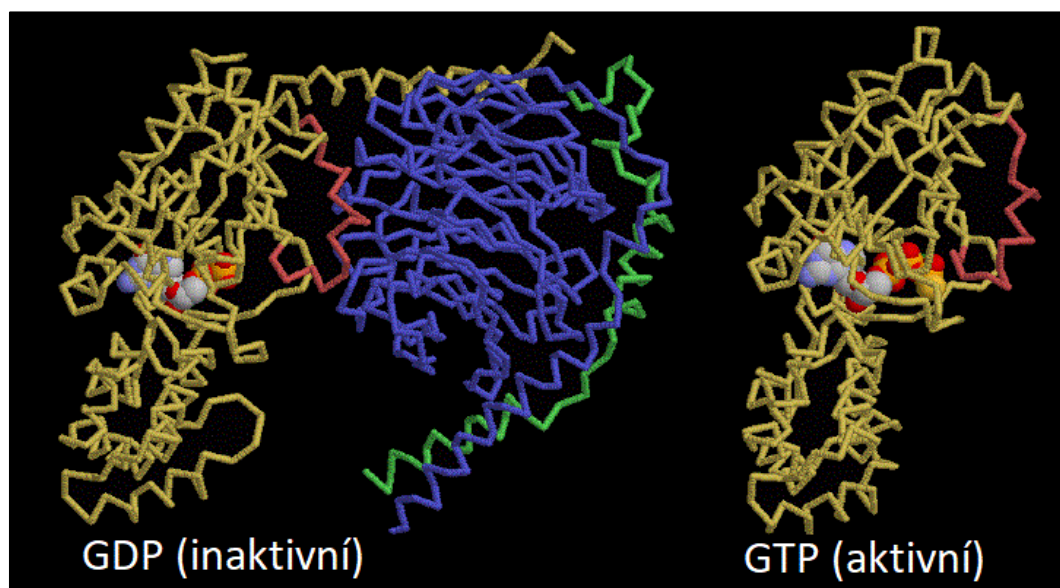
Prvním krokem signalizace zprostředkované G-proteiny je navázání ligandu (např. hormonu, neurotransmiteru nebo molekuly odorantu) na N-konec receptoru spřaženého s G-proteiny, který se nachází na vnější straně buněčné membrány. K této vazbě hojně přispívají i výše zmíněné extracelulární smyčky proteinu, které ji stabilizují. Následná změna konformace receptoru vede k aktivaci α podjednotky G-proteinu, která je jinak ve svém inaktivovaném stavu vázána na molekulu GDP a je pevně přichycena k β a γ podjednotce. Při této aktivaci dochází k fosforylaci GDP za vzniku GTP a k disociaci α podjednotky G-proteinu od dimerní $\beta\gamma$ podjednotky. Takto aktivovaný G-protein může díky interakci s nejrůznějšími membránovými proteiny zapojenými do signální dráhy zapříčinit přenos informací napříč buňkou. Inaktivace G-proteinu je důsledkem hydrolýzy GTP, což vede k opětovnému vzniku heterotrimerního G-proteinu připraveného zapojit se do další signální dráhy [21,23,24].

Aktivací příslušných G-proteinů může docházet k aktivaci či inhibici nejrůznějších kaskád enzymatických reakcí, do nichž se zapojuje celá řada efektorů jako je adenylylcykláza, fosfodiesteráza, fosfolipáza C, napětově závislý Ca^{2+} kanál, apod., které vedou k tvorbě tzv. druhých posílů (např. cyklický adenosinmonofosfát, ionty Ca^{2+} , inositoltrifosfát nebo oxid dusnatý), ovlivňujících širokou škálu intracelulárních enzymů, iontových kanálů a transportérů, vedoucích k buněčné odpovědi [25,26,27].

2.2.3. G-proteiny

Kromě tří hlavních podjednotek heterotrimerních G-proteinů (α , β a γ podjednotka) je dnes známo několik desítek jejich podtypů nacházejících se v různých typech buněk, které se dále dělí podle svého působení na efektorové molekuly. Mezi tyto podtypy patří Gt (transducin) protein, který je schopen vázat molekulu rhodopsinu, a tím regulovat funkci fotoreceptorových buněk, dále Gs a Gi proteiny, které stimulují (Gs) nebo inhibují (Gi) enzym adenylylcyklázu, který je zodpovědný za katalýzu syntézy cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Mezi další podtypy G-proteinů spadají mimo jiné Go, Gz, Gq nebo G11-16 [28].

Na obrázku 4 je grafické strukturní znázornění inaktivního G-proteinu vázajícího molekulu GDP a aktivního G-proteinu vázajícího molekulu GTP.



Obrázek 4. Grafické znázornění heterotrimerního G-proteinu, který je ve své neaktivní formě vázán na molekulu GDP a ve svém aktivovaném stavu (při kterém α podjednotka disociuje od dimerní $\beta\gamma$ podjednotky) na molekulu GTP. Žlutě je na obrázku označena α podjednotka, modře β podjednotka a zeleně γ podjednotka. Upraveno dle [29].

Další skupinou GTP vázajících proteinů jsou monomerní G-proteiny (označované také jako „malé“ G-proteiny). Tyto proteiny jsou také schopny přenosu signálu z aktivovaného receptoru do nitra buňky (ovlivňují tím například buněčný vezikulární transport). První malý G-protein byl objeven ve viru, který u potkanů způsobuje sarkomové nádory, a proto nese označení Ras (z angl. *rat* sarkoma). Funkcí molekuly Ras je regulace buněčné diference a proliferace, která je zajišťována přenosem příslušného signálu z receptorových kináz do jádra. Pokud se Ras nachází ve virulentní formě, tato funkce je pozměněná a může tak docházet k nekontrolovatelné buněčné proliferaci, která může vést k tvorbě nádorů [30].

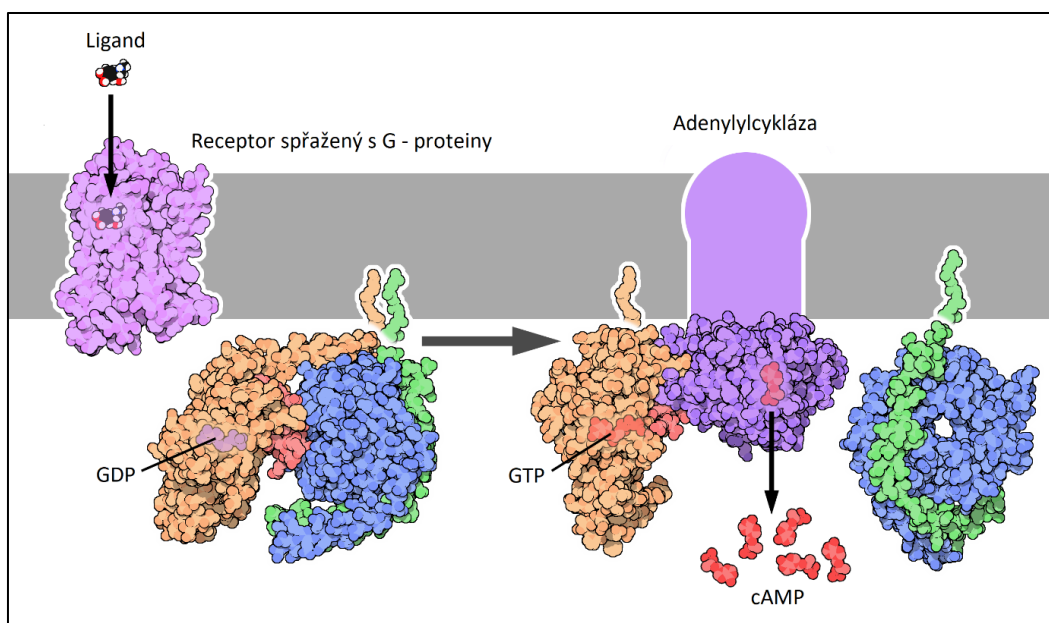
2.2.4. Adenylycyklázový signální systém

Adenylycykláza je efektorový enzym, který se podílí na koordinaci mnoha signálních drah. U savců bylo popsáno nejméně devět izoform tohoto enzymu

označených AC1-AC9. Všechny tyto izoformy mají vysokou sekvenční podobnost v primární struktuře svého katalytického místa a stejnou třírozměrnou strukturu. Každá podjednotka se skládá ze dvou hydrofobních domén se šesti transmembránovými částmi a ze dvou cytoplasmatických domén, které jsou zodpovědné za odlišnou funkci jednotlivých podjednotek adenylcyklázy. Právě tyto odlišné vlastnosti jednotlivých izoform adenylcyklázy a jejich rozdílná distribuce ve tkáních (různé izoformy se nacházejí například v mozkové, srdeční a plicní tkáni nebo dokonce v kosterním svalstvu, děloze a spermiích) či buněčných typech zapříčiňují jejich odlišnou funkci v signálních drahách zprostředkovaných receptory spřaženými s G-proteiny [31,32].

Odlišné funkce adenylcyklázy jsou zapříčiněny také tím, že je aktivita tohoto enzymu regulována celou řadou látek různých signálních kaskád. Hlavní funkcí tohoto enzymu je, na základě této výše zmíněné regulace, katalýza syntézy příslušného množství cAMP, který jako druhý posel dále vystupuje jako regulátor mnoha fyziologických procesů, jako je např. metabolismus glykogenu, srdeční výdej nebo dlouhodobá potenciace [33].

Na Obrázku 5 je graficky znázorněno schéma signalizace prostřednictvím receptoru spřaženého s G-proteiny následované aktivací adenylcyklázy a syntézou cAMP.

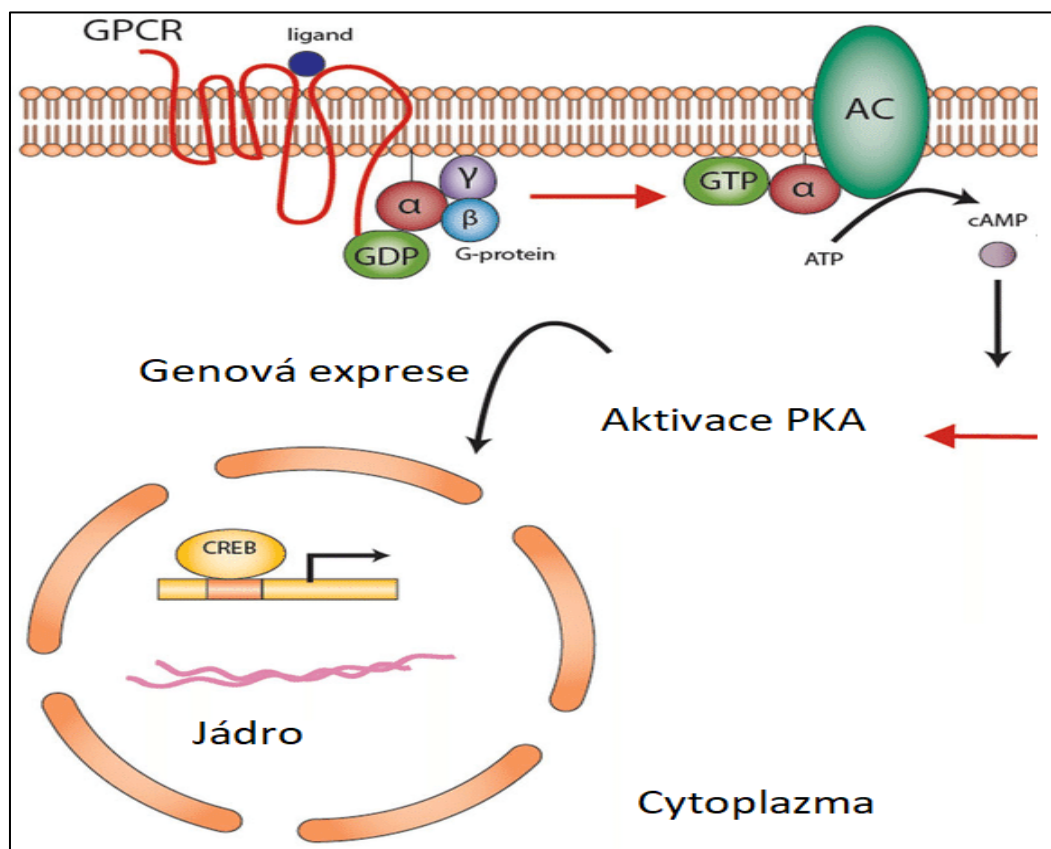


Obrázek 5. Schéma signalizace prostřednictvím receptoru spřaženého s G-proteiny, při kterém dochází k aktivaci adenylylcyklázy. Po navázání ligandu na receptor (označený růžovou barvou) dochází k fosforylaci GDP na GTP a disociaci α podjednotky původně inaktivovaného G-proteinu (který tvoří žlutě značená α , modře značená β a zeleně značená γ podjednotka). Takto aktivovaná α podjednotka poté aktivuje enzym adenylylcyklázu (znázorněna fialovou barvou), který katalyzuje tvorbu cyklického adenosinmonofosfátu (na obrázku zobrazen červeně). Upraveno dle [29].

