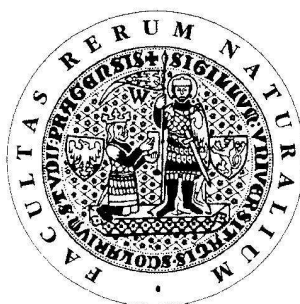


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

---



VLIV DLOUHODOBÉHO PODÁVÁNÍ MORFINU NA  
OPIOIDNÍ RECEPTORY V MOZKOVÉ KŮŘE POTKANA

**Effect of long-term application of morphine on opioid receptors  
in rat brain cortex**

**Diplomová práce**

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

**Vedoucí práce:** RNDr. Lucie Hejnová, Ph.D.

Praha 2012

Kateřina Jeřábková

# PROHLÁŠENÍ

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře fyziologie živočichů Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2010 - 2012, pod vedením školitelky RNDr. Lucie Hejnové, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem veškerou použitou literaturu řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne .....

.....  
Kateřina Jeřábková

***D**ovolují si tímto poděkovat své školitelce RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky k mé práci, dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Novotnému a všem členům Katedry fyziologie živočichů za všestrannou pomoc a ochotu. Současně bych ráda poděkovala svým rodičům a celé rodině za umožnění studia na vysoké škole a v neposlední řadě děkuji za podporu také svým přátelům.*

## ABSTRAKT

Dlouhou dobu je pozornost upírána k popsání mechanismu vzniku tolerance a závislosti v souvislosti s klinickým podáváním morfinu při léčbě těžkých bolestí, jeho znalost by umožnila syntézu nových, přesně cílených farmak. Tato diplomová práce pojednává o problematice opioidních receptorů se zaměřením na vliv dlouhodobého podávání morfinu, který byl sledován pomocí vazebných pokusů s radioaktivně značeným neselektivním antagonistou [<sup>3</sup>H]Diprenorphine. Jedním z cílů této diplomové práce bylo zavedení a optimalizace metody pro přípravu preparátu plazmatických membrán z mozkové kůry potkana pomocí percollového gradientu. Celkem bylo sledováno pět skupin potkanů, které se lišily dobou podávání morfinu: deset dní (M-10), dvacet osm dní (M-28), deset dní se sedmidenní regresí (RM-10), dvacet osm dní se sedmidenní regresí (RM-28) a skupina kontrolní (K). Podávání morfinu vedlo k poklesu celkového množství opioidních receptorů, který byl výrazně patrný již po deseti dnech aplikace, při dalším podávání morfinu došlo k dalšímu, ale již mírnějšímu poklesu počtu vazebných míst. Tento počet se dále snižoval i v době regrese, kdy se od sebe skupiny výrazně nelišily. Celkový úbytek odpovídal přibližně 30 % vazby v kontrolním vzorku. Rovnovážná disociační konstanta ( $K_d$ ) a tedy afinita [<sup>3</sup>H]Diprenorphine k opioidním receptorům se mezi skupinami nelišila. Morfin působí prostřednictvím  $\mu$ -receptoru, proto byla zvláštní pozornost věnována zkoumání vlivu morfinu na tento podtyp, a to pomocí kompetičních vazebných pokusů. Jako kompetitor byl použit selektivní agonista  $\mu$ -receptorů DAMGO. Výsledky ukázaly, že po deseti a dvaceti osmi dnech podávání morfinu dochází ke zvýšení procentuálního zastoupení  $\mu$ -receptorů, v období po regresi se poměr opioidních receptorů vrací na hodnoty kontroly. Afinita DAMGO k  $\mu$ -receptorům vyjádřená rovnovážnou inhibiční konstantou ( $K_i$ ) zůstávala neměnná u všech skupin. Dlouhodobé podávání morfinu snižuje celkové množství opioidních receptorů ve vzorku plazmatických membrán z mozkové kůry potkana. Při vysazení morfinu po sedm dní dochází k jejich dalšímu poklesu. V průběhu aplikace morfinu dochází též ke změnám v poměru jednotlivých typů opioidních receptorů.

**Klíčová slova:** [<sup>3</sup>H]diprenorphine – centrální nervová soustava – DAMGO – G-protein – kompetiční vazebné pokusy –  $\mu$ -opioidní receptor – morfin – saturační vazebné pokusy – tolerance – rovnovážná disociační a inhibiční konstanta

## ABSTRACT

A huge effort has been put in determining the mechanism of the development of tolerance and dependence in context of clinical use of morphine for treatment of severe pain. Understanding of this mechanism would help to design new and more efficient pharmaceuticals. This diploma paper discuss the opiate receptors with a special focus on long-term effect of chronic morphine treatment, which was determined using a radioligand binding assays with a non-selective antagonist [<sup>3</sup>H]Diprenorphine. One of the goals of this work was to create and optimise a method for preparation of pure plasma membranes from rat cortex using percoll gradient. There were five groups, which differed in the length of morphine treatment: ten days (M-10), twenty-eight days (M-28), ten days with seven days of regression (RM-10) twenty-eight days with seven days of regression (RM-28) and a control group (K). The loss of total opioid receptor number was noticeable after ten days and grew slightly during continuous morphine treatment and kept lowering in the period of regression. The total loss was approximately 30% of the control binding. The equilibrium dissociation constant ( $K_d$ ), thus the affinity of [<sup>3</sup>H]Diprenorphine wasn't significantly different among the groups. Morphine acts through  $\mu$ -opioid receptor, that's why there was a special effort to define the effect of long-term morphine treatment on this subtype using competitive binding study. A selective agonist DAMGO was used as a competitive ligand. The results shown, that after ten and twenty-eight days of morphine treatment there is an increase in percentage of  $\mu$ -receptors present in the tissue. During the period of regression, this value regresses back to the control. The affinity of DAMGO to opioid receptors presented by  $K_i$  value remained the same among all groups. It was proved that the long-term morphine treatment lowers the total number of opioid binding in the rat cortex. After seven days of regression, there is still a significant loss of total receptor number. The percentage of receptors present in rat cortex is also changing.

**Key words:** [<sup>3</sup>H]diprenorphine – central nervous system – DAMGO – G-protein – competitive binding experiments –  $\mu$ -opioid receptor – morphine – saturation binding experiments – tolerance – equilibrium dissociation and inhibition constant

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÝ ÚVOD</b>	<b>12</b>
2.1	TYPY OPIOIDNÍCH RECEPTORŮ	12
2.2	FARMAKOLOGIE OPIOIDNÍCH RECEPTORŮ	12
2.2.1	ENDOGENNÍ A SYNTETICKÉ OPIOIDNÍ LIGANDY	13
2.2.2	MORFIN A JEHO VLASTNOSTI	15
2.3	MORFOLOGIE $\mu$ -RECEPTORU	17
2.3.1	STRUKTURNÍ VLASTNOSTI	17
2.3.2	VÝZNAM ALTERNATIVNÍHO SESTŘIHU RNA	18
2.4	SIGNALIZAČNÍ KASKÁDA	20
2.4.1	PRŮBĚH SIGNALIZACE PŘI FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNKÁCH	21
2.4.2	OVLIVNĚNÍ SIGNALIZAČNÍ KASKÁDY CHRONICKÝM PODÁVÁNÍM MORFINU	23
2.5	INTERAKCE RECEPTORŮ	25
2.6	LOKALIZACE RECEPTORU	27
<b>3</b>	<b>METODY</b>	<b>29</b>
3.1	CHEMIKÁLIE	29
3.2	ROZTOKY	29
3.3	STANOVENÍ PROTEINŮ	30
3.3.1	ROZTOKY	30
3.3.2	POSTUP PRÁCE	30
3.3.3	VYHODNOCENÍ	31
3.4	SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA	31
3.4.1	ROZTOKY	31
3.4.2	POSTUP PRÁCE	31
3.4.3	VYHODNOCENÍ	33
3.5	PŘÍPRAVA PLAZMATICKÝCH MEMBRÁN	33
3.5.1	ROZTOKY	33
3.5.2	OPTIMALIZACE METODY	33

3.5.3	PŘÍPRAVA EXPERIMENTÁLNÍCH VZORKŮ .....	34
<b>3.6</b>	<b>VAZEBNÉ POKUSY .....</b>	<b>35</b>
3.6.1	ROZTOKY .....	35
3.6.2	PŘÍPRAVNÝ POKUS .....	35
3.6.3	JEDNOBODOVÉ STANOVENÍ .....	36
3.6.4	SATURAČNÍ USPOŘÁDÁNÍ .....	36
3.6.5	KOMPETIČNÍ USPOŘÁDÁNÍ .....	37
3.6.6	HODNOCENÍ POKUSŮ .....	37
<b>4</b>	<b><u>VÝSLEDKY</u></b> .....	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>ZAVEDENÍ A OPTIMALIZACE METODY PŘÍPRAVY PLAZMATICKÝCH MEMBRÁN .....</b>	<b>39</b>
4.1.1	SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA .....	40
4.1.2	JEDNOBODOVÉ STANOVENÍ .....	41
<b>4.2</b>	<b>VAZEBNÉ POKUSY .....</b>	<b>43</b>
4.2.1	PŘÍPRAVNÝ POKUS .....	43
4.2.2	SATURAČNÍ USPOŘÁDÁNÍ .....	44
4.2.3	KOMPETIČNÍ USPOŘÁDÁNÍ .....	51
<b>5</b>	<b><u>DISKUZE</u></b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b><u>ZÁVĚR</u></b> .....	<b>64</b>

## SEZNAM ZKRATEK

$\lambda$	vlnová délka [nm]
A	absorbance
AC	adenylát cykláza
APS	amoniumpersulfát
B	specifická vazba
BCA	kyselina bicinchonininová
BSA	hovězí sérový albumin
$B_{\max}$	celkový počet vazebných míst ve tkáni
c	molární koncentrace [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
(c)AMP	(cyklický) adenosin monofosfát
CaM-K	kalcium-kalmodulin dependentní kinasa
CNS	centrální nervová soustava
CREB	transkripční faktor, z angl. cAMP response element- binding protein
DAMGO	[D-Ala <sup>2</sup> ,N-Me-Phe <sup>4</sup> ,Gly-ol <sup>5</sup> ]enkefalin
DTT	dithiothretiol
DPDPE	[D-Pen <sup>2,5</sup> ]enkefalin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ERK	kinasa regulovaná extracelulárním signálem
F	koncentrace volného radioligandu
GDP/GTP	guanosin difosfát/ guanosin trifosfát
GIRK	G-proteinem aktivovaný draslíkový kanál
GRK	kinasa pro receptor spřažený s G-proteinem
$K_d$	rovnovážná disociační konstanta komplexu ligand-receptor
$K_i$	rovnovážná inhibiční konstanta neznačeného ligandu
m	hmotnost [kg]
MAPK	mitogen-aktivovaná proteinkinasa
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
mRNA	mediátorová/ informační ribonukleonová kyselina
MRS	regulační sekvence pro $\mu$ -opioidní receptor
PEI	polyethylenimin



pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
PLA/PLC	fosfolipasa A/C
PKA/PKC	proteinkinasa A/C
PTX	pertusis toxin
RGS	regulátory G-proteiny řízené signalizace
SDS	dodecylsulfát
SEM	směrodatná odchylka střední hodnoty
TEMED	tetramethylethyldiamin
TBS	roztok chloridu sodného v Tris pufru
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

# 1 ÚVOD

Společným znakem všech živých organismů je vnímat vnější podněty a reagovat na ně. Každým dnem je člověk vystavován stovkám látek, které více či méně specificky působí v oblasti jeho centrální nervové soustavy. Nejzřetelněji je tato skutečnost vidět na příkladu psychoaktivních látek. Využití opia (z řec. „opos“ = rostlinná šťáva) bylo známo již v dobách před naším letopočtem a to jak pro jeho euforické a narkotické účinky, tak i pro jeho silné analgetické působení. Zmínky o využívání opia pochází především z Persie a Arábie, odkud se postupně šířilo do Číny a později i do Evropy. Nejvíce využívanou látkou obsaženou v opiu je bezesporu morfin, který z něho byl poprvé izolován v roce 1806, a je látkou dodnes používanou k tišení velmi silných bolestí [1]. Jeho klinické využití je omezené, zejména kvůli rychlému rozvoji tolerance a závislosti. Tolerance je projevem adaptativních změn na molekulární úrovni, kdy stejná dávka postupně vyvolává menší odpověď. Závislost je způsobena dlouhodobějšími změnami na úrovni buněčné signalizace, které jsou vyvolané chronickým podáváním návykových látek, při ukončení podávání těchto látek se projeví abstinenční příznaky.

