Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Pavla Kusová

Stanovení receptorů pro opioidy v kůře mozku potkanů vystavených multifunkčním opioidním peptidům

Determination of opioid receptors in cerebral cortex of rats exposed to multifunctional opioid peptides

Bakalářská práce

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

Praha, 2023

Tato bakalářská práce byla vypracována v rámci výzkumu (projekt LTAUSA18110).

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Petra Svobody DrSc., a že jsem všechny použité zdroje řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 22. 8. 2023

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat panu Doc. RNDr. Petru Svobodovi DrSc. za odborné vedení a věnovaný čas. Dále děkuji RNDr. Lence Roubalové, PhD. za pomoc s přípravou vzorků, Mgr. Janě Brejchové, Ph.D. za cenné rady a RNDr. Haně Ujčíkové, PhD. za veškerou pomoc při vypracování této práce.

Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce bylo studium vlivu multifunkčních peptidů LYS739 a LYS744 na množství μ-, δ-, κ-opioidních receptorů (μ-OR, δ-OR, κ-OR) v kortexu potkanů. Peptidy byly podávány v dávce 10 mg/kg po dobu sedmi dnů. Referenční skupině byla po stejnou dobu podávána dávka 10mg/kg morfinu. Účinek morfinu působí hlavně prostřednictvím μ-OR. Následkem dlouhodobého působení morfinu je snížení funkčnosti a množství těchto receptorů v rámci vzniku tolerance a závislosti.

Multifunkční opioidní peptidy se začaly zkoumat pro svůj terapeutický potenciál za účelem snížení nežádoucích účinků a zvýšení účinnosti opioidů. Jejich potenciál spočívá v tom, že jsou schopny interagovat s více opioidními receptory. Peptidy LYS739 a LYS744 působí jako agonisté μ-OR, δ-OR a současně jako antagonisté κ-OR.

Množství opioidních receptorů bylo stanoveno metodou SDS-PAGE a následně Western blot. Výsledky byly porovnávány s kontrolní skupinou, které byl podáván fyziologický roztok a referenční skupinou, které byl podáván morfin. V případě receptorů δ-OR, κ-OR nedošlo k téměř žádné změně. V případě μ-OR došlo u morfinu a LYS739 k poklesu, tato změna však nebyla vyhodnocena jako statisticky významná.

Klíčová slova: opioidní receptory, multifunkční peptidy, morfin, western blot

Abstract

The subject of this bachelor thesis was to study the effects of multifunctional peptides LYS739 and LYS744 on the amount of μ-, δ-, κ-opioid receptors (μ-OR, δ-OR, κ-OR) in rat cortex. Peptides were administered by the dose of 10 mg/kg for seven days. The reference group was administered a dose of 10 mg/kg morphine for the same period of the time. The effect of morphine is mainly through μ-OR. Long-term exposure to this opioid agonist results in a reduction in the function and quantity of these receptors in the development of tolerance and dependence.

Multifunctional opioid peptides have begun to be investigated for their therapeutic potential to reduce adverse effects and increase efficacy. Their potential lies in their ability to interact with multiple opioid receptors. Peptides LYS739 and LYS744 act as agonists of μ-OR, δ-OR and simultaneously as antagonists of κ-OR.

The amount of opioid receptors was determined by SDS-PAGE followed by Western blot. The results were compared with a control group that was administered by saline and a reference group that was administered by morphine. There was almost no change in the δ-OR, κ-OR receptors. In the case of μ-OR, there was a decrease in morphine and LYS739, but this change was not assessed as statistically significant.

Key words: opioid receptors, multifunctional peptides, morphine, western blot

Obsah

Seznam zkratek 7
1. Úvod 9
2. Teoretická část 10
2.1. Morfin 10
2.2. Multifunkční peptidy 11
2.3. Opioidní receptory 13
2.3.1. Signalizace 13
2.3.2. μ-OR, δ-OR, κ-OR 14
2.4. Metody stanovení 14
3. Cíl práce 17
4. Praktická část 18
4.1. Použité chemikálie a přístroje 18
4.2. Aplikace opioidních látek a disekce mozku 19
4.3. Izolace frakcí plazmatických membrán 20
4.4. Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Lowryho 20
4.5. Příprava vzorků pro SDS-PAGE 21
4.6. SDS-PAGE a immunoblotting 21
4.7. Vyhodnocení signálu receptoru na blotu a statistická analýza získaných dat 23
5. Výsledky 24
5.1. Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Lowryho 24
5.2. Stanovení množství μ-opioidních receptorů 24
5.3. Stanovení množství δ opioidních receptorů 26
5.4. Stanovení množství κ opioidních receptorů 27
6. Diskuze 28
5. Závěr 30
Seznam použité literatury 31

Seznam zkratek

β-ME	β-merkaproethanol
δ-OR	δ-opiodní receptory
κ-OR	κ-opioidní receptory
μ-OR	μ-opioidní receptory
Ac-BIS	N, N-methylen-bis-akrylamid
APS	peroxodisíran amonný
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosin monofosát
CNS	centrální nervový systém
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
DTT	dithiotreitol
DNLe	pravotočivý norleucin
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
GABA	gama-aminomáselná kyselina
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
HRP	křenová peroxidáza
N-OR/ ORL-1	nociceptin/orphanin
OR	opioidní receptory
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PNS	post-nukleární supernatant
SDS	dodecylsulfát sodný
STEM	pufr obsahující sacharózu, Tris-EDTA, magnesium

TCEP	((tris(2-karboxyethyl)fosfin)
TBS	pufrovaný fyziologický roztok Tris-HCl
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl) aminomethan

1. Úvod

Po dlouhou dobu byly známé úlevné účinky opia, avšak až ve 20. století došlo k pokroku ve výzkumu toho, jaké účinky mají opiáty, jako je morfin, na organismus. Cílem výzkumu bylo porozumět opioidům a jejich účinkům, s důrazem na objev nových analgetik s minimem nežádoucích účinků, a vývoj nových léčebných terapií pro osoby závislé na opioidech. V 90. letech minulého století byly klonovány geny kódující μ-, δ- a κ- opioidní receptory (μ-OR, δ-OR a κ-OR). Receptory vykazovaly topologickou charakteristiku receptorů spřažených s G proteiny. Později k nim byl přiřazen receptor ORL-1 (opioid receptor like) (1) zvaný také orphanin/nociceptin (N-OR) (2). Všechny tyto receptory vážou ligandy, které jsou schopné vyvolávat analgezii.