Po syntéze cAMP stimulované aktivací adenylylcyklázy prostřednictvím receptorů spřažených s G-proteiny (konkrétně se jedná hlavně o aktivaci $G_{\alpha s}$ podjednotkou) může docházet k vazbě cAMP, a tím i k aktivaci nedílné komponenty adenylylcyklázového signálního systému - proteinkinázy A (PKA). Proteinkináza A patří mezi serin/threonin kinázy a její funkcí je katalýza fosforylace právě serinových a threoninových skupin cílových proteinů. Enzym proteinkináza A je tetramer a skládá se z dimerní regulační podjednotky a dvou monomerních katalytických podjednotek. Po její aktivaci pomocí cAMP dochází k disociaci, a tím i k aktivaci katalytických podjednotek, které katalyzují výše zmíněné fosforylační reakce efektorových proteinů. Dále mohou aktivované katalytické podjednotky PKA vstupovat do jádra buňky a katalyzovat zde fosforylaci nejrůznějších transkripčních faktorů (např. CREB), proto hraje proteinkináza A velkou roli v buněčné diferenciaci a proliferaci [34,35].

Právě ovlivnění transkripčních faktorů a následná regulace genové exprese může být jedním z mechanismů vzniku drogové závislosti [36].

Schéma adenylycyklázového signálního systému i s přesahem do oblasti ovlivnění genové exprese je uvedeno na Obrázku 6.



Obrázek 6. Schema adenylycyklázového signálního systému. Po navázání liandu dochází konformační změnou receptoru spřaženého s G-proteiny (GPCR) k dicosiaci GTP vázající G_{α} podjednotky, která aktivuje enzym adenylycyklázu, jenž katalyzuje syntézu cAMP. Cyklický AMP poté aktivuje katalytické podjednotky proteinkinázy A, která může vstupovat do jádra a fosforylací transkripčních faktorů (např. CREB) docílit změny v genové expresi. Upraveno dle [37].

2.3. Morfinová závislost a abstinence

2.3.1. Morfinová závislost

Závislost na opiátech je chronicky recidivující porucha, pro kterou je charakteristické nutkavé užívání drogy, neschopnost omezit její příjem a intenzivní toužení po droze, které může být zapříčiněno pouhou přítomností lidí, míst nebo předmětů dříve spojených s užíváním dané drogy. Dodnes není plně znám přesný

mechanismus přechodu od náhodného užívání drog k závislosti, ale znalosti těchto neurálních mechanismů jsou neustále prohlubovány [38].

Morfinovou závislostí jsou mimo jiné ovlivněny také signální dráhy spojené s odměnou a neurálními systémy ovlivňujícími stres nebo formování návyků. Do složitých procesů morfinové závislosti je zapojeno také velké množství neurotransmiterových systémů, z nichž je patrně nejvýznamnější systém dopaminergní (dopaminergní neurony mezolimbického systému ve ventrální tegmentální oblasti s axonálním přesahem do nucleus accumbens a prefrontální kůry). Velkou roli zde také hraje vlastní endogenní opioidní systém [10,39].

Pro objasnění mechanismu morfinové závislosti bylo navrženo několik možných hypotéz, v čele s tzv. cAMP hypotézou. Ta říká, že k jevům spojeným s tolerancí a závislostí dochází už na buněčné úrovni a předpokládá, že k těmto jevům přispívají adaptace v signálních drahách souvisejících s regulací intracelulárního cAMP. Výzkum této hypotézy ukázal, že chronická expozice morfinu může způsobovat indukci enzymu adenylylcyklázy a proteinkinázy A, k jejichž náhlému poklesu dojde při vysazení drogy. Mezi další možné mechanismy morfinové závislosti patří například změny v iontové vodivosti, kdy aktivací opioidních receptorů dochází k ovlivnění permeability buněčné membrány vůči draselným iontům a zároveň dochází k aktivaci proteinkinázy C k útlumu opioidních receptorů a k ovlivnění vodivosti iontů [39]. Jiná studie uvádí, že podávání morfinu způsobí prudkou inhibici adenylylcyklázy, což vede k poklesu intracelulární hladiny cAMP [40].

2.3.2. Morfinová abstinence

Drogová abstinence je nedílnou součástí většiny typů závislostí, včetně závislosti na opioidech. Právě morfinová abstinence je považována za klasické měřítko závislosti na opiátech. Syndrom abstinence příznaků závislosti na opiátech je charakterizován mnoha behaviorálními a fyziologickými příznaky, jako jsou behaviorální aktivace, průjem, třes nebo motivační dysfunkce, ke které může v centrální nervové soustavě docházet na mnohých místech [41]. Na molekulární úrovni bylo prokázáno, že morfinová abstinence ovlivňuje mimo jiné i signální dráhu cAMP a látky a systémy s ní spojované. Studie uvádí spojitost morfinové abstinence a cAMP kaskády, kdy

dochází k up-regulaci v rámci této signální dráhy a ke zvýšené expresi adenylylcyklázy, proteinkinázy A a CREB (angl. cAMP-response element binding protein) [42].

Jiný výzkum rozvíjí studie o objevujících se důkazech superaktivace cAMP, která souvisí se zvýšenou vazbou receptor-Gas, disociací G-proteinů a s Gas-adenylylcyklázovou interakcí. Zatím není jasné, jak souvisí disociace G-proteinů s morfinovou abstinencí, ale další studie potvrzují, že signalizace prostřednictvím G-proteinů může být regulována tzv. receptor nezávislými aktivátory, např. AGS3 (z angl. Activator of G-protein Signaling 3) [43].

Morfinovou abstinencí do značné míry ovlivňují i opioidní receptory a samotné části mozku s nimi spojené. Několik studií například uvádí spojitost části mozku zvanou locus coeruleus s rozvojem morfinové závislosti a somatickými symptomy morfinové abstinence. Tyto studie se rovněž zabývaly i výše zmíněnou up-regulací adenylylcyklázové (a cAMP) signální dráhy, v rámci které při chronické expozici morfinu dochází mimo adenylylcyklázu a proteinkinázu A i k ovlivnění hladin $G1\alpha$ či $G\alpha$ [44]. Právě tyto změny se zdají být velice důležité pro expresi nejrůznějších behaviorálních symptomů pozorovaných během abstinenciho syndromu. Opioidní receptory (μ a δ) mohou v rámci morfinové závislosti a abstinence podléhat tzv. desenzitizaci, definované jako snížená schopnost agonisty inhibovat adenylylcyklázu, případně i změně počtu receptorů [44,45].

I přes všechny výše uvedené neblahé účinky morfinové závislosti a abstinence se podle některých studií jedná o reversibilní procesy. Například nedávná studie prováděná na jedincích ovlivňovaných morfinem a poté ponechaných bez drogy (konkrétně se jednalo o proteomickou studii, která byla zaměřena na podjednotky G-proteinů a jednotlivé izofomy adenylylcyklázy v mozku potkana dvacet dní po vysazení morfinu) prokazují vysokou schopnost organismu čelit změnám indukovaným podáváním morfinu s cílem vrátit se do fyziologicky normálního stavu po úplném vymizení podávané drogy [46].

2.4. Metoda Western blot

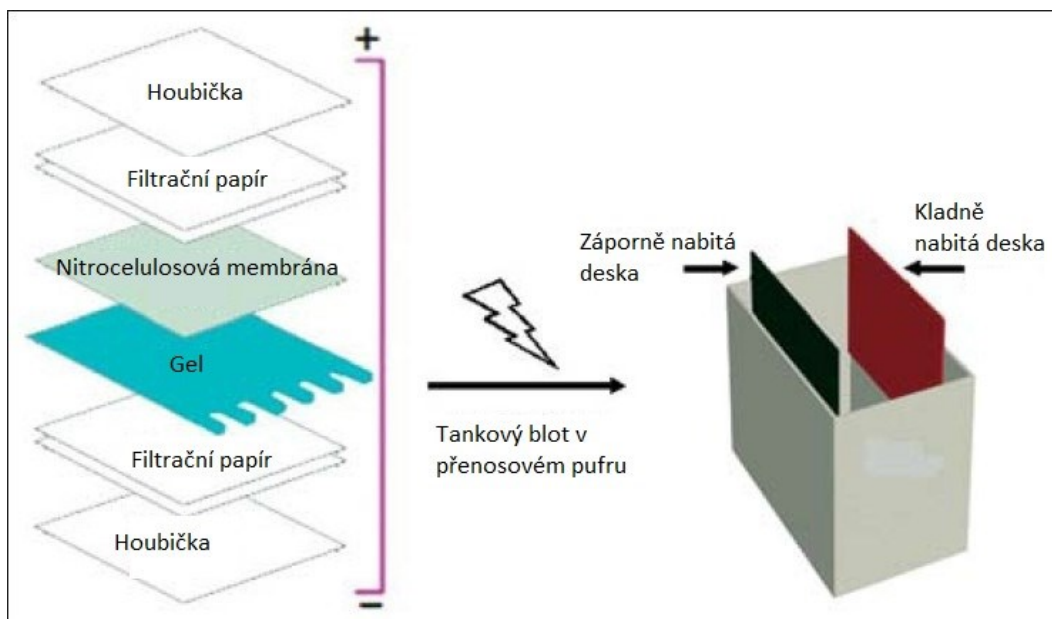
Western blot je metoda hojně využívaná v biomedicínském výzkumu sloužící k separaci a identifikaci nejrozličnějších proteinových struktur v biologických vzorcích [47]. Svě „geografické“ pojmenování získal Western blot, který byl poprvé použit v roce 1979 H. Towbinem, analogicky podle metody Southern blot, kterou vyvinul Edwin Southern v roce 1975 (southern = angl. jižní, odtud western = angl. západní) [48,49]. Kromě kvalitativní a semi-kvantitativní analýzy specifických proteinů ve vzorku je možné tuto metodu využít např. při zkoumání post-translačních modifikací, kinázových aktivit nebo protein-proteinových interakcí [50].

Principem této metody je pohyb záporně nabitých molekul proteinů v elektrickém poli, které umožňuje jejich rozdělení následované elektropřenosem separovaných proteinů na nitrocelulosovou membránu, kde jsou poté imunochemicky detekovány pomocí specifických protilátek [51].

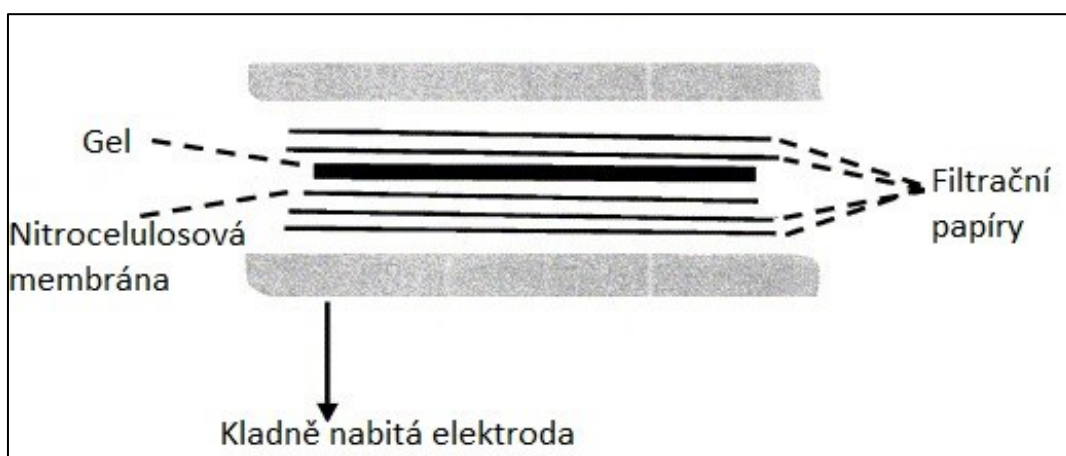
Prvním krokem této analýzy je separace proteinů v elektrickém poli na základě jejich molekulové hmotnosti, obecně nazývaná elektroforéza. Mezi nejpoužívanější druhy elektroforézy patří SDS-PAGE elektroforéza (angl. Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), která probíhá v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti detergentu dodecylsíranu sodného. Detergent obalí molekuly proteinů a udělí jim uniformní záporný náboj. Molekuly se tudíž v gelu separují pouze na základě odlišné molekulové hmotnosti [52].

Kromě velikosti se proteiny mohou dělit mimo jiné i na základě odlišného izoelektrického bodu (2D-elektroforéza), nebo v nenedenaturujícím prostředí při použití nativní elektroforézy, při které se proteiny separují jak díky odlišné velikosti, tak i odlišnému náboji [53,54].

Po separaci proteinů v gelu následuje jejich přenos na nitrocelulosovou membránu, kde je poté možné imobilizované proteiny detekovat. Tento elektropřenos může být proveden v tankovém nebo polosuchém uspořádání (viz Obrázky 7 a 8).



