

Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc., Jonáš Kaufman

Na/K-ATPáza v lymfocytech sleziny a hipokampu
potkana; vliv morfia, stimulace mitogenem a vliv stresu
vyvolaného spánkovou deprivací

Na/K-ATPase in spleen lymphocytes and hippocampus
of rat; effect of morphine, stimulation by mitogen and
effect of stress induced by deprivation from sleep

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Praha, 2020 Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Svobody DrSc. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 10. 8. 2020

.....

Podpis

Poděkování:

Rád bych touto cestou poděkoval svému vedoucímu práce doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc za věnovaný čas, energii a za trpělivost. Dále bych poděkoval Ing. Miroslavě Vošahlíkové, PhD., RNDr. Haně Ujčíkové, PhD., Mgr. Janě Brejchové, PhD. a Mgr. Kristíně Cechové za podporu, objasnění experimentálních přístupů a příjemné pracovní prostředí.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem sodíkem a draslíkem aktivované adenosintrifosfatázy, Na^+/K^+ ATPázy, která je selektivně inhibována kardioaktivním glykosidem ouabainem. Změny množství tohoto enzymu byly sledovány v lymfocytech sleziny a hipokampu potkanů. Metoda, která byla pro toto studiu použita, byla technika „Western blot“ s pomocí protilátek orientovaných proti α podjednotce Na^+/K^+ ATPázy. Při studiu lymfocytů byly použity polyklonální i monoklonální protilátky. Při studiu hipokampu byly použity pouze protilátky monoklonální.

Prvním cílem diplomové práce bylo porovnat změny v hladinách Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech pěstovaných v tkáňové kultuře (tedy v podmínkách *in vitro*) v přítomnosti morfia nebo silného mitogenu konkanavalinu A (ConA). Druhým cílem diplomové práce bylo stanovit změny množství tohoto enzymu v hipokampu potkanů, kteří byli vystaveni stresu po dobu 3 dnů. Stres byl vyvolán spánkovou deprivací.

Dlouhodobá inkubace lymfocytů v přítomnosti 10 μM morfia (48 hodin) nevyvolala významnou změnu v množství Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech. Toto zjištění bylo prokázáno s pomocí monoklonálních protilátek ve frakci post nukleárního supernatantu (PNS). Naproti tomu, stimulace ConA (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) způsobila vysoce signifikantní nárůst α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech. Tento vzestup byl prokázán jak s pomocí monoklonálních protilátek v PNS, tak s pomocí polyklonálních protilátek v PNS a membránové frakci (MF).

Pro stanovení vlivu stresu vyvolaného spánkovou deprivací (SD) na hladiny α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy v hipokampu po dobu 3 dnů byly použity stejné monoklonální protilátky jako při práci s lymfocyty. Toto stanovení bylo provedeno v celkem 6 skupinách experimentálních zvířat. Skupina C1+SD po 1 dnu ve standardní kleci absolvovala 3 dny spánkové deprivace, dohromady 4 dny. Skupina C7+SD po 7 dnech ve standardní kleci absolvovala 3 dny spánkové deprivace, dohromady 10 dní. Skupina C28+SD po 28 dnech ve standardní kleci absolvovala 3 dny spánkové deprivace, dohromady 31 dní. Výsledky získané v těchto zvířatech (ovlivněné SD, +SD) byly srovnány s výsledky získanými na odpovídajících kontrolních zvířatech, která nebyla vystavena SD (C1-SD, C7-SD, C28-SD). Hladina α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy ve všech vzorcích hipokampu potkanů kteří byli vystaveni stresu spánkovou deprivací (+SD), byla signifikantně vyšší než v příslušných kontrolách (-SD).

Klíčová slova: Na⁺/K⁺ ATPáza, lymfocyty sleziny, morfium, Conkanavalin A, hipokampus, stress vyvolaný spánkovou deprivací.

ABSTRACT

This work was oriented to studies of sodium and potassium dependent adenosinetriphosphatase, Na⁺/K⁺ ATPase, which is selectively inhibited by cardioactive glycoside, ouabain. The alterations in level of this enzyme were followed in spleen lymphocytes and hippocampus prepared from rats. Detection of Na⁺/K⁺ ATPase has been made by western blot analysis using primary antibodies oriented against α subunit of Na⁺/K⁺ ATPase. Studies of lymphocytes were based on usage of both monoclonal and polyclonal antibodies. In studies of hippocampus monoclonal antibodies were used.

The first aim of my work was to determine the alterations in the level of Na⁺/K⁺ ATPase in spleen lymphocytes cultivated in tissue culture (i.e. under *in vitro* conditions) in the presence of morphine or strong mitogen, concanavalin A (ConA). The second aim of these theses was to determine the changes of Na⁺/K⁺ ATPase α subunit in hippocampus of rats, which were under *in vivo* conditions exposed to stress lasting 3 days. The stress of experimental animals was induced by deprivation from sleep.

The long-term incubation of spleen lymphocytes with 10 μ M morphine for 48 hours did not cause a significant change of Na⁺/K⁺ ATPase α subunit level. This result was obtain by analysis of post nuclear fraction (PNS), by use of monoclonal antibodies. Contrarily, stimulation of spleen lymphocytes by mitogenic dose of ConA (3 μ g/ml) for the same time, was reflected in the highly significant up-regulation of Na⁺/K⁺ ATPase α subunit. The increase of α subunit of Na⁺/K⁺ ATPase protein level was detected in both post nuclear fraction (PNS) by monoclonal antibodies and in membrane fraction (MF) by polyclonal antibodies.

Determination of the effect of deprivation from sleep (SD) for 3 days on Na⁺/K⁺ ATPase α subunit level in hippocampus was based on the same monoclonal antibodies as those used for determination of this enzyme in lymphocytes. This determination was carried out with six groups of experimental animals. Rats belonging to group C1+SD were kept for 1 day in standard cage and then exposed to SD for 3 days. Rats in group C7+SD were kept for 7 days in standard cage and then exposed to SD for 3 days. Rats in group C28+SD were kept for 28 days in standard cage and then exposed to SD.

Results found in experimental groups rats (exposed to SD, +SD) were compared with those obtained from analysis of corresponding controls, i.e. from rats which were nurtured for 4 (1+3), 11 (7+3) and 31 (28+3) days in standard cages. The Na⁺/K⁺ ATPase α subunit level in hippocampus dissected from all groups of experimental animals exposed to stress (+SD) was significantly different from corresponding controls (-SD).

Key words: Na⁺/K⁺ ATPase, spleen lymphocytes, morphine, conkanavalin A, hippocampus, stress, deprivation from sleep

Obsah

Seznam zkratk	1
1 Úvod	2
2 Literární přehled	3
2.1 Na ⁺ /K ⁺ ATPáza	3
2.2 Regulace aktivity a množství Na ⁺ /K ⁺ ATPázy v lymfocytech	3
2.3 Imunitní systém	5
2.3.1 Antigeny	5
2.3.2 Lektiny	6
2.3.3 Části imunitního systému	6
2.3.4 Buňky imunitního systému	6
2.4 Změny množství Na ⁺ /K ⁺ ATPázy v mozku vlivem stresu vyvolaného REM spánkovou deprivací	7
2.5 Struktura a lokalizace hipokampu	7
2.6 Receptory pro opioidy	9
3 Cíle diplomové práce	10
4 Materiál	11
5 Metody	14
5.1 Spánková deprivace	14
5.2 Zabití zvířat a izolace potřebných tkání	15
5.3 Příprava vzorků hipokampu	15
5.4 Izolace lymfocytů	16
5.5 Příprava subcelulárních frakcí	17
5.6 Příprava post nukleárního supernatantu (PNS) z lymfocytů	17
5.7 Příprava membránové frakce (MF) z lymfocytů	18
5.8 Příprava membránové frakce z hipokampu	18
5.9 Stanovení bílkovin metodou dle Lowryho	18
5.10 Dělení a detekce proteinů metodou „Western blot“	19
5.11 Statistické hodnocení výsledků metody „Western blot“	20
6 Výsledky	21
6.1 Stanovení Na ⁺ /K ⁺ ATPázy v lymfocytech potkana	21
6.2 Vliv morfia na lymfocyty pěstované ve tkáňové kultuře	21

6.3 Stimulace lymfocytů Konkanavalinem A	22
6.3.1 Hodnocení s pomocí monoklonálních protilátek	22
6.3.2 Hodnocení s pomocí polyklonálních protilátek	24
6.4 Stanovení Na ⁺ /K ⁺ ATPázy v hipokampu potkana	26
7 Diskuze.....	28
7.1 Studie lymfocytů sleziny.....	28
7.1.1 Účinek morfia.....	28
7.1.2 Účinek concanavalinu A	29
7.2 Hipokampus	31
8 Závěr	33
9 Literatura	34

Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
CNS	centrální nervová soustava
ConA	konkanavalin A
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FCS	plodové telecí sérum
GPCR	receptory spřažené s G proteiny
HeLa	nádorová linie lidských epiteliálních buněk
HPA	stresová
MF	membránová frakce
Mor	skupina vzorků ovlivněná morfiem
Na ⁺ /K ⁺ ATPáza	sodno draselná adenosintrifosfatáza
Nat	kontrolní, neovlivněná skupina vzorků
NK	buňky imunitního systému, „přirození zabijáci“
non-REM	spánek bez rychlého pohybu očí
OR	opioidní receptor
PBS	fosfátový pufr
PHA	fytohemagglutinin
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PNS	postnukleární supernatant
PWM	mitogen získaný z rostliny „Líčidlo americké“
REM	spánek doprovázený rychlým pohybem očí
SD	spánková deprivace
SDS	dodecylsírán sodný
SEM	směrodatná odchylka
STEM	TEM pufr se sacharózou
TBS	pufr tris-HCl/NaCl
TE	pufr tris-HCl/EDTA
TEM	pufr tris-HCl/EDTA/MgCl ₂
TEMED	tetramethylethylendiamin
TM	Transmembránový úsek bílkoviny

1 Úvod

Sodno-draselná adenosin trifosfatáza (dále Na^+/K^+ ATPáza) je enzym, který byl objeven v roce 1957 (Skou a kol., 1957). Mezi její hlavní funkce patří udržování osmotické rovnováhy čerpáním sodných a draselných iontů přes membránu. V nervové a svalové tkáni je nezbytná pro navrácení membránového potenciálu do klidového stavu po proběhnutí akčního potenciálu. Řízení jejího množství a aktivity na plazmatické membráně buněk různých tkání však není zcela objasněno.

2 Literární přehled

2.1 Na⁺/K⁺ ATPáza

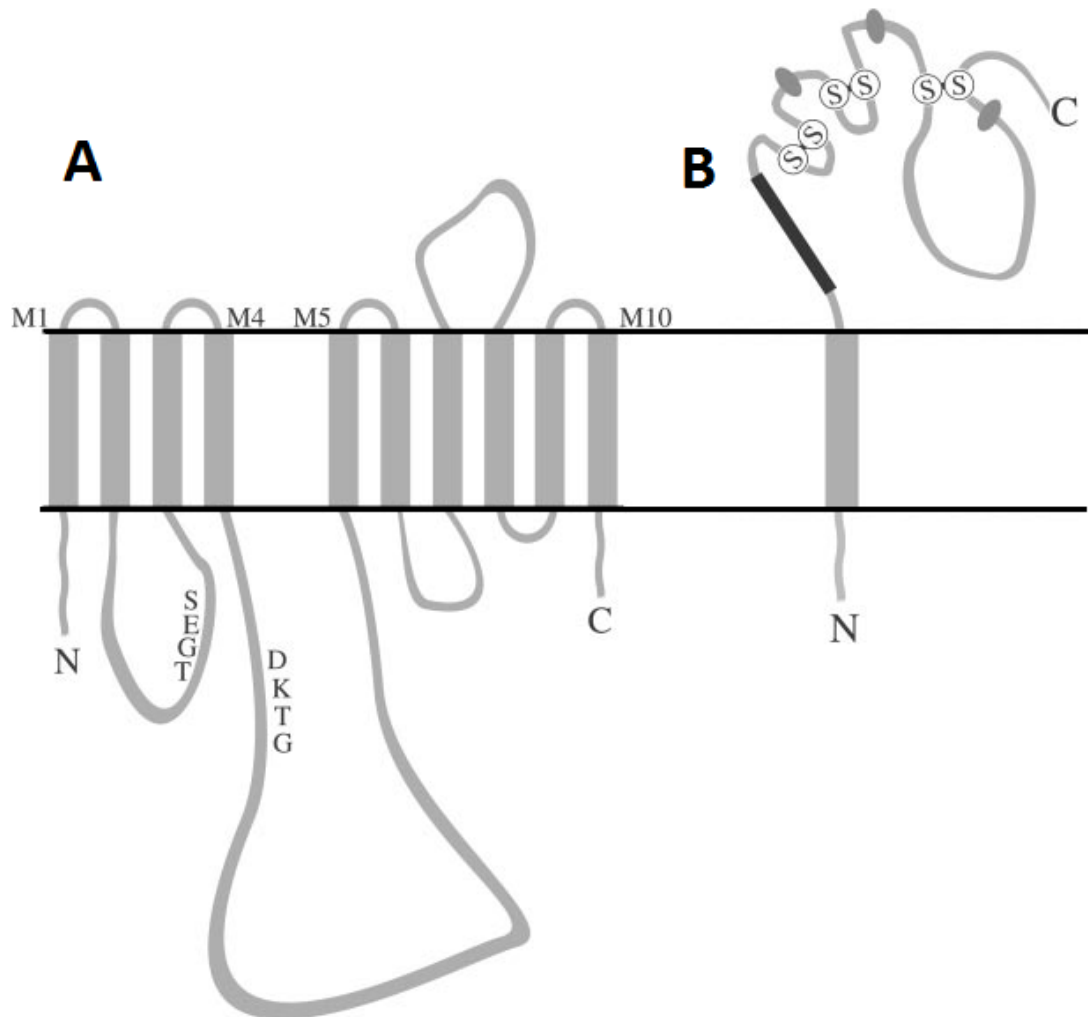
Na⁺/K⁺ ATPáza je enzym, který je nezbytný pro iontovou homeostázu v buňkách. Za spotřeby adenosintrifosfátu (dále ATP) transportuje sodné a draselné ionty přes plazmatickou membránu a zajišťuje tak jejich konstantní koncentraci ve vnitrobuněčném prostředí. Je specificky inhibována ouabainem a pro její funkčnost jsou nezbytné hořečnaté ionty. (Kurauchi a kol., 2018; shrnuto v Matchkov a Krivoi, 2016) Vedle tvorby iontové rovnováhy, která je důležitá například pro funkci ledvin, se také Na⁺/K⁺ ATPáza podílí na ustálení membránového potenciálu. (Mernissi a kol., 1991) V nervové a svalové tkáni jsou vznikající akční potenciály provázeny vtokem sodných ionů do buňky a výlevem draselných ionů do extracelulárního prostoru. Na⁺/K⁺ ATPáza zde navrácí koncentraci zmíněných iontů na původní hodnoty a je tedy zásadní pro iontovou homeostázu. Za spotřeby jednoho ATP přenesou 3 sodné ionty z buňky a 2 draselné ionty do buňky. V konečné bilanci tak dochází k přenosu jednoho kladného náboje směrem ven z buňky. Zvyšuje se membránový potenciál neboli probíhá hyperpolarizace buňky. (Kim a Gesdorff 2012; Macdonald a kol., 2005)

Na obrázku 1 je znázorněna struktura Na⁺/K⁺ ATPázy, skládá se z α a β podjednotky, které vytváří heterotetramer (2x $\alpha\beta$). (Mimura a kol., 2008) Obě podjednotky mají několik izoform, jejichž exprese se liší podle typu tkáně nebo se může měnit s věkem jedince. Známé izoformy α podjednotky jsou $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ a $\alpha 4$ a β podjednotky $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 3$. (Sverdlov a kol., 1988; Emanuel a kol., 1987; Lingrel a Therasa, 1994; McGrail a kol., 1991; Sundaram a kol., 2019) α podjednotka je složena z 10 transmembránových (dále TM) úseků a na rozdíl od receptorů spřažených s G proteiny (dále GPCR) jsou N-konec i C-konec orientovány do vnitrobuněčného prostředí. Vazebné místo pro ATP je na vnitrobuněčné smyčce α podjednotky mezi TM4 a TM5 a vazebné místo pro ouabain je na extracelulárních smyčkách. Extracelulární C-konec β podjednotky je silně glykosilován.