Opioidy se používají jako analgetikum. (3) Zásadní nevýhodou jejich použití je vznik tolerance na podávanou dávku, která výrazně snižuje analgetickou účinnost a vyvolává řadu nežádoucích, vedlejších účinků. Tolerance je definována jako ztráta účinku při opakovaném/dlouhodobém podávání tak, že pro dosažení rovnocenného účinku je zapotřebí aplikace stále vyšších a vyšších dávek. Jedná se o výsledek adaptačních mechanismů na úrovni cílového místa léku (μ-OR), na úrovni buněčné, synaptické a nervové síťové úrovni, kde dochází k adaptacím v důsledku homeostatických mechanismů. Ty mají tendenci obnovit normální funkci navzdory pokračujícím poruchám vyvolaným podáváním opioidů. Při léčbě chronické bolesti se v klinické praxi používá i desetinásobek dávky běžně používané v případě akutního podání. Osoby závislé na nelegálních opioidech mohou denně spotřebovat desetkrát až stokrát vyšší dávky, než jsou potřeba k akutnímu účinku. (4)

2. Teoretická část

2.1. Morfin

Morfin spolu s dalšími důležitými alkaloidy pochází z rostliny Máku setého (*Papaver Somniferum*). (5) Používá se jako analgetikum pro úlevu od střední až silné bolesti. Dále se podává ke snížení úzkosti, vyvolání sedace a při léčbě plicního edému. Má vazodilatační a bradykardické účinky, proto je velmi užitečný při léčbě infarktu myokardu. V terapeutických dávkách morfin vyvolává respirační depresi a gastrointestinální problémy. Dále vzniká tolerance k opakovanému užívání této drogy a tím vzniká závislost.

Morfin je široce používán v Evropě a Severní Americe. Například v Číně jsou však v klinické praxi používanější sufentanil a fentanyl, protože mají rychlejší nástup účinku a méně nežádoucích účinků, jakými jsou respirační deprese nebo pooperační nevolnost a zvracení. (6) Fentanyl i sufentanil jsou silnými agonisty μ-OR a mají malý vliv na κ-OR.

Morfin se spolu s kodeinem, fentanylem a buprenorfinem považuje za nejúčinnější analgetikum. (7) Stimuluje především μ-OR. Užívání morfinu nebo jiných opioidů vede ke stimulaci struktur v mezolimbickém systému CNS, což vede ke zvýšení uvolňování dopaminu v nucleus accumbens, který vyvolává pocit potěšení-euforie. Impulzy z jiných mozkových struktur také mohou stimulovat mezolimbický systém, což ovlivňuje hladiny dopaminu v nucleus accumbens. Výrazné zvyšování příjmu morfinu je tedy charakterizováno dysregulací odměňujících dopaminových drah v mozku. Odměňující účinek morfinu a jiných opioidů je spojen se stimulací μ-OR lokalizovaných na zakončení inibičního neurotransmiteru kyseliny γ-aminomáselné (GABA). Tato stimulace inhibuje uvolňování GABA, což zase aktivuje dopaminergní neurony a vede k uvolňování dopaminu v nucleus accumbens, což vyvolává pocity euforie.

Chronické podávání morfinu vede k fyzické i psychické závislosti. Hlavním akutním účinkem morfinu je snížení hladiny cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) a hyperpolarizace, která je vyvolána změnou aktivity draslíkových a vápníkových kanálů. Chronický účinek morfinu však vyvolává adaptivní změny v opioidních receptorech. To vede ke snížení akutní odpovědi receptoru. Tyto změny jsou stěžejní pro řízení aktivity

receptoru, protože chrání receptory před hyper-stimulací, podporují ukončení signálu a regulují jejich expresi.

Morfin je často považován za standard, se kterým se srovnávají další opioidy. (8) Ukázalo se, že v léčbě pooperační bolesti má morfin podaný epidurálně vyšší analgetickou účinnost než morfin aplikovaný systémově.

2.2. Multifunkční peptidy

V současné době dostupné léky proti chronické bolesti stále nejsou ideální z důvodu nežádoucích vedlejších účinků nebo nedostatečné účinnosti. (9) Proto přetrvává potřeba vyvíjet nové léčebné postupy, které by zvýšily účinnost a bezpečnost léčby. Multifunkční opioidní ligandy prokázaly svůj terapeutický potenciál ke snížení nežádoucích účinků tím, že interagují s více opioidními receptory a umožňují aktivaci jejich specifických konformací a signálních drah.

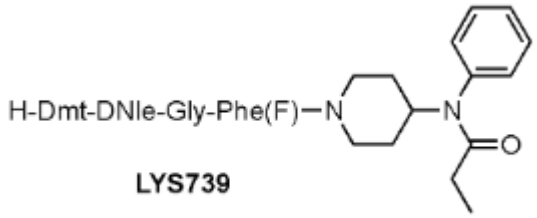
Endogenní opioidní peptidy (endorfiny, enkefaliny, dynorfiny) mají v organismu klíčovou roli v regulaci patologických stavů bolesti a dalších procesů jako je závislost, odměna, sedace nebo deprese. (10) Využití těchto peptidů může poskytnout účinný model pro nová analgetika s lepšími terapeutickými účinky.

Většina analgetik působících proti silné bolesti, působí na μ-OR. (11) Silnými analgetiky jsou také agonisté κ-OR, nedoporučují se však kvůli sedativním dysforickým a psychotonickým účinkům. Agonisté δ-OR mají také analgetické účinky. Chvíli se jejich použití zdálo slibné, protože tyto látky projevovaly méně nežádoucích účinků, avšak některé z testovaných látek způsobovaly u experimentálních zvířat křeče. Dostatečně účinná analgetika na bázi agonistů δ-OR dosud nebyla vyvinuta. Opioidní agonisté se selektivitou k jednomu ze tří typů opioidních receptorů mají omezení kvůli svým vedlejším nebo slabým analgetickým účinkům. Některé experimentální výsledky naznačují, že ligandy, které působí jako agonisté na jednom z opioidních receptorů a zároveň jako antagonisté na jiném opioidním nebo neopioidním receptoru, mohou mít terapeutický potenciál jako analgetika s menšími vedlejšími účinky nebo pro léčbu závislosti na kokainu.

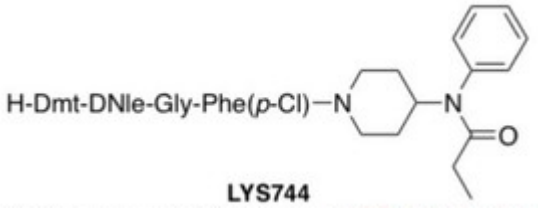
Zjistilo se, že podání malého množství agonisty δ-OR s morfinem, tedy agonistou μ-OR, může snížit vážné vedlejší účinky morfinu, jako je tolerance, a zároveň zvýšit jeho sílu a účinnost. (12)

Hlavním omezením použití přirozených opioidních peptidů v klinické praxi je jejich nízká biologická dostupnost způsobená nízkou metabolickou stabilitou a nízkou úrovní lipofilicity, což značně omezuje schopnost peptidů pronikat přes hematoencefalickou bariéru.