Obrázek 7. Tanková varianta metody Western blot. Gel a membrána jsou vloženy mezi filtrační papíry následované porézními houbičkami. Vzniklý „sandwich“ je poté v přítomnosti přenosového pufri umístěn mezi elektrody. Upraveno dle [47]



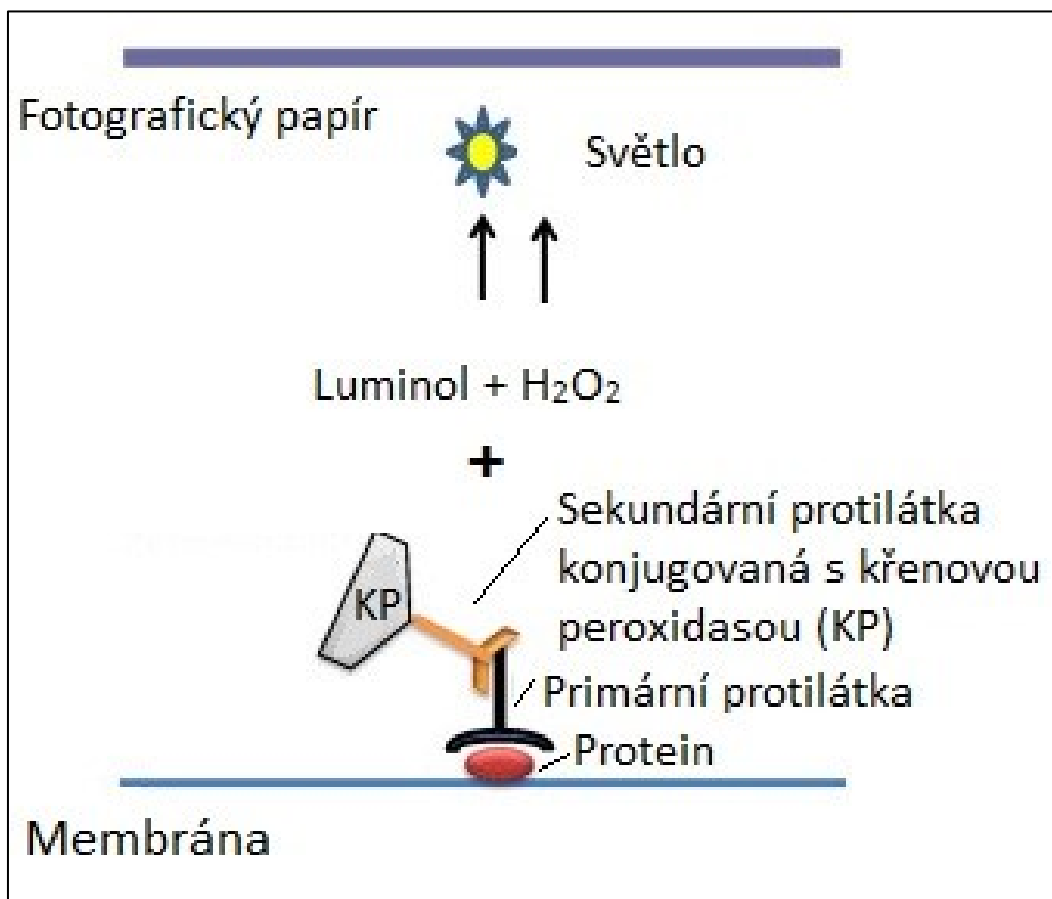
Obrázek 8. Polosuchá varianta metody Western blot. Gel je v těsném kontaktu s membránou z obou stran obklopen filtračními papíry nasáklými přenosovým pufrem a následně vložen do aparatury mezi elektrody. Upraveno dle [49].

Obě uspořádání fungují na principu přenosu proteinů z gelu na membránu, který je umožněn přítomností elektrického pole vytvořeného mezi dvěma elektrodami a v němž se proteiny pohybují díky svému zápornému náboji [55].

Po ukončení elektropřenosu se membrána či gel zpravidla barví specifickými barvivy interagujícími s proteiny, čímž můžeme získat první informaci o průběhu prováděné analýzy proteinů [56].

Následuje blokáce membrány ve vhodném pufru, aby bylo zabráněno pozdějšímu nespecifickému navázání protilátek na membránu. Po blokování je membrána inkubována v roztoku specifických primárních protilátek proti analyzovanému proteinu případně proti jeho specifické části. Poté je membrána inkubována v roztoku sekundárních protilátek, které se specificky vážou na primární protilátky a zároveň na sobě nesou enzym, díky kterému je v následujícím kroku této imunochemické detekce celý komplex možno vizualizovat [50].

Schéma imunodetekce je znázorněno na Obrázku 9.

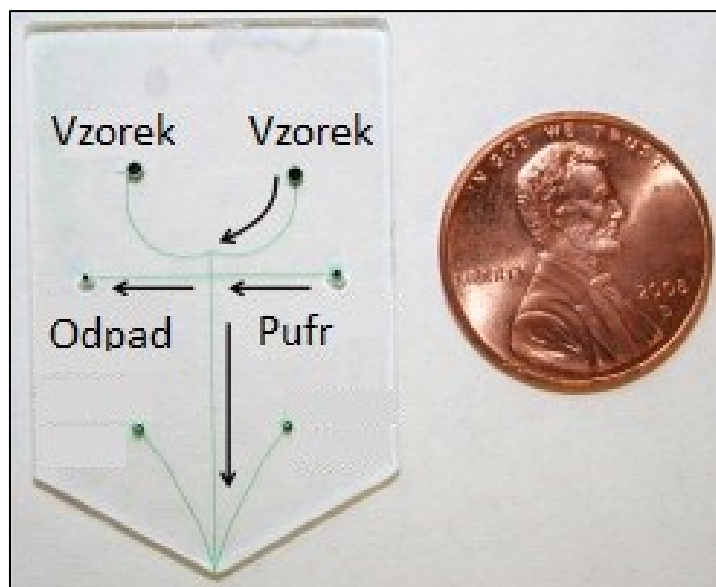


Obrázek 9. Grafické znázornění imunodetekce. Na protein se specificky váže primární protilátka, na kterou se poté váže sekundární protilátka s detekovatelnou sondou v podobě enzymu, který poté katalyzuje reakci se substrátem za vzniku záření, které detekujeme na fotografickém papíře. Upraveno dle [61].

Následující krok spočívá v reakci enzymu navázaného na sekundární protilátce se specifickým substrátem; touto reakcí vzniká buď barevný produkt, který kvantitativně odpovídá množství analyzovaného proteinu, nebo nestabilní meziprodukt, který svou přeměnou na stabilní produkt emituje detekovatelné záření. Pro vizualizaci se nejčastěji používá enzym luminol, který reaguje s peroxidem vodíku za vzniku modrého světla, které může být detekováno na fotografickém papíře [57].

Ačkoliv je Western blot dostupná a relativně snadno proveditelná metoda, prochází neustálým vývojem a modernizací. Příkladem může být její mikročipové provedení, které je znázorněno na Obrázku 10. Alternativou k separaci proteinů pomocí gelové elektroforézy může být například použití kapilární elektroforézy nebo nejrůznějších chromatografických metod [58,59].

K dalším metodám analýzy proteinů, využívajícím imunodetekce, můžeme zařadit např. metodu ELISA (angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) či RIA (RadioImmunoAssay) [60].



Obrázek 10. Mikročipové provedení metody Western blot. SDS-proteinové komplexy jsou na mikročipu separovány a poté jsou po průchodu čipem zachyceny na mobilní membráně. Upraveno dle [58].

3. Experimentální část

3.1. Materiál

3.1.1. Reagencie

TMES pufr (20 mM Tris, 3 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1mM EDTA, 250 mM sacharóza, H_2O , pH 7,4), inhibitor proteáz Complete (50× konc.), PhosSTOP (10× konc.), reagent A (8 g Na_2CO_3 , 1,6 g Na tartrát, 100 mL H_2O , pH 11,25), reagent B (4 g kyseliny bicinchoninové, 100 mL H_2O (MiliQ)), reagent C (0,4 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mL H_2O), BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), pufr 1 (1,5 M Tris, H_2O , pH 8,8), pufr 2 (0,5 M Tris, H_2O , pH 6,8), 30% akrylamid, 0,8% N,N'-methylenbisakrylamid, 10% APS, 10% SDS, tetramethylethylendiamin, předznačený standard proteinů o známých molekulových hmotnostech (Sigma), elektrodový pufr (0,25 M Tris, 2M glycin, 35 mM SDS; 10×konc.), Laemmliho pufr (30% glycerol, 0,25 M Tris (pH 6,8), 8% SDS, 8% 2-merkapt ethanol, 0,02% bromfenolová modř; 4×konc.), TBS pufr (150 mM NaCl, 10 mM Tris, H_2O , pH 8,0; 10×konc.), blokovací pufr (10 mL 10×konc. TBS, 5 g sušeného mléka, 100 μL Tween 20, 90 mL H_2O), ředící pufr (10mL 10×konc. TBS, 1 g sušeného mléka, 100 μL Tween 20, 90 mL H_2O), promývací pufr (100 mL 10×konc. TBS, 3 mL Tween 20, 900 mL H_2O), přenosový pufr (25mM Tris, 190 mM glycin, 20% methanol, H_2O), primární protilátky proti G_{α} podjednotce (2000×řed.), $G_{i3\alpha}$ podjednotce (200000×řed.), $G_{1/2}$ podjednotce (10000×řed.), dále myší monoklonální IgG protilátka proti PKA $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotkám (Santa Cruz; sc 365615, 1000×řed.) a králičí polyklonální IgG protilátka proti I podjednotce adenylylcyklázy (Santa Cruz; sc 586, 1000×řed.), sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou proti králičí (40000×řed.) a myší (20000×řed.) IgG (obojí Amersham), substrát SuperSignalTM West Dura (Thermo Scientific). Chemikálie na přípravu roztoků a pufrů byly zakoupeny u společností Sigma a Serva.

3.1.2. Přístrojové vybavení a materiál

Potter-Elvehjemův sklo-teflonový homogenizátor, centrifuga (Hettich UNIVERSAL R30), vortex (VELP scientifica), termoblok (TECHNE Dri-Block®), soupravy pro elektroforézu Mini-Protean II (BIO-RAD), soupravy pro western blot (BIO-RAD), nitrocelulózová membrána, třepačka (Stuart Scientific), fotocitlivé filmy CP-BU NEW (AGFA), vyvolávací přístroj OPTIMAX (Fomei).

3.1.3. Vzorky

Pro experimentální část práce byly použity vzorky jednotlivých částí mozku (hipokampus, mozeček, kůra mozková a striatum) tří skupin potkanů kmene Wistar, z nichž každá skupina obsahovala morfinem ovlivněné jedince, kterým byl po dobu 10 dnů podáván morfin sulfát (i.p.) ve stupňovaných dávkách (první 2 dny dávka činila 10 mg/kg/den, následně 2 dny 15 mg/kg/den, 2 dny 20 mg/kg/den a 2 dny 30 mg/kg/den, 9. den byla potkanům podána dávka 40 mg/kg/den a 10. den dávka 50 mg/kg/den), jedince takto ovlivněné morfinem po vysazení jeden a tři měsíce a odpovídající kontrolní neovlivněné jedince.

3.2. Pracovní postup

Vzorky částí mozku jednotlivých potkanů byly zváženy na analytických vahách a poté za stálého chlazení ledem homogenizovány v přítomnosti odpovídajícího množství vychlazeného TMES pufru, inhibitoru proteáz Complete a fosfatáz PhosSTOP (pro přípravu 10% homogenizátu bylo na 1 g mozkové tkáně použito 7,8 mL TMES pufru, 200 µL 50x konc. Complete a 1000 µL 10×konc. PhosSTOP) pomocí sklo-teflonového homogenizátoru při 1200 otáčkách/min po dobu 2 minut. Vzniklý homogenizát byl poté centrifugován při 2100 otáčkách/min po dobu 10 min při 4 °C. Po centrifugaci byl z homogenizátu opatrně odebrán supernatant, který byl následně rozdělen na alikvoty o objemu 100 µL, zmrazen tekutým dusíkem a uchován při teplotě – 80 °C. Následně byla ve vzorcích metodou BCA stanovena celková koncentrace proteinů. Ze standardního roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) o

koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ byla na 96jamkové mikrotitrační destičce připravena kalibrační řada znázorněná v Tabulce 1, kterou následovaly tripletly analyzovaných vzorků (z alikvotu vzorků bylo pro stanovení celkové koncentrace proteinů odebráno malé množství vzorku, jež bylo rozděleno do tripletu, 100x zředěno a poté v objemu 100 μL pipetováno do příslušných jamek destičky).