Z těchto skutečností vycházely mnohé pokusy o přípravu nových, méně návykových látek se stejně silnými analgetickými účinky jako má morfin. Byla uskutečněna řada syntéz ve snaze takovou látku připravit, jejichž produktem byl například i heroin, o kterém bylo až později zjištěno, že z hlediska nežádoucích účinků je ještě méně využitelný než morfin. V 60. letech minulého století bylo na základě četných farmakologických studií zjištěno, že každá látka působí prostřednictvím specifického vazebného místa (receptoru) a že každá buňka dokáže odpovědět jen na ty signály, pro které má exprimovaný příslušný receptor, což je důvodem proč buňky reagují na odlišné druhy podnětů [2]. Receptor je umístěn v plazmatické membráně na povrchu buňky nebo v jejím vnitřním prostoru a má své specifické místo pro vazbu signální molekuly, jež vyvolává příslušnou odpověď v organismu.

První zmínka o existenci  $\mu$ -receptoru, specifického pro vazbu morfinu, byla publikována v roce 1973 a bylo tak zjištěno za pomoci vazebných studií se značenými radioligandy [3]. Další studie potvrzující tuto skutečnost se v zápětí připojily [4]. Následovalo popsání a charakterizace i dalších podtypů označených jako  $\delta$ - a  $\kappa$ -.

Doposud se podařilo všechny podtypy podrobně charakterizovat z hlediska morfologického a farmakologického, byla určena jejich genová sekvenci a roku 1992 se poprvé podařilo receptory klonovat, což umožnilo jejich podrobnější výzkum [5]. Podrobný mechanismus vzniku tolerance a závislosti v důsledku chronického podávání morfinu však stále není přesně znám. Jeho popsání by umožnilo připravit přesně cílená analgetika s minimálními nežádoucími účinky a to zejména bez rozvoje tolerance a závislosti.

Cílem této diplomové práce je:

1. Zavést a optimalizovat metodu přípravy čistých plazmatických membrán pomocí Percollového gradientu z mozkové kůry potkana.
2. Zjistit vliv dlouhodobého podávání morfinu na celkový počet opioidních receptorů v mozkové kůře potkana.
3. Konkretizovat vliv dlouhodobého podávání morfinu na  $\mu$ -opioidní receptor.

## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Typy opioidních receptorů

Jak již bylo řečeno, rozeznáváme  $\mu$ - (mí),  $\delta$ - (delta) a  $\kappa$ - (kappa) typy opioidních receptorů, označované také jako MOP-, DOP- a KOP- receptory [6], tento název je někdy v literatuře nesprávně zaměňován za MOR-, DOR- a KOR- receptory, což je v rozporu s názvoslovím definovaným databází IUPHAR, jednalo by se totiž o označení opioidní receptor receptor [7]. Jednotlivé receptory se liší aminokyselinovým složením svého proteinového řetězce, specifitou vazby k jednotlivým opioidním ligandům, a tím i fyziologickými účinky na organismus. Každý typ opioidního receptoru je kódován jiným genem, nicméně struktura jednotlivých typů opioidních receptorů je velmi podobná, vykazuje homologii kolem 60 % [8], ta je nejvyšší v transmembránových oblastech, až 76%, naopak extracelulární části receptorů jsou velmi odlišné [2]. Na základě podobnosti genové sekvence byl v cDNA knihovně identifikován ještě ORL-1 receptor, který se vyskytuje především v limbickém systému a předpokládá se, že má vliv na chování a emoce [9]. Na základě farmakologických a vazebných pokusů bylo charakterizováno několik různých variant jednotlivých typů opioidních receptorů. Pravděpodobně se ale nejedná o jejich podtypy, protože každou skupinu receptorů kóduje pouze jediný gen [10], odlišnosti vznikají až posttranskripčními úpravami (viz. 2.3.2), případně tvorbou dimerů (viz. 2.5).

### 2.2 Farmakologie opioidních receptorů

Nejznámějším zástupcem látek opiátového charakteru je silně psychoaktivní molekula - morfin. Byl izolován již v roce 1804 z opia a masivně byl používán ve 2. světové válce jako prostředek tišící bolest [11]. K tomuto účelu je morfin více či méně používán dodnes. S podáváním látek opioidního charakteru je spojena kromě rozvoje tolerance a fyzické závislosti řada dalších nežádoucích účinků. Jedná se především o zúžení zorniček, nevolnost, zvýšené uvolňování histaminu a potlačení dýchacího reflexu, které bývá častou příčinou úmrtí při znežívání těchto látek [12].

### 2.2.1 Endogenní a syntetické opioidní ligandy

Z farmakologického hlediska je důležité dělení ligandů na agonisty, jež stimulují činnost receptoru, a antagonisty, kteří receptor neaktivují, nedochází tedy k přenosu signálu do buňky. Ligandy lze dále dělit na selektivní (specifické) a neselektivní (nespecifické). Nеспецифický ligand se dokáže s podobnou afinitou vázat na více typů receptorů. Příkladem takového ligandu je morfin (agonista) nebo antagonistu všech opioidních receptorů naloxon. Specifické ligandy jsou látky, které upřednostňují vazbu na jeden typ receptoru, jejich afinita k němu je alespoň 100x vyšší oproti afinitám k ostatním typům receptorů [10]. Přehled selektivity běžných endogenních i syntetických ligandů shrnuje Obr. 1.

Dohromady existuje přes dvacet endogenních opioidních ligandů, ale všechny mají společné pouze tři prekurzorové proteiny: pro-opiomelanocortin, proenkephalin, prodynorphin [13]. Takovýto protein byl nalezen i pro endogenní ligand ORL-1 receptoru, jde o prepronociceptin, který s ostatními proteiny vykazuje vysokou homologii [14].

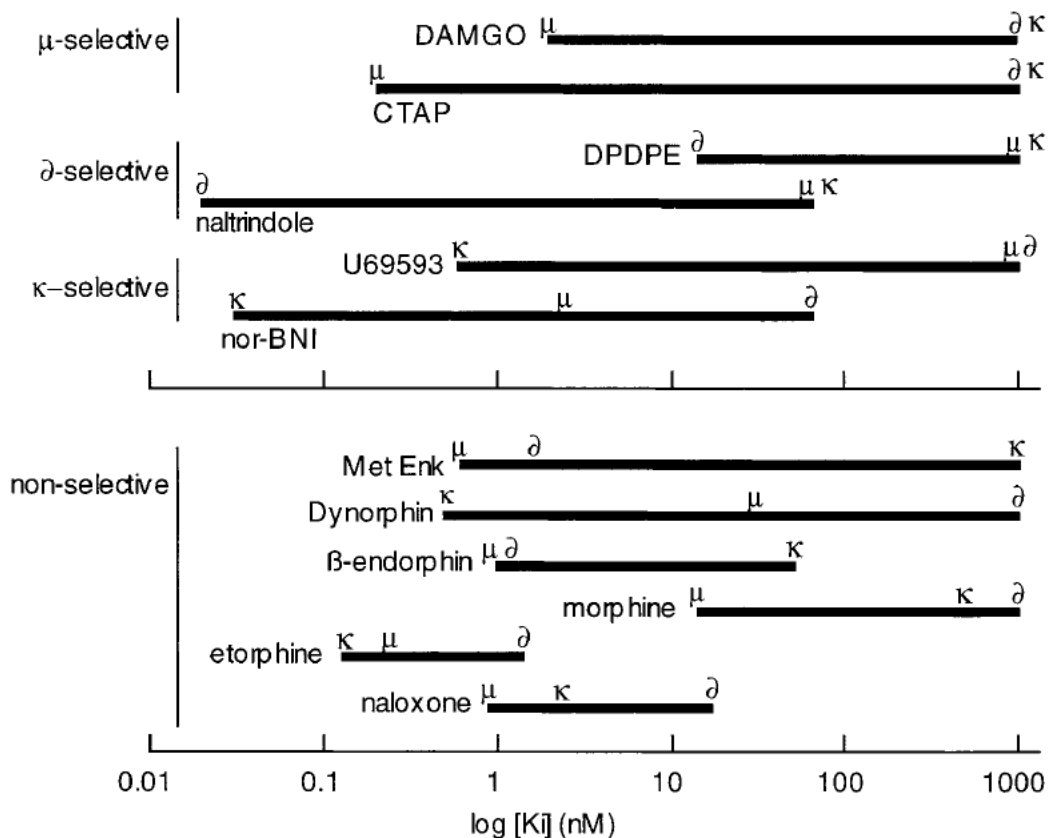
Pro  $\mu$ -receptory jsou typickými endogenními ligandy  $\beta$ -endorfiny a enkefaliny, mezi významné exogenní ligandy patří morfin (viz. Obr. 2A) a DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>,N-Me-Phe<sup>4</sup>,Gly-ol<sup>5</sup>]enkefalin). Aktivace tohoto typu receptoru vyvolává snížené vnímání bolesti, zpomalení dýchání, euforii, ztrátu tělesné hmotnosti, uvolnění prolaktinu a snížení motility střev [11]. Tyto receptory dokáží také zprostředkovat účinky jiných, než opioidních drog, například kanabinoidů, alkoholu nebo nikotinu. Aktivace  $\mu$ -receptorů je výrazně spojena se vznikem tolerance [2].

Pro  $\delta$ -receptor jsou specifickými endogenními ligandy [Lue]-enkefalin a [Met]-enkefalin, mezi exogenní ligandy patří DPDPE ([D-Pen<sup>2,5</sup>]enkefalin). Aktivací  $\delta$ -receptorů dochází k potlačení strachu a deprese. Je prokázáno, že  $\delta$ -receptory mohou funkčně spolupracovat s  $\mu$ -receptory a podporovat tak jejich činnost. Například navázání specifické molekuly na  $\delta$ -receptor sníží vnímání bolesti, které je regulováno přes  $\mu$ -receptor [15].

Poněkud odlišné jsou  $\kappa$ -receptory, pro které jsou typické opačné funkce, než u  $\mu$ - a  $\delta$ -receptorů [16]. Aktivací  $\kappa$ -receptorů dochází k potlačení příjemných pocitů vyvolaných aktivací  $\mu$ -receptoru, a tím i k potlačení vzniku závislosti plynoucí

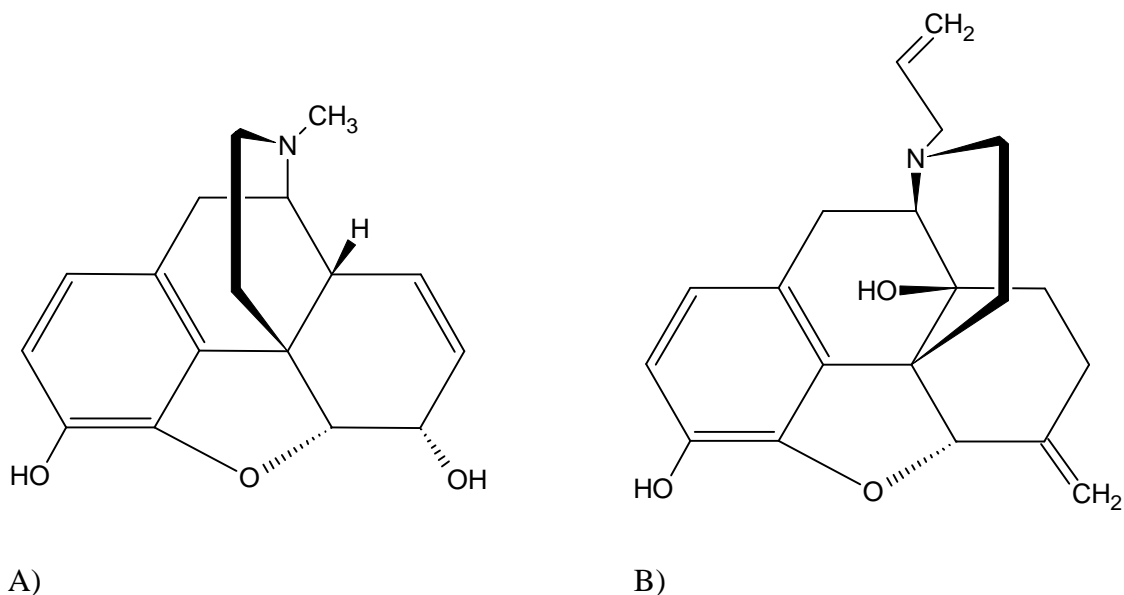
z chronického užívání morfinu [17]. Schopnost vázat se na  $\kappa$ -receptory má dynorfin A a ketocyklazocin.