Většina těchto smíšených agonistů μ-OR a δ-OR interaguje také s κ-OR. (9) Peptidy LYS739 a LYS744 patří mezi nejúčinnější multifunkční ligandy s částečným agonismem k μ-OR a δ-OR a čistým antagonismem ke κ-OR. LYS739 má největší neuro-protektivní potenciál. (13) LYS744 se prokázal jako velmi biologicky aktivní, proto má terapeutický potenciál pro léčbu patologické aktivace κ-OR u chronických bolestí. Je to způsobené jeho antagonismem vůči κ-OR, čímž moduluje vedlejší účinky a zároveň má analgetickou účinnost díky agonismu vůči μ-OR a δ-OR.



Obrázek 1. Struktura peptidu LYS739 (převzato z citace (9))



Obrázek 2. Struktura peptidu LYS744 (převzato z cit. (8))

Byly zkoumány také účinky analgetik prostřednictvím opioidního receptoru orphaninu. (14) Při společné aplikaci selektivního agonisty orphaninu a morfinu v podprahových analgetických dávkách byla snížena citlivost na bolest. K mnoha dalším klinickým studiím však nedošlo, pravděpodobně kvůli nízké perorální biologické dostupnosti a vedlejším účinkům, jako je zhoršení paměti a motorické aktivity.

2.3. Opioidní receptory

2.3.1. Signalizace

Opioidní receptory patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny třídy Gi/Go, jejichž charakteristickým rysem je sedm transmembránových domén. Spadají pod ně mí (μ), kappa (κ) a delta (δ). (15) Byly předloženy další typy receptorů (sigma, orphanin- nazývaný také nociceptin), které se již však nepovažují za klasické opioidní receptory. (16) Opioidní receptor μ je receptor pro β-endorfin, δ-OR je receptor pro enkefaliny a κ-OR je receptor pro dynorfiny (17). Nociceptin je pro nociceptin/orfanin FQ. (18) Aktivace opioidních receptorů inhibuje neurony, které potom blokují přenos míšní bolesti. (15) V klidovém stavu Gα podjednotka má navázaný GDP a s βγ dimerem tvoří komplex ukotvený v plasmatické membráně. Po navázání ligandu na receptor, například exogenního agonisty, jako je morfin, dojde v molekule receptoru ke konformační změně, která se přenáší na G protein. Tato interakce vede k výměně GDP za GTP na Gα podjednotce, což má za následek rozpad komplexu na volné podjednotky Gα a Gβγ. Již dříve bylo dokázáno, že guaninové nukleotidy (např. GTP) v membránových preparátech z tkáně mozku modulují vazbu agonistů na opioidní receptory.

Další důležitou funkcí je to, že opioidní receptory dokážou modulovat vápníkové a draslíkové kanály. Dochází k tomu po disociaci Gαi od Gβγ. Proteinová podjednotka Gα přímo interaguje s G-proteinem řízeným dovnitř usměrňujícím draslíkovým kanálem. Hydrolýzou GTP na GDP a odstraněním Gβγ z interakce s kanálem dochází k deaktivaci kanálu, což způsobuje hyper-polarizaci buňky a inhibici tonické nervové aktivity.

Opioidní receptory dále vyvolávají inhibici vápníkového kanálu, což je způsobeno vazbou disociované podjednotky Gβγ na kanál.

Agonisté jsou ligandy, které způsobují aktivaci receptoru. Běžně dostupné opioidní léky (morfin, fentanyl) jsou agonisté především μ-OR. (16) Při chronickém podávání agonistů dochází k toleranci a fyzické závislosti, přičemž náhlé přerušení dávek nebo podání antagonistů vyvolává abstinenční syndrom.

Antagonisté jsou ligandy, které inhibují aktivaci receptoru. Často byly používány k léčbě zácpy, což je nejčastější vedlejší účinek opioidních léků u pacientů po operaci nebo s rakovinou. Obvykle se léčí laxativy. Jako terapeutické alternativy se používají naloxon nebo metylnaltrexon. Tyto látky byly zkoumány s cílem vyhnout se centrálním

účinkům, které by snižovaly analgezii nebo vyvolávaly abstinenční příznaky. Ačkoli bylo prokázáno zlepšení, aplikace v praxi je omezena relativně nízkou mírou odezvy a zvýšenými nežádoucími účinky. Látky, které působí jako smíšení agonisté a antagonisté (buprenorfin, nalbufin) při nižších dávkách působí jako agonisté a při vyšších dávkách jako antagonisté.

2.3.2. μ-OR, δ-OR, κ-OR

Všechny tři typy opioidních receptorů vážou ligandy, vyvolávající analgetické účinky, ale vedlejší účinky se projevují různě. Pravděpodobně je to způsobeno rozdíly v regionální expresi a rozdíly ve funkční aktivitě receptorů v různých částech centrálních a periferních orgánových systémů. Například účinky μ-OR se projevují respirační depresí, sedací, pocity euforie a dalšími. Kappa receptory vyvolávají dysforické, averzní, sedativní a diuretické účinky. Delta receptory mohou zprostředkovávat pocit odměny, respirační depresi a křeče.

2.4. Metody stanovení

SDS-PAGE

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) je jedna z nejběžnějších metod separace proteinů s vysokým rozlišením. (19), (20). Polyakrylamidový gel je tvořen polymerizací monomerů akrylamidu s monomery vhodné síťovací látky. (21) Nejčastěji používaným síťovacím činidlem je N, N-methylen-bis-akrylamid (zkráceně bisakrylamid nebo Ac-BIS). Polymerace gelu obvykle začíná přidáním persíranu amonného (APS) a reakce se urychluje přidáním katalyzátoru N, N, N, N-tetramethylenediaminu (TEMED).

Proteiny jsou denaturovány aniontovým detergentem SDS, který se na ně váže a dává jim negativní náboj úměrný jejich molekulové hmotnosti. (19) Na 1 g proteinu se váže 1,4 gramu SDS. Na základě této molekulové hmotnosti dochází k separaci přes porézní akrylamidovou matrici.