Tabulka 1. Schéma přípravy kalibrační řady roztoku BSA o známé koncentraci pro stanovení celkové koncentrace proteinů v analyzovaných vzorcích

Jamka č.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Množství BSA [μg]	0	0,2	0,5	1,0	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
Pipetovaný objem BSA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) [μL]	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
Pipetovaný objem BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) [μL]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
Pipetovaný objem H_2O [μL]	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

Poté bylo do všech jamek přidáno vždy 100 μL roztoku obsahujícího reagent A, reagent B a reagent C v poměru 26:25:1. Takto připravené roztoky byly na thermoblocku inkubovány 30 minut při 60 $^{\circ}\text{C}$ a poté byla pomocí spektrofotometru změřena jejich absorbance při 562 nm. Následně byla z rovnice kalibrační křivky programem GEN 5 stanovena celková koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích, po které následovala příprava roztoků pro elektroforézu o finální koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tak, že příslušné množství vzorku bylo rozpuštěno v příslušném množství destilované vody a 4×koncentrovaného Laemmliho pufru. Takto připravený roztok vzorku byl

poté inkubován po dobu 2 minut při 90 °C. Prvním krokem elektroforézy byla příprava 10% rozdělovacího gelu. Na přípravu dvou gelů bylo zapotřebí 8 mL H₂O, 5 mL pufru 1, 6,7 mL 30% Ac-Bis, 90 μL 10% APS, 200 μL 10% SDS a 8 μL tetramethylethylendiaminu. Vzniklá směs byla nalita mezi skla soupravy na elektroforézu do výšky zhruba 5,5 cm a poté převrstvena směsí butanolu s destilovanou vodou v poměru 3:1 a ponechána 1 hodinu tuhnout při laboratorní teplotě. Poté byla vrstva butanolu a vody vylita, gel byl omyt vodou a vysušen filtračním papírem. Poté byla na rozdělovací gel nalita směs tvořící 4% zaostřovací gel (směs pro 4 gely obsahovala 6 mL vody, 2,5 mL pufru 2, 1,3 mL 30% Ac-Bis, 90 μL 10% APS, 100 μL 10% SDS a 8 μL tetramethylethylendiaminu) ihned následovaná vložením hřebínku pro tvorbu jamek. Směs byla poté půl hodiny ponechána tuhnout při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí gelů byla skla přemístěna do soupravy pro elektroforézu, která obsahovala 10×zředěný elektrodový pufr do vytvořených jamek byly pipetovány jednotlivé vzorky (vzorky pro analýzu podjednotek G-proteinů a PKA byly pipetovány v objemu 10 μL na jamku a vzorky pro analýzu AC I v objemu 20 μL na jamku) a standard (v objemu 3 μL). Elektroforéza poté probíhala po dobu 1 hodiny při konstantním napětí 200 V. Po ukončení elektroforézy byly gely vyňaty ze soupravy a dle Obrázku 7 (str. 16) vloženy spolu s popsanou nitrocelulózovou membránou do soupravy pro tankový Western blot, která obsahovala tuhé filtrační papíry a porézní houbičky (důkladně zbavené vzduchových bublin) v přenosovém pufru. Následný elektropřenos probíhal po dobu 1 hodiny při konstantním napětí 100 V. Po přenosu proteinů byla nitrocelulózová membrána omyta vodou, obarvena Ponceau S červení a oskenována, načez byla po dobu 45 minut inkubována v blokovacím pufru (na jednu membránu připadá 1 mL 10×konc. TBS, 0,5 g sušeného mléka, 10 μL Tween 20 a 9 mL H₂O), poté promyta destilovanou vodou a následně inkubována (membrány se vzorky pro analýzu podjednotek G-proteinů a PKA byly inkubovány přes noc a membrány se vzorky pro analýzu AC I přes dvě noci) při 4 °C v ředicím pufru s příslušnou primární protilátkou (ředicí pufr potřebný pro 1 membránu obsahuje 1 mL 10×konc. TBS, 0,1 g sušeného mléka, 10 μL Tween 20 a 9 mL H₂O). Po inkubaci byla membrána omyta vodou a poté 3×10 minut promývána promývacím roztokem. Dále byla membrána po dobu 1 hodiny inkubována v ředicím pufru v přítomnosti příslušné sekundární protilátky. Následovalo opětovné omytí membrány destilovanou vodou a 3×10 minut promytí promývacím pufrem. Na omytou membránu byl poté nanesen substrát a po jednodominutové inkubaci byla membrána přenesena do fotografické

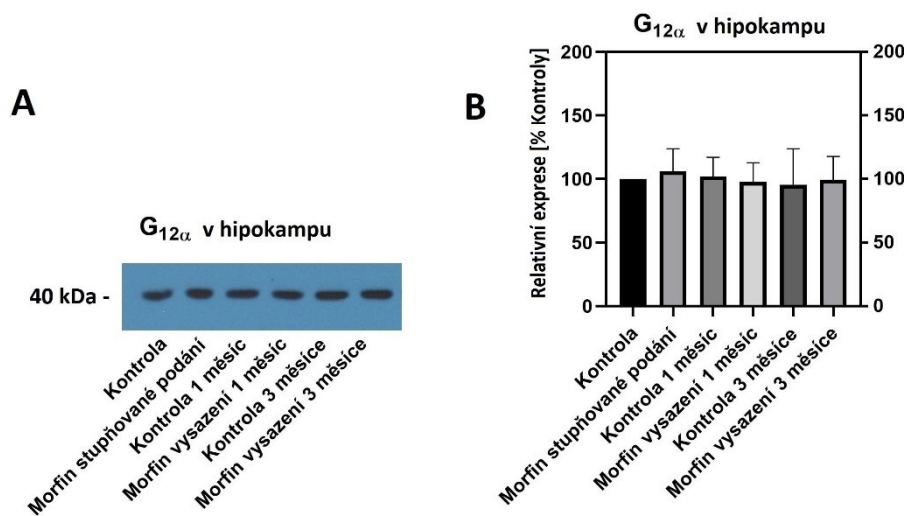
kazety. V temné komoře následovala expozice membrány na fotografický papír, který byl poté vyvolán pomocí vyvolávacího přístroje. Fotografický papír byl se záznamem exponované protilátky navázané na analyzovaný vzorek oskenován a vyhodnocen pomocí programů ImageJ a Image Lab (data získaná ze skenů fotografických filmů byla normalizována pomocí dat ze skenů membrán po barvení Ponceau S červení). Výsledná data byla graficky a statisticky (pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu ANOVA) zpracována pomocí programu GraphPad Prism. Měření v rámci všech tří skupin vzorků byla prováděna celkem třikrát.

4. Výsledky a diskuze

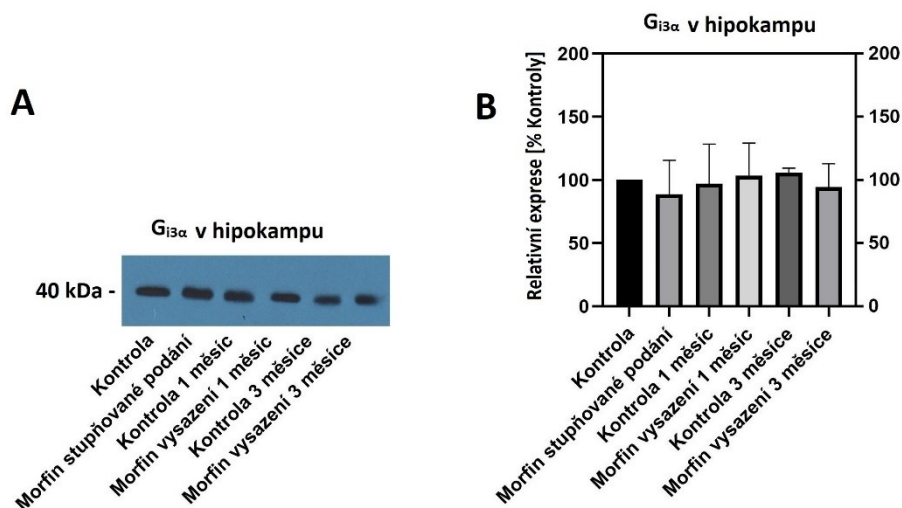
4.1. Výsledky

Výsledky studia vlivu morfinové abstinence na vybrané komponenty adenylylcyklázového signálního systému v jednotlivých částech mozku potkana jsou uvedeny v Obrázcích 11 – 30. Data získaná analýzou pomocí metody Western blot byla vztažena na arbitrární hodnotu optické denzity Kontroly a do grafů zanesena v procentech Kontroly.

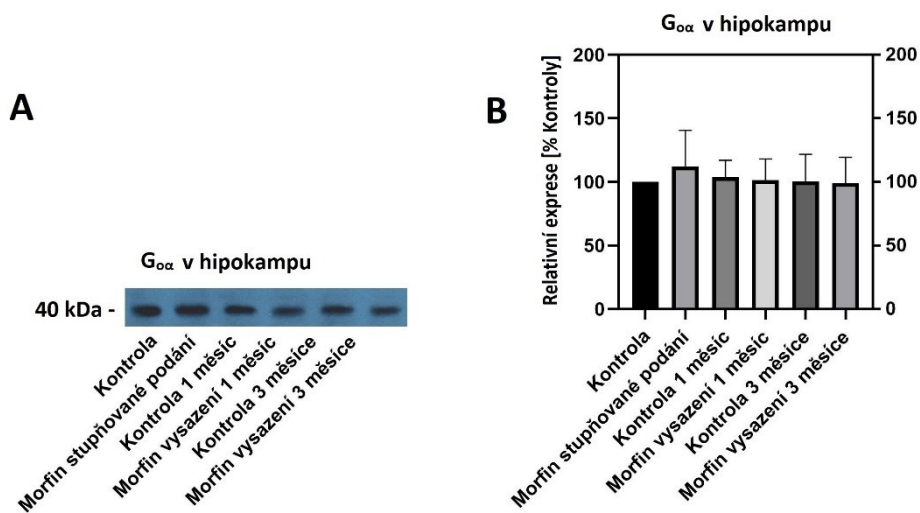
Výsledky analýzy hipokampální části mozku potkana jsou uvedeny v Obrázcích 11 – 15 (str. 24 – 26) a statisticky vyhodnoceny v Tabulce 2 (str. 27).



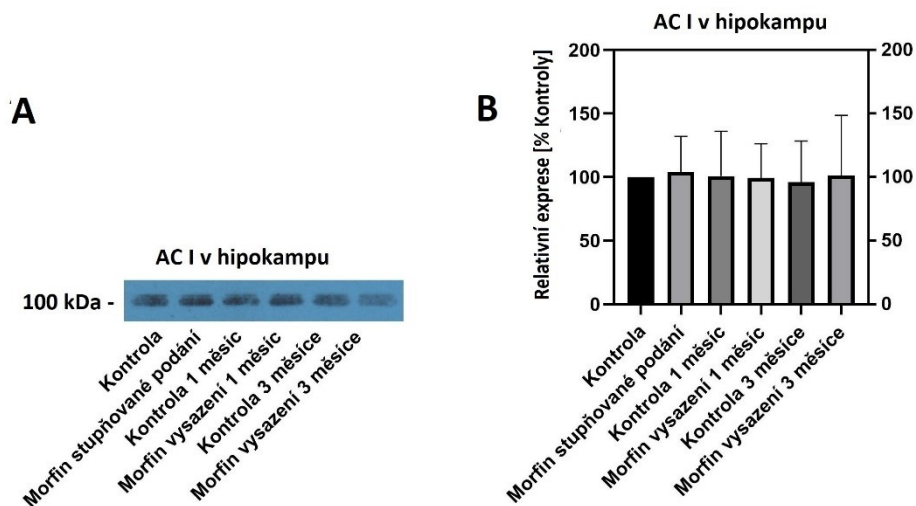
Obrázek 11. V části A je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{12\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v hipokampální části mozku potkana. V části B je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



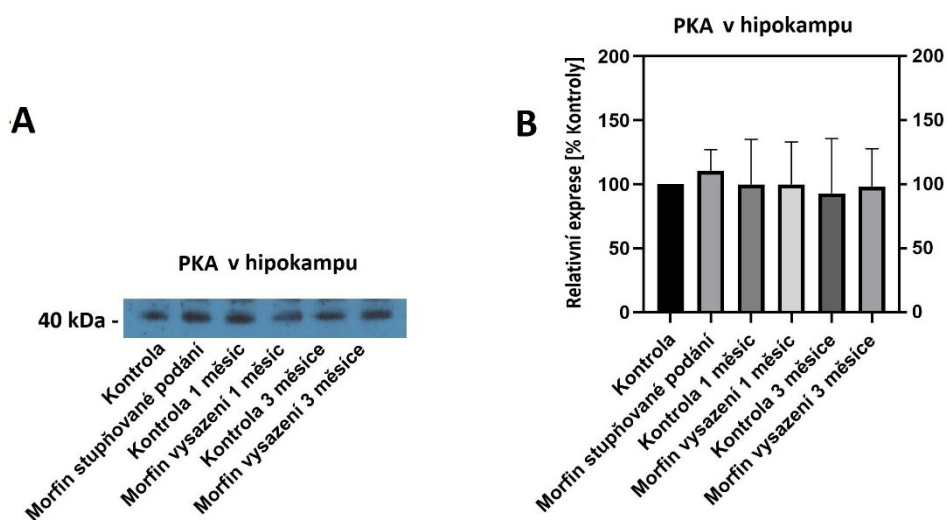
Obrázek 12. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{\beta 3\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v hipokampální části mozku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaheny na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 13. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{\alpha\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v hipokampální části mozku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaheny na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 14. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi I izoformy adenylylcyklázy (o molekulové hmotnosti přibližně 100 kDa) ve skupinách Kontrola, Morfinu stupňovaného podání, Kontrola 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v hipokampální části mozku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaheny na hodnotu Kontrola (100 %).



Obrázek 15. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontrola, Morfinu stupňovaného podání, Kontrola 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v hipokampální části mozku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaheny na hodnotu Kontrola (100 %).

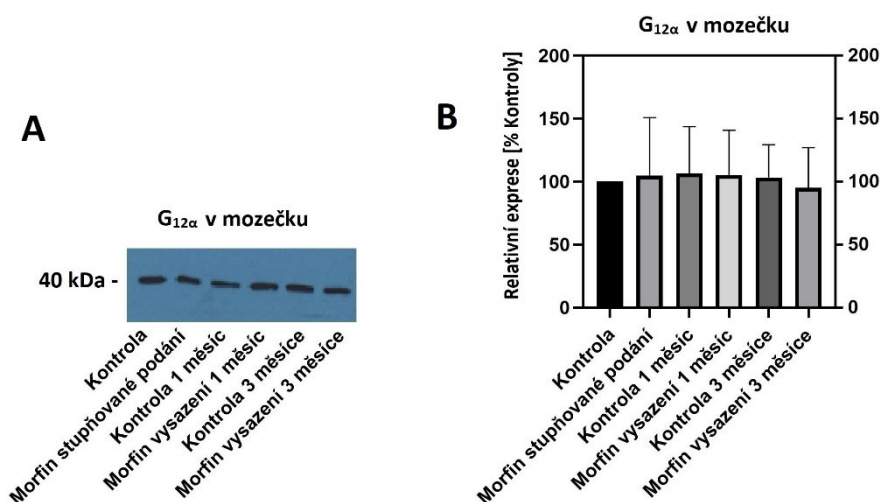
Z Obrázků 11 – 15 (str. 24 - 26) je patrné nevýrazné kolísání hodnot % Kontroly jedinců ovlivněných morfinem oproti odpovídajícím kontrolám. Stupňované podání vykazovalo vesměs vyšší hodnoty oproti Kontrole s výjimkou vlivu morfinové abstinence na $G_{i3\alpha}$ podjednotku (Obrázek 12, str. 25).