2.2 Regulace aktivity a množství Na⁺/K⁺ ATPázy v lymfocytech

Na lymfocyty mohou působit látky, které ovlivňují jejich aktivitu. Mezi tyto látky patří například hormony, růstové faktory nebo cytokiny. Na jejich vliv buňka reaguje změnou aktivity nebo množství Na⁺/K⁺ ATPázy na plazmatické membráně. Krátkodobá

regulace spočívá ve změně aktivity Na^+/K^+ ATPázy, dále pak následuje přesun Na^+/K^+ ATPázy z vnitrobuněčných rezerv. (Kaplan a kol., 1978; Moolenaar a kol., 1986; Rozengurt a kol., 1986; Prasad a kol., 1987; Grinstein a kol., 1989, Karitskaya a kol., 2010)



Obrázek1: Schematické znázornění Na^+/K^+ ATPázy (extracelulární prostor je na horní straně obrázku). Pod písmenem A je znázorněna α podjednotka s 10 transmembránovými úseky. Písmenem B je označena β podjednotka. Na její extracelulární smyčce jsou tmavšími ovály naznačena glykosylovaná místa. (převzato a upraveno z Kaplan a kol., 2002)

Mitogen přidaný do média kultivovaných buněk způsobí přechod buněk z klidového stavu do stavu mitoticky se dělících buněk. Tento přechod je doprovázen postupným zvyšováním transportu draselných iontů do buněk. Zmíněný vzestup byl pozorován na tkáňových kulturách z buněk vaječníku čínského křečka (CHO) (Marakhova a kol., 1989) a také na lidských lymfocytech (Marakhova a kol., 1998).

Zvýšený transport draselných iontů byl navržen jako indikátor transformace buněk v maligní fenotyp. (Rosoff a Cantley, 1985; Rozengurt a kol., 1986) Ukázalo se, že ouabain (specifický inhibitor Na^+/K^+ ATPázy) snižuje reversibilním způsobem dělení lidských lymfocytů pěstovaných v primární tkáňové kultuře. (Dornand a kol., 1986; Brodie a kol., 1995) Tyto studie prokazují, že regulace Na^+/K^+ ATPázy hraje významnou roli v buněčném dělení a růstu lymfocytů.

Dále se zjistilo na mitogenem stimulovaných lymfocytech, že interleukin-2 (dále IL-2) zvyšoval expresi α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy při přechodu buněk z klidového stavu do proliferujícího. (Marakhova a kol., 2005) Později tento tým zjišťoval změny Na^+/K^+ ATPázy na periferních lymfocytech stimulovaných mitogenem fytohemagglutinin (dále PHA). Byla měřena rychlost transportu sodíkových a draselných iontů, vazba radioaktivně značeného (^3H)-ouabainu, změny množství α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy („Western blot“) a mRNA Na^+/K^+ ATPázy. Po inkubaci lymfocytů po dobu 48 hodin a stimulaci PHA byl potvrzen nárůst Na^+/K^+ ATPázy všemi výše zmíněnými metodami. Pro expresi Na^+/K^+ ATPázy byla také důležitá přítomnost IL-2. (Karitskaya a kol., 2010)

2.3 Imunitní systém

Imunitní systém je jedním z homeostatických mechanismů organismu, jehož základní funkcí je udržovat organismus v optimálním stavu. Tento systém je schopen chránit organismus proti patogenním mikroorganismům, jejich toxickým produktům a řadě dalších škodlivých látek. Mechanismus, kterým je imunitní systém schopen tuto funkci provádět, lze charakterizovat jako schopnost rozeznat škodlivé faktory od neškodlivých. Tyto faktory mohou přicházet do organismu jednak z vnějšího prostředí a jednak je imunitní systém schopen rozlišit vnitřní škodlivé faktory, rakovinné buňky nebo jinak poškozené buňky.

2.3.1 Antigeny

Antigeny jsou látky, na které imunitní systém reaguje a rozpoznává je. Můžeme je rozdělit na exoantigeny a autoantigeny. První zmíněné jsou látky cizorodé a druhé zmíněné jsou látky z vlastního organismu. Imunitní systém dokáže rozlišovat tyto antigeny a buď je tolerovat, nebo proti nim spustit imunitní odpověď. Antigeny mohou být rozmanité chemické struktury, které jsou rozpustné ve vodě, nebo vázány na povrch buněk. Příkladem silných antigenů jsou proteiny, polysacharidy nebo glykoproteiny.

Takové látky mohou vyvolávat silnou imunitní odpověď. (shrnutí v Messina a kol., 2019)

2.3.2 Lektiny

Lektiny jsou proteiny, které specificky váží sacharidové struktury. Mezi nejvýznamnější patří již zmíněný fytohemagglutinin (PHA), „pokeweed“ mitogen (PWM) a konkanavalin A (ConA). (shrnutí v Sharon a Lis, 1972) Tyto látky byly izolovány z rostlin. Některé z izolovaných lektinů se vážou na sacharidové komponenty membránových glykoproteinů a mohou, dojde-li k překřížení několika struktur, působit jako polyklonální mitogeny. Tuto funkci umožňuje jejich „valence“. Monovalentní lektiny jsou nemitogenní. Byla identifikována celá řada membránových antigenů, které reagují s rostlinnými lektiny. PHA, tetra- a hexavazebný glykoprotein složený ze dvou podjednotek, reaguje se společným antigenem leukocytů CD45. Na stejný membránový antigen se také váže konkanavalin A. (Monostori a kol., 1994)

Concanavalin A, lektin izolovaný z *Canavalia ensiformis* lze použít jako metodický nástroj pro indukci výrazné mitogenní odpovědi u lymfocytů a následně sledovat změny ke kterým v těchto buňkách dochází po tomto typu stimulace. (Fecho a kol., 1994; Miller a kol., 1996; Cechova a kol., 2018; Ujcikova a kol., 2020).

2.3.3 Části imunitního systému

Reakce imunitního systému probíhají s pomocí mnoha různých typů buněk a molekul. Buňky imunitního systému spolu s pojivovými buňkami tvoří funkční a anatomické celky – lymfatickou tkáň a lymfatické orgány. *Primárními* lymfatickými orgány jsou kostní dřeň a thymus (brzlík), protože v těchto orgánech probíhá tvorba, diferenciace a zrání buněk imunitního systému. Mezi *sekundárními* lymfatickými orgány patří slezina, lymfatické uzliny, jejich organizované shluky (tonzily, Peyerovy plaky ve střevě) a mukózní lymfatická tkáň (sliznice ústní dutiny, střev, pochvy). Sekundární lymfatické orgány jsou místem, kde probíhají hlavní fáze antigenně specifických imunitních reakcí. (Rooijen, 1972)

2.3.4 Buňky imunitního systému

Buňky, které provádějí imunitní odpověď organismu, jsou *bílé krvinky* (leukocyty). Všechny typy leukocytů pocházejí z kmenových buněk, které jsou přítomny v kostní dřeni, v malém počtu zde existují po celý život a mají schopnost *pluripotence*, jsou tedy schopné diferencovat do všech tříd leukocytů. Diferenciace kmenových buněk probíhá

nejprve do dvou základních linií, myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie vznikají *monocyty*, které cirkulují v krvi a ve tkáních tvoří *makrofágy*. Dále z myeloidní linie vznikají tři druhy granulocytů: *neutrofilů*, *eozinofilů* a *bazofilů*. Tkáňovou formou bazofilů jsou *mastocyty* neboli žírné buňky. Dalšími typy buněk, které vznikají z myeloidní linie, jsou *dendritické buňky*, *erytrocyty* a *trombocyty*. (shnuto v Maddaly a kol., 2010)

Z lymfoidní linie se diferencují buňky NK („natural killer cells“) a lymfocyty B a T. Vývoj B lymfocytů probíhá v kostní dřeni a dokončuje se po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. V konečné vývojové fázi (*plazmocyty*), B lymfocyty produkují protilátky.

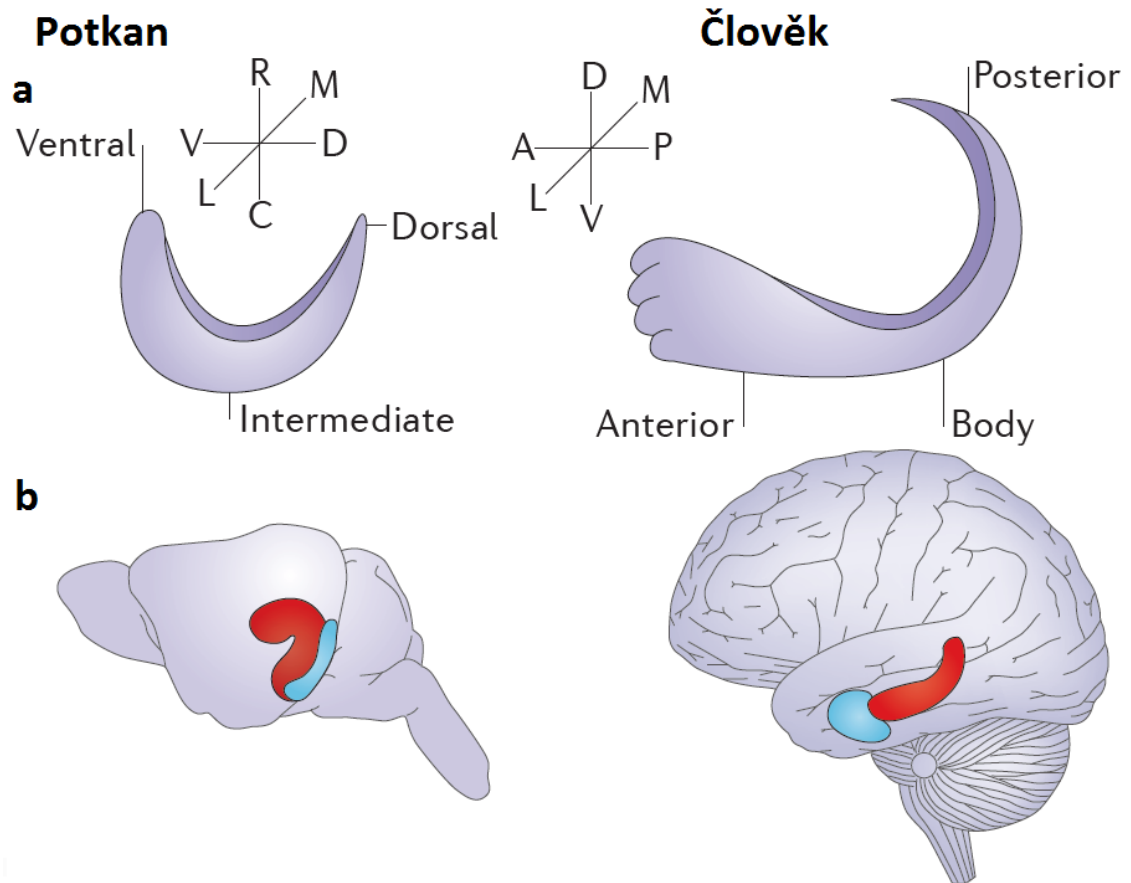
Hlavní část vývoje T lymfocytů probíhá v brzlíku s tím, že z brzlíku odchází dvě hlavní, fenotypicky rozlišitelné sub-populace. Jednak prekurzory pomocných T_H buněk (*helper cells*) jednak prekurzory cytotoxických buněk (T_c). Třetí hlavní sub-populací T lymfocytů jsou NK buňky („natural killer cells“). (shnuto v Maddalay a kol., 2010)

2.4 Změny množství Na⁺/K⁺ ATPázy v mozku vlivem stresu vyvolaného REM spánkovou deprivací

Ve spánku můžeme zaznamenat fáze doprovázené rychlými pohyby očí (dále REM fáze) a non-REM fáze. Obě tyto fáze jsou důležité pro konsolidaci paměti a navození správné excitability mozku spojené s noradrenergním systémem. Pro výzkum významu REM spánku se provádí na experimentálních zvířatech REM spánková deprivace (SD). Tento model slouží pro výzkum konsolidace paměti (Havekes a kol., 2016) a psychických chorob (alzheimer, bipolární porucha, deprese, drogová závislost). (shrnuto v Colavito a kol., 2013; Andrabi a kol., 2020; Puhl a kol., 2009) Je známo že REM spánková deprivace navyšuje množství Na⁺/K⁺ ATPázy, jak potvrzují četné studie. (Gulyani a Mallick, 1993; Mallick a Adya, 1999; Majumdar a kol., 2003)

2.5 Struktura a lokalizace hipokampu

Hipokampus je lokalizován v mediálním spánkovém laloku mozku (obrázek 2). Jeho lokalizace je stejná u potkana i člověka. (shrnuto v Strange a kol., 2014)



Obrázek 2: Umístění hipokampů v mozku potkana a člověka je analogické. Podélná osa hipokampu potkana je orientována ventro-dorzálně a člověka antero-posteriorní. Zdánlivý rozdíl je způsoben rozdílným názvoslovím v anatomii potkanů a člověka (převzato a upraveno podle Strange a kol., 2014)

Hipokampus je část tzv. limbického systému (název odvozen od latinského *limbus* – hranice), části mozku, která přímo sousedí a navazuje na mozkovou kůru (kortex). Kromě hipokampu zahrnuje tato část části CNS (*cingulate cortex*, *olfactory cortex*, *amygdala*). V místě kontaktu mezi kůrou a hipokampem, dochází ke ztenčení kůry, která je v ostatních částech mozku tvořena 6-7 vrstvami neuronů, na 3-4. Distribuce neuronů a nervové dráhy, které je propojují, jsou velmi podobné u všech savců.