ORL-1 receptor se od ostatních farmakologicky liší, neváže dosud známé opioidní peptidy a ani naloxon (viz. Obr. 2B), pouze dynorfin A vykazuje slabou afinitu. Toto zjištění vedlo k rozdělení opioidních receptorů na dvě farmakologické větve, hlavní ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), kde naloxon působí jako antagonist, a vedlejší (ORL-1), která naloxon neváže [7]. Jediným známým agonistou těchto receptorů je nociceptin/orfarin [18][19]. Existují i potenciální antagonisté ORL-1, jejich farmakologie zatím není podrobně prozkoumána, byly syntetizovány a sledovány jako potenciální látky pro modifikaci tolerance vzniklé vlivem podávání morfinu [20].



**Obr. 1** Přehled selektivních (nahore) a neselektivních (dole) opioidních ligandů.

Zdroj: [10].



**Obr. 2** Chemická struktura A) morfinu – neselektivní agonista B) naloxonu – neselektivní antagonisty opioidních receptorů.

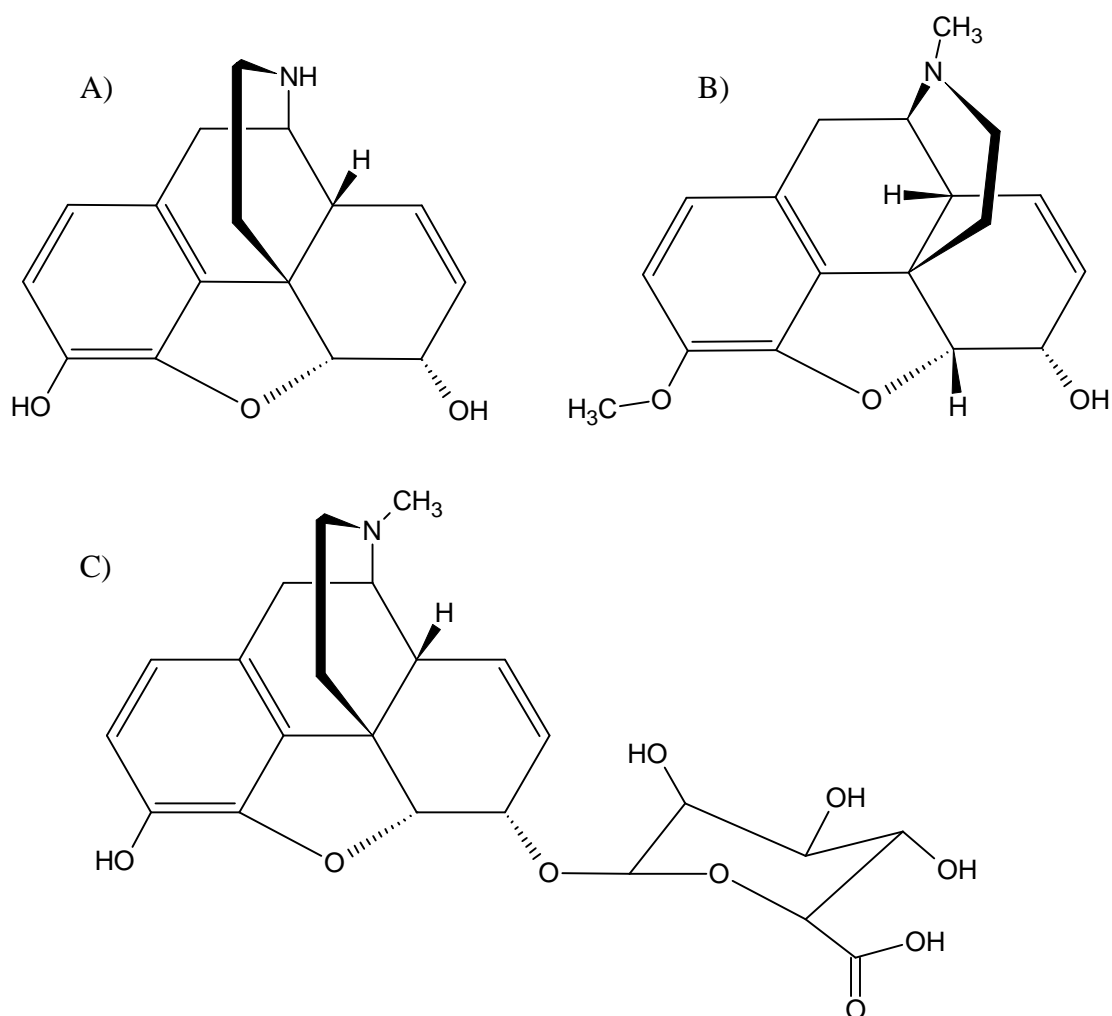
### 2.2.2 Morfin a jeho vlastnosti

Morfin je fenantrenový alkaloid, skládá se z pěti kondenzovaných kruhů, z toho jsou tři šestičlenné uhlíkaté cykly a dva heterocykly – šestičlenný dusíkatý a pětičlenný kyslíkatý heterocyklus. Na uhlíku C3 je přítomna fenolová skupina a na uhlíku C6 je skupina hydroxylová (viz. Obr. 2A). Tyto skupiny dávají morfinu jeho specifické farmakologické vlastnosti. Morfin je slabá báze s pKa rovno 7,9, při fyziologickém pH je jeho molekula ze 76 % ionizovaná a poměrně dobře ve vodě rozpustná [21].

Methylací hydroxylové skupiny na třetím uhlíku vzniká kodein, zatímco heroin je acetylovaný morfin na uhlíku tři a současně i šest. Terciární dusík je důležitý pro analgetické působení morfinu, pokud změním dusík na kvartérní, není už schopen prostoupit do centrálního nervového systému, čímž se jeho účinky podstatně snižují. Na analgetické působení morfinu má dále vliv jeho optická aktivita, pouze levotočivý izomer je fyziologicky aktivní látka [11].

Biodostupnost morfinu při perorálním podání je silně snížena vlivem rychlé biotransformace morfinu v játrech, tzv. First pass effect. Po prvním průchodu játry zůstává v plasmě pouze 40 % podané látky [22][23]. Aby mohl být morfin z těla vyloučen, musí proběhnout řada reakcí měnících jeho strukturu a polaritu. Tato přeměna probíhá v játrech a je souhrnně označována jako proces biotransformace a je rozdělena

na dvě fáze. První fáze je zprostředkována činností mikrosomálních enzymových systému, zejména cytochromem P450, skládá se převážně z oxidoredukčních dějů. Malá část morfinu je přeměněna demethylací na normorfin, případně methylací na kodein [11]. Druhá fáze biotransformace sestává ze syntetických reakcí a je katalyzována enzymem UDP-glukuronosyltransferáza. Dochází ke konjugaci morfinu s kyselinou glukuronovou. Vzniká morfin-6-glukuronid (M6G, viz. Obr. 3), který má analgetické účinky, a morfin-3-glukuronid (M3G), který je fyziologicky neaktivní. Rovnováha této reakce je ve prospěch M3G [24]. Poločas eliminace morfinu je přibližně 120 minut. Některá farmaka jako je diklofenak, naloxon, benzodiazepiny a heterocyklická antidepressiva mohou narušit průběh biotransformace morfinu, konkrétně jeho konjugaci s kyselinou glukuronovou, a tím eliminaci zpomalit [11].



**Obr. 3** Struktura metabolitů pocházejících z biotransformace morfinu: A) normorfin, B) kodein C) morfin-6-glukuronid.



## 2.3 Morfologie $\mu$ -receptoru

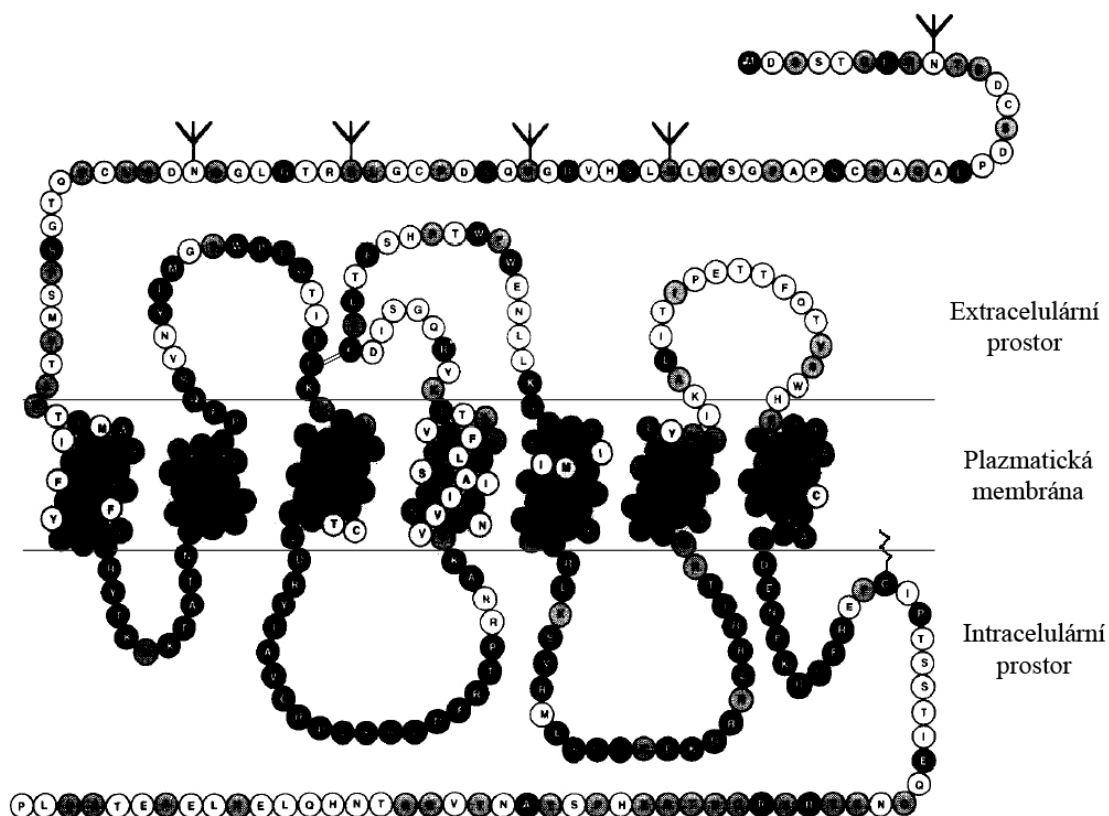
### 2.3.1 Strukturní vlastnosti

Z hlediska klinického využití je významným typem  $\mu$ -receptor, který specificky váže morfin a zprostředkovává jeho analgetické účinky. Tento receptor se vyskytuje v několika variantách, které se liší fyziologickým účinkem, dříve zmiňovaných jako podtypy [8][15]. Bylo zjištěno, že všechny typy kóduje pouze jediný gen a proto se v pravé podstatě o podtypy nejedná [10]. Mí receptor, stejně jako ostatní typy receptorů, je tvořen dlouhým polypeptidovým řetězcem. Délka řetězce se v závislosti na druhu liší,  $\mu$ -receptor potkana se skládá z 398 aminokyselinových zbytků,  $\mu$ -receptor člověka jich má přesně 400 [8][25]. Polypeptidový řetězec sedmkrát prochází plazmatickou membránou a vznikají tak tři extracelulární a tři intracelulární smyčky, N-konec polypeptidového řetězce je vně buněčné membrány, uvnitř se nachází C-konec, který má řadu fosforylačních míst. V první a ve druhé extracelulární smyčce je přítomen cystein, který tvoří disulfidickou vazbu (viz. Obr. 4). C-konec polypeptidového řetězce obsahuje dva cysteinové zbytky, které ve spojení s plazmatickou membránou tvoří ještě čtvrtou a pátou intracelulární smyčku [26]. Starší zdroje uvádí jednu [28] nebo žádnou smyčku [11]. Oblast čtvrté a páté smyčky řetězce je až k druhému cysteinovému zbytku vysoce konzervativní a vyskytuje se u všech typů opioidních receptorů. Tvorba těchto intracelulárních smyček hraje důležitou roli ve spojení opioidních receptorů s proteiny signalizační kaskády.