V Tabulce 2 je uvedeno statistické zpracování výsledků analýzy vzorků hipokampálních částí mozku potkanů metodou ANOVA s použitím hodnoty hladiny významnosti α 0,05. Ani v jedné porovnávané skupině analyzovaných komponent v této části mozku není statisticky významný rozdíl. Patrnější, avšak statisticky nevýznamný rozdíl je pouze mezi $G_{o\alpha}$ podjednotkou Kontroly a Stupňovaného podání morfinu.

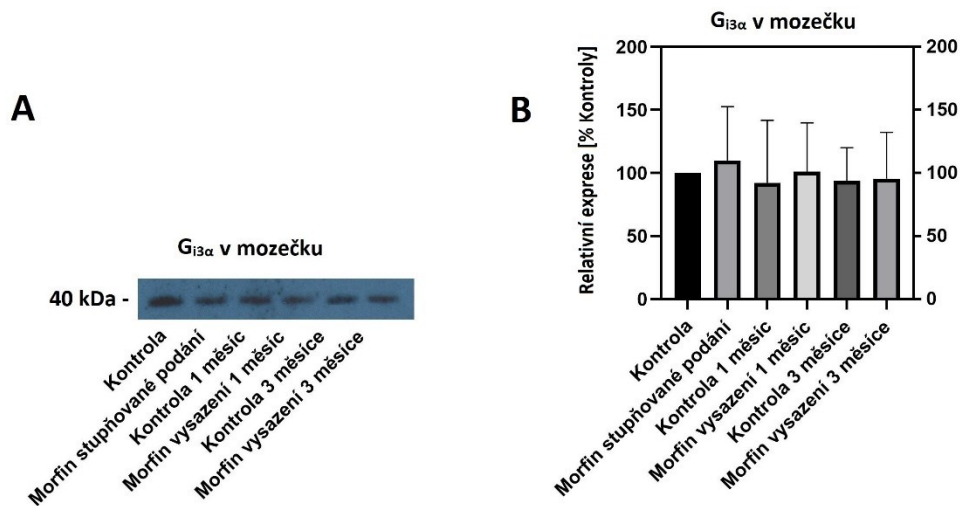
Tabulka 2. Statistické zpracování výsledků analýzy exprese níže uvedených komponent adenylycyklázového signálního systému v hipokampu potkana. V tabulce jsou uvedeny hodnoty hladiny významnosti P mezi jednotlivými skupinami. Hodnoty P nižší než hodnota hladiny významnosti 0,05 jsou považovány za statisticky významné.

Hladina významnosti P					
Analyzované komponenty / Porovnávané skupiny	$G_{12\alpha}$	$G_{i3\alpha}$	$G_{o\alpha}$	AC I	PKA $\alpha/\beta/\gamma$
Kontrola a Morfin stupňované podání	0,8599	0,7462	0,4600	0,9905	0,7829
Kontrola a vysazení Morfinu (1 měsíc)	0,9648	0,9621	0,9943	0,9998	>0,9999
Kontrola a vysazení Morfinu (3 měsíce)	0,9692	0,9253	0,9984	0,9908	0,9891

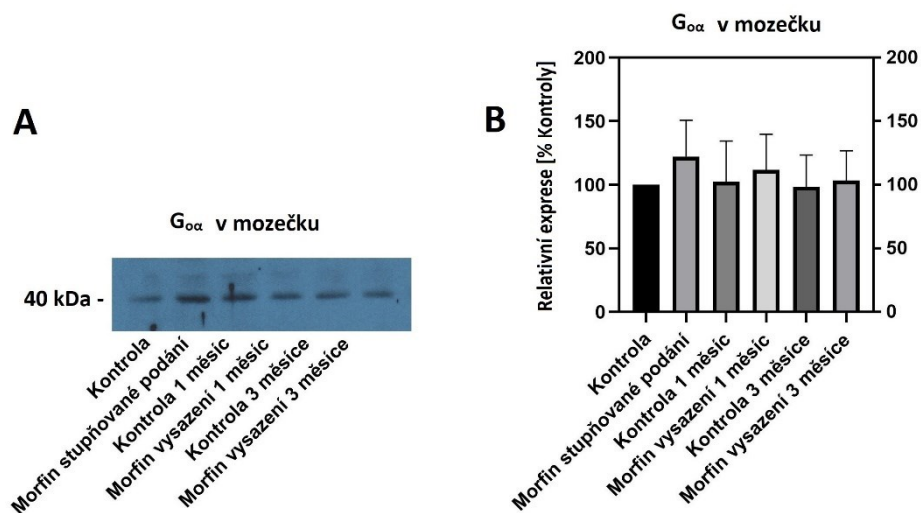
Výsledky vlivu morfinové abstinence na expresi komponent adenylycyklázového signálního systému v mozečku jsou obsaženy v Obrázcích 16 – 20 (str. 28 – 30).



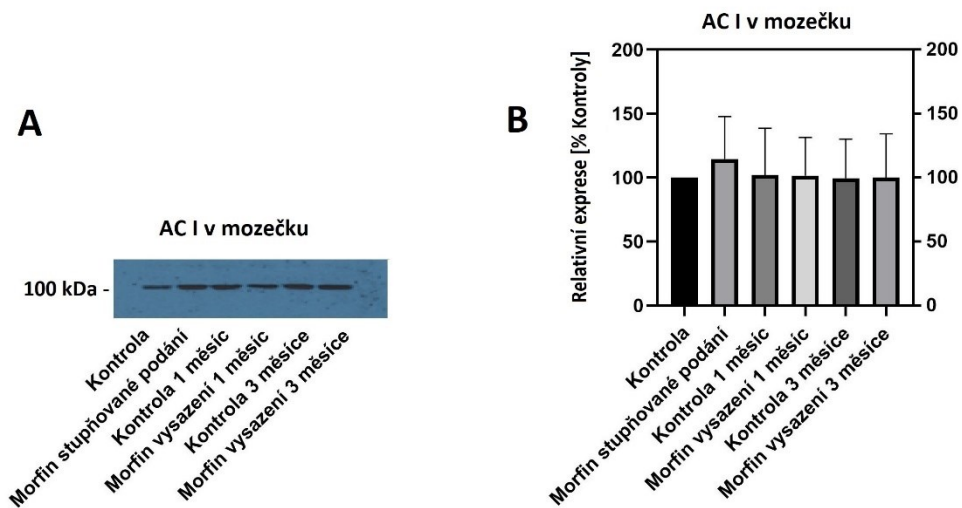
Obrázek 16. V části **A** je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{12\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontrola, Morfinu stupňovaného podání, Kontrola 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v mozečku potkana. V části **B** je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontrola (100 %).



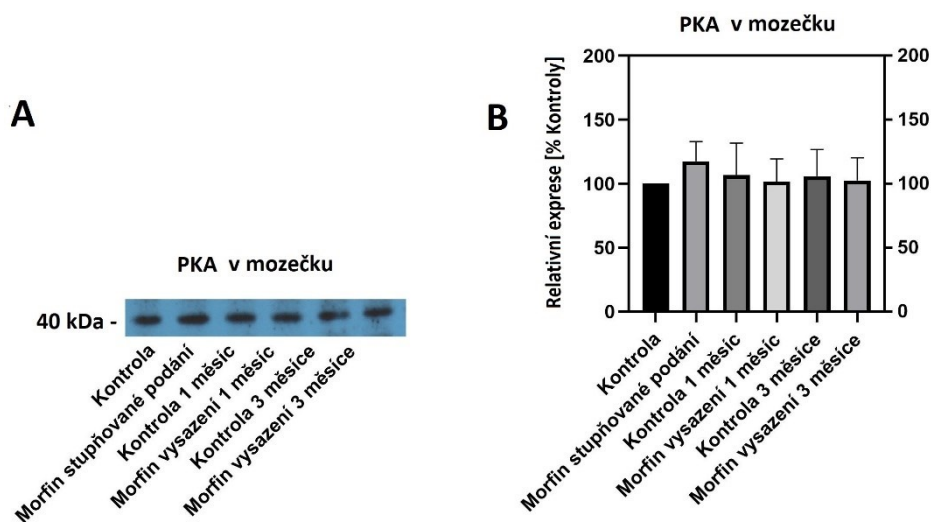
Obrázek 17. V části **A** je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{\beta3\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v mozečku potkana. V části **B** je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 18. V části **A** je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{\alpha\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v mozečku potkana. V části **B** je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 19. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi I izofomy adenylylcyklázy (o molekulové hmotnosti přibližně 100 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v mozečku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaheny na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 20. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v mozečku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaheny na hodnotu Kontroly (100 %).

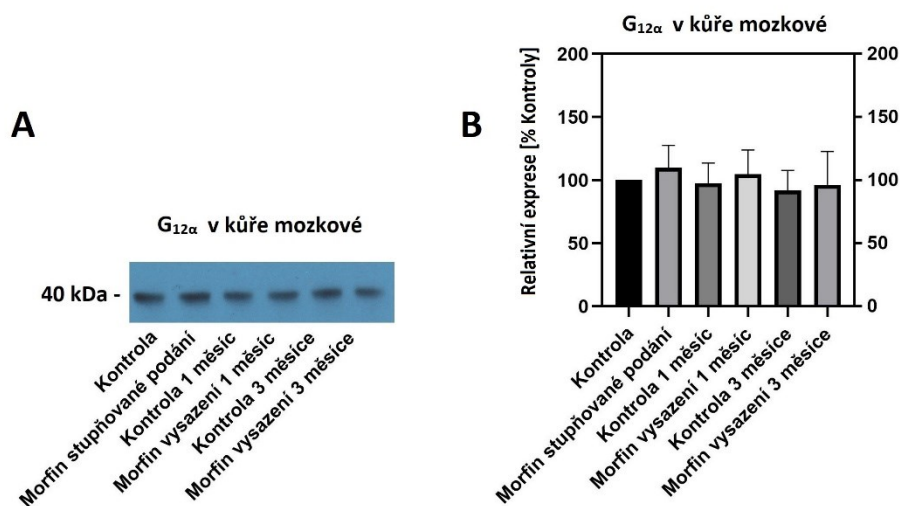
Expres $G_{12\alpha}$ podjednotky (Obrázek 16, str. 28) v mozečku se napříč analyzovanými skupinami jedinců jeví prakticky nezměněná. V grafu $G_{i3\alpha}$ podjednotky (Obrázek 17, str. 29) a $G_{o\alpha}$ podjednotky (Obrázek 18, str. 29) v mozečku je patrná tendence k nárstu hodnot Stupňovaného podání a vysazení Morfinu 1 měsíc oproti odpovídajícím kontrolám. V Obrázku 19 (str. 30) je patrná tendence k nárstu I izofomy adenylylcyklázy ve skupině Stupňovaného podání a v Obrázku 20 (str. 30) tendence k nárstu $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A v téže skupině.

V Tabulce 3 je uvedeno statistické zpracování výsledků analýzy vzorků mozečků potkanů metodou ANOVA s použitím hodnoty hladiny významnosti α 0,05. Ani v jedné z porovnávaných skupin analyzovaných komponent v této části mozku není statisticky významný rozdíl. Patrný, avšak statisticky nevýznamný je rozdíl v množství $G_{o\alpha}$ podjednotky a $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A a mezi jedincem kontroly a jedincem ovlivněným stupňovaným podáváním morfinu.

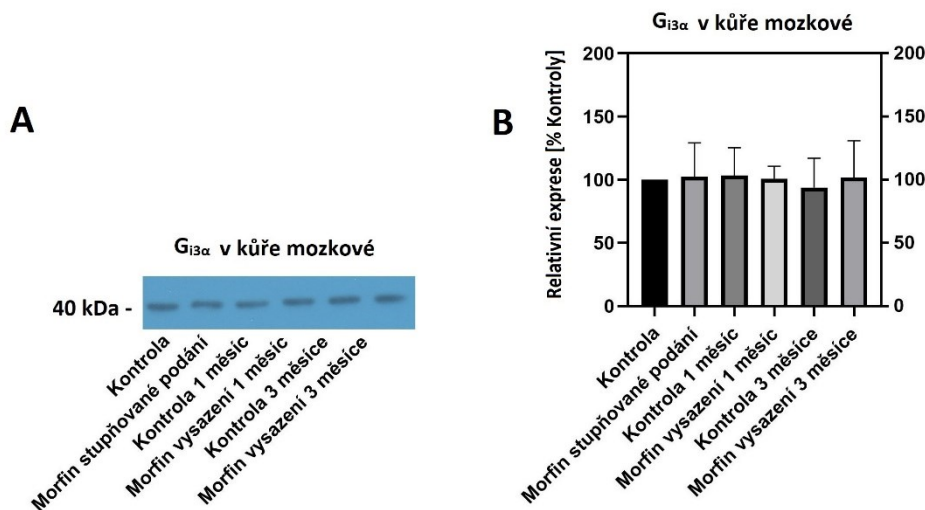
Tabulka 3. Statistické zpracování výsledků analýzy exprese níže uvedených komponent adenylylcyklázového signálního systému v mozečku potkana. V tabulce jsou uvedeny hodnoty hladiny významnosti P mezi jednotlivými skupinami. Hodnoty P nižší než hodnota hladiny významnosti 0,05 jsou považovány za statisticky významné.