Systém je vytvořen tak, že zaostřovací gel sedí na separačním gelu. Každý z nich má odlišné pH. V zaostřovacím gelu dochází ke koncentrování vzorků z velkého objemu do velmi malých zón, čímž se zvyšuje účinnost separace. Při spuštění elektroforézy se ionty pohybují směrem k elektrodám. V zaostřovacím gelu mají největší pohyblivost

chloridové a nejmenší glycinové ionty (přítomné v separačním pufru, tedy v celém systému). Komplexy protein-SDS mají pohyblivost v rozmezí těchto iontů. Když se pohyblivé zóny přesunou do separačního gelu, kde je vyšší pH, glycinové ionty předstihnou komplex protein-SDS a tím se proteiny začnou separovat.

Nevýhodou této metody je denaturace proteinů před elektroforézou, proto touto metodou nelze stanovit například enzymatickou aktivitu nebo proteinové vazebné interakce. (20)

Při přípravě vzorku je redukce nutná k tomu, aby se kromě vodíkových vazeb rozštěpily i vazby disulfidické. (22) K tomu se používají redukční činidla - merkaptoethanol (β-ME), dithiotreitol (DTT) nebo ((tris(2-carboxyethyl)fosfin (TCEP).

V posledním stupni přípravy, se vzorky zahřívají při teplotě 95-100 °C, což slouží k lepší denaturaci a tím k jejich inaktivaci. (23)

Western Blot

Western Blot je běžná metoda využívaná k imunodetekci a kvantifikaci specifických proteinů v komplexních buněčných lyzátech. (24) Pro získání kvantitativních údajů z western blotů je třeba použít přesnou metodiku. Validace protilátek je důležitá pro zajištění specifické a správné interakce mezi protilátkou a antigenem a pro určení faktoru ředění vzorků, který je nutný pro nanášku bílkovin v kvantitativní lineární analýze pro každou protilátku.

Tato metoda je založena na specifické interakci protilátek s cílovými antigeny přítomnými ve směsi vzorků. (25) Existují dva základní typy detekce signálu, a to chemiluminiscence a fluorescence. Detekce pomocí fluorescence je neenzymatická metoda, která používá sekundární protilátky značené fluoroforem k přímé detekci vazby protilátek.

Pro detekci cílového proteinu pomocí chemiluminiscence se na membránu, jako sonda proti cílovém antigenu, aplikuje primární protilátka (monoklonální nebo polyklonální). (26) Membrána se po promytí inkubuje se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP). Po dalším promytí se membrána inkubuje s chemiluminiscenčním substrátem na bázi luminolu. Luminol v přítomnosti HRP a

peroxidového pufru oxiduje a dostává se do excitovaného stavu, při přechodu do základního stavu vyzařuje energii ve formě světla.

Detekce pomocí fluorescence poskytuje stabilnější a reprodukovatelnější signály, protože nejsou ovlivněny načasováním nebo dostupností substrátu, které omezují využití chemiluminiscenčních metod pro kvantitativní analýzu. (25)

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo stanovení množství receptorů pro opioidy typu μ, δ a κ v kůře mozku potkanů, kteří byli vystaveni v podmínkách in vivo účinkům multifunkčních peptidů LYS739 a LYS744. Toto stanovení bylo provedeno s pomocí 1D-elektroforézy a immunoblotů přičemž potkani, kteří byli vystaveni působení morfinu, představují referenční skupinu experimentálních zvířat.

4. Praktická část

4.1. Použité chemikálie a přístroje

Chemikálie:

- Pufr STEM (250 mM sacharóza, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl2, pH 7,6)
- Pufr TE (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6)
- Roztoky pro stanovení koncentrace proteinů metodou podle Lowryho A (2% Na_2CO_3, 0,1M NaOH), B (2% vínan sodno-draselný), C (1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- 1 mg/ml standard BSA (hovězí sérový albumin), Sigma-Aldrich
- Folinovo-Cioccaltteauovo fenolové reagens, Sigma
- Vzorkový pufr (2,4 ml 1M Tris-HCl, 1 ml glycerol, 0,8 g SDS, 0,8 g DTT, 1,0 mg bromfenolová modř, doplnit vodou do 10 ml)
- 10% SDS (10 g dodecylsulfát sodný, doplnit do 100 ml vodou)
- 1,5 mol/l Tris-HCl (18,17 g Tris-HCl, doplnit vodou do 100 ml, pomocí HCl upravit pH na 8,8)
- 0,5 mol/l Tris-HCl (6,05 g Tris-HCl, doplnit vodou do 100 ml, pomocí HCl upravit pH na 6,8)
- TBS pufr 10× koncentrovaný (90 ml 4M NaCl, 24 ml 1M Tris – HCl, 126 ml H_2O)
- Promývací pufr (3 ml Tween 20, 100 ml TBS pufr)
- Elektroforetický pufr (30,3 g Tris – HCl, 141,1 g glycin, 10 g SDS, doplněno do 1000 ml vodou)
- Blokovací pufr (5 g sušené mléko, 10 ml TBS pufru 10×, 100 µ Tween 20, doplnit vodou do 100 ml)
- Ředící pufr (1 g sušené mléko, 10 ml TBS pufru 10×, 100 µ Tween 20, doplnit vodou do 100 ml)
- Blotovací pufr (15 g Tris-HCl, 72 glycin, 1,25 g SDS, doplnit vodou do 5000 ml)
- Primární protilátka µ-OR (D-12), sc-515933, Santa Cruz Biotechnology
- Primární protilátka δ-OR , ab-176324, Abcam

- Primární protilátka κ-OR , ab-183825, Abcam
- Sekundární protilátka m-IgGκ BP-HRP (Anti-mouse, sc-516102), Santa Cruz Biotechnology
- Sekundární protilátka (Donkey Anti-rabbit NA934V) GE Healthcare
- Chemiluminiscenční substrát s křenovou peroxidasou, SuperSignal West Dura, Thermo Scientific Pierce

Přístroje:

- Spektrofotometr Biophotometr plus, Eppendorf
- Termoblok BBD, Grant Boekel
- Zdroj napětí Power pac 200, Biorad
- Vyvolávací přístroj OPTIMAX X-Ray Film Processor, Optimax

Další příslušenství:

- Nitrocelulózová membrána
- Autoradiografická kazeta
- Film

4.2. Aplikace opioidních látek a disekce mozku

Samcům potkanů kmene Wistar byla intraperitoneálně podávána dávka morfinu nebo peptidů LYS739 a LYS744 (10 mg/kg) jednou denně po dobu 7 dní. Kontrolní skupině byl podáván fyziologický roztok (0,9% chlorid sodný). Peptidy a morfin byly před aplikací naředěny v 0,9% chloridu sodném na koncentraci 5 mg/ml. Usmrcení zvířat proběhlo 24 hodin po podání poslední dávky.