Předmětem četných studií bylo zjistit, které strukturní části receptoru se podílejí na vazbě ligandu. Ukázalo se, že N-konec v tomto ohledu hraje minimální roli a důležitá je až první extracelulární smyčka. Například od  $\delta$ -receptoru se tato smyčka liší pouze sedmi aminokyselinami, které jsou klíčové pro rozpoznávání mezi  $\mu$ - a  $\delta$ -receptorem [28].

Sledováno bylo i spojení receptoru s G-proteiny signalizační kaskády. Druhá a třetí intracelulární smyčky vykazují vysokou homologii s ostatními typy receptorů [35], proto byla přednostně zkoumána tato dvě místa. Klíčovou roli hraje zde přítomná kyselina asparagová. Její nahrazení kyselinou glutamovou nemá na spojení s G-proteiny žádný vliv na rozdíl od jejího nahrazení za asparagin. Tento pokus ukazuje, že záporný náboj v druhé transmembránové doméně je nezbytný pro optimální spojení receptoru

s G-proteiny signalizační kaskády [8]. Bylo potvrzeno, že existuje více než jedna aktivní konformace receptoru, protože různí agonisté stabilizují odlišné aktivní formy receptoru [27]. Vzhledem ke skutečnosti, že existuje více podtypů G-proteinů, se kterými  $\mu$ -receptor může interagovat, je nalezení místa (aminokyselinového zbytku) odpovědného za spojení receptoru s G-proteinem obtížné.



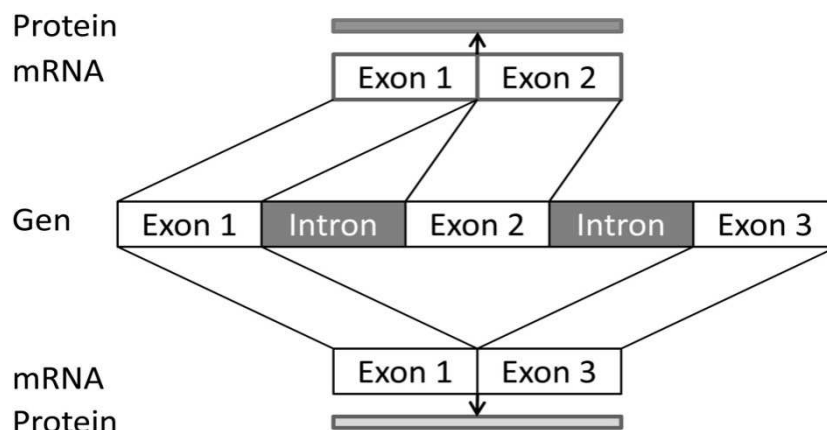
**Obr. 4** Struktura  $\mu$ -opioidního receptoru potkana; černě jsou vyznačeny aminokyseliny přítomné ve všech typech receptorů, šedivě jsou vyznačeny aminokyseliny přítomné ještě buď v  $\delta$ - nebo v  $\kappa$ -receptorech a bílé jsou aminokyseliny specifické pro  $\mu$ -receptor [28].

### 2.3.2 Význam alternativního sestřihu RNA

Alternativní sestřih RNA neboli splicing, umožňuje vznik více proteinů z jediného kódujícího genu [29]. To je pozorováno i v případě  $\mu$ -receptoru, který je kódován pouze jediným genem OPRM1 [30][31] a doposud bylo nalezeno šestnáct variant jeho alternativního sestřihu, které se mezi sebou liší nejen strukturně, ale i lokalizací v mozku [29][30], což potvrzuje jejich pravděpodobný fyziologický význam. Každý

gen obsahuje dva typy sekvencí, a to kódující (exony) a nekódující (introny). Při sestřihu RNA dochází k vypouštění intronů a spojování exonů, může docházet ale i k vypouštění exonů a jejich různému spojování, což je označováno jako alternativní sestřih [29]. Princip alternativního sestřihu znázorňuje Obr. 5.

Jednotlivé izoformy  $\mu$ -receptoru, pocházející z alternativního sestřihu, jsou označovány čísly a písmeny podle pořadí v jakém byly objeveny, liší se počtem a druhem spojených exonů a tedy i délkou peptidového řetězce [32].



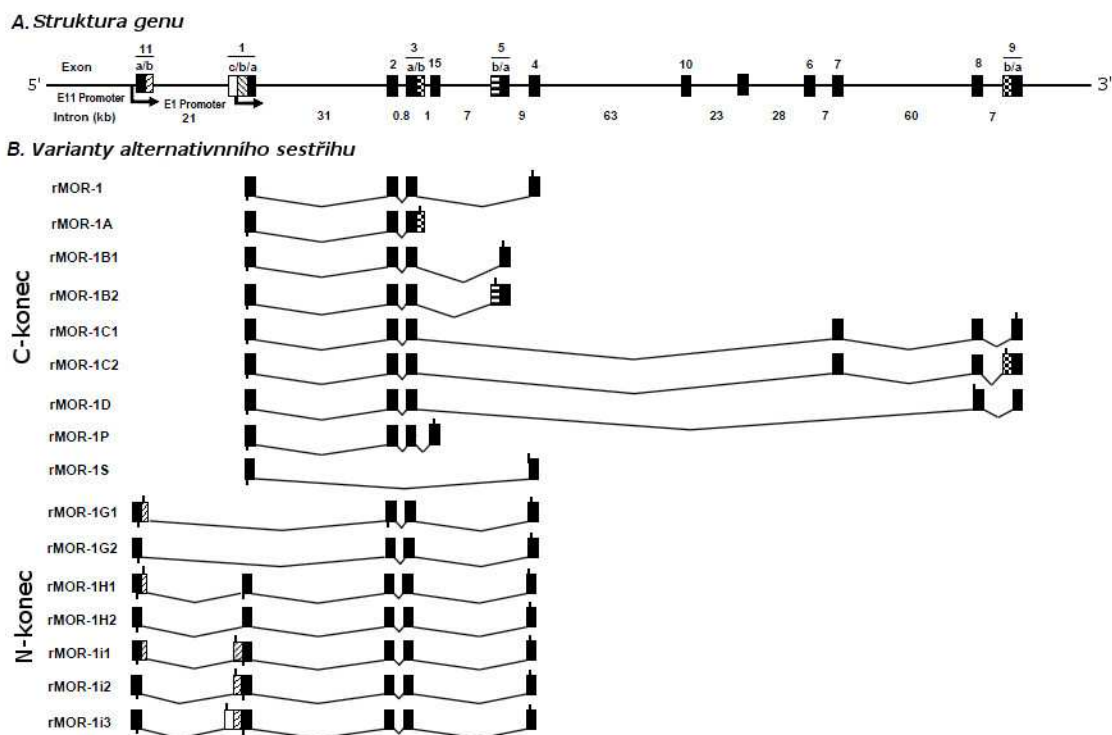
**Obr. 5** Znázornění principu alternativního sestřihu, kdy z jednoho genu vzniká více strukturně odlišných proteinů [29]

Alternativní sestřih může probíhat jak na 3', tak na 5' konci (viz. Obr. 6A). Sestřih na 3' konci byl charakterizován dříve, jedná se o sestřih C-konce a celkem bylo popsáno až devět variant tohoto sestřihu [30][31]. MOR-1 izoforma  $\mu$ -receptoru byla objevena jako první a zatím je nejlépe popsána, sestřihaný gen obsahuje celkem čtyři exony, první tři kódují N-konec a sedm transmembránových oblastí, čtvrtý exon kóduje posledních několik aminokyselin obsažených v C-konci [31][32] (viz. Obr. 6B). Číslo exonu nesouvisí s jeho umístěním v RNA, ale odpovídá pořadí, v jakém byly exony objeveny [30].

Sestřih na 5' konci probíhá v oblasti před exonem-1, která je kódována exonem-11. Celkem bylo popsáno sedm variant toho sestřihu, z nichž jedna vytváří novou variantu N-konce, která by pravděpodobně mohla mít farmakologické vlastnosti odlišné od již dříve popsané izoformy MOR-1 [30].

Bylo zjištěno, že osud receptoru po endocytóze je dán strukturou C-konce a dále byla objevena MRS (MOR regulační sekvence), která je schopná řídit návrat receptoru

do membrány [33][34]. Tato MRS sekvence je kódována exonem 4, který může být při alternativním sestřihu nahrazován jinými exony a tudíž tuto sekvenci ztrácí [32][35]. Sekvence s podobnou funkcí byly zatím nalezeny jen pro některé z dalších izoform. Otázkou zůstává, zda odlišná délka C-konce má vliv na konformaci receptoru a tím i na jeho zvýšenou/sníženou afinitu k opioidním ligandům [33].



**Obř. 6** Znázornění alternativního sestřihu pro OPRM1 gen  $\mu$ -opioidního receptoru, A) Struktura genu, kde ■ znázorňuje jednotlivé exony, číslované podle pořadí objevění, B) Zobrazuje šestnáct dosud popsaných variant  $\mu$ -receptoru vzniklých alternativním sestřihem jeho genu [30].

## 2.4 Signalizační kaskáda

Signalizační kaskáda je soubor dějů, ke kterým dochází po aktivaci receptoru signální molekulou. Dochází k přenosu signálu do buňky a následuje aktivace celé řady procesů uvnitř buňky, které mohou ovlivnit přenos nervového vzruchu, homeostázi organismu, metabolické enzymy nebo proces transkripce DNA v jádře buňky a tím i syntézu proteinů [36].