Hladina významnosti P					
Analyzované komponenty	$G_{12\alpha}$	$G_{i3\alpha}$	$G_{o\alpha}$	AC I	PKA $\alpha/\beta/\gamma$
Porovnávané skupiny					
Kontrola a Morfin stupňované podání	0,9942	0,9476	0,2751	0,7193	0,1237
Kontrola a vysazení Morfinu (1 měsíc)	>0,9999	0,9783	0,8851	>0,9999	0,9117
Kontrola a vysazení Morfinu (3 měsíce)	0,9699	0,9998	0,9778	>0,9999	0,9888

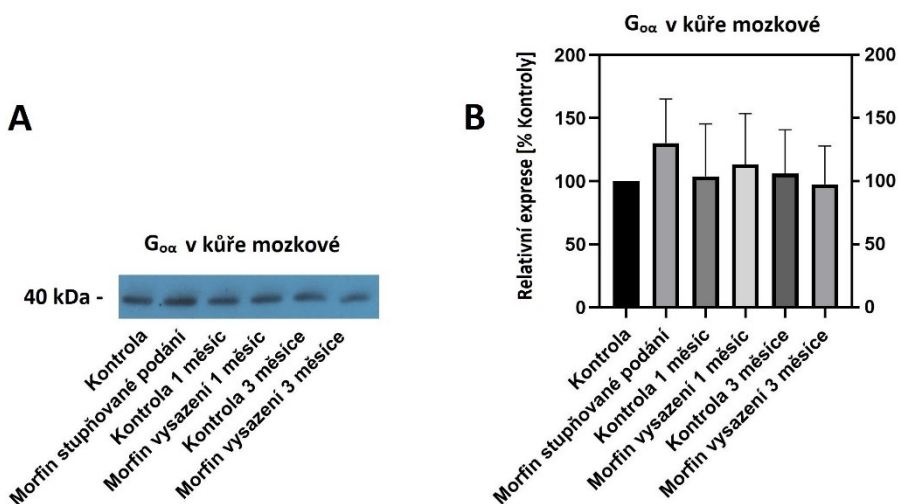
V Obrázcích 21 – 25 (str. 32 – 34) je znázorněn vliv morfinové abstinence na komponenty adenylycyklázového signálního systému v korové části mozku potkana.



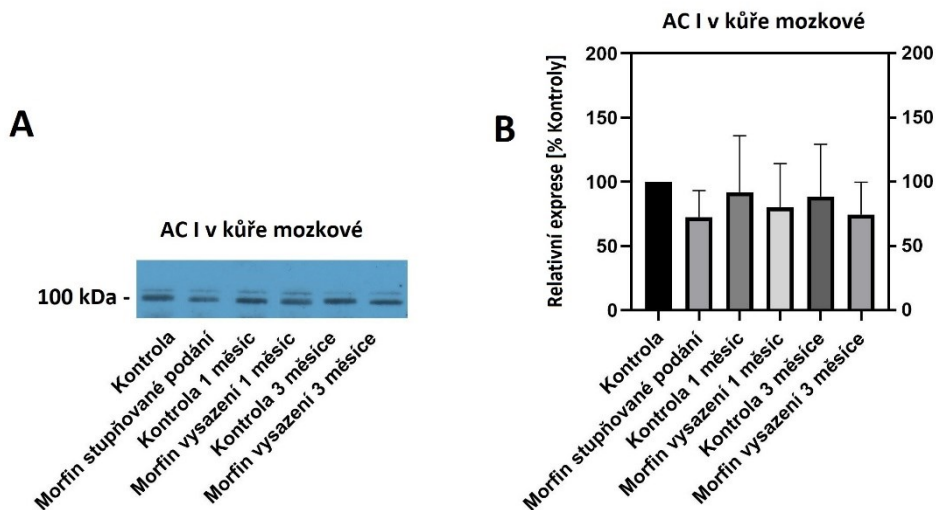
Obrázek 21. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{12\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontrola, Morfinu stupňovaného podání, Kontrola 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v korové části mozku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontrola (100 %).



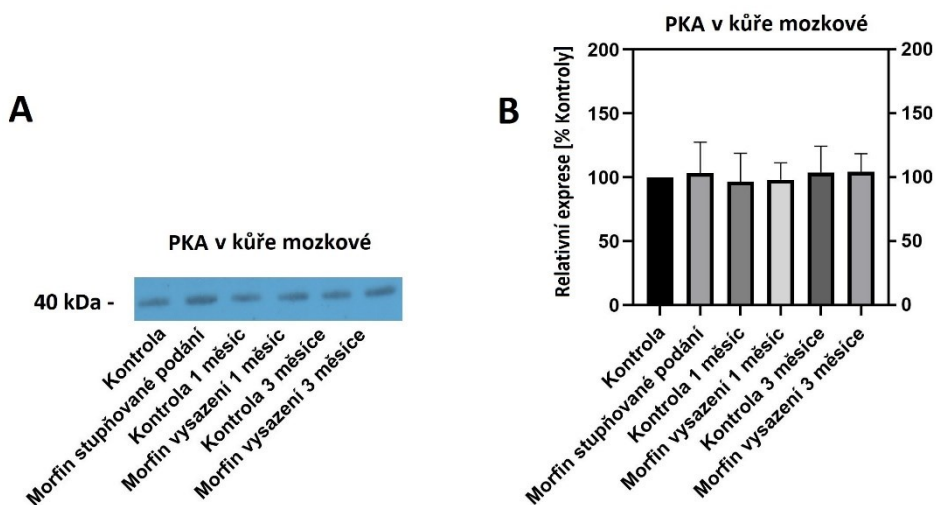
Obrázek 22. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{13\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v korové části potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 23. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{0\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v korové části mozku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 24. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi I izoformy adenylycyklázy (o molekulové hmotnosti přibližně 100 kDa) ve skupinách Kontrola, Morfinu stupňovaného podání, Kontrola 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v korové části mozku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 25. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontrola, Morfinu stupňovaného podání, Kontrola 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce v korové části mozku potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).

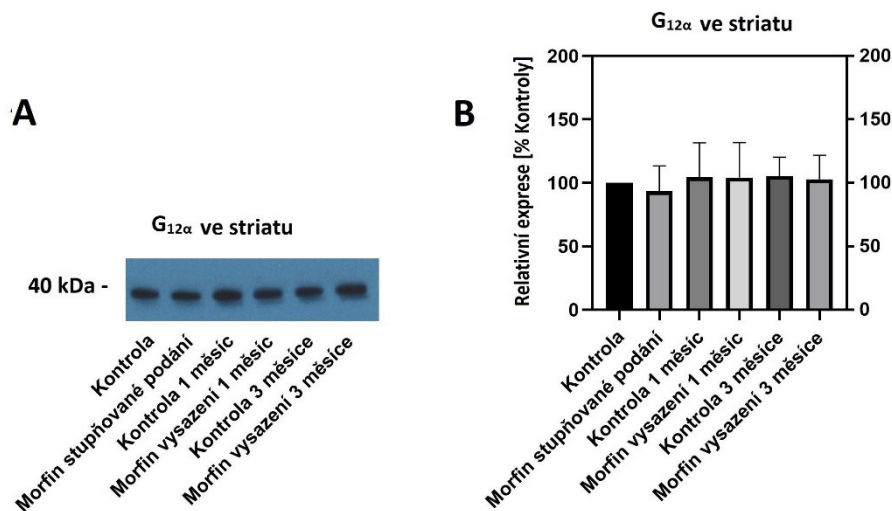
V Obrázku 21 (str. 32) dochází k nepatrné tendenci k nárůstu exprese $G_{12\alpha}$ podjednotky skupin Morfinu stupňovaného podání a Morfinu regrese 1 měsíce a tendence k nárůstu Morfinu regrese 3 měsíců oproti odpovídajícím kontrolám v korové oblasti mozku potkana. Expres $G_{13\alpha}$ podjednotky (Obrázek 22, str. 33) není v této části mozku morfinovou abstinencí prakticky ovlivněna. V grafickém znázornění exprese $G_{0\alpha}$ podjednotky (Obrázek 23, str. 33) jsou viditelné tendence k nárůstu skupin Stupňovaného podání a Morfinu regrese 1 měsíc oproti odpovídajícím kontrolám. V Obrázku 24 (str. 34) dochází k tendenci k poklesu izoformy I adenylylcyklázy všech tří skupin ovlivněných morfinem (tzn. Morfin stupňované podání, vysazení Morfinu 1 nebo 3 měsíce) oproti odpovídajícím kontrolám. V Obrázku 25 (str. 34) nejsou viditelné prakticky žádné změny v expresi $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A.

V Tabulce 4 (str. 36) je uvedeno statistické zpracování výsledků analýzy vzorků korových částí mozku potkanů metodou ANOVA s použitím hodnoty hladiny významnosti α 0,05. V korové části mozku není patrný statisticky významný rozdíl mezi žádnými z porovnávaných skupin. V množství $G_{0\alpha}$ podjednotky a izoformy I adenylylcyklázy jedince kontroly a jedince ovlivněného stupňovaným podáním morfinu je statisticky nevýznamný rozdíl, který je ale vyšší než rozdíly ostatních komponent porovnávaných skupin.

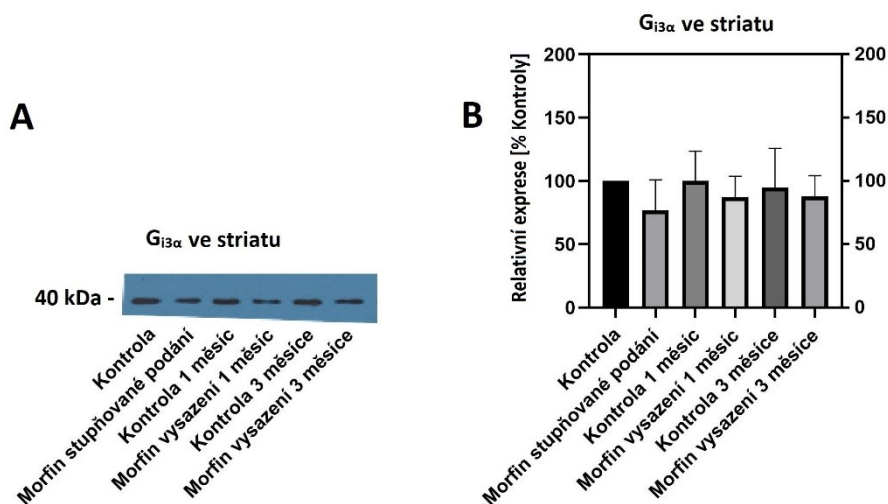
Tabulka 4. Statistické zpracování výsledků analýzy exprese níže uvedených komponent adenylylcyklázového signálního systému v mozkové kůře potkana. V tabulce jsou uvedeny hodnoty hladiny významnosti P mezi jednotlivými skupinami. Hodnoty P nižší než hodnota hladiny významnosti 0,05 jsou považovány za statisticky významné.

Hladina významnosti P					
Analyzované komponenty	$G_{12\alpha}$	$G_{i3\alpha}$	$G_{o\alpha}$	AC I	PKA $\alpha/\beta/\gamma$
Porovnávané skupiny					
Kontrola a Morfin stupňované podání	0,5606	0,9936	0,2206	0,2317	0,9687
Kontrola a vysazení Morfinu regrese (1 měsíc)	0,8211	0,9942	0,9408	0,8247	0,9988
Kontrola a vysazení Morfinu (3 měsíce)	0,9488	0,8674	0,9609	0,8877	>0,9999

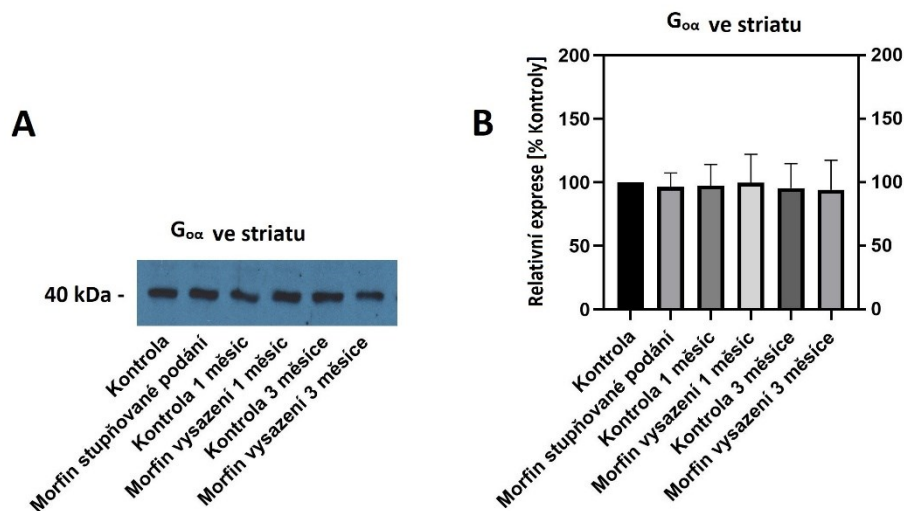
Obrázky 26 - 30 (str. 37 – 39) znázorňují vliv morfinové abstinence na expresi komponent adenylylcyklázového signálního systému ve striatu potkana.