Na skupinu bylo odebráno 1,5 – 1,7 g (vlhká hmotnost) tkáně kortexu. Tyto vzorky zvířat jedné skupiny se zpracovávaly v jednom směsném vzorku.

Aplikace látek potkanům, usmrcení a odběr mozkové tkáně bylo provedena paní doktorkou Roubalovou).

4.3. Izolace frakcí plazmatických membrán

Frakce plasmatických membrán byla připravena podle publikovaného protokolu (27). Tkáň byla přenesena do STEM pufru obsahujícího navíc inhibitory proteáz. Následně byla provedena homogenizace v homogenizátoru teflon-sklo a byl připraven 20% homogenát (2 g tkáně/10 ml STEM pufru). K oddělení buněčných zbytků a jaderné frakce od post-nukleárního supernatantu (PNS) byl centrifugován po dobu 7 minut při 3500 otáčkách za minutu (1200 × g). PNS byl přenesen do čisté centrifugační zkumavky a byl centrifugován při 50 000 otáčkách za minutu (200 000 × g) po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Sediment membrán byl poté znovu suspendován v TE pufru, zmražen v kapalném dusíku a uložen při teplotě -80 °C.

4.4. Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Lowryho

Do deseti zkumavek byly podle tabulky č. 1 pipetovány kalibrační roztoky. Do dalších zkumavek bylo pipetováno 20 µl vzorku a 480 µl destilované vody; vzorky byly připraveny v triplikátech. Následně byla připravena směs roztoků A + B + C (v poměru 50:1:1), a 1,5 ml této směsi bylo přidáno do všech zkumavek v 15sekundovém intervalu. Roztoky se nechaly 10–15 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 150 µl Folinova reagens (naředěno s destilovanou vodou v poměru 1:1) ve stejném časovém intervalu. Zkumavky byly promíchány a nechaly se inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byla měřena absorbance vzorků v 15sekundovém intervalu při vlnové délce 595 nm.

Vyhodnocení výsledků proběhlo v programu GraphPad Prism. Kalibrační křivka byla určena jako nelineární regrese s polynomem druhého stupně. Ze tří vypočtených hodnot koncentrací daného vzorku byl vypočten průměr. Poté byl ke vzorku přidán vzorkový pufr a vzorky byly naředěny na konečnou koncentraci 2 mg/ml. Vzorky byly zahřáty v termo-bloku na teplotu 100 °C po dobu pěti minut.

Tabulka 1. Kalibrační řada roztoku BSA (1mg/ml)

Č. standartu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V(BSA)/µl	0	10	20	30	40	50	75	100	150	200
V(H_2O)/µl	500	490	480	470	460	450	425	400	350	300

4.5. Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Poté byl ke vzorku přidán vzorkový pufr a vzorky byly naředěny na konečnou koncentraci 2 mg/ml. Vzorky byly zahřáty v termo-bloku na teplotu 100 °C po dobu pěti minut.

4.6. SDS-PAGE a immunoblotting

Na přípravu gelů byla skla vyčištěna destilovanou vodou, lihem a vnitřní strana byla otřena acetonem. Touto stranou byla zasazena k sobě do stojánku. Dále byly připraveny 10% gely podle tabulky č. 2 a 3 (objemy jsou počítané pro 4 gely). Separační gel byl nalit mezi skla a byl převrstven 0,5 ml butanolem. Nechal se tuhnout 45 minut při laboratorní teplotě. Po této době se butanol vylil a na separační gel byl nalit zaostřovací gel, do kterého byly zasazeny hřebínky na vytvoření jamek. Tuhnutí trvalo 25 minut. Ze zatuhlého zaostřovacího gelu byl vytažen hřebínek a skla byla umístěna do elektroforetické vany. Mezi skla byl nalit elektroforetický pufr a do jamek bylo pipetováno 2,5 µl standardu BSA a 10 µl vzorku. V případě µ-OR bylo pipetováno 20 µl. Po napipetování byl doplněn elektroforetický pufr (celkový objem pufru 900 ml) a nechala se běžet elektroforéza po dobu 45 minut při 200 V.

Tabulka 2: Objemy sloučenin pro přípravu separačního gelu (pro 4 gely)

Chemická látka	(V/µl)
Destilovaná voda	16 000
1,5 mol/l Tris HCl	10 000
30% Ac-Bis	13 400
10% SDS	400
10% APS	270
TEMED	24

Tabulka 3: Objemy sloučenin pro přípravu zaostřovacího gelu (pro 4 gely)

Chemická látka	(V/µl)
Destilovaná voda	12 000
0,5 mol/l Tris-HCl	5 000
30% Ac-Bis	2 600
10% SDS	200
10% APS	135
TEMED	24

Do misky byl nalit blotovací pufr, do kterého byla připravena blotovací mřížka, na kterou se postupně navrstvil molitan, silnější filtrační papír, gel se vzorky, standard směrem doleva a čelo nahoru, dále nitrocelulózová membrána, filtrační papír a molitan. Mřížka byla zavřena pod hladinou a následně umístěna do blotovací vany, do které byl doplněn potřebný objem blotovacího pufru. Blotování probíhalo po dobu jedné hodinu při 100 V.

Poté byla membrána přendána do krabičky, kde byla několikrát omyta destilovanou vodou a poté k ní bylo přidáno 25 ml blokovacího pufru a bylo ponecháno 40 minut na třepačce při laboratorní teplotě. Dále byla membrána opět několikrát omyta destilovanou vodou a byla přidána primární protilátka naředěná v ředícím pufru, kde se nechala inkubovat přes noc v chladícím boxu na třepačce.

Druhý den byla membrána omyta destilovanou vodou a třikrát po dobu 10 minut byla promývána v 15 ml promývacího pufru. Poté byla přidána sekundární protilátka, která se nechala inkubovat jednu hodinu na třepačce při laboratorní teplotě. Následně byla membrána opět promývána třikrát promývacím pufrem. Membrána byla po omytí destilovanou vodou osušena filtračním papírem, poté bylo na membránu napipetováno 500 ml chemiluminiscenčního substrátu, který se nechal působit jednu minutu. Membrána byla opět osušena ve filtračním papíru, zabalena do folie a přilepena do kazety. Následně ve fotokomoře byla provedena expozice filmu a film byl vyvolán na vyvolávačce.

4.7. Vyhodnocení signálu receptoru na blotu a statistická analýza získaných dat

Pro každý typ receptoru byly vyhodnoceny tři imunobloty, pro vytvoření grafu byl vypočítán jejich průměr. Vyhodnocení relativní intenzity signálu proužků z výše zmíněných pokusů bylo provedeno v programu Image J. Z těchto dat byly vytvořeny grafy v programu GraphPad Prism, které znázorňují relativní signální intenzitu proužku zkoumaného vzorku (kontrola, morfin, LYS739, LYS744). Ke statistickému vyhodnocení byl využit program one-way ANOVA test a Bonferroni test.