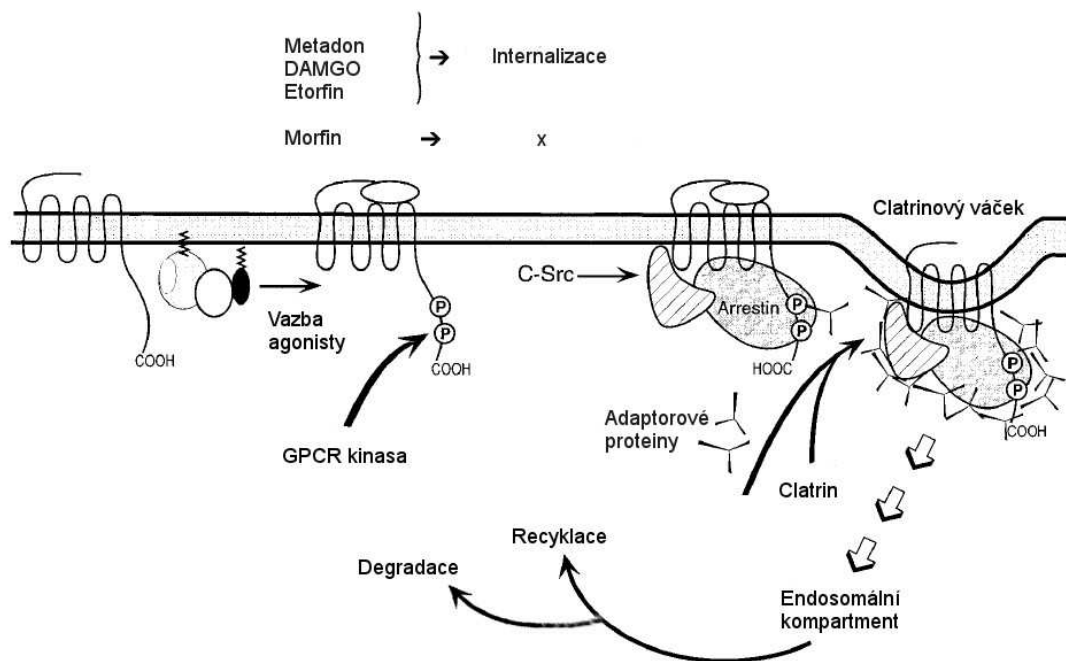
### 2.4.1 Průběh signalizace při fyziologických podmínkách

Opioidní receptory předávají signál do buňky pomocí proteinů vázajících guaninové nukleotidy (G-proteiny). Jedná se o heterotrimerní komplexy složené z podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , které po aktivaci receptoru interagují s efektorovými proteiny v buňce. Existuje přibližně dvacet skupin G-proteinů, opioidní receptory jsou spojeny výhradně s proteiny ze skupin  $G_{i(1-3)}/G_{o(1-2)}$  [37], které jsou citlivé na přítomnost pertusis toxinu (PTX). Tento toxin katalyzuje ADP ribosylaci cysteinového postranního řetězce  $\alpha$ -podjednotky na jejím C-konci, čímž brání její interakci s receptorem a tím ji inaktivuje [38]. Existují zmínky o možné interakci opioidních receptorů s G-proteiny ze skupin  $G_z$  [39],  $G_{12}$  [37],  $G_{14}$  a  $G_{16}$ . Interakce s jednotlivými typy G-proteinů jsou tkáňově specifické, záleží na místě výskytu receptoru, jeho druhu a četnosti [35]. Po navázání signální molekuly na receptor dochází k jeho konfirmační změně, konkrétně dojde ke změně pozice třetího, šestého a sedmého helixu, což změní intracelulární strukturu receptoru a umožní tak jeho interakci s dosud neaktivním G-proteinem [10]. V tomto stavu váže  $\alpha$ -podjednotka GDP, po interakci s aktivovaným receptorem se GDP uvolní a naváže se GTP, čímž se G-protein aktivuje a dojde k rozpadu heterotrimeru na aktivovanou  $\alpha$ -podjednotku a  $\beta\gamma$ -komplex [6]. Obě molekuly jsou biologicky vysoce aktivní a mohou přenášet signál dále do buňky. G-protein zůstává v aktivní formě pouze omezenou dobu, což je řízeno podjednotkou  $\alpha$ , která má vnitřní GTPasovou aktivitu, po čase dojde k hydrolyze vázaného GTP na GDP a G-protein se vrátí do neaktivního heterotrimerního uspořádání [40]. Tato vnitřní GTPasová aktivita  $\alpha$ -podjednotky může být předčasně aktivována RGS proteiny, což jsou regulační proteiny pro signalizaci zprostředkovanou G-proteiny [35]. Bylo zjištěno, že jedna  $\alpha$ -podjednotka může interagovat s  $\beta\gamma$ -komplexy pocházejícími z různých rodin G-proteinů [37]. Přenos signálu pomocí  $\alpha$ -podjednotky  $G_{i/o}$  má inhibiční povahu, jedná se především o snížení aktivity enzymu adenylátcyklasa (AC – syntéza cAMP) a snížení uvolňování neurotransmiterů (glutamát, dopamin) prostřednictvím inhibice vápníkových kanálů [32][39]. Snížená hladina  $Ca^{2+}$  brání uvolňování vesikul. Signalizace zprostředkovaná komplexem  $G_{\beta\gamma}$  má stimulační charakter, zprostředkovává aktivaci draslíkových kanálů (GIRK) a celé řady kinas [10]: GRK, PKC, PKA, MAPK, PLA, PLC, CaM-K. Aktivace draslíkových kanálů způsobuje hyperpolarizaci membrány, což redukuje vzrušivost nervů [39]. GRK (kinasa pro receptor spřažený

s G-proteinem) hraje hlavní roli v procesu internalizace, po její aktivaci dojde k translokaci tohoto enzymu do plazmatické membrány, kde zajišťuje fosforylaci aktivovaného receptoru a následně jeho desensitizaci [27][41]. PKC a PKA jsou proteinkinasy, které mohou fosforylovat samotný receptor, iontové kanály nebo transkripční faktory. MAPK (mitogen-aktivované proteinkinasy) jsou opioidními receptory aktivovány nepřímo ( $G_{\alpha}$  aktivuje tyrosinkinasy, které následně aktivují MAPK [36]) a hrají důležitou roli v rozvoji tolerance, změnách chování, mohou mít vliv na synaptickou plasticitu a paměť. Po jejich aktivaci dochází k translokaci kinasy do jádra buňky, kde dochází k aktivaci transkripčních faktorů, především CREB (vliv na neuronální plasticitu a dlouhodobou paměť) [32]. PLA a PLC jsou fosfolipasy, které hrají významnou roli v metabolismu fosfolipidů a při rozvoji tolerance [41].

Signalizace je ukončena internalizací receptoru. Internalizace je zahájena fosforylací aktivovaného receptoru pomocí GRK kinasy na specifických místech C-konce, který obsahuje celkem tři místa přístupná fosforylaci. Jedná se o serin<sup>375</sup>, což je primární místo pro fosforylaci, threonin<sup>370</sup>, který může být kromě GRK fosforylován i prostřednictvím PKC, a serin<sup>363</sup>, který je stále fosforylován nezávisle na přítomnosti agonisty [42]. Fosforylovaný receptor nemůže asociovat s G-proteinem a dojde ke zvýšení jeho afinity pro vazbu cytoplazmatického proteinu  $\beta$ -arestinu [10], na který se váže clatrin. V této podobě je receptor desensitizován, to znamená, že již nemůže přenášet signál do buňky [43]. Na procesu desensitizace se mohou podílet i další proteiny z řady kinas a to PKC, PKA, c-Src a kalcium kalmodulin-dependentní kinasa II (CaK-M) [44]. Následuje fosforylace dynaminu (cytoplasmatická GTPasa) [45] pomocí c-Src kinasy a dochází k uzavření clatrinového váčku a k internalizaci receptoru [6][27]. Receptor je transportován do perinukleárního kompartmentu, kde je defosforylován endosomální fosfatase a poté, již v aktivní formě, transportován zpět do membrány [46][47]. Mechanismus internalizace je znázorněn na Obr. 7. Bylo zjištěno, že receptory mohou být internalizovány i bez fosforylace a to prostřednictvím vchlípení membrány (calveoly) [27].

Signalizační kaskáda není souborem sousledných událostí, ale jedná se o síť dějů uskutečněných v buňce po aktivaci receptoru signální molekulou, proto jsou důsledky aktivace receptoru velmi rozsáhlé a těžce ohraničitelné. Celý mechanismus ještě není přesně znám a je předmětem neustálého zkoumání.



**Obr. 7** Mechanismus internalizace. Aktivovaný opioidní receptor je fosforylován GPCR kinasou, dochází k vazbě arrestinu a clatrinu a k následné endocytóze [10].

#### 2.4.2 Ovlivnění signální kaskády chronickým podáváním morfinu

Hlavními důsledky dlouhodobého podávání morfinu je rozvoj tolerance a závislosti. Vlivem tolerance dochází ke snižování odpovědi vůči podávané látce a pro dosažení stejného účinku je nutné zvyšování dávky [44]. Fyzická závislost je způsobena trvalými změnami v neuronálním systému, které kompenzují stálou přítomnost morfinu. Začínají změnami na buněčné úrovni, jakými jsou například počet receptorů nebo množství efektorových proteinů. Po ukončení podávání morfinu se tyto změny projeví v podobě abstinčních příznaků [10][35]. Opiáty mají různou schopnost způsobovat toleranci/závislost. Tato schopnost byla charakterizována RAVE indexem, který byl určen jako poměr schopnosti aktivovat receptor a schopnosti způsobit jeho internalizaci. Čím je index větší, tím je rozvoj tolerance pravděpodobnější. Podle studie [43] má morfin tento index vysoký.

Při chronické administraci morfinu dochází k přepnutí mezi inhibičním efektem  $G_{i\alpha}$  a stimulačním efektem komplexu  $G_{\beta\gamma}$ , zároveň dochází k fosforylaci třech klíčových proteinů (GRK,  $G_{\beta}$ ,  $\beta$ -arrestin), čímž dochází ke změně jejich schopností asociace a tím k přestavbě signální kaskády a ustavení homeostáze za těchto podmínek [41].

Vazba morfinu pravděpodobně nezpůsobuje internalizaci a defosforylaci receptoru jako je tomu u jiných agonistů  $\mu$ -receptoru (DAMGO), ale receptor zůstává v membráně, a to fosforylován v místě serin<sup>375</sup>. Receptor je pravděpodobně v takové konformaci, která neumožňuje vazbu GRK ani  $\beta$ -arestinu a tím ani jeho internalizaci [46]. Vlivem stálé signalizace dochází k adaptativním změnám v buňce jako je superaktivace AC, způsobená její fosforylací a zvýšenou afinitou ke komplexu  $G_{\beta\gamma}$  [41]. Fosforylací transkripčních faktorů dochází ke zvýšení hladiny mRNA pro AC a tím i k zvýšení syntézy tohoto proteinu, což vede k nárůstu přítomného cAMP, které může být přeměňováno na adenosin, který má schopnost aktivovat  $A_1$  receptory a tím inhibovat uvolňování neurotransmiterů [44]. Během přítomnosti morfinu dochází k aktivaci velkého počtu proteinkinás a k mnohačetné fosforylaci v buňce. Klíčovým prvkem by mohla být i fosforylace  $G_{\beta}$  pomocí PKA a PKC. Její fosforylací dochází ke změně dynamiky procesů a tím k pravděpodobnému snížení afinity GRK ke komplexu  $G_{\beta\gamma}$ , čímž by byl ve větší míře dostupný pro další signalizaci, a mohl ovlivňovat celou řadu dalších signalizačních procesů. Existuje domněnka, že fosforylovaná  $G_{\beta}$  by mohla katalyzovat enzymatický přenos fosfátu na GDP v  $\alpha$ -podjednotce, čímž by bránila formaci trimerního G-proteinu a tak prodlužovala délku trvání signálu [41]. Tato skutečnost však nebyla *in vivo* prokázána [48].

Dalším důsledkem chronického působení morfinu je snížení celkového počtu vazebných míst (downregulace receptorů) a to na úrovni genové exprese, biosyntézy a degradace receptorů [47]. Existují dvě cesty, kterými může být inaktivovaný receptor odbourán: lysosomální proteolýza a nebo ubiquitinem řízená degradace receptoru [45].

Morfin není schopen vyvolat rychlou internalizaci a recyklaci receptoru do membrány a to ani při velmi vysokých koncentracích. Vazba morfinu způsobuje endocytózu spojenou pouze s degradací  $\mu$ -receptoru [43][49]. Endocytóza je závislá na druhu ligandu a jedná se o hierarchický proces složený z více kroků [34][50]. První krok je pravděpodobně řízen převážně strukturou C-konce receptoru, podle kterého je rozhodnuto, zda bude receptor defosforylován a vrácen do membrány nebo zda bude degradován a jakým způsobem [42][47][51]. Tato cesta je na ubiquitinu zcela nezávislá.

V dalším kroku je receptor transportován do lysosomu, kde je enzymaticky odbourán. Tento krok může, ale nemusí být řízen ubiquitinem [34]. Je pravděpodobné, že ubiquitinace je využita k organizaci odbourávání receptoru v lysosomech. Degradace



pevného hydrofobního jádra receptoru je časově náročný proces a proto je nutné tento proces řídit, aby nedošlo k přesycení lysosomu [52]. Bylo zjištěno, že pokud tento krok proběhne bez přítomnosti ubiquitinu, je jeho účinnost snížena zhruba na polovinu [34].

Způsob downregulace je specifický pro každý typ receptoru. Bylo prokázáno, že degradace  $\delta$ -receptoru probíhá jiným mechanismem, než u výše popsaného  $\mu$ -typu [47][53]. Internalizace  $\delta$ -receptoru je dvakrát více účinná než u  $\mu$ -typu a je zcela nezávislá na ubiquitinaci [52][54].