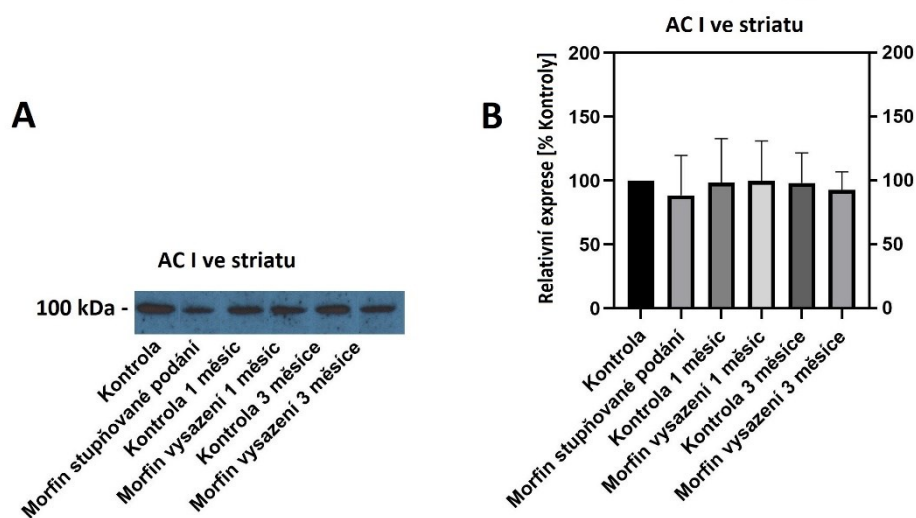
Obrázek 26. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{12\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce ve striatu potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



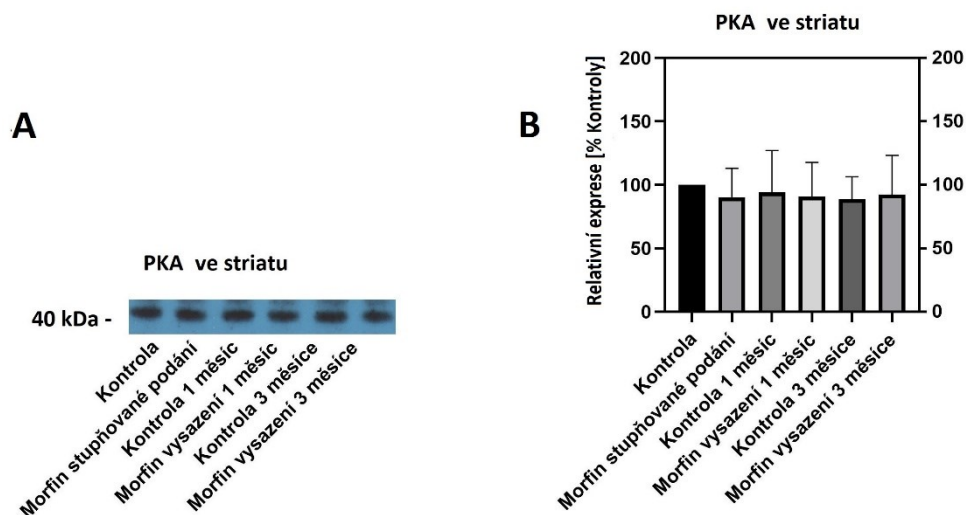
Obrázek 27. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{13\alpha}$ podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce ve striatu potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 28. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi G_{α} podjednotky (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce ve striatu potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 29. V části *A* je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi I izoformu acetylylcyklázy (o molekulové hmotnosti přibližně 100 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce ve striatu potkana. V části *B* je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).



Obrázek 30. V části A je zobrazen reprezentativní blot analýzy vlivu morfinové abstinence na expresi $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A (o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa) ve skupinách Kontroly, Morfinu stupňovaného podání, Kontroly 1 měsíc, Morfinu vysazení 1 měsíc, Kontroly 3 měsíce a Morfinu vysazení 3 měsíce ve striatu potkana. V části B je graf ukazující kvantitativní vyhodnocení. Hodnoty získané analýzou vzorků označených Kontrola, Morfin stupňované podání, Kontrola 1 měsíc, Morfin vysazení 1 měsíc, Kontrola 3 měsíce a Morfin vysazení 3 měsíce jsou vztaženy na hodnotu Kontroly (100 %).

V grafu vlivu morfinové abstinence na expresi $G_{12\alpha}$ podjednotky (Obrázek 26, str. 37) je viditelná minimální tendence k poklesu ve skupině Morfinu stupňované podání oproti Kontrole. Ovšem v Obrázku 27 (str. 37) je možné sledovat tendenci k poklesu $G_{13\alpha}$ podjednotky u všech skupin ovlivněných morfinem oproti odpovídajícím kontrolám. Podjednotka $G_{0\alpha}$ (Obrázek 28, str. 38) se zdá být morfinovou abstinencí prakticky neovlivněna. V grafu exprese I izofomy adenylycyklázy (Obrázek 29, str. 38) je nepatrná tendence k poklesu ve skupině Stupňovaného podání morfinu. Známky tendence k poklesu množství $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A (Obrázek 30, str. 39) u skupiny Stupňovaného podání jsou skoro nepatrné.

V Tabulce 5 (str. 40) je uvedeno statistické zpracování výsledků analýzy vzorků striata potkanů metodou ANOVA s použitím hodnoty hladiny významnosti α 0,05. V této části mozku není patrný statisticky významný rozdíl mezi žádnými z porovnávaných skupin. Velmi patrný (ale statisticky stále nevýznamný) je ale rozdíl v množství $G_{i3\alpha}$ podjednotky mezi jedincem kontroly a jedincem ovlivněným stupňovaným podáním morfinu.

Tabulka 5. Statistické zpracování výsledků analýzy exprese níže uvedených komponent adenylylcyklázového signálního systému ve striatu potkana. V tabulce jsou uvedeny hodnoty hladiny významnosti *P* mezi jednotlivými skupinami. Hodnoty *P* nižší než hodnota hladiny významnosti 0,05 jsou považovány za statisticky významné.

Hladina významnosti P					
Analyzované komponenty	$G_{12\alpha}$	$G_{i3\alpha}$	$G_{o\alpha}$	AC I	PKA $\alpha/\beta/\gamma$
Porovnávané skupiny					
Kontrola a Morfin stupňované podání	0.8728	0,0942	0,9593	0,7689	0,7839
Kontrola vysazení Morfinu (1 měsíc)	>0,9999	0,6959	0,9938	0,9998	0,9896
Kontrola a vysazení Morfinu (3 měsíce)	0,9947	0,9085	0,9986	0, 8950	0,9890

4.2. Diskuze

Cílem této práce byla detekce exprese základních komponent signálního systému adenylylcyklázy v hipokampu, mozečku, kůře mozkové a striatu potkanů po desetidenním stupňovaném podávání zvyšujících se dávek morfinu a následně jeden a tři měsíce po jeho vysazení a její porovnání s odpovídajícími kontrolními jedinci neovlivněnými morfinem.

Morfin se v mozku váže na opioidní receptory (MOR, DOR, KOR i NOP) které jsou schopny aktivací G_i/G_o proteinů inhibovat enzym adenylylcyklázu [62,63].

V této práci se nám vliv morfinu na expresi G_i ani G_o podjednotky v hipokampální části mozku nepodařilo zjistit. Z grafického znázornění a statistického vyhodnocení výsledků (Tabulka 2, str. 27) vyplývá, že exprese $G_{12\alpha}$ (Obrázek 11, str. 24), $G_{i3\alpha}$ (Obrázek 12, str. 25) ani $G_{o\alpha}$ (Obrázek 13, str. 25) podjednotek ve skupinách ovlivněných morfinem nebyla oproti odpovídajícím kontrolám v hipokampální oblasti mozku nijak ovlivněna. Nepatrný vliv morfinu na podjednotky G-proteinů, které jsou součástí adenylylcyklázového signálního systému, může být způsoben nízkým počtem μ opioidních receptorů v hipokampální oblasti mozku, které je znázorněno na Obrázku 3 (str. 7). Významný vliv experimentálně podávaného morfinu na neurony hipokampu neprokázala ani studie [64]. Vliv morfinové abstinence není v této bakalářské práci možno považovat za patrný ani na izoformu I adenylylcyklázy (Obrázek 14, str. 26) a $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotku proteinkinázy A (Obrázek 15, str. 26), což je také výsledkem proteomické analýzy hipokampu potkanů ovlivněných morfinem, která neprokázala v této části mozku jakékoliv změny v oblasti adenylylcyklázové signální dráhy a prakticky ani skoro žádné jiné signální dráhy v této oblasti, čímž potvrdila, že morfin a jiné drogy specificky ovlivňují jen určité části mozku [65].

Naše práce neprokázala statisticky významný vliv (Tabulka 3, str. 31) morfinové abstinence na úroveň exprese $G_{12\alpha}$ (Obrázek 16, str. 28), $G_{i3\alpha}$ (Obrázek 17, str. 29) ani $G_{o\alpha}$ (Obrázek 18, str. 29) podjednotky G-proteinů v mozečku. Nicméně viditelná, avšak statisticky nevýznamná, byla tendence k nárustu exprese podjednotky $G_{o\alpha}$ skupiny Morfin stupňované podání oproti odpovídající kontrole. Statisticky nevýznamné byly v mozečku také rozdíly v expresi I podjednotky adenylylcyklázy (Obrázek 19, str. 30) morfinem ovlivněných skupin oproti jejich kontrolám. Statisticky nevýznamný rozdíl byl i mezi morfinem ovlivněnými skupinami a odpovídajícími kontrolami sledujícími expresi $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A (Obrázek 20, str. 30), ale viditelná (přesto statisticky nevýznamná) tendence k nárustu byla patrná u skupiny Stupňovaného podání oproti Kontrole. Studie [66] prokázala snížení hladiny cerebelárního cAMP při akutním podání morfinu, které ale již nebylo tak patrné při chronickém podáváním morfinu. Při vysazení drogy se hladina cAMP, jehož syntéza je katalyzována adenylylcyklázou, vrátila k původním hodnotám. Vliv morfinové abstinence na tuto část mozku nebyl prokázán.

Analýze vlivu morfinu na korovou oblast mozku se věnovalo již několik studií. Dle studie [46], která se zabývala vlivem morfinové abstinence na podjednotky G-proteinů (a jejich desenzitizací) a izoformy adenylylcyklázy, zůstaly po odnětí drogy hladiny G-proteinů nezměněny. Při desetidenním podáváním morfinu byla touto studií zjištěna up-regulace I izoformy adenylylcyklázy, která byla dle této studie následkem kompenzace desenzitizace G-proteinové signalizace. Up-regulace AC I ve vzorcích jedinců 20 dní po odnětí drogy již prokázána nebyla. Naše práce při studiu podjednotek $G_{12\alpha}$ (Obrázek 21, str. 32), $G_{13\alpha}$ (Obrázek 22, str. 33) ani $G_{0\alpha}$ (Obrázek 23, str. 33) ani $\alpha/\beta/\gamma$ proteinkinázy A (Obrázek 25, str. 34) korové části mozku nenašla mezi skupinami ovlivněnými morfinem a kontrolními skupinami statisticky významné rozdíly (Tabulka 4, str. 36). U $G_{0\alpha}$ podjednotky je možné sledovat tendenci k nárůstu ve skupině Morfin stupňované podání oproti odpovídající kontrole. V Grafu znázorňujícím vliv morfinové abstinence na I izoformu adenylylcyklázy (Obrázek 24, str. 34) je možné sledovat tendenci k poklesu všech skupin ovlivněných morfinem oproti jejich kontrolám, tyto poklesy jsou však statisticky nevýznamné. Pozorované poklesy adenylylcyklázy mohou souviset a pozorovanou tendencí k nárůstu exprese $G_{0\alpha}$ podjednotky, která může inhibovat aktivaci adenylylcyklázy. Trend rozdílu mezi ovlivněnými a neovlivněnými skupinami (rozdíl klesá s dobou abstinence) ale potvrzuje výše zmiňovanou studii, která tvrdí, že se organismus vystavený morfinu po jeho odnětí vrací do fyziologické normy. Změny ve výsledcích této práce a studie [46] jsou pravděpodobně způsobeny jinými podmínkami experimentu.