Důležitou vlastností hipokampu je, že v tato část mozku si uchovává proliferační aktivitu neuronů i dospělosti. Proces *neurogeneze* probíhá v části hipokampu, která se nazývá “dentate gyrus”. Proces neurogeneze může být pozitivně ovlivněn aktivním cvičením (pacienti po mozkové mrtvici), nebo negativně opakovanými epileptickými záchvaty. (Pilz a kol., 2018)

U lidí, kteří byli vystaveni dlouhodobému traumatickému stresu, dochází k atrofii hipokampu ve větší míře než v ostatních částech mozku. (Lee a kol., 2019) K těžké

degradaci struktury a funkce hipokampu dochází rovněž při Alzheimerově chorobě (Josephs a kol., 2017) a dalších formách demence, kdy dochází ke ztrátě krátkodobé paměti a ztrátě prostorové orientace. (Wiest a kol., 2000) K poškození funkce hipokampu dochází rovněž při hypoxii, encefalitidě (zánětu mozku) (Miller a kol., 2017) a různých formách epilepsie. (Shih a kol., 2017)

2.6 Receptory pro opioidy

Opiáty jako je například morfin, kodein nebo heroin se vážají na receptory pro opiaty (OR). Dělí se do 3 skupin μ -OR, δ -OR a κ -OR a jsou přítomny v centrálním nervovém systému i ve většině ostatních orgánů savců. (Wittert a kol., 1996) Podle Cechova a kol., 2018 byly na slezinných lymfocytech myši v malé míře detekovány κ -OR. Zbylé dva typy receptorů μ -OR a δ -OR se na membránách lymfocytů objevily až po stimulaci konkanavalinem A.

OR mají 7 TM úseků, N-konec směřuje do extracelulárního prostředí a C-konec je orientován intracelulárně. Extracelulární smyčky jsou silně glykosylovány. Jedná se o GPCR, které stimulují inhibiční G_i proteiny. Tím snižují aktivitu adenylátcyklázy. (Koehl a kol., 2018)

3 Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv různých faktorů na množství Na^+/K^+ ATPázy ve vzorcích připravených z lymfocytů potkana pěstovaných v primární tkáňové kultuře a z hipokampu potkana. Množství Na^+/K^+ ATPázy bylo stanovováno metodou „Western blot“ za požití polyklonálních a polyklonálních protilátek. Pro stanovení byly použity vzorky ve formě postnukleárního supernatantu a membránové frakce. Uspořádání experimentů bylo následovné:

- Stanovení změny množství Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech ze sleziny potkana pěstovaných 48 hodin v primární tkáňové kultuře v přítomnosti morfinu.
- Stanovení změny množství Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech ze sleziny potkana pěstovaných 48 hodin v primární tkáňové kultuře v přítomnosti konkanavalinu A.
- Stanovení změny množství Na^+/K^+ ATPázy v hipokampu potkanů vystavených 72 hodinové spánkové deprivaci

4 Materiál

Roztoky

- Fosfátový pufr (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 2mM KH₂PO₄, H₂O
- Médium RPMI 1640, R8758, Sigma-Aldrich
- Fetální telecí sérum (FCS), 10270, Gibco
- Ficoll-Paque PLUS, 17–1440-02, GE Healthcare
- TEM pufr: 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA
- STEM pufr: 1M Tris-HCl (pH 7,6), 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,25M sacharóza
- COMPLETE: inhibitory proteas, (tableta), Rocher Diagnostic
- TE pufr: 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA, pH 7.6
- Roztok A: 2% Na₂CO₃, 0,1 M NaOH
- Roztok B: 2% vlnan sodno-draselný
- Roztok C: 1% CuSO₄ · 5 H₂O
- Folin-Ciocalteu fenolové reagens, Sigma
- 30% Ac-Bis: 30 g akrylamid, 0,8 g N, N' – metylen bisakrylamid, doplnit do 100 ml vodou
- Elektroforetický pufr (10x koncentrovaný): 30,3 g Tris-HCl, 141,1 g Glycin, 10 g SDS, doplnit do 1000 ml vodou
- Vzorkový pufr: 2,4 ml 1M Tris-HCl (pH = 6,8), 1 ml glycerol, 0,8 g SDS, 0,8 g DTT, 1 mg bromfenolová modř, doplnit do 10 ml vodou
- Přenosový pufr: 15 g Tris-HCl, 72 g Glycin, 1,25 g SDS, 1000 ml metanol, doplnit do 5000 ml vodou
- Blokovací pufr: 2,5 g sušené mléko, 5 ml TBS pufr (10x koncentrovaný), 50 μl Tween 20, doplnit do 50 ml vodou
- TBS pufr (10x koncentrovaný, pH = 8,0): 84,1 g NaCl, 11,6 g Tris-HCl, doplnit do 960 ml vodou
- Ředící pufr: 0,5 g sušené mléko, 5 ml TBS pufr (10x koncentrovaný), 50 μl Tween 20, doplnit do 100 ml vodou
- Promývací pufr: 3 ml Tween 20, 100 ml TBS pufr (10x koncentrovaný), doplnit do 1000 ml vodou

Složení gelů pro elektroforézu

- Gel elektroforetický separační: 8 ml voda MILI-Q, 5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8), 6,7 ml 30% Ac-Bis, 200 μ l 10% SDS, 135 μ l 10% APS, 12 μ l TEMED
- Gel elektroforetický zaostřovací: 6 ml voda MILI-Q, 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8), 1,3 ml 30% Ac-Bis, 100 μ l 10% SDS, 135 μ l 10% APS, 12 μ l TEMED

Přístroje a příslušenství

- Centrifuga Univesal 320R, rotor 1619, HETTICH ZENTRIFUGEN
- Inkubátor CO₂ SANYO
- Ultracentrifuga Beckman Optima XL-100K, úhlový rotor Beckman Ti 70.1.
- Homogenizátor IKA RW 20
- Sonikátor SONOPLUS, Bandelin Electronic
- Vortex, MS1 Minishaker, IKA
- Aparatura pro nalévání gelů BioRad
- Zdroj napětí pro elektroforézu BioRad POWER PAC 200
- Sada pro elektroforézu BioRad Mini-PROTEAN Tetra System (elektroforéza, „Western blot“)
- Autoradiografická kazeta, Hypercassette RPN 13642, 18 x 24 cm, Amersham Biosciences UK
- Laboratorní třepačka MiniMix, Labnet
- Vyvolávací přístroj OPTIMAX X-Ray Film Processor, Optimax
- Skener EPSON PERFECTION 4990 PHOTO
- Spektrofotometr: BioPhotometer plus, Eppendorf

Materiál

- Morfin: Morfin-sulfát, Senca pharmaceuticals
- Konkanavalin A, C2272, Sigma-Aldrich
- Nitrocelulózová membrána, Amersham Portman 0,2 μ m NC, GE Healthcare Life science
- Film 13x18 (Medical X-Ray film blue), Agfa
- Standard molekulových hmotností (SDS7B2), Sigma-Aldrich

- Chemiluminiscenční substrát s křenovou peroxidasou, SuperSignal® West DURA, Thermo Scientific Pierce

Nástroje a laboratorní vybavení

- Skalpel, nůžky, pinzeta
- Skleněný homogenizátor, ruční, sklo-teflon
- Bürkerova komůrka
- Zkumavky, kádinky, stojan na zkumavky
- Skla, pipety, mikrozukavky

Protilátky

- Primární protilátka: Na⁺/K⁺ ATPase α (H-3), sc-48345, myší monoklonální, proti α 1 podjednotce Na⁺/K⁺ ATPasy (100-113 kDa), Santa Cruz Biotechnology
- Primární protilátka: Na⁺/K⁺ ATPase α (H-300), sc-28800, králičí polyklonální, proti α 1 podjednotce Na⁺/K⁺ ATPasy (100-113 kDa) Santa Cruz Biotechnology
- Primární protilátka: Actin (I-19), sc-1616, ovčí polyklonální, proti C-konci aktinu (43 kDa), Santa Cruz Biotechnology
- Primární protilátka: β -Actin (C4), sc-47778, myší monoklonální, proti C-konci β 1-aktinu (43 kDa) Santa Cruz Biotechnology
- Sekundární protilátka: m-IgG κ BP-HRP, sc-516102, konjugát s křenovou peroxidázou, pro myší monoklonální primární protilátky, Santa Cruz Biotechnology
- Sekundární protilátka: goat anti-rabbit IgG-HRP, sc-2004, konjugát s křenovou peroxidázou, pro králičí a ovčí polyklonální primární protilátky, Santa Cruz Biotechnology

5 Metody

Pro experimenty byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar, vážící okolo 200 g. Potkani byli ustájeni na oddělení chovu zvířat FGU AV ČR za následujících podmínek: teplota 22°C, vlhkost 50%, světelný režim 12/12h světlo/tma, přístup k potravě a vodě *ad libitum* (dále standardní podmínky).

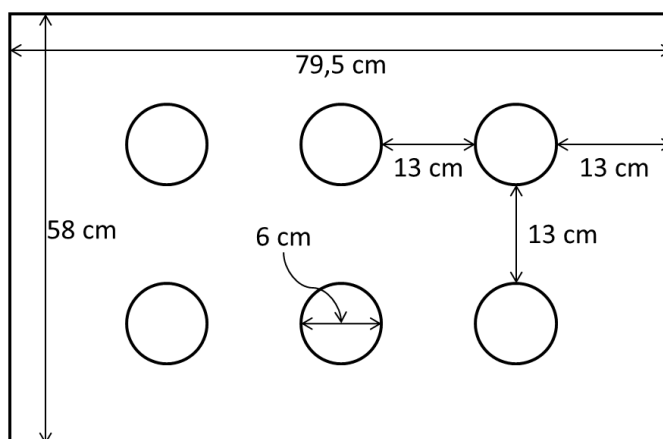
5.1 Spánková deprivace

Samci potkana kmene Wistar byli 3 dny ponecháni v klecích po 3 jedincích z důvodu aklimatizace. Po jejím uplynutí byli náhodně rozděleni do 6 skupin (C1-SD, C1+SD, C7-SD, C7+SD, C28-SD, C28+SD). Potkani byli ponecháni 1-, 7- nebo 28 dní ve standardních podmínkách (viz tabulka 1) a poté následovala u poloviny skupin spánková deprivace (SD).

Název skupiny	Počet dní ve standardních podmínkách	Následující postup
C1-SD	1	3 dny - standardní podmínky
C7-SD	7	
C28-SD	28	
C1+SD	1	3 dny - spánková deprivace
C7+SD	7	
C18+SD	28	

Tabulka 1. Popis jednotlivých skupin použitých zvířat

Spánková deprivace byla prováděna ve speciálně upravené aparatuře. Jedná se o plastovou nádobu obdélníkovitého půdorysu, která obsahuje 6 vyvýšených kruhových plošin. Aparatura je naplněna vodou asi 1 cm pod okraj plošin. Rozmístění plošin je zaznamenáno na obrázku 1. Pokud potkani umístění na plošiny upadnou do REM fáze spánku, neudrží rovnováhu a spadnou do vody. Tato stresová zkušenost u nich následně vyvolala stav „polo-spánku“, či „non-REM spánku“, ve kterém se již udrželi na platformách.



Obrázek 1. Půdorys aparatury pro provádění spánkové deprivace

Spánková deprivace probíhala 3 dny, zatímco kontrolní skupiny byly ponechány v původních klecích. V každé ze 6 skupin (C1-SD, C7-SD, C28-SD, C1+SD, C7+SD, C28+SD) byli 3 potkani, tedy celkem 18 zvířat. Experiment trval pro jednotlivé skupiny rozdílnou dobu. Skupina C1+SD po 1 dnu ve standardní kleci absolvovala 3 dny spánkové deprivace, dohromady 4 dny. Skupina C7+SD po 7 dnech ve standardní kleci absolvovala 3 dny spánkové deprivace, dohromady 10 dní. Skupina C28+SD po 28 dnech ve standardní kleci absolvovala 3 dny spánkové deprivace, dohromady 31 dní. Po skončení experimentu byla zvířata usmrcena a byly jim odebrány potřebné vzorky.

5.2 Zabití zvířat a izolace potřebných tkání

Pro první část experimentů této práce byly použity výše uvedené skupiny potkanů (C1-SD, C7-SD, C28-SD, C1+SD, C7+SD, C28+SD). Z mozků těchto zvířat byl separován hippokampus. Pro druhou část experimentů byla použita zvířata chovaná ve standardních podmínkách. Z těchto zvířat byly odebrány sleziny, z nich izolovány lymfocyty, které byly následně pěstovány v inkubačním médiu pro primární tkáňové kultury. Do média primárních kultur byl pak přidáván morfin nebo konkanavalin A.

5.3 Příprava vzorků hippokampu.

Hipokampus byl izolován z potkanů skupin C1-SD, C1+SD, C7-SD, C7+SD, C28-SD a C28+SD. Do nádoby s ledem byla vložena kovová destička vychlazená na -20°C , která byla pokryta sterilním filtračním papírem namočeným ve vychlazeném ve fosfátovém pufru (dále PBS). Zvířata byla zabita dekapitací pod etherovou narkózou a byl jim co nejrychleji vyjmut mozek. Mозek byl promyt od zbývající krve vychlazeným PBS a položen na připravenou destičku, kde byla provedena izolace hipokampu. Takto

získaná tkáň byla zamrazena do tekutého dusíku a uchovávána při -80°C v mrazicím boxu do dalšího zpracování.