5. Výsledky

5.1. Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Lowryho

Tabulka 4. Výsledky koncentrace proteinů použitých vzorků, výchozí koncentrace pro ředění vzorků na elektroforézu.

Skupiny vzorků	c/ mg/ml
Kontrola	15,5
Morfin	17,5
LYS739	16,8
LYS744	16,5

Po naředění byla výsledná koncentrace ve všech vzorcích stejná a činila 2 mg/ml.

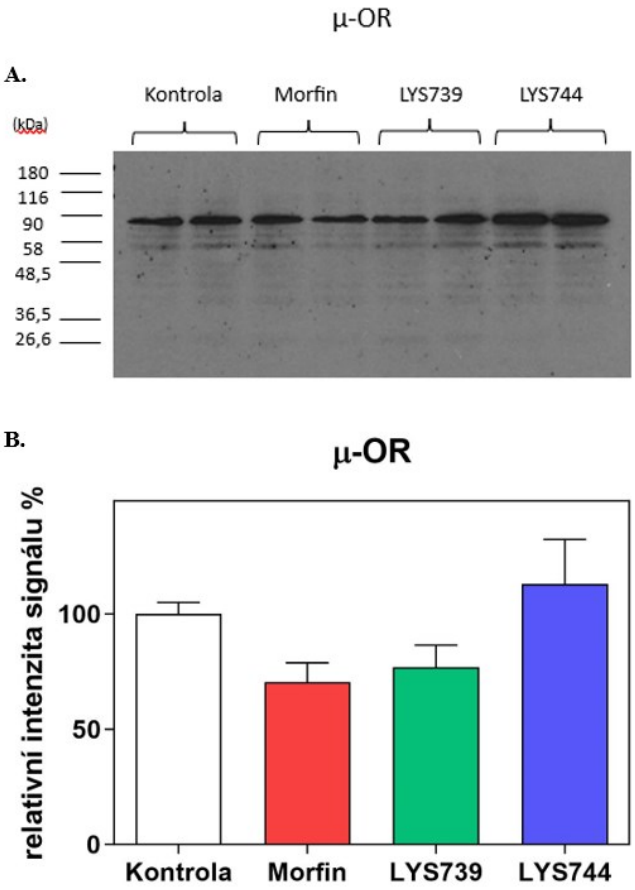
5.2. Stanovení množství μ-opioidních receptorů

Na obrázku č. 3A jsou znázorněny výsledky imunodetekce v kůře mozku potkanů, kteří byli vystaveni morfinu a multifunkčním opioidním peptidům LYS739 a LYS744. V souhlase s literaturou, dominantní proužky μ-OR byly detekovány při relativní molekulové hmotnosti ~ 80 kDa, což dobře odpovídá glykosylované formě tohoto receptoru. Rovněž nelze vyloučit, že se jedná o dimer tohoto receptoru – diskuse (str. 26).

Kromě dominantního proužku detekovaného při ~ 80 kDa, byl detekován méně intenzivní signál s relativní molekulovou hmotností ~ 55 kDa. Pro detekci byla použita monoklonální protilátka sc-515933. Pro přípravu vzorků pro elektroforézu byl použit pufr s DTT, což se projevilo přítomností více pásů minoritních proteinů μ-OR v širokém rozsahu molekulových hmotností 25-90 kDa. Signály imunoblotu byly hodnoceny rozmezí 40-90 kDa. To, že μ-OR vykazuje více signálů v různých molekulových vahách je způsobeno glykosylací (28).

Po opracování glykosydázami se molekulová hmotnost μ-OR sníží do oblasti ~ 40-50 kDa, což naznačuje, že glykosylové zbytky se se významně podílí na molekulové hmotnosti μ-OR.

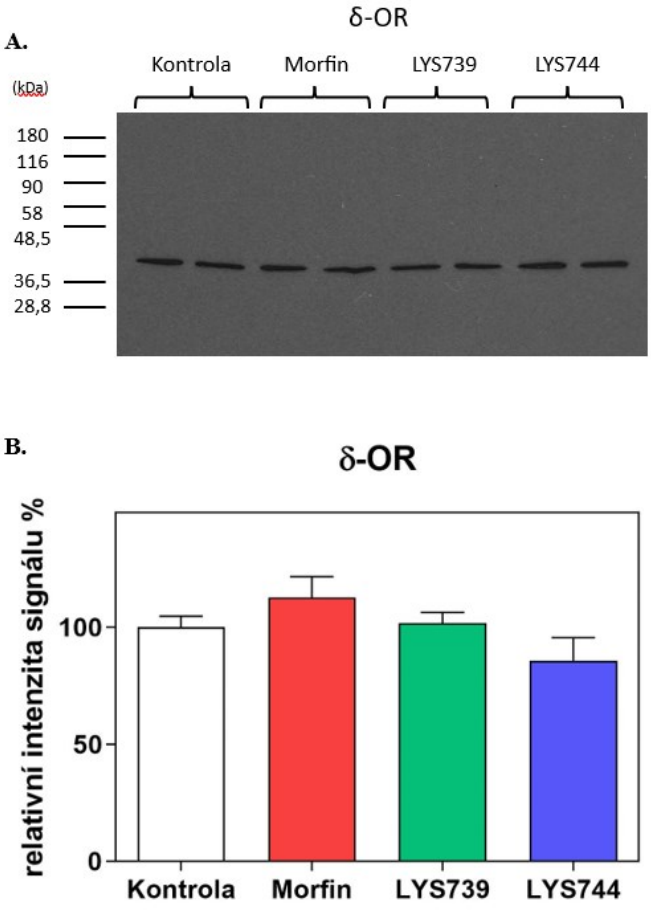
Graf na obrázku č. 3B. znázorňuje výsledek kvantifikace intenzity těchto signálů μ-OR. Statistického hodnocení signálů ukázalo, že pokles u morfinu a LYS739 a mírný nárůst u LYS744 není signifikantní.



Obrázek 3. (A) Výsledky imunodetekce μ-opioidního receptoru v kortexu. (B) Grafické zpracování experimentálních výsledků.

5.3. Stanovení množství δ opioidních receptorů

Na obrázku č. 4A jsou zachyceny výsledky imunodetekce δ-OR v kůře mozku potkanů, kteří byli vystaveni multifunkčním opioidním peptidům a morfinu. Proužky δ-OR jsou detekovány v molekulové váze ~ 40 kDa, což odpovídá možné formě tohoto receptoru. Pro detekci byla použita monoklonální protilátka ab-176324. Graf na obrázku č. 4B. znázorňuje výsledek kvantifikace intenzity signálu δ-OR. Lze vidět, že intenzita signálu ve zkoumaných vzorcích nebyla významně odlišná od kontrolní skupiny. Statistického hodnocení signálů ukázalo, že mírný nárůst u morfinu a LYS739 a pokles u LYS744 není signifikantní.