## 2.5 Interakce receptorů

Vztahy mezi receptory mají zásadní vliv na výsledný účinek aplikované látky. Receptory spolu mohou interagovat mnoha způsoby. Rozlišujeme interakce místní, kdy receptory jsou ve stejné tkáni, a interakce vzdálené, které popisují vztah receptorů v odlišných tkáních a mohou se uskutečnit například mezi receptory přítomnými v mozku a v míše. Místní i vzdálené interakce lze rozdělit podle jejich typu na funkční, které ovlivňují činnost receptoru, a fyzické, kde dochází k přímému spojování receptorů do dimerních i vícemerních celků. Lze rozlišit symetrické, asymetrické, potenciační a inhibiční funkční interakce. Pokud jsou receptory v asymetrickém vztahu, činnost jednoho receptoru ovlivňuje činnost druhého, ale naopak to neplatí. V symetrickém vztahu se receptory ovlivňují vzájemně. Tento vliv může být potenciační, tedy stimulační, nebo inhibiční, kdy je činnost receptoru potlačována [15]. Obecně platí, že spolu mohou interagovat receptory stejných ale i odlišných typů.

Nyní se předpokládá, že opioidní receptory se nevyskytují samostatně, ale většinou v podobě homo-oligomerních nebo hetero-oligomerních celků. Redukčním působením dochází ke vzniku disulfidických vazeb v extracelulárních smyčkách receptorů, a tím k jejich spojování. Důležitou roli při interakcích receptorů hrají i jejich intracelulární C-konce. Zatím byly popsány homomerní celky  $\mu$ - $\mu$ ,  $\delta$ - $\delta$ ,  $\kappa$ - $\kappa$  a  $\mu$ - $\delta$ ,  $\mu$ - $\kappa$   $\delta$ - $\kappa$  heteromerní komplexy. Interakce mezi  $\mu$  a  $\delta$  receptory je stimulační, mezi  $\mu$  a  $\kappa$  je inhibiční. Vznik receptorových komplexů je důležitý například při amplifikaci signálu, protože aktivací jednoho receptoru se zároveň aktivuje i druhý [26][55].

Příkladem hetero-oligomeru je  $\mu$ - $\delta$  komplex, který má odlišné farmakologické vlastnosti, než samotný  $\mu$  a  $\delta$  receptor. Vlivem fyzického spojení receptorů dochází k extracelulárním změnám, čímž vznikají modifikovaná vazebná místa, a dále dochází

i k intracelulárním konformačním změnám, což umožňuje spojení s jinými G-proteiny. Afinita  $\mu$ - $\delta$  komplexu k selektivním ligandům pro  $\mu$  a  $\delta$  receptory je podstatně nižší, největší afinitu má pro deltorphin-II, který je schopen způsobit desensitizaci receptoru i inhibici adenylát cyklasy [56]. Komplex je spojen s proteiny signalizační kaskády odlišnou cestou než je tomu u samostatně se vyskytujících receptorů. Uplatňují se G-proteiny, které nejsou citlivé na pertusis toxin, konkrétně  $G_z$  proteiny [55]. Ke vzniku heteromerů dochází buď přímo při translaci, nebo ihned po ní. Bylo zjištěno, že struktura a délka C-konce má vliv na farmakologické vlastnosti vazebného místa a hraje roli ve spojování receptorů do oligomerních celků [56]. Farmakologické vlastnosti komplexu lze modifikovat současným podáním více látek. Přítomnost velmi nízké koncentrace  $\delta$ -selektivního ligandu výrazně zvýší vazbu agonisty k  $\mu$ -receptoru [57] a vyrostle účinnost fosforylace pomocí MAP kinasy [58]. Internalizace probíhá stejným způsobem jako u monomerních receptorů za účasti  $\beta$ -arestinů a týká se vždy celého komplexu. Byla pozorována zvýšená míra ubiquitinace  $\mu$ -receptorů a jejich internalizace [59], k té může dojít pouze, pokud jsou obě vazebná místa komplexu obsazena. Tato internalizace byla pozorována i v přítomnosti morfinu [55]. Tyto komplexy mají význam především v předávání signálů v místech, kde dochází k současnému uvolňování více endogenních opioidních peptidů najednou [26]. Předpokládá se, že hetero-oligomery jsou podstatou několika již dříve popsaných receptorových podtypů,  $\delta_2$  a  $\kappa_2$  [15].

Opioidní receptory mohou interagovat i s ostatními typy receptorů spřažených s G-proteiny především s  $\alpha_{2A}$ - a  $\beta_2$ -adrenoreceptory [26][60]. Přesný význam těchto spojení zatím nebyl popsán.

Podrobná znalost receptorových interakcí by umožnila syntézu nových, přesně cílených léčiv, která by byla účinnější a zároveň jejich návykovost by byla nižší, jako například kombinované léky pro léčbu chronické bolesti. Jsou známy dimerní enkefaliny, které dokáží interagovat s více receptory zároveň, čímž se podstatně zvýší jejich účinnost [26].

## 2.6 Lokalizace receptoru

K lokalizaci receptorů v mozku se používají různé metody. Zkoumání začalo v sedmdesátých letech vazebnými pokusy se značenými radioligandy [3], později byly receptory lokalizovány pomocí značených sond metodou *in situ* hybridizace [61], která sleduje výskyt mRNA příslušného receptoru. Dále se využívají imunohistochemické metody [62], které určují přítomnost receptoru aplikací specifických protilátek a metoda autoradiografie [63][64], která umožňuje přímou vizualizaci rozmístění receptorů vazbou radioligandu. Metodou vazebných pokusů získáme informaci o hustotě receptorů zastoupených ve zkoumané části mozku, naopak autoradiografie umožňuje lokalizovat receptor na řezu mozku s velkou přesností, ale její provedení je velmi náročné. Metoda *in situ* hybridizace neumožňuje zkoumat přímo funkční receptor, pouze lokalizaci jeho mRNA mechanismem hybridizace se značenou sondou o sekvenci komplementární k hledané mRNA. Pomocí této metody nelze sledovat transport receptorů z místa syntézy do ostatních částí mozku.

Výsledky ukazují, že nejvyšší koncentrace  $\mu$ -opioidního receptoru je v oblasti thalamu a striata, v limbickém systému a to především v oblasti hippocampu a amygdaly, ve středním mozku je výskyt nejvyšší v oblasti collicul a v mozkovém kmeni jde především o oblast locus coreuleus [7][35][63][64]. V těchto místech je sledována vysoká shoda mezi místem lokalizace receptoru a expresí příslušné mRNA [65]. Lokalizaci  $\mu$ -receptorů a výskyt příslušné mRNA shrnuje Obr. 8.

Popis výskytu  $\mu$ -receptoru v oblasti mozkové kůry se liší, uváděna je nejvyšší hustota ve vrstvách I. a IV. [63][65], některé zdroje uvádí i vrstvy III. [64] a VI. [63].

V oblasti thalamu je vysoká koncentrace  $\mu$ -receptorů ve všech thalamických jádrech, minimální výskyt je sledován v anteriodorsálním thalamu [65].

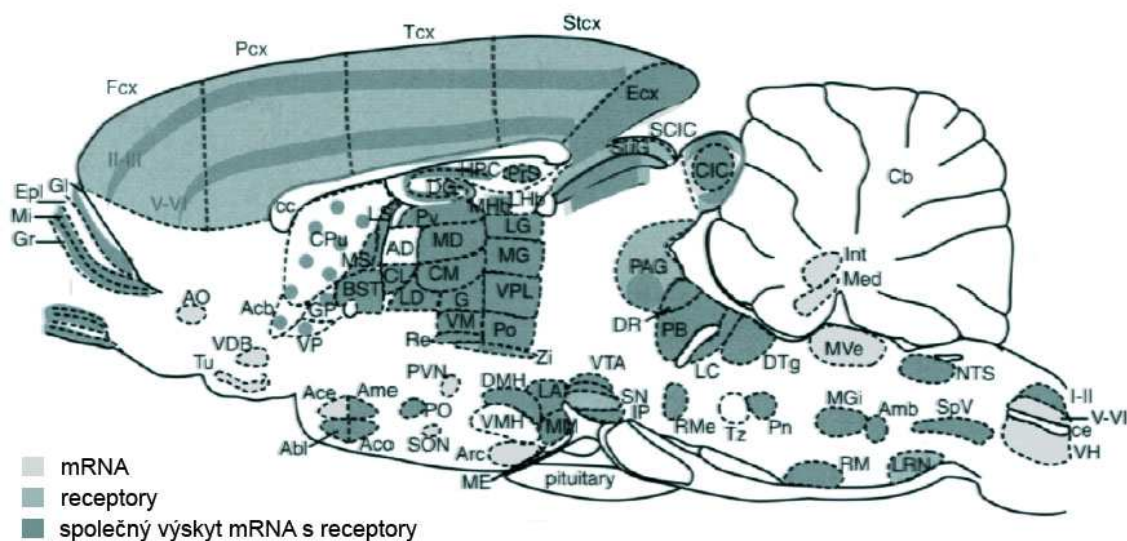
Striatum je součástí basálních ganglií a tvoří jej nucleus caudatus, putamen a globus pallidus [66]. Mí receptory jsou zde rozmístěny ve formě malých shluků s nejvyšší hustotou v oblasti caudato-putamen [62][63][65]. Existuje předpoklad, že zde lokalizované receptory by mohly hrát roli v analgetickém působení opioidních látek a ovlivňovat dopaminergní dráhy [67].

Hippocampus je součástí limbického systému a tvoří jej gyrus dentatus a vrstva molekulárních a pyramidových buněk. Nejvyšší koncentrace  $\mu$ -receptorů byly nalezeny

v gyrus dentatus a ve vrstvě pyramidových buňek [7][63][64]. Další částí limbického systému je amygdala, kde byly nalezeny vysoké koncentrace  $\mu$ -receptorů ve všech jádrech, kromě jádra centrálního [63][65].

Opioidní receptory byly také nalezeny v čichovém centru, což by svědčilo o jejich schopnosti přenášet čichové vjemy [63]. Relativně vyšší hladiny  $\mu$ -receptorů byl nalezeny i v oblastech jako jsou nucleus raphe a periaqueduktální šed', kde by mohly ovlivňovat dýchací a oběhovou soustavu, náladu či imunitní funkce [7].

Velmi nízké hladiny  $\mu$ -opioidních receptorů jsou pozorovány v oblasti mozečku a hypothalamu [63][64][65].