5.4 Izolace lymfocytů

Potkan byl pod etherovou narkózou usmrčen dekapitací a následně byla odebrána slezina. Slezina byla ihned přenesena do zkumavky s RPMI 1640 médiem (5% FCS) kde očištěna a přenesena do nové zkumavky, která obsahovala 2 ml čerstvého média (RPMI 1640, 5% FCS). V této zkumavce byla rozstříhána na malé kousky. Výsledný obsah byl převeden do ručního skleněného homogenizátoru a doplněn do přibližně 6 ml média RPMI 1640 + 5% FCS. Homogenizace byla prováděna po dobu ≈ 5 minut. Homogenát byl následně filtrován přes sterilizované síto do centrifugační zkumavky (15 ml). Homogenizátor byl opláchnut ještě 3 ml média (RPMI 1640, 5% FCS) a oplach byl také přefiltrován přes síto do centrifugační zkumavky. Zkumavka byla centrifugována 11 minut na 170 G při 22°C . Po odsátí většiny supernatantu bylo přidáno 8 ml média (RPMI 1640, 5% FCS) a sediment byl suspendován.

Do dvou centrifugačních zkumavek (15 ml) s 3 ml Ficollu, temperovaných na 18°C , byly opatrně naneseny 4 ml vzniklé suspenze. Obě zkumavky byly centrifugovány 35 minut na 800 G při 18°C . Ze zkumavek byla odsáta část vrchní vrstvy, poté byla odsáta vrstva s lymfocyty na rozhraní Ficollu. Lymfocyty byly přeneseny do centrifugační zkumavky (50 ml) s 5 ml média (RPMI 1640 + 5% FCS). Obsah zkumavky byl doplněn do 20 ml médiem (RPMI 1640 + 5% FCS). Poté byly buňky 3x centrifugovány podle následujícího postupu.

Zkumavka byla centrifugována 11 minut na 170 G při 22°C . Byl odsát supernatant a sediment byl suspendován ve 20 ml média RPMI 1640 + 5% FCS. Po poslední centrifugaci byl sediment suspendován v 6 ml média RPMI 1640 + 5% FCS a bylo provedeno počítání buněk v Bürkerově komůrce.

Po zjištění počtu buněk v suspenzi, bylo připraveno 3x3 kultivačních lahví (75 cm^2). Do první trojice bylo pipetováno 6,6 ml média RPMI 1640 + 5% FCS (Nat). Do druhé trojice kultivačních lahví byl přidán koncentrovaný roztok morfia na výslednou koncentraci 10^{-5} M (Mor). Do třetí trojice inkubačních lahví byl přidán konkanavalin A na výslednou koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ (ConA). Do každé kultivační lahve bylo přidáno přibližně 11×10^6 lymfocytů. Lahve byly následně přeneseny do CO_2 inkubátoru, kde se inkubovaly při 37°C po dobu 48 hodin. Po inkubaci byly všechny skupiny lymfocytů

sklizeny. Trojice inkubačních lahví v rámci jednotlivých skupin (Nat, Mor a ConA) byly spojeny dohromady a centrifugovány.

Nejprve byla centrifuga vychlazena na 6°C. Do ledové lázně byly připraveny centrifugační zkumavky (50 ml) a PBS v kádince. Inkubační lahve byly vyjmuty z inkubátoru a buněčná suspenze byla pomíchána jemným potřepáním. Z každé skupiny byl odebrán vzorek (50 µl) pro počítání buněk v Bürkerově komůrce. Obsah lahví byl přepipetován do připravených centrifugačních zkumavek (50 ml) a lahve byly opláchnuty 5 ml PBS, který byl také pipetován do zkumavek. Zkumavky byly centrifugovány 11 minut při 6°C a 240G. Po slítí supernatantu byly sedimenty suspendovány v 2-5 ml PBS a suspenze pro každou skupinu individuálně (Nat, Mor a ConA) byly spojeny do jedné centrifugační zkumavky. Objem takto vzniklých zkumavek byl doplněn na 25 ml PBS a byla provedena další centrifugace (11 minut, 6°C, 240G). Sedimenty byly opět po slítí supernatantu suspendovány ve 2-5 ml PBS, doplněny na 25 ml PBS a naposledy centrifugovány (11 minut, 6°C, 240G).

Vzniklé sedimenty byly suspendovány v malém množství (100-200 µl) TEM pufru s inhibitory proteáz (complete 1x, PMSF 1mM) a vzniklá suspenze byla přenesena do mikro-zkumavek (1,5 ml). Dno centrifugační zkumavky bylo opláchnuto asi 100 µl TEM pufru s inhibitory proteáz. Z mikro-zkumavky byl odebrán vzorek pro stanovení množství proteinů (Lowry) a zbylá suspenze byla zamražena do tekutého dusíku a uchovávána v mrazicím boxu při -80°C.

5.5 Příprava subcelulárních frakcí

Stanovení množství Na⁺/K⁺ ATPázy metodou „Western blot“ bylo provedeno v subcelulárních frakcích post nukleárního supernatant (PNS) a membránová frakce (MF). Z lymfocytů byly připraveny obě zmiňované frakce.

Pro stanovení Na⁺/K⁺ ATPázy ve vzorcích z hipokampu byla připravena pouze membránová frakce, MF. Veškerá práce se vzorky PNS a MF probíhala za neustálého chlazení na ledové lázni.

5.6 Příprava post nukleárního supernatantu (PNS) z lymfocytů.

Vzorky v TEM pufru byly rozmrazeny na ledu, suspenze byla přenesena do homogenizátoru a doplněna na objem přibližně 2 ml TEM pufrům. Dále byl přidán PMSF (1mM) a inhibitory proteáz ředěné 50x v pufru STEM. Homogenizace byla

provedena v homogenizátoru teflon-sklo 7 minut při 1360 RPM (IKA RW 20). Homogenát byl přenesen do nové mikro-zkumavky, homogenizátor opláchnut TEM pufrem s inhibitory proteáz a slit do mikro-zkumavky. Následovala sonikace 3 x 1 sekundu při nízké hladině výkonu s mezičasy pro chlazení o délce 20 sekund. Vzorby byly centrifugovány 7 minut při 500 G (4°C), čímž došlo k sedimentaci jaderné frakce buněčné suspenze. Post nukleární supernatant byl rozdělen na dvě části. První část byla odpipetována, převedena v aliquotech 150 µl do mikro-zkumavek, odebrán vzorek pro stanovení obsahu proteinů (Lowry), zamražena do tekutého dusíku a uschována pro při -80 °C.

5.7 Příprava membránové frakce (MF) z lymfocytů

Post nukleární frakce lymfocytů byla rozmražena na ledu a přenesena do homogenizátoru teflon-sklo. Objem byl doplněn na 2 ml STEM médiem a homogenizace probíhala 7 minut při 1800 RPM. Homogenát byl převeden do centrifugační zkumavky a centrifugován 7 minut při 1200 G pro oddělení nukleární frakce od zbytku homogenitu.

PNS byl převeden do nové centrifugační zkumavky a centrifugován 30 minut při 200000 G. Po odsátí supernatantu byl sediment suspendován v TE pufru, odebrán vzorek pro stanovení bílkovin a nakonec byl vzorek opět zamražen do tekutého dusíku a uchováván při -80°C pro další měření.

5.8 Příprava membránové frakce z hippokampu.

Vzorby PNS hippokampů byly rozmraženy na ledu a následující postup probíhal zcela identický s přípravou MF z lymfocytů.

5.9 Stanovení bílkovin metodou dle Lowryho

Obsah bílkovin ve vzorcích byl stanoven standardně podle Lowryho. (Lowry a kol., 1951) Vzorby byly měřeny vždy v triplicátu. Naměřená data byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism 5. Z průběhu kalibrační křivky byl odvozen polynom druhého stupně ($y = ax^2 + bx + c$). Z naměřených absorbancí pro jednotlivé vzorky byla pomocí získaného polynomu vypočítána koncentrace bílkoviny. Ze 3 koncentrací pro každý vzorek byl vypočten aritmetický průměr.

5.10 Dělení a detekce proteinů metodou „Western blot“

Následující postup popisuje přípravu a práci se dvěma gely. Skla pro nalévání gelů byla umyta destilovanou vodou, denaturovaným lihem, otřena acetonem a vložena do stojanu pro odlévání gelů. Byl připraven roztok pro přípravu separačního gelu (30% Ac-Bis: 30 g akrylamid, 0,8 g N, N' – metylen bisakrylamid) a nakonec přidáno APS a TEMED. Po napipetování takto připraveného roztoku mezi skla aparatury Mini-Protean II byly gely převrstveny směsí butanolu s vodou (1:4). Gely byly ponechány 60 minut v klidu. Butanol s vodou byl z gelů opláchnut destilovanou vodou. Předem připravený zaostřovací gel byl nalit až po okraj skel a následně byly zasazeny „hřebínky“ pro vytvoření 10 jamek (1 – 10). Gely byly ponechány 25 minut v klidu.

Mezitím bylo připraveno 900 ml elektroforetického pufru (1x koncentrovaný), aparatura pro elektroforézu a vzorky. Vzorky byly rozmrazeny na ledu a byla změřena koncentrace proteinů podle Lowryho. Vzorky byly poté naředěny na stejnou koncentraci a byl k nim přidán vzorkový pufr v poměru vzorek/pufr = 0,75/0,25. Následně byly vzorky zahřáty na termobloku na 100°C po dobu 3 minut. Vzorky byly vráceny na led. Z gelů byl odstraněn „hřebínek“ a jamky byly opláchnuty destilovanou vodou. Gely byly umístěny do aparatury pro elektroforézu a zality částí elektroforetického pufru. Do jamky 1 bylo pipetováno 10 µl standardu molekulových hmotností. Do jamek 2-5 byl pipetován kontrolní vzorek (pro lymfocyty Nat, pro hippocampus C1-SD, C7-SD nebo C28-SD). Do jamek 6-9 byl pipetovány vzorky ovlivněné, tj. pro lymfocyty Mor nebo Con A, pro hippocampus C1+SD, C7+SD a C28+SD. Do jamky 10 bylo pipetováno 3 µl standardu molekulových hmotností. Následně byl do horního rezervoáru nalit elektroforetický pufr a aparatura byla připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala 45 minut při konstantním napětí 200 V.

Po ukončení elektroforetické separace v gelu byla připravena aparatura pro „Western blot“. Gely byly postupně vyjmuty ze skel. Do plastové vany byl nalit přenosový pufr, pod jeho hladinou byl sestaven „sendvič“ (molitan, filtrační papír, gel, nitrocelulózová membrána, filtrační papír a molitan) a v kazetě byl umístěn do aparatury. Do aparatury byl nalit přenosový pufr a byla připojena ke zdroji napětí. „Western blot“ probíhal 60 minut na konstantním napětí 100 V.

Nitrocelulózové membrány byly z aparatury přeneseny do malých plastových vaniček, čelem vzhůru. Membrány byly 3x promyty destilovanou vodou a inkubovány

60 minut s 25 ml blokovacího pufru na laboratorní třepače. Membrány byly opět 3x promyty destilovanou vodou. Následně bylo přidáno 10 ml ředícího pufru a primární protilátka, ředěná podle návodu výrobce. Membrány s primární protilátkou byly ponechány přes noc ve 4°C na laboratorní třepače.

Další den byly membrány promývány 3x za sebou promývacím pufrem dle následujícího postupu. Nejprve byly promyty 3x destilovanou vodou, pak bylo přidáno 15 ml promývacího pufru a vaničky byly ponechány 10 minut na laboratorní třepače. Po promytí bylo přidáno 10 ml ředícího pufru a membrány byly inkubovány 60 minut na laboratorní třepače se sekundární protilátkou, která byla ředěna dle návodu výrobce.

Následně byly membrány 3x promyty destilovanou vodou a promývacím pufrem stejně jako v případě odstranění primárních protilátek (viz. výše) a osušeny mezi dvěma vrstvami filtračního papíru. Na membrány bylo přidáno 800 μ l chemiluminiscenčního substrátu, který se nechal inkubovat 1 minutu. Membrány byly osušeny mezi dvěma vrstvami filtračního papíru, zabaleny do průhledné fólie a vloženy do autoradiografické kazety pro vyvolávání filmu. Do kazety byl v temné komoře vložen film a po vhodné době expozice byl přenesen do vyvolávacího přístroje OPTIMAX.

5.11 Statistické hodnocení výsledků metody „Western blot“

Výsledkem výše popisované metody byly vyvolané filmy (dále imunoblotty), které byly převedeny do elektronické podoby (skener). V programu Aida image analyser byla provedena denzitometrická analýza všech 8 proužků [4 kontrolní a 4 ovlivněné]. Statistická analýza byla provedena s pomocí programu GraphPad Prism 5. Naměřené hodnoty z programu Aida image analyser byly uspořádány 2 dvou skupin: kontrolní a ovlivněné. Z těchto dvou skupin byl vypočten aritmetický průměr a standardní chyba průměru (SEM) a pomocí Studentova T-testu zhodnocena signifikance rozdílu mezi dvěma skupinami. Výsledek byl pak vyneseno do grafu v arbitrárních jednotkách.

6 Výsledky

6.1 Stanovení Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech potkana

První část diplomové práce předkládá výsledky získané při stanovení množství Na^+/K^+ ATPázy ve vzorcích lymfocytů. Lymfocyty, jak už bylo výše zmíněno, byly po izolaci ze sleziny rozděleny do třech skupin a pěstovány 48 h ve tkáňové kultuře (podrobně v sekci Metody, 5.4). Buňky kontrolní (Nat) byly inkubovány 48 hodin v samotném médiu RPMI 1640 + 5% FCS. Buňky ovlivněné morfiem (Mor) byly inkubovány 48 hodin médiu RPMI 1640 + 5% FCS, které obsahovalo 10 μM morfin-sulfátu. Buňky ovlivněné konkanavalinem A (Con A) byly inkubovány 48 hodin médiu RPMI 1640 + 5% FCS, které obsahovalo 10 $\mu\text{g/ml}$ konkanavalinu A.