Ve studii [65], která prováděla proteomickou analýzu striata potkanů ovlivněných morfinem, byl zaznamenán pokles proteinu (specifický typ proteasomu), který může hrát roli v regulaci neuronální rovnováhy heterotrimerních G-proteinů a adenylylcyklázy, a tím vyvolávat při dlouhodobém podáváním opioidů závislost. V naší práci se vliv podáváním morfinu ani jeho následného vysazení na expresi sledovaných proteinů potvrdit nepodařilo. Tabulka 5 (str. 40) neudává u studovaných komponent adenylylcyklázového signálního systému ve striatu žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami ovlivněnými morfinem a neovlivněnými touto látkou. Z Obrázku 26 (str. 37) je ovšem patrná velmi mírná tendence k poklesu $G_{12\alpha}$ podjednotky ve skupině Stupňovaného podání morfinu. Tato tendence je ještě markantnější u $G_{13\alpha}$ podjednotky (Obrázek 27, str. 37), kde je patrná tendence k poklesu všech tří skupin ovlivněných morfinem oproti odpovídajícím kontrolám. Tyto rozdíly ovšem nelze

stále považovat za statisticky významné (Tabulka 5, str. 40). Prakticky žádné rozdíly naše práce neodhalila ani u $G\alpha$ podjednotky (Obrázek 28, str. 38) a izoformy I adenylylcyklázy (Obrázek 29, str. 38), i když zde byla nepatrná tendence k poklesu ve skupině Stupňovaného podání morfinu ani u $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A (Obrázek 30, str. 39). Vliv morfinové abstinence se tedy nepodařilo prokázat ani na komponenty adenylylcyklázového signálního systému ve striatu potkana. Rozdíly ve výsledcích naší práce a výše zmiňované studie [66] jsou pravděpodobně způsobeny použitím jiné metody (na proteomickou analýzu byla použita metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF) a odlišnými podmínkami experimentu.

5. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala vlivem morfinové abstinence na adenylylcyklázový signální systém v mozku potkana. V rámci této práce byla metodou Western blot detekována exprese $G_{12\alpha}$, $G_{i3\alpha}$ a $G_{o\alpha}$ podjednotky heterotrimerních G-proteinů a dále exprese I izofomy adenylylcyklázy a $\alpha/\beta/\gamma$ podjednotky proteinkinázy A v hipokampu, mozečku, kůře a striatu skupin potkanů, kterým byl po deseti dnů podáván morfin ve zvyšujících se dávkách, a dále skupin potkanů takto ovlivněných morfinem po jednom a třech měsících po vysazení. Výsledky získané touto analýzou byly následně porovnány s odpovídajícími kontrolami a statisticky vyhodnoceny.

Porovnání dat získaných analýzou vzorků skupin ovlivněných morfinem a odpovídajících kontrolních skupin neprokázalo statisticky významné rozdíly v expresi žádné komponenty adenylylcyklázového signálního systému v žádné části mozku. Z výsledků je ale patrná opakující se tendence k nárustu $G_{o\alpha}$ podjednotky ve skupině potkanů po desetidenním stupňovaném podání morfinu oproti odpovídající kontrole v hipokampu, mozečku a kůře mozkové. V korové oblasti je navíc patrná i tendence k poklesu izofomy I adenylylcyklázy ve skupině potkanů po podání morfinu i ve skupinách potkanů 1 a 3 měsíce abstinujících oproti příslušným kontrolním skupinám. Ve striatu potkanů došlo k viditelné tendenci k poklesu exprese $G_{i3\alpha}$ podjednotky v ovlivněných skupinách, která mírně přetrvávala i ve skupině abstinující jeden měsíc.

Ke statisticky významným výsledkům v této oblasti výzkumu by mohlo vést použití citlivější metody (např. hmotnostní spektrometrie nebo chromatografické metody). Případně analýza i jiných částí mozku a dalších komponent signálních drah spojovaných s morfinovou abstinencí.

Při studiu vlivu morfinové abstinence na adenylylcyklázový signální systém v mozku potkana nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami ovlivněnými morfinem a skupinami kontrolními. Tato práce tím potvrzuje již dříve zjištěnou schopnost organismu vracet se po vysazení drogy do fyziologicky normálního stavu.

Použitá literatura

- [1] McDonald, J., & Lambert, D. G.: Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 17 (9), 464–468 (2016)
- [2] Debnath, B., Singh, W. S., Das, M., Goswami, S., Singh, M. K., Maiti, D., & Manna, K.: Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry*, 9, 56–72 (2018)
- [3] Aragón-Poce, F., Martínez-Fernández, E., Márquez-Espinós, C., Pérez, A., Mora, R., & Torres, L. M.: History of opium. *International Congress Series, 1242*, 19–21 (2002)
- [4] Nesměrák K.: Historie analgetik. *Bolest*, 19, 103-112 (2016)
- [5] Nobel, T. B., Zaveri, S., Khetan, P., & Divino, C. M.: Temporal trends in opioid prescribing for common general surgical procedures in the opioid crisis era. *The American Journal of Surgery*, 217 (4), 613–617 (2019)
- [6] Kozák J., Lejčko J., a Vrba I., *Opioidy*, Praha: nakladatelství Mladá fronta, 2018
- [7] Lejčko J.: Přehled opioidních analgetik. *Praktické lékařství*, 5 (4), 172-174 (2009)
- [8] Smith, H. S., & Laufer, A.: Opioid induced nausea and vomiting. *European Journal of Pharmacology*, 722, 67–78 (2014)
- [9] Ersek, M., Cherrier, M. M., Overman, S. S., & Irving, G. A.: The cognitive effects of opioids. *Pain Management Nursing*, 5 (2), 75–93 (2004)
- [10] Contet, C., Kieffer, B. L., & Befort, K.: Mu opioid receptor: A gateway to drug addiction. *Current Opinion in Neurobiology*, 14 (3), 370–378 (2004)
- [11] Benyhe, S.: Morphine: New aspects in the study of an ancient compound. *Life Sciences*, 55 (13), 969–979 (1994)
- [12] Stefano, G. B., Ptáček, R., Kuželová, H., & Kream, R. M.: Review Article Endogenous Morphine: Up-to-Date. *Folia biologica*, 58 (2), 49-56 (2012)
- [13] Brook, K., Bennett, J., & Desai, S. P.: The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *Journal of Anesthesia History*, 3 (2), 50–55 (2017)
- [14] Sinatra, R. S.: Opioids and opioid receptors. *The Essence of Analgesia and Analgesics*. Cambridge: Cambridge University Press (2010)
- [15] Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E., & Gilbert, P. E.: The effects of morphine and nalorphine like drugs in the nondependent and morphine dependent chronic spinal dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 197 (3), 517–532 (1976)
- [16] Dietis, N., Rowbotham, D. J., & Lambert, D. G.: Opioid receptor subtypes: Fact or artifact? *British Journal of Anaesthesia*, 107 (1), 8–18 (2011)

- [17] Šlamberová, R.: Opioid receptors of the CNS: Function, structure and distribution. *Československá fyziologie*, 53 (4), 159-166 (2004)
- [18] Pathan, H., & Williams, J.: Basic opioid pharmacology: An update. *British Journal of Pain*, 6 (1), 11–16 (2012)
- [19] Lutz, P.-E., & Kieffer, B. L.: Opioid receptors: Distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*, 36 (3), 195–206 (2013)
- [20] Shang, Y., & Filizola, M.: Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *European Journal of Pharmacology*, 763, 206–213 (2015)
- [21] Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K.: The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459 (7245), 356–363 (2009)
- [22] Hu, G.-M., Mai, T.-L., & Chen, C.-M. Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Scientific Reports*, 7 (1), 15495 (2017)
- [23] „GPCR Pathway - Creative Diagnostics". [Online]. Dostupné z: <https://www.creative-diagnostics.com/gpcr-pathway.htm>.
- [24] Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V.: Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (12) (2017). Dostupné z: doi:10.3390/ijms18122519
- [25] Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M.: Second Messengers. *Neuroscience. 2nd Edition* (2001)
- [26] „GPCR | Learn Science at Scitable". [Online]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471>.
- [27] Wettschureck, N., & Offermanns, S.: Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews*, 85 (4), 1159–1204 (2005)
- [28] Nestler, E. J., & Duman, R. S.: Heterotrimeric G Proteins. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th Edition* (1999)
- [29] „PDB101: Molecule of the Month: G Proteins", *RCSB: PDB-101*. [Online]. Dostupné z: <http://pdb101.rcsb.org/motm/58>.
- [30] Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M.: G-Proteins and Their Molecular Targets. *Neuroscience. 2nd Edition*. (2001)
- [31] Defer, N., Best-Belpomme, M., & Hanoune, J.: Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279 (3), F400–F416 (2000)
- [32] Sunahara, R. K., & Taussig, R.: Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: Multiplicities of signaling. *Molecular interventions*, 2 (3), 168–184 (2002)
- [33] Tesmer, J. J., & Sprang, S. R.: The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Current Opinion in Structural Biology*, 8 (6), 713–719 (1998)

- [34] Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., & Bulla, L. A.: A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (26), 9897–9902 (2006)
- [35] Robinson-White, A., & Stratakis, C. A.: Protein Kinase A Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 968 (1), 256–270 (2002)
- [36] Nestler, E. J.: Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, 47, 24–32 (2004)
- [37] Hannah-Shmouni, F.: Alterations of Phosphodiesterases in Adrenocortical Tumors. *Frontiers in Endocrinology*, 7 (2016). Dostupné z: doi: 10.3389/fendo.2016.001
- [38] Vries, T. J. D., & Shippenberg, T. S.: Neural Systems Underlying Opiate Addiction. *Journal of Neuroscience*, 22 (9), 3321–3325 (2002)
- [39] Gupta, S., & Kulhara, P.: Cellular and molecular mechanisms of drug dependence: An overview and update. *Indian Journal of Psychiatry*, 49 (2), 85–90 (2007)
- [40] Sharma, S. K., Klee, W. A., & Nirenberg, M.: Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72 (8), 3092–3096 (1975)
- [41] Koob, G. F., Maldonado, R., & Stinus, L.: Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends in Neurosciences*, 15 (5), 186–191 (1992)
- [42] Wu, Q., Cao, M., Wang, T., Jiang, P., & Zhou, K.: Downregulation of cAMP response element-binding protein by lentiviral vector-mediated RNAi attenuates morphine withdrawal syndromes in rats. *Behavioural Brain Research*, 233 (1), 217–223 (2012)
- [43] Fan, P., Jiang, Z., Diamond, I., & Yao, L.: Up-Regulation of AGS3 during Morphine Withdrawal Promotes cAMP Superactivation via Adenylyl Cyclase 5 and 7 in Rat Nucleus Accumbens/Striatal Neurons. *Molecular Pharmacology*, 76 (3), 526–533 (2009)
- [44] Noble, F., & Cox, B. M.: Differential desensitization of μ - and δ - opioid receptors in selected neural pathways following chronic morphine treatment. *British Journal of Pharmacology*, 117, 161-169 (1996)
- [45] Ujcikova, H., Dlouha, K., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Kagan, D., & Svoboda, P.: Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20days after morphine withdrawal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1810 (12), 1220–1229 (2011)
- [46] Ujcikova, H., Vosahlikova, M., Roubalova, L., & Svoboda, P.: Proteomic analysis of protein composition of rat forebrain cortex exposed to morphine for 10days; comparison with animals exposed to morphine and subsequently nurtured for 20days in the absence of this drug. *Journal of Proteomics*, 145, 11–23 (2016)

- [47] Mahmood, T., & Yang, P.-C.: Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4 (9), 429–434 (2012)
- [48] Kurien, B. T., & Scofield, R. H.: Electrophoresis | Gel Electrophoresis: Blotting Techniques☆. In P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, & M. Miró (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)* (s. 400–407) (2015)
- [49] Kurien, B. T., & Scofield, R. H.: Western blotting. *Methods (San Diego, Calif.)*, 38 (4), 283–293 (2006)
- [50] Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J.: An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27 (1), 4–25 (2017)
- [51] Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (9), 4350–4354 (1979)
- [52] Nachimuthu, S., & Ponnusamy, R.: Introduction to proteomics. *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*. Woodhead Publishing (2011)
- [53] Bernhardt, J., & Riedel, K.: Electrophoresis | Gel Electrophoresis: Techniques of Two-Dimensional Gel Electrophoresis☆. In P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, & M. Miró (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)* (s. 469–492) (2019)
- [54] Li, C., & Arakawa, T.: Application of native polyacrylamide gel electrophoresis for protein analysis: Bovine serum albumin as a model protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 566–571 (2019)
- [55] Jensen, E. C.: The basics of western blotting. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)*, 295 (3), 369–371 (2012)
- [56] Dunn, M. J.: ELECTROPHORESIS | Proteins, Detection of. In *Encyclopedia of Separation Science* (s. 1342–1348) (2000)
- [57] Kricka, L. J.: Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clinical Chemistry*, 37 (9), 1472–1481 (1991)
- [58] Jin, S., & Kennedy, R. T.: New developments in Western blot technology. *Chinese Chemical Letters*, 26 (4), 416–418 (2015)
- [59] Xu, D., Marchionni, K., Hu, Y., Zhang, W., & Susic, 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)

- [60] Kaur, H., Bhagwat, S. R., Sharma, T. K., & Kumar, A.: Analytical techniques for characterization of biological molecules—Proteins and aptamers/oligonucleotides. *Bioanalysis*, 11 (2), 103–117 (2019)
- [61] MacPhee, D. J.: Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61(2), 171–177 (2010)
- [62] Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L.: Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 953–990 (2004)
- [63] Carter, B. D., & Medzihradsky, F.: Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (9), 4062–4066 (1993)
- [64] Robinson, T. E., Gorny, G., Savage, V. R., & Kolb, B.: Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 46 (4), 271–279 (2002)
- [65] Bierzynska-Krzysik, A., Pradeep John, J., Silberring, J., Kotlinska, J., Dylag, T., Cabatic, M., & Lubec, G. Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine. *International Journal of Molecular Medicine* 18, 775-784 (2006)
- [66] Charalampous, K. D., & Askew, W. E.: Cerebellar cAMP levels following acute and chronic morphine administration. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 55 (1), 117–120 (1977)