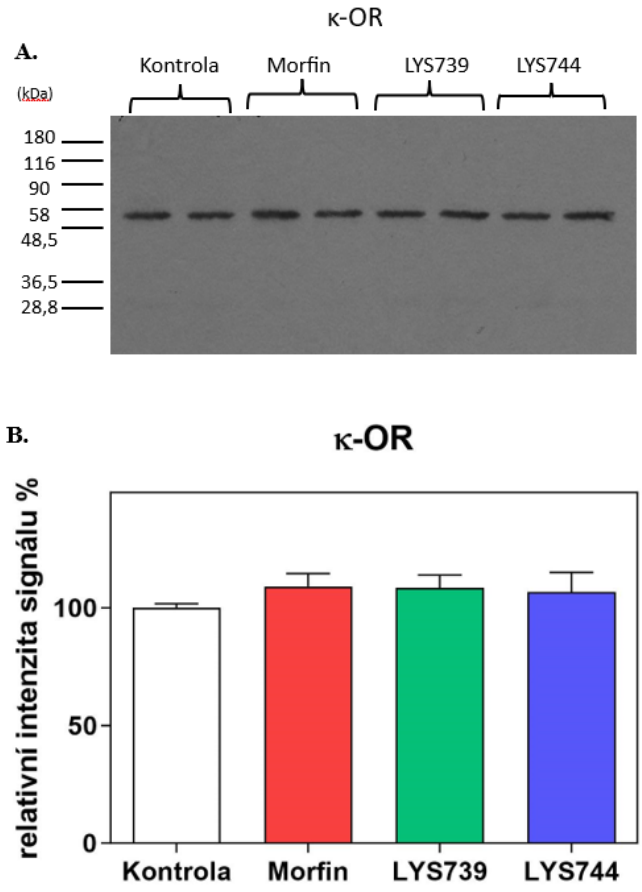


Obrázek 4. (A) Výsledky imunodetekce δ-opioidního receptoru v kortexu. (B) Grafické zpracování experimentálních výsledků.

5.4. Stanovení množství κ opioidních receptorů

Na obrázku č. 5A jsou zachyceny výsledky imunodetekce κ-OR v kůře mozku potkanů, kteří byli vystaveni multifunkčním opioidním peptidům a morfinu. Proužky δ-OR jsou detekovány v molekulové váze ~ 56 kDa, což odpovídá možné formě tohoto receptoru. Pro detekci byla použita monoklonální protilátka ab-183825.

Graf na obrázku č. 5B. znázorňuje výsledek kvantifikace intenzity signálu κ-OR. Lze vidět, že intenzita signálu ve zkoumaných vzorcích nebyla významně odlišná od kontrolní skupiny. Statistického hodnocení signálů ukázalo, že malý nárůst u morfinu, LYS739 a LYS744 není signifikantní.



Obrázek 5. (A) Výsledky imunodetekce κ-opioidního receptoru v kortexu. (B) Grafické zpracování experimentálních výsledků.

6. Diskuze

V této práci byly tedy detekovány tři typy opioidních receptorů μ-OR, δ-OR a κ-OR po podání morfinu a multifunkčních peptidů LYS739 a LYS744. U receptoru μ-OR byl zaznamenán nejsilnější signál v molekulové váze ~80 kDa, což by odpovídalo možné dimerní formě. Z publikace (29) lze vidět, že se tento OR je chová jinak v různých typech gelů, a to, jak se projeví signál také závisí na tom, jestli se pracovalo za disociovaných podmínek (do vzorkového pufru bylo přidáno DTT) nebo ne.

Validace je experimentální důkaz a dokumentace, že konkrétní protilátka je vhodná pro zamýšlený test nebo účel. (30) V případě Western blotů je to tedy důkaz, že daná protilátka je specifická a může se selektivně vázat na určený cíl v komplexním heterogenním vzorku. Validace je běžně používaná prodejci protilátek během vývoje a šaržového testování. Na druhou stranu zde není žádná záruka, že daná protilátka bude specificky detekovat sledovaný cíl.

Například k detekci μ-OR v této bakalářské práci byla použita protilátka od jiného výrobce, než je uvedeno v publikaci (29), což pravděpodobně způsobuje rozdíl v signálu tohoto receptoru. Tento rozdíl je zřejmě dán různou specifitou použitých protilátek.

U toho receptoru lze také vidět více proužku oproti δ-OR a κ-OR. Pokud se po detekci ukazuje více pruhů, nemusí to hned znamenat nespecifickou vazbu (30). Další pruhy mohou představovat degradaci proteinu, štěpení post-translační modifikací, přítomnost sestřihových variant cílového proteinu nebo přítomnost jiných proteinů, které také obsahují cílový epitop. Proto je důležité potvrdit, že protilátka rozpoznává cílový protein v zamýšleném testu a pochopit význam dalších pruhů.

Běžnou post-translační modifikací je N-vázaná glykosylace. (31) Pásy μ-OR lze rozdělit široké a difúzní pásy s vyšší relativní molekulovou hmotností, způsobené právě glykosylací a ostré pásy s nižší molekulovou hmotností. Po deglykosylaci, tedy odstranění N-vázaných glykanů se sníží molekulová hmotnost, konkrétně u μ-OR na ~ 43kDa. V případě stanovení μ-OR se tedy objevovaly o glykosylované, difúzní pásy s širokým rozsahem molekulových hmotností, které by tedy po deglykosylaci měly vykazovat 50 kDa (17). V případě δ-OR a κ-OR se jedná o ostré pásy s nižší molekulovou hmotností.

Výsledkem této práce je, že nedošlo ke změně u LYS739, LYS744, ani u morfinu. Nezměněné množství OR u morfinu není překvapivý výsledek. Je v souladu s prací (29), kde ani podávání zvyšujících se dávek morfinu nezpůsobilo, žádné významné změny v expresi OR. To bylo potvrzeno například i experimentem stanovení vazby radioligandů. (29)

Analogy LYS739 a LYS744 mají však vliv na změnu jiných molekul. (32) V této publikaci byla zkoumána změna proteinů v mozkové kůře, hipokampu a v lymfocytech sleziny po podání dávek 3 mg/kg a 10 mg/kg. Při nižší dávce byly změny pozorovány spíše u LYS744. U vyšší dávky byla pozorována větší změna převážně u LYS739, v případě LYS744 nebyl pozorován zvýšený počet změněných proteinů.