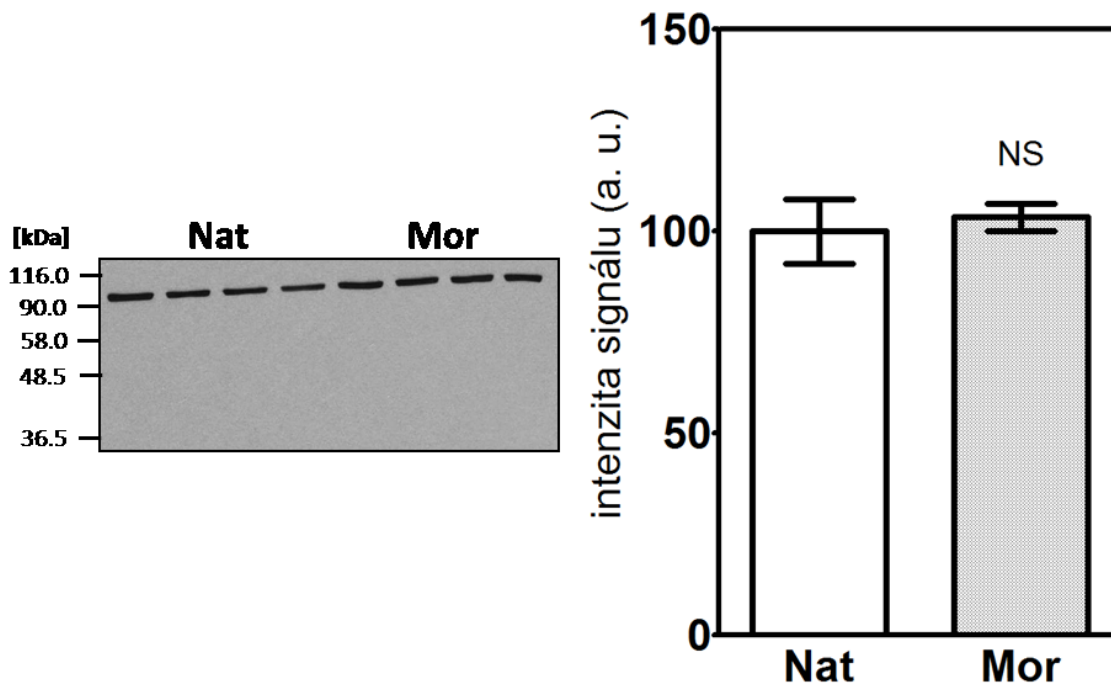
Z lymfocytů byl následně připraven post nukleární supernatant (PNS) a membránová frakce (MF). Dále se experimenty lišily v použití primárních protilátek (polyklonální a monoklonální)

6.2 Vliv morfia na lymfocyty pěstované ve tkáňové kultuře

V této kapitole byla hodnocena skupina, která byla ovlivněna morfiem (Mor). Tato skupina byla srovnávána s kontrolní skupinou (Nat). Z obou skupin byl po kultivaci připraven PNS a pro elektroforézu bylo do jamek gelu nanášeno 10 μg proteinů (do jamek 2-5, vzorky Nat, do jamek 6-9, vzorky Mor). Koncentrace proteinů obou vzorků byla po rozmražení ověřena Lowryho metodou (druhé stanovení) pro co nejpřesnější nanášky pro elektroforézu. Pro stanovení Na^+/K^+ ATPázy byla použita monoklonální primární protilátka Na^+/K^+ ATPase $\alpha(\text{H-3})$, sc-48345, (Santa Cruz). Po navázání sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou proběhla reakce s chemiluminiscenčním substrátem. Výsledná intenzita chemiluminiscenčního záření byla zaznamenána na přiložený film a odpovídala množství Na^+/K^+ ATPázy ve vzorcích Nat a Mor.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno na základě 2 imunoblotů. Každý vzorek byl na jeden imunoblot nanášen do 4 jamek. Dohromady bylo tedy srovnáváno 8 (Nat) a 8 (Mor) individuálních signálů. Rozdíl byl pomocí Studentova t-tesu vyhodnocen jako nesignifikantní, NS ($p > 0.05$). Reprezentativní imunoblot je znázorněn na obrázku 1 vlevo. Je zřejmé, že monoklonální protilátka reagovala s jedinou bílkovinou, jejíž molekulová hmotnost (90-116 kDa) odpovídala dříve publikovaným výsledkům z naší

laboratoře při stanovení α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy v mozku potkana (Ujčíková a spol., 2017; Vosahlikova a spol., 2020).



Obrázek 1. Vliv morfia na lymfocyty ze sleziny potkana.

Levá část: Reprezentativní imunoblot s proužky odpovídajícími molekulové hmotnosti α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy. Použita byla myší monoklonální primární protilátka Na^+/K^+ ATPase α (H-3), sc-48345, Santa Cruz. Srovnávány byly PNS z neovlivněných vzorků (Nat) a ze vzorků ovlivněných morfiem (Mor).

Pravá část: Grafické znázornění relativních množství Na^+/K^+ ATPázy ve vzorcích Nat a Mor, které bylo zjištěno na základě hodnocení 2 imunoblotů.

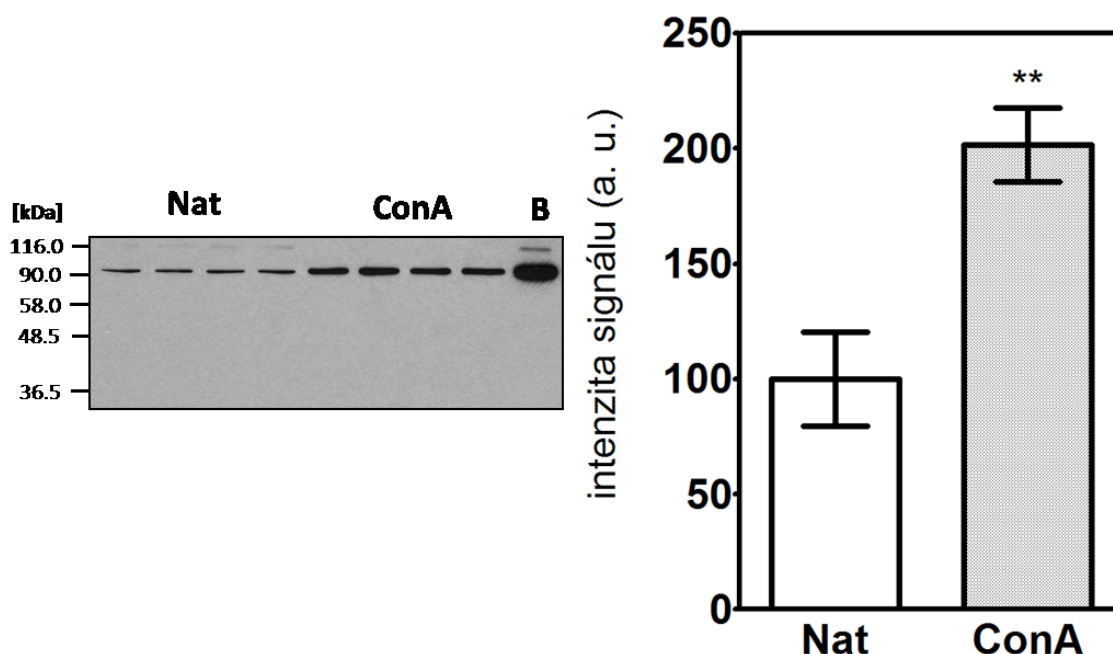
6.3 Stimulace lymfocytů Konkanavalinem A

Další látka, kterou byly lymfocyty v primární kultuře ovlivněny, byl konkanavalin A. Pro detekci Na^+/K^+ ATPázy byly použity jak myší monoklonální protilátky α (H-3), sc-48345, tak králičí polyklonální protilátky α (H-300), sc-28800, Santa Cruz.

6.3.1 Hodnocení s pomocí monoklonálních protilátek

Měření bylo provedeno na PNS získaného z lymfocytů ovlivněných konkanavalinem A (ConA) a z neovlivněných lymfocytů (Nat). Koncentrace proteinů v obou vzorcích byla ještě před elektroforézou ověřena podle Lowryho (druhé stanovení) a do jamek

bylo tudíž nanášeno přesně 10 µg proteinů. Jak je znázorněno na obrázku 2, podobně jako při stanovení vlivu morfia. Monoklonální protilátka reagovala s jedinou bílkovinou, jejíž relativní molekulová hmotnost (90 - 116 kDa) odpovídala α podjednotce Na^+/K^+ ATPázy. Pro statistické hodnocení obsahu α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy byly použity 2 imunoblotty. Rozdíl byl pomocí Studentova t-tesu vyhodnocen jako vysoce signifikantní ($p < 0.01$, **). Grafické vyhodnocení (vpravo) a reprezentativní imunoblot (vlevo) jsou znázorněny na obrázku 2. Výrazný rozdíl v síle proužků /intenzitě signálů mezi oběma vzorky (Nat versus ConA) je patrný pouhým okem. Z tohoto výsledku jednoznačně vyplývá, že stimulace lymfocytů konkanavalinem A vede ke zvýšení obsahu/množství Na^+/K^+ ATPázy v těchto buňkách.



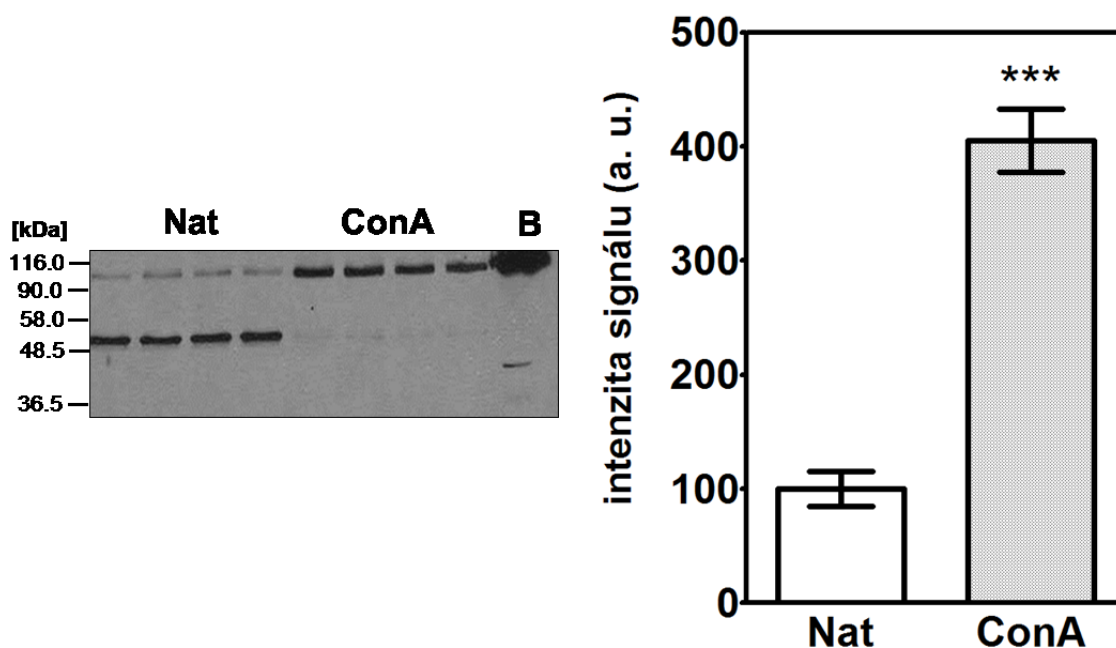
Obrázek 2. Vliv konkanavalinu A na lymfocyty ze sleziny potkana.

Levá část: Reprezentativní imunoblot s proužky odpovídajícími molekulové hmotnosti α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy. Do poslední jamky byl pipetován PNS získaný z mozku potkanů, jako pozitivní kontrola (B). Použita byla **myší** monoklonální primární protilátka Na^+/K^+ ATPase α (H-3), sc-48345, Santa Cruz. Srovnávány byly PNS vzorků neovlivněných (Nat) a vzorků ovlivněných konkanavalinem A (ConA).

Pravá část: Grafické znázornění rozdílu v relativním množství/obsahu Na^+/K^+ ATPázy v těchto vzorcích provedené na základě 2 imunoblotů.

6.3.2 Hodnocení s pomocí polyklonálních protilátek

Ve srovnání s předchozím experimentem byla použita králičí polyklonální protilátka α (H-300), sc-28800, Santa Cruz. Pro měření byl použit jak post nukleární supernatant (PNS), tak membránová frakce (MF), které byly připraveny z lymfocytů pěstovaných v přítomnosti konkanavalinu A. Před elektroforézou byla opět ověřena koncentrace proteinů podle Lowryho ve všech vzorcích a do každé jamky bylo pipetováno 20 μ g proteinů.



Obrázek 3. Vliv konkanavalinu na lymfocyty ze sleziny potkana.

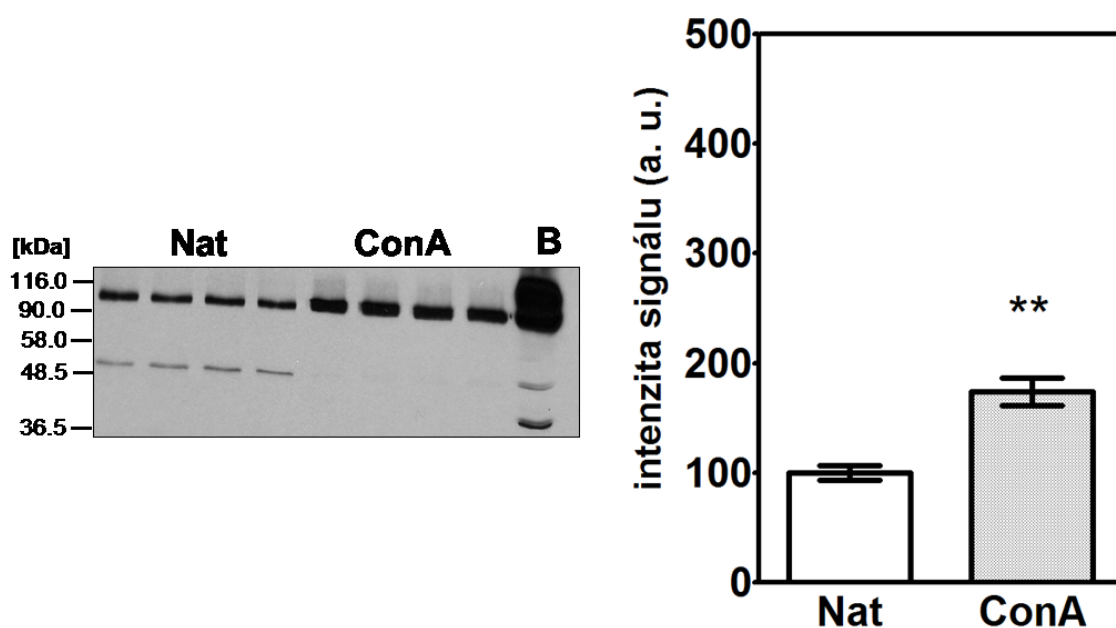
Levá část: Reprezentativní imunoblot pro vzorky PNS. Ve vrchní části imunoblotu se nachází proužky, které svojí molekulovou hmotností odpovídají α podjednotce Na^+/K^+ ATPázy. Okolo molekulové hmotnosti 50 kDa vidíme signál, který interpretujeme jako nespecifický. Písmeno B označuje jamku, do které byl pipetován vzorek mozku, sloužící jako pozitivní kontrola. Srovnávány byly PNS připravené z neovlivněných lymfocytů (Nat) se vzorky ovlivněnými konkanavalinem A (ConA). Použita byla králičí polyklonální protilátka α (H-300), sc-28800, Santa Cruz.