ABL, basolateral amygdaloid nucleus; ac, anterior commissure; ACB, nucleus accumbens; ACE, central amygdaloid nucleus; ACO, cortical amygdaloid nucleus; AD, anteriodorsal thalamus; AL, anterior lobe, pituitary; AMB, nucleus ambiguus; AME, medial amygdaloid nucleus; AON, anterior olfactory nucleus; ARC, arcuate nucleus, hypothalamus; BST, bed nucleus stria terminalis; cc, corpus callosum; ce, central canal; CL, centrolateral thalamus; CM, centromedial thalamus; CPU, caudate-putamen; CRB, cerebellum; DG, dentate gyrus; DH, dorsal horn, spinal cord; DMH, dorsomedial hypothalamus; DPC, deep gray layer, superior colliculus; DTN, dorsal tegmental nucleus; ENT, entorhinal cortex; EPL, external plexiform layer, olfactory bulb; FCX, frontal cortex; G, nucleus gelatinosus thalamus; GL, glomerular layer, olfactory bulb; GP, globus pallidus; HL, lateral habenula; HM, medial habenula; HPC, hippocampus; IC, inferior colliculus; IGR, intermediate granular layer, olfactory bulb; IL, intermediate lobe, pituitary; ING, intermediate gray layer, superior colliculus; IntP, interposed cerebellar nucleus; IP, interpeduncular nucleus; LC, locus coeruleus; LD, laterodorsal thalamus; LG, lateral geniculate thalamus; LHA, lateral hypothalamic area; LRN, lateral reticular nucleus; LS, lateral septum; MD, dorsomedial thalamus; ME, median eminence; Med, medial cer-

ebellar nucleus; MG, medial geniculate; Mi, mitral cell layer, olfactory bulb; ml, medial lemniscus; MM, medial mammillary nucleus; MS, medial septum; MV, medial vestibular nucleus; NDB, nucleus diagonal band; NL, neural lobe, pituitary; NRG, nucleus reticularis gigantocellularis; NTS, nucleus tractus solitarius; OB, olfactory bulb; ot, optic tract; OTU, olfactory tubercle; PAG, periaqueductal gray; PBN, parabrachial nucleus; pc, posterior commissure; PCX, parietal cortex; PN, pons; PnR, pontine reticular; PO, posterior nucleus thalamus; POA, preoptic area; PrS, presubiculum; PV, paraventricular thalamus; PVN, paraventricular hypothalamus; RD, dorsal raphé; RE, reuniens thalamus; RM, raphé magnus; RME, median raphé; SC, superior colliculus; scp, superior cerebellar peduncle; SG, substantia gelatinosa; SNC, substantia nigra, pars compacta; SNR, substantia nigra, pars reticulata; SNT, sensory nucleus trigeminal; SON, supraoptic nucleus; STCX, striate cortex; STN, spinal trigeminal nucleus; SUG, superficial gray layer, superior colliculus; TCX, temporal cortex; TZ, trapezoid nucleus; VH, ventral horn, spinal cord; VL, ventrolateral thalamus; VM, ventromedial thalamus; VMH, ventromedial hypothalamus; VP, ventral pallidus; VPL, ventroposterolateral thalamus; VTA, ventral tegmental area; and ZI, zona incerta.

**Obr. 8** Přehled lokalizace  $\mu$ -receptorů a příslušné mRNA v mozku potkana [68].

## 3 METODY

### 3.1 Chemikálie

[<sup>3</sup>H]Diprenorphine (American Radiolabeled Chemicals, USA), Akrylamid (Serva, Německo), Amoniumpersulfát (Serva, Německo), Bicinchoninová kyselina (Sigma-Aldrich, USA), Bromfenolová modř (Serva, Německo), Complete – koktejj inhibitorů proteas (Roche Diagnostic, Německo), DAMGO (Sigma-Aldrich, USA), Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, USA, >98%), Dodecylsulfát (Serva, Německo), Glycerol (Sigma-Aldrich, USA), Glycin (Sigma-Aldrich, USA, >99%), Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA), Hydroxid amonný (Lachema, ČR), Chlorid hořečnatý (Serva, Německo), Chlorid sodný (Penta, ČR), Kyselina ethylendiamintetraoctová (Lachema, ČR, čistota 97 %), Kyselina chlorovodíková (Lach:ner, ČR), Kyselina chlorovodíková (Lach:ner, ČR), Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA, >98%), Methanol (Lach:ner, ČR), N,N'-metylenbisakrylamid (Serva, Německo), Naloxone (Sigma-Aldrich, USA), Pentahydrát síranu měďnatého (Lachema, ČR), Percoll - sterilní (GE Healthacare UK Limited), Sacharóza (Serva, Německo), Scintilační roztok CytoScint (MP Biomedicals, USA), Sekundární protilátky (GE Healthcare UK Limited), Substrát pro křenovou peroxidasu (Thermo Scientific, USA), Sušené mléko (Promil, ČR), Tetramethylethylendiamin (Serva, Německo), Trisma<sup>®</sup> base (Fluka, USA, čistota ≥99), Tween (Sigma-Aldrich, USA), Uhličitan sodný (Sigma-Aldrich, USA), Vinan sodný (Lachema, ČR), Značené primární protilátky (SC-378, SC-55598, SC-28800 Santa-Cruz, USA). Pokud není uvedeno jinak, byly chemikálie v p.a. čistotě.

### 3.2 Roztoky

Všechny roztoky byly připraveny podle rozpisů uvedených u jednotlivých metod. Vždy přesně navážené množství látky bylo rozpuštěno ve vodě deionizované na přístroji Elix 5 (Millipore, USA,  $R > 5 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) a pH bylo upraveno pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (elektroda: 3 mol dm<sup>-3</sup> KCl, Mettler-Toledo, Švýcarsko, pH metr, Orion, USA).

### 3.3 Stanovení proteinů

#### 3.3.1 Roztoky

Standard BSA,  $c = 1 \text{ mg cm}^{-3}$

Desetkrát zředěný standard BSA,  $c=0,1 \text{ mg cm}^{-3}$  (50  $\mu\text{l}$  BSA + 450  $\mu\text{l}$  deioniz. vody)

**A:** 8 mg uhličitanu sodného + 1,6 mg vinanu sodného doplněno na objem 100 ml, pH upraveno na 11,25 pomocí  $10 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH

**B:** 4 mg BCA ve 100 ml deionizované vody

**C:** 0,4 mg pentahydrátu síranu měďnatého v 10 ml deionizované vody

**Pracovní roztok:** 1 díl roztoku C + 25 dílů roztoku B + 26 dílů roztoku A

#### 3.3.2 Postup práce

Na mikrotitrační destičce byla připravena řada standardů BSA s obsahem proteinů v rozpětí od 0,5  $\mu\text{g}$  do 30  $\mu\text{g}$  proteinů ve 100  $\mu\text{l}$  (viz. Tab. 1). Vzorke plazmatických membrán byly nejprve naředěny destilovanou vodou (k 10  $\mu\text{l}$  vzorku membrán bylo přidáno 990  $\mu\text{l}$  deionizované vody), stanoveno bylo vždy 100  $\mu\text{l}$  naředěného vzorku v triplikátu. Stanovení bylo provedeno BCA metodou [69].

**Tab. 1 Příprava standardních roztoků BSA s rostoucím obsahem proteinů pro stanovení množství proteinů ve vzorku pomocí kalibrační přímky.**

č. standardu	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b><math>\mu\text{g}</math> BSA</b>	0	0,5	1,0	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30
<b><math>\mu\text{l}</math> BSA</b> (0,1 $\text{mg cm}^{-3}$ )	-	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-
<b><math>\mu\text{l}</math> BSA</b> (1 $\text{mg cm}^{-3}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30
<b><math>\mu\text{l}</math> H<sub>2</sub>O</b>	100	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70

Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku a destička byla 30 minut inkubována při teplotě 60°C. Mikrotitrační destička byla čtena při vlnové délce 562 nm (přístroj Synergy HT, BioTek Instruments, USA)

### 3.3.3 Vyhodnocení

Výsledky byly zpracovány v programu Gen 5, v. 1.08. Množství proteinů ve vzorku bylo vypočteno z rovnice (1).

$$y = A \cdot x + B \quad (1)$$

kde  $y$  je absorbance vzorku,  $x$  je koncentrace proteinů ve vzorku,  $A$  je směrnice přímky a  $B$  je úsek na ose  $y$ . Hodnoty parametrů  $A$  a  $B$  byly určeny lineární regresní analýzou hodnot absorbance řady standardů BSA a jsou charakteristické pro dané měření.

## 3.4 SDS-PAGE Elektroforéza

### 3.4.1 Roztoky

30% (hmot.) akrylamid, 0,8% (hmot.) N,N'-metylenbisakrylamid,

*Pufř 1:* 1,5 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, pH 8,8

*Pufř 2:* 0,5 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, pH 6,8

*Elektrodový pufř:* 0,25 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, 2 mol dm<sup>-3</sup> glycin, 35 mmol dm<sup>-3</sup> SDS,

*Vzorkový pufř:* 0,25 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, 10% (obj.) glycerol, 30 mmol dm<sup>-3</sup> SDS, 0,5 mol dm<sup>-3</sup> DTT, 0,15 mmol dm<sup>-3</sup> bromfenolová modř,

*Blotovací pufř:* 25 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, 0,2 mol dm<sup>-3</sup> glycin, 20% (obj.) metanol;

*Promývací pufř:* 0,3% (obj.) Tween v TBS pufři;

*TBS pufř:* 200 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 12 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, pH 8,0

*Blokovací pufř:* 5% (hmot.) mléko a 0,1% (obj.) Tween v TBS pufři

*Inkubační pufř:* 1% (hmot.) mléko a 0,1% (obj.) Tween v TBS pufři

10% (hmot.) roztok SDS; 10% (hmot.) roztok APS; 100% roztok TEMED

### 3.4.2 Postup práce

Pomocí SDS elektroforézy byly proteiny rozděleny podle jejich molekulové hmotnosti. Přídavek SDS způsobil denuraci proteinů a celkový záporný náboj molekuly, pohyblivost v elektrickém poli byla řízena pouze velikostí proteinu.

Dělení proteinů bylo provedeno vertikální elektroforézou v 10% polyakrylamidovém gelu. Připraveno bylo vždy 20 ml roztoku akrylamidu podle následujícího postupu: 5 ml pufři 1; 6,7 ml akrylamidu, 200  $\mu$ l SDS, 8  $\mu$ l TEMED,

90 µl APS a 8 ml vody. Gely byly převrstveny 75% butanolem. Po zatuhnutí gelu byl navrstven 4% zaostřovací gel následujícího složení: 2,5 ml pufru 2, 1,3 ml akrylamidu, 100 µl SDS 8 µl TEMED, 90 µl APS a 6 ml vody. Byl použit hřeben o tloušťce 1,5 mm pro přípravu deseti jamek.

Vzorky byly připraveny pomocí vzorkového pufru v poměru 3:1 (vzorek:pufr) tak, aby výsledná koncentrace proteinů ve vzorku byla 0,5 mg cm<sup>-3</sup>. Směs byla vařena 2 minuty při teplotě 100 °C a vzorky nanoseny do jamek podle schématu (viz. Tab. 2). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V po dobu 45-60 minut, aparatura MiniProtean<sup>®</sup> (Bio-Rad, USA).

**Tab. 2 Rozložení vzorků plazmatických membrán a mitochondrií pro gelovou elektroforézu**

<b>Jamka</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
Vzorek		PM1	PM2	PM3	PM4	M1	M2	M3	M4
min/ ot.	STD	5/1200	5/600	7,5/1200	7,5/600	5/1200	5/600	7,5/1200	7,5/600

STD = standard, objem 2 µl. Nanášeno bylo vždy 20 µl vzorku do jedné jamky, vzorky pocházely z různého způsobu homogenizace mozkové kůry 1-4. (viz. Tab. 3). Sledovány byly dvě frakce: PM – plazmatické membrány, M – mitochondrie.

Po skončení elektroforézy byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu (GE Healthcare UK Limited) pomocí western blotu. Gel a membrána byly v těsném spojení a po celou dobu byly ponořeny v blotovacím pufru. Nádoba se sestavenou blotovací aparaturou byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí o velikosti 100 V, doba trvání jedna hodina. Po skončení byla membrána propláchnuta vodou a inkubována 30 minut v blokovacím pufru a poté jednu hodinu v králičích primárních protilátkách proti a) Gβ, b) Na/K ATPase, c) F1 ATPase proteinům. Protilátky byly ředěny 5000x v inkubačním pufru. Po skončení inkubace byla membrána promyta v promývacím pufru (tříkrát 10 min) a následně inkubována v oslích sekundárních protilátkách anti-rabbit IgG enzymaticky značených křenovou peroxidasou. Protilátky byly ředěny 40 000x v inkubačním pufru, inkubace probíhala přes noc, cca. 10-15 hodin. Poté byla membrána promyta třikrát deset minut v promývacím pufru a inkubována jednu minutu se substrátem (1:1, luminol:peroxid



vodíku) pro křenovou peroxidasu za vzniku chemiluminiscentního produktu. Membrána byla exponována na film (AGFA, Belgie) a vyvolána.

### 3.4.3 Vyhodnocení

Vyvolané filmy byly scanovány do počítače, kde byly zpracovány programem Gimp 2 a následně analyzovány v programu Image Quant. Pomocí tohoto programu byly vypočítány plochy a intenzity jednotlivých proužků detekovaných na filmu. Takto zjištěné hodnoty byly převedeny na procenta. Jako 100 % byla vždy zvolena nejvyšší hodnota. Data byla zpracována graficky pomocí programu GraphPad Prism 5.0.