5. Závěr

V této bakalářské práci byla studována změna hladin v expresi opioidních receptorů typu μ-, δ-, κ-proteinů v kůře mozku potkanů, kteří byli vystaveni po dobu 7 dnů dávce 10 mg/kg morfinu nebo multifunkčním peptidům LYS739 a LYS744.

V grafu na obrázku č.3B lze pozorovat menší pokles v receptoru μ-OR po podání morfinu a LYS739, tento pokles byl však při statistické analýze vyhodnocen jako nevýznamný.

Ze statistického hodnocení dat dalších dvou opioidních receptorů typu δ-OR a κ-OR vyplývá, že podávání multifunkčních peptidů vedlo k menší nesignifikantní změně na obou typech OR (δ-OR, κ-OR).

Seznam použité literatury

1. Corbett, A., D., Graeme, H., McKnight, A., T.: Paterson, S. J., 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *British Journal of Pharmacology* **147**:S1, 153-162 (2006).

2. Azzam Ammar, A., H., McDonald J., Lambert, D., G.: Hot topics in opioid pharmacology: mixed and biased opioids. *British Journal of Anaesthesia* **122**:6, 2019.

3. Bailey, C., P., Connor, M.: Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Current Opinion in Pharmacology* **5**:1, 60-68 (2005).

4. Christie, M., J., Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *British Journal of Pharmacology* **154**:2, 384-396 (2008).

5. Dewey, W.: Pentazocine. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* Elseiver, 1-6 (2007).

6. Han, Lichun, Yuqiang SU, Hongfei Xiong, et al.: Oxycodone versus sufentanil in adult patient-controlled intravenous analgesia after abdominal surgery. *Medicine* **97**:31, (2018).

7. Listos, J., Lupina, M., Talarek S., Mazur, A., Orzelska-Górka, J., Kotlińska, J.: The Mechanisms Involved in Morphine Addiction. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:17 (2019).

8. Mugabure, B., B.: A Clinical Approach to Neuraxial Morphine for the Treatment of Postoperative Pain. *Pain Research and Treatment* 1-11 (2012).

9. Lee, Y., S., Remesic, M., Ramos-Colon, C., et al.: Multifunctional Enkephalin Analogs with a New Biological Profile: MOR/DOR Agonism and KOR Antagonism. *Biomedicines* **9**:6 (2021).

10. Lee, Y., S.: Peptidomimetics and Their Applications for Opioid Peptide Drug Discovery. *Biomolecules* **12**:9 (2022).

11. Schiller, P., W.: Bi- or multifunctional opioid peptide drugs. *Life Sciences* **86**:15-16, 598-603 (2010).

12. Lee, Y., S., Vinod, K., Scott, M., C., et al.: Development of Potent μ and δ Opioid Agonists with High Lipophilicity. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**:1, 382-386 (2011).

13. Islam, M., R., Yang, L., Lee, Y., S., et al: Enkephalin-Fentanyl Multifunctional Opioids as Potential Neuroprotectants for Ischemic Stroke Treatment. *Current Pharmaceutical Design* **22**:42, 6459-6468 (2017).

14. Günther, T., Dasgupta, P., Mann, A., Miess, E., Kliewer, A., Fritzwanker, S., Steinborn, R., Schulz S.: Targeting multiple opioid receptors – improved analgesics with reduced side effects? *British Journal of Pharmacology* **175**:14, 2857-2868 (2017).

15. Al-Hasani, R., Bruchas, M., R.: Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology* **115**:6, 1363-1381 (2011).

16. Stein, Ch.: Opioid Receptors. *Annual Review of Medicine* **67**:1, 433-451 (2016).

17. MOR-1 antibody (D-12), sc-515933, Santa Cruz Biotechnology.

18. Corder, G., Daniel, C., Bruchas, M., R., Scherrer, G.: Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annual Review of Neuroscience* **41**:1, 453-473 (2018).

19. Smith, B., J.: SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Basic Protein and Peptide Protocols* 23-34 (1994).

20. Nowakowski, A., B., Wobig, W., J., Petering, D., H.: Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics* 6:5, 1068-1078 (2014).

21. Al-Tubuly, A., A.: SDS-PAGE and Western Blotting. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*, 391-405 (2000).

22. Wiesner, R., Scheller, Ch., Krebs, F., Wätzig, H., Oltmann-Norden I.*:* A comparative study of CE-SDS, SDS-PAGE, and Simple Western: Influences of sample preparation on molecular weight determination of proteins. *Electrophoresis* **42**:3, 206-218 (2021).

23. Kurien, B., T., Scofield, R., H.: Common Artifacts and Mistakes Made in Electrophoresis. *Protein Electrophoresis,* 633-640 (2012).

24. Taylor, S., C., Posch, A.: The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International* **2014,** 1-8 (2014).

25. Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A., R., Harford, J. A.: A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical Biochemistry* **593** (2020).

26. Alegria-Schaffer, A.: Western Blotting using Chemiluminescent Substrates. *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C* 251-259 (2014).

27. Vošahlíková, M., Roubalová L., Brejchová, J., Alda, M., Svoboda, P.: Therapeutic lithium alters polar head-group region of lipid bilayer and prevents lipid peroxidation in forebrain cortex of sleep-deprived rats. *Biochimica et Biophysica (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1866**:9 (2021)

28. Kasai, S., Yamamoto, H., Kamegaya, E., Uhl, G., R., Sora, I., Watanabe, M., Ikeda, K., Quantitative Detection of μ Opioid Receptor: Western Blot Analyses Using μ Opioid Receptor Knockout Mice. *Current Neuropharmacology* **9**:1, 219-222 (2011).

29. Ujčíková, H., Hloušková, M., Cechová, K., Stolařová, K., Roubalová, L., Svoboda, P.: Determination of μ-, δ- and κ-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**:10, (2017).

30. Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A. R., Harford, J. A.: A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical Biochemistry* **593** (2020).

31. Huang, P., Chen, Ch., Mague, S., D., Blendy, J., A., Liu-Chen, LY.: A common single nucleotide polymorphism A118G of the μ opioid receptor alters its N-glycosylation and protein stability. *Biochemical Journal* **441**:1, 379-386 (2012).

32. Ujčíková, H., Roubalová, L., Lee, Y., S., Slaninová, J., Brejchová, J., Svoboda, P.: The Dose-Dependent Effects of Multifunctional Enkephalin Analogs on the Protein Composition of Rat Spleen Lymphocytes, Cortex, and Hippocampus; Comparison with Changes Induced by Morphine. Biomedicines **10**:8 (2022)