Pravá část: Grafické znázornění statistického hodnocení. Vidíme významný nárůst množství Na^+/K^+ ATPázy v konkanavalinem A stimulovaných lymfocytech. Statistická analýza byla založena na 3 imunoblotech.

Typický imunoblot pro PNS vzorky je znázorněn v levé části obrázku 3. Podobně jako v případě myší monoklonální protilátky, králičí polyklonální protilátka identifikovala signál s relativní molekulovou hmotností 90 - 116 kDa. Tento signál bylo tedy možno jednoznačně přiřadit α podjednotce Na^+/K^+ ATPázy.

V kontrolních vzorcích (Nat), však tato protilátka reagovala ještě s dalším proteinem, jehož relativní molekulová hmotnost byla ≈ 50 kDa. Tento výsledek je možno interpretovat jako nescifickou reakci polyklonální protilátky, což je častý problém při použití protilátek tohoto typu.

Podobné rozložení proužků bylo možno pozorovat i na imunoblotech připravených z membránové frakce MF (obrázek 4, levá část) – tj. proužky odpovídající α podjednotce Na^+/K^+ ATPázy mezi 90 a 116 kDa a nescifický signál s $M_r \approx 50$ kDa, který byl detekován pouze u nestimulovaných lymfocytů.



Obrázek 4. Vliv konkanavalinu A na lymfocyty ze sleziny potkana.

Levá část: Reprezentativní imunoblot pro vzorky MF. Ve vrchní části imunoblotu se nachází proužky, které svojí molekulovou hmotností odpovídají α podjednotce Na^+/K^+ ATPázy. Okolo molekulové hmotnosti 50 kDa vidíme nescificky navázanou primární polyklonální protilátku (podobně jako na obrázku 3). Písmeno B označuje jamku, do které byl napipetován vzorek mozku, sloužící jako pozitivní kontrola. Použita byla králičí polyklonální protilátka α (H-300), sc-28800, Santa Cruz.

Pravá část. Grafické znázornění statistického hodnocení založeného na 3 imunoblotech.

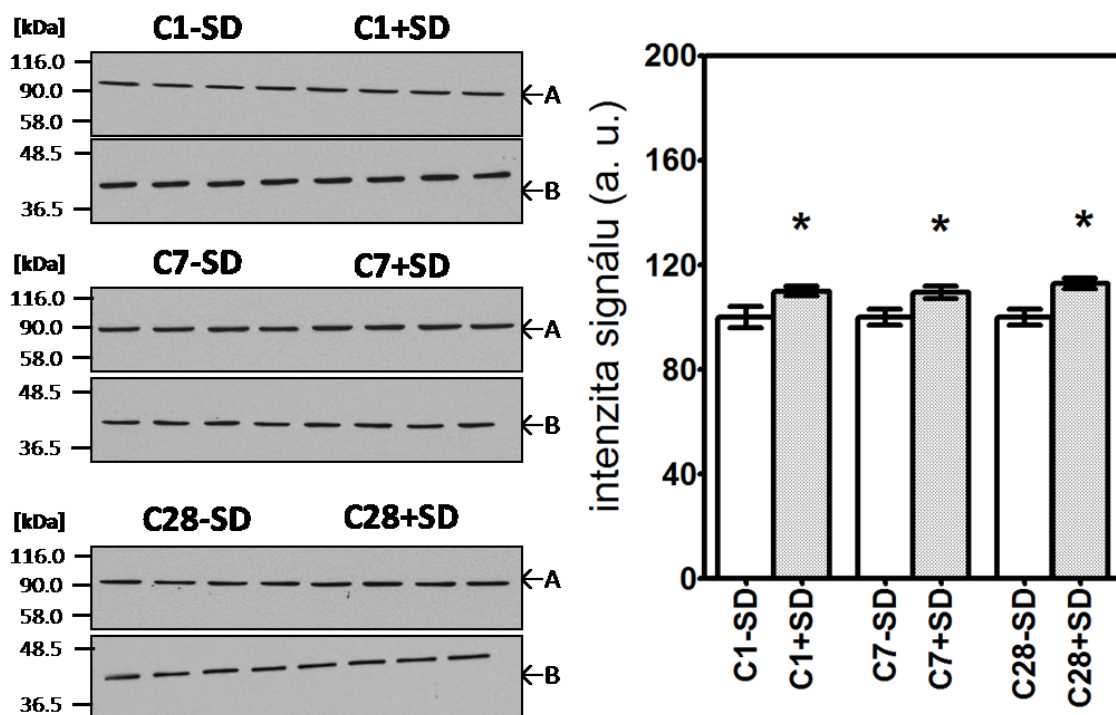
Vyhodnoceny byly vždy 3 imunoblotty jak pro PNS tak pro MF. V obou případech se prokázal signifikantní nárůst Na^+/K^+ ATPázy po stimulaci konkanavalinem A ($p < 0.001$, ***; $p < 0.01$, **). To lze vidět na obrázcích 3 a 4 vpravo.

6.4 Stanovení Na^+/K^+ ATPázy v hipokampu potkana

Stanovení množství Na^+/K^+ ATPázy bylo provedeno v PNS frakci připravené z hipokampů 6 skupin potkanů (C1-SD, C1+SD, C7-SD, C7+SD, C28-SD, C28+SD). Hlavním cílem v těchto pokusech bylo zjistit, jak ovlivňuje spánková deprivace (dále SD) množství Na^+/K^+ ATPázy. Srovnávány proto byly skupiny C1-SD a C1+SD, C7-SD a C7+SD, C28-SD a C28+SD. Koncentrace proteinů jednotlivých vzorků byla před elektroforézou ověřena podle Lowryho a na každou jamku bylo naneseno 20 μg proteinů. Vždy byl do první jamky nanesen standard molekulových hmotností a do dalších 4 kontrolní skupiny (-SD). Na následující 4 jamky byly naneseny PNS ze skupin ovlivněných spánkovou deprivací (+SD). Pro ověření přesnosti pipetování a koncentrace proteinů měřených vzorků byly imunoblotty zhotovovány vždy ve dvojicích. Na prvním imunoblotu byla stanovována α podjednotka Na^+/K^+ ATPázy a na druhém β -Aktin.

Pro detekci α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy byla použita myší monoklonální protilátka Na^+/K^+ ATPase $\alpha(\text{H-3})$, sc-48345, Santa Cruz. Pro normalizaci dat byl použit β -aktin, který byl myší monoklonální protilátkou β -Actin (C4), sc-47778, Santa Cruz. Pro statistickou analýzu každé dvojice (například C1-SD a C1+SD) bylo použito 6 gelů pro Na^+/K^+ ATPázu a 6 gelů pro β -aktin.

Na obrázku 5 vlevo vidíme reprezentativní imunoblotty pro každou dvojici. Jsou zde jasně patrné proužky odpovídající svojí molekulovou hmotností α podjednotce Na^+/K^+ ATPázy (90-116 kDa). Tyto proužky jsou na obrázku označeny: \leftarrow A. Proužky β -aktinu (označené \leftarrow B) byly detekovány při $M_r \approx 40$ kDa. V levé části obrázku 5 je vidět grafické zobrazení statistické analýzy. U každé ze 3 dvojic byl prokázán signifikantní nárůst Na^+/K^+ ATPázy po SD ($p < 0.05$, *). Obsah β -aktinu ve vzorcích se vlivem SD neměnil ($p > 0.05$, NS)



Obrázek 5. Vliv spánkové deprivace na obsah Na^+/K^+ ATPázy ve vzorcích hipokampu potkana.

Levá část: Reprezentativní imunoblot pro dvojice C1-SD versus C1+SD, C7-SD versus C7+SD a C28-SD versus C28+SD. Šipkou ←A jsou označeny proužky, které svojí molekulovou hmotností odpovídají α podjednotce Na^+/K^+ ATPázy (90 – 116 kDa). Proužky β -Aktinu (←B) byly rozeznány okolo velikosti ≈ 43 kDa. Srovnávány byly MF vzorků neovlivněných SD (-SD) se vzorky ovlivněnými SD (+SD).

Pravá část: Grafické zobrazení statistického hodnocení, které bylo založeno na celkem 18 imunoblotech (6 imunoblotů pro každou dvojici -SD a +SD).

7 Diskuze.

7.1 Studie lymfocytů sleziny

7.1.1 Účinek morfia

Prvním cílem diplomové práce bylo porovnat změny v hladinách Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech pěstovaných v tkáňové kultuře v přítomnosti morfia nebo silného mitogenu, konkanavalinu A (ConA). Dlouhodobá inkubace lymfocytů v přítomnosti 10 μM morfia (48 hodin) nevyvolala významnou změnu v množství Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech. Změna byla stanovována metodou „Western blot“ za pomoci monoklonálních protilátek ve frakci post nukleárního supernatantu. Jak bylo řečeno v literárním přehledu, morfiem je opioid, který působí na OR. Existence mRNA μ -OR, δ -OR a κ -OR v lymfocytech krve i sleziny byla prokázána již na konci minulého století (Chuang a kol., 1994, 1995a, b; Sedqi a kol., 1995; Gaveriaux a kol., 1995). Exprese mRNA OR v lymfocytech však byla velmi nízká a buňky imunitního systému (cytotoxické a pomocné T lymphocyty, makrofágy, endoteliální buňky, mastocyty a prekursori myeloidních linií) nevázaly specifické radioligandy používané pro charakterizaci množství OR v mozku (Sibinga a Goldstein, 1988).

Vzestup v hladinách μ -OR, δ -OR a κ -OR po stimulaci lidských a opičích periferních lymfocytů periferní krve po inkubaci s morfiem ukázali Suzuki a kol. (2000, 2001a,b).

Celkově je možno říci, že exprese OR v buňkách imunitního systému je za fyziologických podmínek velmi nízká. Vliv různých faktorů jako je přítomnost cytokinů, interleukinů, proliferačních agens, ale i vlivem stresu či vystavení účinku morfia, může vést k nárůstu množství těchto receptorů v buňkách imunitního systému (Madden a kol., 1998; Borner a kol., 2007, 2009, 2013; Suzuki a kol., 2000, 2001a,b; Wang a kol., 2002; Liu a kol., 2010). V recentní studii lymfocytů sleziny (Cechova a kol., 2018) byl prokázán nárůst μ -OR, δ -OR a κ -OR po stimulaci konkanavalinem A, přičemž v kontrolních lymfocytech nebyl zaznamenán žádný signifikantní signál odpovídající μ - a δ -receptorům. Naproti tomu, κ -OR byly ve významné míře detekovány již v kontrolních, nestimulovaných lymfocytech a stimulace ConA způsobila výrazný vzestup těchto receptorů (2.4x).

7.1.2 Účinek concanavalinu A

Na^+/K^+ ATPáza je enzym, který se vyskytuje na plazmatické membráně všech eukaryotických buněk. Jeho hlavním úkolem je udržování buněčné homeostázy. Podílí se na vytváření klidového membránového potenciálu, udržování vnitrobuněčného pH. Udržuje fyziologickou hladinu Na^+ a K^+ iontů uvnitř buňky a stálý objem buňky. Na to je navázán sekundární transport H^+ a Ca^{2+} iontů, a mnoha dalších molekul významných pro život buňky.

Poškození Na^+/K^+ ATPázy je spojeno se závažnými onemocněními kardiovaskulárního systému (vysoký tlak, ateroskleróza, srdeční selhání nebo uremická kardiomyopatie), nervové soustavy (migréna s aurou, zkrřížená hemiparéza) a imunitního systému (systémový lupus erythematoses). (shrnutí v Yan a Shapiro, 2016; Srikanthan a kol., 2016; Clausen a kol., 2017, Desfrere a kol., 2009, Hsieh a kol., 2008, Scarrone a kol., 2007)

V této práci bylo stanovováno množství Na^+/K^+ ATPázy v mitogenem aktivovaných lymfocytech ze sleziny potkana metodou „Western blot“. Zde použitým mitogenem byl konkanavalin A. Dále se také ve vědecké praxi používá mitogen fytohaemagglutinin (dále PHA), který také vyvolává aktivaci lymfocytů. (Gao a kol., 2018)

Po stimulaci lymfocytů ze sleziny potkana konkanavalinem A (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) došlo k nárůstu množství Na^+/K^+ ATPázy. Nárůst byl prokázán na PNS i MF získaných ze stimulovaných lymfocytů. Výsledek byl srovnatelný za použití polyklonálních i monoklonálních protilátek.

Nárůst množství nebo aktivity Na^+/K^+ ATPázy ve stimulovaných lymfocytech je znám již ze starší literatury. Vzestup vazby [^3H]ouabainu a ouabain-senzitivního transportu rubidia (Rb^+) byl pozorován v HeLa buňkách a v lidských lymfocytech, které byly dlouhodobě pěstované v tkáňové kultuře v přítomnosti fetálního hovězího séra, nízké koncentrace K^+ iontů, kyseliny etakrinové nebo dialyzovatelného faktoru séra (Pollack a kol., 1981; Rapeport a kol., 1986; Oh a spol., 1987)

Nárůst množství a aktivity Na^+/K^+ ATPázy byl zaznamenán po aktivaci lidských T-lymfocytů mitogenem PHA. (Marakhova a kol., 2005) Pro stanovení aktivity Na^+/K^+ ATPázy byl měřen ouabainem inhibovaný tok Rb a množství bylo stanoveno metodou „Western blot“. V podobném experimentu dlouhodobá stimulace (24-48 hodin) lidských lymfocytů mitogenem PHA vyvolala vzestup v expresi Na^+/K^+ ATPasy. Detekce byla provedena metodou „Western blot“ a stanovením mRNA. Přítomnost

interleukinu-2 (IL-2) v inkubačním médiu byla nezbytná proto, aby ke zvýšené expresi Na^+/K^+ ATPasy došlo. (Karitskaya a kol., 2010)

Nárůst množství a aktivity Na^+/K^+ ATPázy by se dal vysvětlit jako fyziologická odezva buňky na proliferaci vyvolanou mitogenem. Před proliferací buňka nabývá na objemu, a proto jsou kladeny zvýšené nároky na udržení fyziologických koncentrací Na^+ a K^+ iontů. (Yokoyama a kol., 1993) To, že je přítomnost Na^+/K^+ ATPázy nezbytná pro proliferaci dokazuje fakt, že po stimulaci lidských lymfocytů (PHA) za přítomnosti ouabainu (speciický inhibitor Na^+/K^+ ATPázy) k proliferaci nedošlo. (Brodie a kol., 1995)

Karitskaya a kol., 2010 ukazuje, že koncentrace K^+ iontů během proliferace stimulovaných lymfocytů (PHA) uvnitř buňky postupně narůstá. Vtok K^+ iontů je následován vtokem aniontů, pro zachování klidového elektrického potenciálu na membráně buňky. Takto zvýšená koncentrace iontů v buňce vyvolá vtok H_2O vlivem osmózy. Zvýšená aktivita a množství Na^+/K^+ ATPázy umožňuje zachovat fyziologické podmínky při takto dynamických změnách při proliferaci. (Marakhova a kol., 2019).

Dalším důvodem pro změnu množství Na^+/K^+ ATPázy na plazmatické membráně lymfocytů po jejich aktivaci by mohlo být zapojení Na^+/K^+ ATPázy v signalizaci spojené s proliferací. Podle (Marakhova a kol., 2005) je v signalizaci exprese Na^+/K^+ ATPázy zahrnut IL-2. Ten je produkován aktivovanými lymfocyty a je důležitý pro další proliferaci okolních lymfocytů. Cyklosporinem A inhibovaná produkce IL-2 lymfocyty aktivovanými PHA inhibovala nárůst množství Na^+/K^+ ATPázy ve srovnání s PHA aktivovanými lymfocyty v prostředí bez Cyklosporinu A.

7.2 Hipokampus

Bylo zjištěno, že spánková deprivace narušuje správnou funkci paměti, způsobuje poruchy nálad. (Diekelmann a Born, 2010; Kalmbach a kol., 2017) Studie prováděné na potkanech ukazují, že spánková deprivace způsobuje vznik depresivního nebo úzkostného chování (Ma a kol., 2019; Rocha-Lopes a kol., 2018) Častým způsobem léčby bipolární poruchy je podávání stravy obohacené o litium. Litium totiž zabraňuje změnám vyvolaným spánkovou deprivací. (Vosahlikova a kol., 2020) Spánková deprivace tedy vyvolává u potkanů symptomy podobné, jako se objevují při manické fázi bipolární poruchy. Z těchto důvodů se spánkově deprivovaní potkani používají jako model bipolární poruchy (shrnuto v Logan a McClung, 2016)

Výše zmíněné funkce, které jsou ovlivněny spánkovou deprivací, úzce souvisí se správným fungováním hipokampu. Proto jsme se rozhodli pro studium vlivu spánkové deprivace na Na^+/K^+ ATPázu právě v hipokampu.

Pro spánkovou deprivaci byl použit model vyvýšených plošin nad vodní hladinou. Tento model však může vedle REM spánkové deprivace působit na pokusná zvířata i jinými sresory, jako například izolace, imobilizace nebo samotné spadnutí do vody. (shrnuto v Logan a Colleen, 2016) Tyto „vedlejší stresory“ mohou spouštět osu hypotalamus – hypofýza – nadledviny (dále HPA osa). Samotná spánková deprivace má vliv na aktivaci HPA osy. Minkel a kol., 2014 naměřili zvýšené hodnoty kortizolu měřeného ve slinách dobrovolníků, kteří prodělali kompletní noční spánkovou deprivaci ve srovnání s normálně spícími jedinci. Zvýšené množství kortizolu bylo také stanoveno v krvi potkanů po 72 h spánkové deprivaci. (Lee a kol., 2019) Dále bylo prokázáno, že chronický stress způsobený imobilizací potkanů na 6 h za den po dobu 21 dní způsobil úbytek objemu hipokampu. (Lee a kol., 2009) Ačkoliv se těžko definuje hranice mezi akutním a chronickým stresem (Hammen a kol., 2009) je možné se domnívat, spánková deprivace má výrazný vliv na hipokampus.

V této práci se podařilo stanovit vliv stresu vyvolaného spánkovou deprivací po dobu 3 dnů na hladiny α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy v hipokampu. Hladina α podjednotky Na^+/K^+ ATPázy ve všech vzorcích hipokampu potkanů kteří byli vystaveni stresu spánkovou deprivací (+SD), byla signifikantně vyšší než v příslušných kontrolách (-SD).

Tento výsledek je ve shodě s mnoha studiemi. (Gulyani a Mallick, 1993; Mallick a Adya, 1999; Majumdar a kol., 2003) Bylo rovněž prokázáno, že blokáda GABA_B -

receptorů bilaterální mikro-infuzí pikrotoxinu způsobila snížení délky REM fází spánku a zvýšila aktivitu Na^+/K^+ ATPázy ve volně se pohybujících potkanech ve srovnání s kontrolami (Kaur a spol., 2004).

REM fáze spánku je důležitá udržování excitability jak hipokampu (Grosmark a kol., 2012) tak celého mozku (Das a Mallick, 2007). Možný mechanismus, kterým by byla udržována excitabilita mozku souvisí v první řadě s jáderem v mozku zvaném „locus coeruleus“. Je to jedno z jader Varolova mostu, které obsahuje REM-OFF noradrenergní neurony. V REM fázi spánku tyto neurony nejsou aktivní a naopak jsou aktivní při spánkové deprivaci. (shrnutí v Pal a Mallick, 2007) Během spánkové deprivace byla prokázána zvýšená sekrece a syntéza noradrenalinu v tomto jádře. (Porkka-Heiskanen a kol., 1995) REM-OFF noradrenergní neurony z „locus coeruleus“ projikují do amygdaly, cingulárního gyru, hipokampu nebo hypotalamu. (shrnutí v Mallick a kol., 2010)

Zvýšené množství noradrenalinu v hipokampu pak působí na množství Na^+/K^+ ATPázy. Bylo prokázáno, že noradrenalin zvyšuje množství jednotlivých podjednotek Na^+/K^+ ATPázy na Neuro-2a buňkách prostřednictvím $\alpha 1$ a β adrenergních receptorů. (Amar a Mallick, 2018) Tuto teorii podporuje Khanday a kol., (2016). Inhibici syntézy noradrenalinu v locus coeruleus se projevila zvýšeným podílem REM fází ve spánku. V poslední řadě bylo prokázáno, že REM spánková deprivace zvyšuje míru depolarizace v mozku, čímž zvyšuje jeho excitabilitu. Zvýšená depolarizace byla provázená zvýšenou aktivitou Na^+/K^+ ATPázy (Das a Mallick, 2007)

V kontrastu s výše zmíněnými studiemi stojí snížení aktivity Na^+/K^+ ATPázy v hipokampu po spánkové deprivaci. (Khadrawy a kol., 2011) Jedním z důvodů pro odlišné výsledky může být fakt, že spánková deprivace výše zmíněným mechanismem za účasti noradrenalinu sice zvyšuje množství Na^+/K^+ ATPázy v neuronech, ale naopak její množství snižuje v gliových buňkách (Baskey a kol., 2009)

8 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala vlivem různých faktorů na množství Na^+/K^+ ATPázy jednak na lymfocytech izolovaných ze sleziny potkanů, které byly pěstované v primární tkáňové kultuře a jednak na hipokampech získaných z mozku potkanů. Stanovováno bylo množství Na^+/K^+ ATPázy metodou „Western blot“ pomocí polyklonální a monoklonální protilátky na membránové frakci a postnukleárním supernatantu.

Nejprve bylo stanovováno množství Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech, které byly pěstovány v primární kultuře v přítomnosti 10 μM morfia po dobu 48 hodin. Změna, ke které došlo v množství Na^+/K^+ ATPázy stanovované monoklonální protilátkou, nebyla signifikantní. Možným vysvětlením je, že lymfocyty nacházející se v klidovém stavu mají zanedbatelné množství opioidních receptorů, na které se morfin váže.

Dále bylo určováno množství Na^+/K^+ ATPázy v lymfocytech, které byly pěstovány v primární kultuře v přítomnosti 3 $\mu\text{g/ml}$ konkanavalinu A po dobu 48 hodin. Použita byla membránová frakce a postnukleární supernatant vzorků a polyklonální a monoklonální protilátky. Ve všech variantách experimentu byl prokázán vysoce signifikantní nárůst v množství Na^+/K^+ ATPázy (monoklonální protilátka, postnukleární supernatant ($p < 0.01$, **); polyklonální protilátka, postnukleární supernatant ($p < 0.001$, ***); polyklonální protilátka, membránová frakce ($p < 0.01$, **).

Poslední skupina výsledků se ukazuje vliv spánkové deprivace na množství Na^+/K^+ ATPázy v hipokampu potkanů. Spánková deprivace probíhala (+SD) nebo neprobíhala (-SD) po dobu 72 hodin v 6 různých skupinách (C1-SD, C1+SD, C7-SD, C7CC+SD, C28-SD, C28+SD). Na^+/K^+ ATPáza byla stanovována primární protilátkou na membránových frakcích. Spánkové deprivace způsobila signifikantní nárůst v množství Na^+/K^+ ATPázy ($p < 0.05$, *).

9 Literatura

- Amar M, Mallick BN (2018), Mechanism of noradrenaline-induced alpha1-adrenoceptor mediated regulation of Na-K ATPase subunit expression in Neuro-2a cells. *Brain Res Bull* 139:157-166.
- Andrabi M, Andrabi MM, Kunjuni R, Sriwastva MK, Bose S, Sagar R, Srivastava AK, Mathur R, et al. (2020), Lithium acts to modulate abnormalities at behavioral, cellular, and molecular levels in sleep deprivation-induced mania-like behavior. *Bipolar Disord* 22:266-280.
- Baskey G, Singh A, Sharma R, Mallick BN (2009), REM sleep deprivation-induced noradrenaline stimulates neuronal and inhibits glial Na-K ATPase in rat brain: in vivo and in vitro studies. *Neurochem Int* 54:65-71.
- Borner C, Lanciotti S, Koch T, Holtt V, Kraus J (2013), mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 263:35-42.
- Borner C, Stumm R, Holtt V, Kraus J (2007), Comparative analysis of mu-opioid receptor expression in immune and neuronal cells. *J Neuroimmunol* 188:56-63.
- Borner C, Warnick B, Smida M, Hartig R, Lindquist JA, Schraven B, Holtt V, Kraus J (2009), Mechanisms of opioid-mediated inhibition of human T cell receptor signaling. *J Immunol* 183:882-889.
- Brodie C, Tordai A, Saloga J, Domenico J, Gelfand EW (1995), Ouabain induces inhibition of the progression phase in human T-cell proliferation. *J Cell Physiol* 165:246-253.
- Cechova K, Hlouskova M, Javorkova E, Roubalova L, Ujcikova H, Holan V, Svoboda P (2018), Up-regulation of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in concanavalin A-stimulated rat spleen lymphocytes. *J Neuroimmunol* 321:12-23.
- Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H (2017), The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol* 8:371.
- Colavito V, Fabene PF, Grassi-Zucconi G, Pifferi F, Lamberty Y, Bentivoglio M, Bertini G (2013), Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Front Syst Neurosci* 7:106.

- da Silva Rocha-Lopes J, Machado RB, Suchecki D (2018), Chronic REM Sleep Restriction in Juvenile Male Rats Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Monoamine Systems in the Amygdala and Hippocampus. *Mol Neurobiol* 55:2884-2896.
- Das G, Mallick BN (2008), Noradrenaline acting on alpha1-adrenoceptor mediates REM sleep deprivation-induced increased membrane potential in rat brain synaptosomes. *Neurochem Int* 52:734-740.
- Desfrere L, Karlsson M, Hiyoshi H, Malmersjo S, Nanou E, Estrada M, Miyakawa A, Lagercrantz H, et al. (2009), Na,K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2212-2217.
- Diekelmann S, Born J (2010), The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11:114-126.
- Dornand J, Favero J, Bonnafous JC, Mani JC (1986), Mechanism whereby ouabain inhibits human T lymphocyte activation: effect on the interleukin 2 pathway. *Immunobiology* 171:436-450.
- el Mernissi G, Barlet-Bas C, Khadouri C, Marsy S, Cheval L, Doucet A (1991), Characterization and localization of ouabain-insensitive Na-dependent ATPase activities along the rat nephron. *Biochim Biophys Acta* 1064:205-211.
- Emanuel JR, Garetz S, Stone L, Levenson R (1987), Differential expression of Na⁺,K⁺-ATPase alpha- and beta-subunit mRNAs in rat tissues and cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9030-9034.
- Fecho K, Maslonek KA, Coussons-Read ME, Dykstra LA, Lysle DT (1994), Macrophage-derived nitric oxide is involved in the depressed concanavalin A responsiveness of splenic lymphocytes from rats administered morphine in vivo. *J Immunol* 152:5845-5852.
- Gao Y, Zhou Z, Ren T, Kim SJ, He Y, Seo W, Guillot A, Ding Y, et al. (2019), Alcohol inhibits T-cell glucose metabolism and hepatitis in ALDH2-deficient mice and humans: roles of acetaldehyde and glucocorticoids. *Gut* 68:1311-1322.
- Gaveriaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J, Kieffer B (1995), Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett* 369:272-276.
- Grinstein S, Dixon SJ (1989), Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol Rev* 69:417-481.
- Grosmark AD, Mizuseki K, Pastalkova E, Diba K, Buzsaki G (2012), REM sleep reorganizes hippocampal excitability. *Neuron* 75:1001-1007.

- Gulyani S, Mallick BN (1993), Effect of rapid eye movement sleep deprivation on rat brain Na-K ATPase activity. *J Sleep Res* 2:45-50.
- Hammen C, Brennan PA, Keenan-Miller D, Hazel NA, Najman JM (2010), Chronic and acute stress, gender, and serotonin transporter gene-environment interactions predicting depression symptoms in youth. *J Child Psychol Psychiatry* 51:180-187.
- Havekes R, Park AJ, Tudor JC, Luczak VG, Hansen RT, Ferri SL, Bruinenberg VM, Poplawski SG, et al. (2016), Sleep deprivation causes memory deficits by negatively impacting neuronal connectivity in hippocampal area CA1. *Elife* 5.
- Hsieh SC, Wu TH, Tsai CY, Li KJ, Lu MC, Wu CH, Yu CL (2008), Abnormal in vitro CXCR2 modulation and defective cationic ion transporter expression on polymorphonuclear neutrophils responsible for hyporesponsiveness to IL-8 stimulation in patients with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 47:150-157.
- Chuang LF, Chuang TK, Killam KF, Jr., Chuang AJ, Kung HF, Yu L, Chuang RY (1994), Delta opioid receptor gene expression in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1291-1299.
- Chuang LF, Chuang TK, Killam KF, Jr., Qiu Q, Wang XR, Lin JJ, Kung HF, Sheng W, et al. (1995), Expression of kappa opioid receptors in human and monkey lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 209:1003-1010.
- Chuang TK, Killam KF, Jr., Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, Yu L, Chuang RY (1995), Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 216:922-930.
- Josephs KA, Dickson DW, Tosakulwong N, Weigand SD, Murray ME, Petrucelli L, Liesinger AM, Senjem ML, et al. (2017), Rates of hippocampal atrophy and presence of post-mortem TDP-43 in patients with Alzheimer's disease: a longitudinal retrospective study. *Lancet Neurol* 16:917-924.
- Kalmbach DA, Arnedt JT, Song PX, Guille C, Sen S (2017), Sleep Disturbance and Short Sleep as Risk Factors for Depression and Perceived Medical Errors in First-Year Residents. *Sleep* 40.
- Kaplan JG (1978), Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. *Annu Rev Physiol* 40:19-41.
- Kaplan JH (2002), Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71:511-535.

- Karitskaya I, Aksenov N, Vassilieva I, Zenin V, Marakhova I (2010), Long-term regulation of Na,K-ATPase pump during T-cell proliferation. *Pflugers Arch* 460:777-789.
- Kaur S, Panchal M, Faisal M, Madan V, Nangia P, Mallick BN (2004), Long term blocking of GABA-A receptor in locus coeruleus by bilateral microinfusion of picrotoxin reduced rapid eye movement sleep and increased brain Na-K ATPase activity in freely moving normally behaving rats. *Behav Brain Res* 151:185-190.
- Khadrawy YA, Nour NA, Aboul Ezz HS (2011), Effect of oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation on the activities of Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in the cortex and hippocampus of rat. *Transl Res* 157:100-107.
- Khanday MA, Somarajan BI, Mehta R, Mallick BN (2016), Noradrenaline from Locus Coeruleus Neurons Acts on Pedunculo-Pontine Neurons to Prevent REM Sleep and Induces Its Loss-Associated Effects in Rats. *eNeuro* 3.
- Koehl A, Hu H, Maeda S, Zhang Y, Qu Q, Paggi JM, Latorraca NR, Hilger D, et al. (2018), Structure of the micro-opioid receptor-Gi protein complex. *Nature* 558:547-552.
- Kurauchi Y, Noma K, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H (2018), Na(+), K(+)-ATPase inhibition induces neuronal cell death in rat hippocampal slice cultures: Association with GLAST and glial cell abnormalities. *J Pharmacol Sci* 138:167-175.
- Lee DS, Choi JB, Sohn DW (2019), Impact of Sleep Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Erectile Tissue. *J Sex Med* 16:5-16.
- Lee T, Jarome T, Li SJ, Kim JJ, Helmstetter FJ (2009), Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Neuroreport* 20:1554-1558.
- Lingrel JB, Kuntzweiler T (1994), Na⁺,K(+)-ATPase. *J Biol Chem* 269:19659-19662.
- Liu H, Li H, Guo L, Li M, Li C, Wang S, Jiang W, Liu X, et al. (2010), Mechanisms involved in phosphatidylinositol 3-kinase pathway mediated up-regulation of the mu opioid receptor in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 79:516-523.
- Logan RW, McClung CA (2016), Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience* 321:163-188.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Ma W, Song J, Wang H, Shi F, Zhou N, Jiang J, Xu Y, Zhang L, et al. (2019), Chronic paradoxical sleep deprivation-induced depression-like behavior, energy metabolism and microbial changes in rats. *Life Sci* 225:88-97.
- Macdonald WA, Nielsen OB, Clausen T (2005), Na⁺-K⁺ pump stimulation restores carbacholine-induced loss of excitability and contractility in rat skeletal muscle. *J Physiol* 563:459-469.
- Maddaly R, Pai G, Balaji S, Sivaramakrishnan P, Srinivasan L, Sunder SS, Paul SF (2010), Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation--insights from both in vivo and in vitro approaches. *FEBS Lett* 584:4883-4894.
- Madden JJ, Whaley WL, Ketelsen D (1998), Opiate binding sites in the cellular immune system: expression and regulation. *J Neuroimmunol* 83:57-62.
- Majumdar S, Faisal M, Madan V, Mallick BN (2003), Increased turnover of Na-K ATPase molecules in rat brain after rapid eye movement sleep deprivation. *J Neurosci Res* 73:870-875.
- Mallick BN, Adya HV (1999), Norepinephrine induced alpha-adrenoceptor mediated increase in rat brain Na-K ATPase activity is dependent on calcium ion. *Neurochem Int* 34:499-507.
- Mallick BN, Singh S, Singh A (2010), Mechanism of noradrenaline-induced stimulation of Na-K ATPase activity in the rat brain: implications on REM sleep deprivation-induced increase in brain excitability. *Mol Cell Biochem* 336:3-16.
- Marakhova, II, Vereninov AA, Toropova FV, Vinogradova TA (1998), Na, K-ATPase pump in activated human lymphocytes: on the mechanisms of rapid and long-term increase in K influxes during the initiation of phytohemagglutinin-induced proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1368:61-72.
- Marakhova, II, Vinogradova TA, Yefimova EV (1989), Early and delayed changes in potassium transport during the initiation of cell proliferation in CHO culture. *Gen Physiol Biophys* 8:273-282.
- Marakhova I, Karitskaya I, Aksenov N, Zenin V, Vinogradova T (2005), Interleukin-2-dependent regulation of Na/K pump in human lymphocytes. *FEBS Lett* 579:2773-2780.

- Marakhova I, Yurinskaya V, Aksenov N, Zenin V, Shatrova A, Vereninov A (2019), Intracellular K(+) and water content in human blood lymphocytes during transition from quiescence to proliferation. *Sci Rep* 9:16253.
- Matchkov VV, Krivoi, II (2016), Specialized Functional Diversity and Interactions of the Na,K-ATPase. *Front Physiol* 7:179.
- McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ (1991), Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci* 11:381-391.
- Messina NL, Zimmermann P, Curtis N (2019), The impact of vaccines on heterologous adaptive immunity. *Clin Microbiol Infect* 25:1484-1493.
- Miller B (1996), delta opioid receptor expression is induced by concanavalin A in CD4+ T cells. *J Immunol* 157:5324-5328.
- Miller TD, Chong TT, Aimola Davies AM, Ng TWC, Johnson MR, Irani SR, Vincent A, Husain M, et al. (2017), Focal CA3 hippocampal subfield atrophy following LGII VGKC-complex antibody limbic encephalitis. *Brain* 140:1212-1219.
- Mimura K, Tahara Y, Shinji N, Tokuda E, Takenaka H, Hayashi Y (2008), Isolation of stable (alpha)4-Tetraprotomer from Na⁺/K⁺ ATPase solubilized in the presence of short-chain fatty acids. *Biochemistry* 47:6039-6051.
- Minkel J, Moreta M, Muto J, Htaik O, Jones C, Basner M, Dinges D (2014), Sleep deprivation potentiates HPA axis stress reactivity in healthy adults. *Health Psychol* 33:1430-1434.
- Monostori E, Hartyani Z, Ocsosvzky I, Hegedus Z, Oravecz T, Kalman M, Ando I (1994), Effect of fytohaemagglutinin on CD45 in T cells. *Immunol Lett* 42:197-201.
- Montreekachon P, Nongparn S, Sastraruji T, Khongkhunthian S, Chruewkamlow N, Kasinrerak W, Krisanaprakornkit S (2014), Favorable interleukin-8 induction in human gingival epithelial cells by the antimicrobial peptide LL-37. *Asian Pac J Allergy Immunol* 32:251-260.
- Moolenaar WH, Defize LH, De Laat SW (1986), Ionic signalling by growth factor receptors. *J Exp Biol* 124:359-373.
- Oh VM, Taylor EA, Ding JL, Boon NA, Aronson JK, Grahame-Smith DG (1987), Enhancement of specific [³H]ouabain binding and ouabain sensitive ⁸⁶Rb⁺ influx in intact human lymphocytes by a dialysable factor in human and fetal calf serum. *Clin Sci (Lond)* 72:71-79.

- Pal D, Mallick BN (2007), Neural mechanism of rapid eye movement sleep generation with reference to REM-OFF neurons in locus coeruleus. *Indian J Med Res* 125:721-739.
- Pilz GA, Bottes S, Betizeau M, Jorg DJ, Carta S, Simons BD, Helmchen F, Jessberger S (2018), Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Science* 359:658-662.
- Pollack LR, Tate EH, Cook JS (1981), Na⁺, K⁺-ATPase in HeLa cells after prolonged growth in low K⁺ or ouabain. *J Cell Physiol* 106:85-97.
- Porkka-Heiskanen T, Smith SE, Taira T, Urban JH, Levine JE, Turek FW, Stenberg D (1995), Noradrenergic activity in rat brain during rapid eye movement sleep deprivation and rebound sleep. *Am J Physiol* 268:R1456-1463.
- Prasad KV, Severini A, Kaplan JG (1987), Sodium ion influx in proliferating lymphocytes: an early component of the mitogenic signal. *Arch Biochem Biophys* 252:515-525.
- Puhl MD, Fang J, Grigson PS (2009), Acute sleep deprivation increases the rate and efficiency of cocaine self-administration, but not the perceived value of cocaine reward in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 94:262-270.
- Rapeport WG, Aronson JK, Grahame-Smith DG, Harper C (1986), The effects of serum, lithium, ethacrynic acid, and a low external concentration of potassium on specific [3H]-ouabain binding to human lymphocytes after incubation for 3 days. *Br J Clin Pharmacol* 22:275-279.
- Rosoff PM, Cantley LC (1985), Ion fluxes and differentiation in transformed cell lines. *Soc Gen Physiol Ser* 39:193-204.
- Rozengurt E (1986), Early signals in the mitogenic response. *Science* 234:161-166.
- Scarrone S, Podesta M, Cupello A, Finocchi C, Frassoni F, Gandolfo C, Balestrino M (2007), Abnormalities of Na/K ATPase in migraine with aura. *Cephalalgia* 27:128-132.
- Sedqi M, Roy S, Ramakrishnan S, Elde R, Loh HH (1995), Complementary DNA cloning of a mu-opioid receptor from rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 209:563-574.
- Sharon N, Lis H (1972), Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 177:949-959.
- Shih YC, Tseng CE, Lin FH, Liou HH, Tseng WY (2017), Hippocampal Atrophy Is Associated with Altered Hippocampus-Posterior Cingulate Cortex

- Connectivity in Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 38:626-632.
- Sibinga NE, Goldstein A (1988), Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Annu Rev Immunol* 6:219-249.
- Skou JC (1957), The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 23:394-401.
- Srikanthan K, Shapiro JI, Sodhi K (2016), The Role of Na/K-ATPase Signaling in Oxidative Stress Related to Obesity and Cardiovascular Disease. *Molecules* 21.
- Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI (2014), Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* 15:655-669.
- Sundaram SM, Safina D, Ehrkamp A, Faissner A, Heumann R, Dietzel ID (2019), Differential expression patterns of sodium potassium ATPase alpha and beta subunit isoforms in mouse brain during postnatal development. *Neurochem Int* 128:163-174.
- Suzuki S, Chuang LF, Doi RH, Bidlack JM, Chuang RY (2001), Kappa-opioid receptors on lymphocytes of a human lymphocytic cell line: morphine-induced up-regulation as evidenced by competitive RT-PCR and indirect immunofluorescence. *Int Immunopharmacol* 1:1733-1742.
- Suzuki S, Chuang TK, Chuang LF, Doi RH, Chuang RY (2001), Morphine upregulates kappa-opioid receptors of human lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 493:81-87.
- Suzuki S, Miyagi T, Chuang TK, Chuang LF, Doi RH, Chuang RY (2000), Morphine upregulates mu opioid receptors of human and monkey lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 279:621-628.
- Sverdlov ED, Akopyanz NS, Petrukhin KE, Broude NE, Monastyrskaya GS, Modyanov NN (1988), Na⁺,K⁺-ATPase: tissue-specific expression of genes coding for alpha-subunit in diverse human tissues. *FEBS Lett* 239:65-68.
- Ujcikova H, Cechova K, Roubalova L, Brejchova J, Kaufman J, Holan V, Svoboda P (2020), The high-resolution proteomic analysis of protein composition of rat spleen lymphocytes stimulated by Concanavalin A; a comparison with morphine-treated cells. *J Neuroimmunol* 341:577191.
- Ujcikova H, Hlouskova M, Cechova K, Stolarova K, Roubalova L, Svoboda P (2017), Determination of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in forebrain cortex of rats exposed to morphine for 10 days: Comparison with animals after 20 days of morphine withdrawal. *PLoS One* 12:e0186797.

- van Rooijen N (1972), Antigens in the spleen. The non-specificity of the follicles in the process of antigen trapping and the role of antibody. *Immunology* 22:757-765.
- Vosahlikova M, Roubalova L, Cechova K, Kaufman J, Musil S, Miksik I, Alda M, Svoboda P (2020), Na(+)/K(+)-ATPase and lipid peroxidation in forebrain cortex and hippocampus of sleep-deprived rats treated with therapeutic lithium concentration for different periods of time. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 102:109953.
- Wang J, Charboneau R, Barke RA, Loh HH, Roy S (2002), Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 169:3630-3636.
- Wiest G, Muller C, Gluck J, Deecke L, Baumgartner C (2000), Idiopathic orientation and path integration in unilateral hippocampal atrophy and sclerosis. *J Vestib Res* 10:301-309.
- Wittert G, Hope P, Pyle D (1996), Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 218:877-881.
- Yan Y, Shapiro JI (2016), The physiological and clinical importance of sodium potassium ATPase in cardiovascular diseases. *Curr Opin Pharmacol* 27:43-49.
- Yokoyama T, Lin LR, Chakrapani B, Reddy VN (1993), Hypertonic stress increases NaK ATPase, taurine, and myoinositol in human lens and retinal pigment epithelial cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:2512-2517.