## 3.5 Příprava plazmatických membrán

### 3.5.1 Roztoky

*TME* - 50 mmol dm<sup>-3</sup> TRIS HCl, pH 7,4

*TMES* - 20 mmol dm<sup>-3</sup> Trizma-HCl, 3 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA, 250 mmol dm<sup>-3</sup> sacharóza, pH 7,4

*Percoll*: 18% roztok v *TMES* pufru,

*Roztok Complete 50x* koncentrovaný (1tableta do 1 ml vody)

### 3.5.2 Optimalizace metody

Prvním krokem přípravy plazmatických membrán z mozkové kůry potkana bylo zavést a optimalizovat metodu jejich izolace. Postup byl upraven podle metody [32]. Rozhodujícím krokem byla homogenizace tkáně. Bylo třeba zvolit takové podmínky, aby tkáň a buňky byly dostatečně rozbité, ale mitochondrie zůstaly intaktní. Z tohoto důvodu byly testovány 4 typy uspořádání homogenizace tkáně (tab. 3).

**Tab. 3 Čtyři různá uspořádání homogenizace pro optimalizaci metody izolace plazmatických membrán**

Frakce 1, frakce 2	PM1, M1	PM2, M2	PM3, M3	PM4, M4
<b>Doba homogenizace [min]</b>	5,0	5,0	7,5	7,5
<b>Rotace pístu [ot. min<sup>-1</sup>]</b>	1200	600	1200	600

V jednom homogenizačním kroku byly získány dvě frakce: PM – plazmatické membrány, M – mitochondrie.

Přesně odvážené množství mozkové kůry (~3 g) samců potkanů kmene Whistar bylo nastříháno a smícháno s příslušným množstvím TMES pufru tak, aby byl připraven 10% (hmot.) homogenát tkáně, ke kterému bylo přidáno odpovídající množství Complete. Homogenizace byla provedena ve sklo-teflonovém homogenizátoru (Eurostar per-b, IKA, Německo), doba homogenizace a rychlost otáček pístu dle čtyř různých typů uspořádání (viz. Tab. 3). Jádra a zbytky buněk byly odstraněny centrifugací homogenátu, (centrifuga universal 30RF, Hettich, Německo), při 2500 ot. min<sup>-1</sup> (1000g), 10 minut, 4°C. Supernatant byl nanesen na Percoll, vždy 3 ml na 20 ml 18% Percollu. Následovala centrifugace 15 minut při 26 000 ot. min<sup>-1</sup> (58 000g), 4°C, (rotor 50.2TI, Beckman-Coulter, USA), během které se vytvořil percollový hustotní gradient a v něm jasně viditelné dvě frakce, které byly opatrně rozebrány. Vrchní frakci vždy tvořily plazmatické membrány (PM), ve spodní frakci byly mitochondrie (M). Z rozdělených gradientů byly odebrány vždy 4 ml plazmatických membrán a 2 ml mitochondrií, tak aby byl vzorek co nejčistší. Odebrané frakce byly promyty v TMES pufru, ředění 1:4 (vzorek:pufr), centrifugace 60 minut při 60 000 ot. min<sup>-1</sup> (130 000g) na stejné centrifuze. Výsledný pelet byl resuspendován v malém objemu TMES pufru. Takto připravené vzorky plazmatických membrán a mitochondrií byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -75°C.

### 3.5.3 Příprava experimentálních vzorků

Zkoumané vzorky byly připraveny z mozkové kůry samců potkanů kmene Whistar o průměrné hmotnosti jedince ~300 g. Celkem byly sledovány čtyři skupiny pokusné (M-10, M-28, RM-10 a RM-28) a jedna skupina kontrolní (K). Pokusným skupinám potkanů byl podáván morfin vždy jednou denně, intramuskulárně. Dávka činila 10 mg kg<sup>-1</sup>, ředění 10 mg ml<sup>-1</sup>, průměrně tedy 300 µl na potkana. Skupina kontrolní dostávala průměrně 300 µl fyziologického roztoku (0,9% NaCl). Jednotlivé skupiny se lišily v délce podávání morfinu (viz. Tab. 4), v době regrese zvířatům nebyly podávány žádné látky. Potkani byli usmrceni dvacet čtyři hodin po podání poslední dávky, případně po sedmi dnech regrese. Odebrané mozkové kůry byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -70°C.

**Tab. 4 Přehled sledovaných skupin potkanů**

Skupina	K	M-10	M-28	RM-10	RM-28
Doba podávání morfinu [den]	-	10	28	10	28
Regrese [den]	-	-	-	7	7

Vzorky plazmatických membrán z mozkové kůry potkanů jednotlivých skupin byly připraveny podle postupu popsaného výše, homogenizace číslo 2. (viz. 3.5.2).

### 3.6 Vazebné pokusy

Cílem studia vazebných pokusů s radioaktivně značeným ligandem je sledování interakce receptorů s ostatními chemickými látkami. Takto lze zjistit jak celkový počet receptorů přítomných v dané tkáni, tak i procentuální zastoupení jednotlivých podtypů za použití selektivních ligandů. Vazebné pokusy lze rozdělit do tří kategorií podle jejich uspořádání. Jedná se o pokusy saturační (určení afinity radioaktivně značeného ligandu a maximální vazebné kapacity tkáně), kompetiční (stanovení rovnovážné inhibiční konstanty nezačteného ligandu k receptoru a v případě použití podtypově selektivního nezačteného ligandu i určení procentuálního zastoupení příslušného podtypu ve vzorku) a kinetické (popisují rychlost disociace a asociace radioligandu k receptoru) [70].

#### 3.6.1 Roztoky

[<sup>3</sup>H]Diprenorphine - radioaktivně značený antagonist opioidních receptorů,  
Specifická radioaktivita =  $1,88 \cdot 10^{-12}$  Bq mmol<sup>-1</sup>

[D-Ala<sup>2</sup>,N-Me-Phe<sup>4</sup>,Gly-ol<sup>5</sup>]enkefalin (DAMGO), specifický agonista  $\mu$ -opioidních receptorů, Mr=513,59

Naloxone hydrochlorid dihydrát - nespecifický antagonist všech typů opioidních receptorů, Mr = 399,87

Inkubační pufr - TME pufr, 50 mmol dm<sup>-3</sup> Tris HCl, pH 7,4

0,3% (hmot.) polyethylenimin (PEI)

#### 3.6.2 Přípravný pokus

Během tohoto kroku byla sledována závislost specifické vazby [<sup>3</sup>H]Diprenorphine na vzrůstající koncentraci plazmatických membrán ve vzorku. Použity byly pouze vzorky plazmatických membrán izolované z kontrolní skupiny potkanů. Koncentrace

[<sup>3</sup>H]Diprenorphine byla po celou dobu konstantní, vždy 1 nmol dm<sup>-3</sup>. Radioligand byl inkubován jednu hodinu se vzorkem plazmatických membrán v množství 50, 75, 100 a 150 µg proteinů při teplotě 25°C v celkovém objemu reakční směsi 0,5 ml inkubačního pufru. Nespecifická vazba byla stanovena inkubací v přítomnosti 50 µmol dm<sup>-3</sup> naloxonu. Všechna stanovení byla provedena v triplicátu. Reakce byla ukončena přidáním 3 ml vychlazeného inkubačního pufru. Vázaný radioligand byl oddělen vakuovou filtrací přes filtry GF/C namočené 1 hodinu v 0,3% roztoku PEI. Filtry byly následně promyty dvakrát třemi mililitry inkubačního pufru. Radioaktivita zachycená na filtrech byla stanovena kapalnou scintilační spektrometrií přístrojem německé firmy Ray-Test ve 4 ml scintilačního roztoku CytoScint, doba měření 5 min, účinnost ~40 %.

### 3.6.3 Jednobodové stanovení

Jedná se o typ vazebného pokusu se značeným radioligandem [<sup>3</sup>H]Diprenorphine pomocí kterého zjistíme množství vazebných míst ve zkoumaných vzorcích plazmatických membrán a mitochondrií. Stanovena byla celková a nespecifická vazba radioligandu, sledováno bylo množství specificky vázaného [<sup>3</sup>H]Diprenorphine ve vzorcích pocházejících z různých způsobů homogenizace (viz. Tab. 3). Vždy 1 nmol dm<sup>-3</sup> roztok [<sup>3</sup>H]Diprenorphine byl inkubován jednu hodinu při teplotě 25°C s připravenými vzorky plazmatických membrán a mitochondrií o celkové koncentraci 100 µg proteinů na vzorek v celkovém objemu reakční směsi 0,5 ml inkubačního pufru. Nespecifická vazba byla stanovena inkubací v přítomnosti 50 µmol dm<sup>-3</sup> naloxonu. Ukončení reakce a měření zachycené radioaktivity bylo provedeno stejným způsobem jako v přípravném pokuse (viz. 3.6.2).

### 3.6.4 Saturační uspořádání

Pomocí saturačních pokusů byl stanoven celkový počet vazebných míst ve vzorku a hodnota rovnovážné disociační konstanty komplexu receptor-radioligand pro [<sup>3</sup>H]Diprenorphine. V tomto uspořádání vazebných pokusů bylo sledováno celkové množství specificky vázaného radioligandu v závislosti na jeho měnící se koncentraci. Parametry vazby byly sledovány ve vzorcích plazmatických membrán připravených izolací z mozkové kůry všech pěti různých skupin potkanů (viz. 3.5.3). Stanovena byla

celková a nespecifická vazba radioligandu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine při jeho sedmi různých koncentracích 2; 1; 0,5; 0,25; 0,13; 0,06 a 0,03 nmol dm<sup>-3</sup> v triplikátu. Vzorek plazmatických membrán o koncentraci 50 μg byl inkubován s příslušnou koncentrací radioligandu jednu hodinu při teplotě 25°C v celkovém objemu reakční směsi 0,5 ml inkubačního pufru. Nespecifická vazba byla stanovena inkubací v přítomnosti 50 μmol dm<sup>-3</sup> naloxonu. Ukončení reakce a stanovení radioaktivity bylo provedeno stejným způsobem jako v přípravném pokuse (viz. 3.6.2).

### 3.6.5 Kompetiční uspořádání

Pomocí kompetičních pokusů byla stanovena hodnota rovnovážné inhibiční konstanty nezačteného ligandu a dále procentuální zastoupení μ-receptorů přítomných v daném vzorku plazmatických membrán. Jmenované parametry byly sledovány v jednotlivých vzorcích plazmatických membrán připravených izolací z mozkové kůry pěti různých skupin potkanů (viz. 3.5.3). Stanovena byla celková a nespecifická vazba, sledováno bylo množství specificky vázaného radioligandu v závislosti na měnící se koncentraci použitého kompetitoru. Pro stanovení celkové vazby byl použit [<sup>3</sup>H]Diprenorphine v konstantní koncentraci 0,5 mol dm<sup>-3</sup> a kompetitor DAMGO ve dvaceti jedna různých koncentracích: 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-4,5</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-5,3</sup>, 10<sup>-5,7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-6,3</sup>, 10<sup>-6,7</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-7,3</sup>, 10<sup>-7,7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-8,3</sup>, 10<sup>-8,7</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-9,3</sup>, 10<sup>-9,7</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-10,3</sup>, 10<sup>-10,7</sup>, 10<sup>-11</sup> mol dm<sup>-3</sup>. Radioligand a kompetitor o dané koncentraci byly vždy inkubovány jednu hodinu při teplotě 25°C se vzorkem plazmatických membrán o celkovém množství 70 μg na vzorek. Celkový objem reakční směsi byl 0,5 ml inkubačního pufru. Nespecifická vazba byla stanovena inkubací v přítomnosti 50 μmol dm<sup>-3</sup> naloxonu. Ukončení reakce a stanovení radioaktivity bylo provedeno stejným způsobem jako v přípravném pokuse (viz. 3.6.2).

### 3.6.6 Hodnocení pokusů

Při vyhodnocení dat z vazebných pokusů byla stanovena celková vazba radioligandu, která odpovídá radioaktivitě zachycené na filtrech. Vazba nespecifická byla stanovena filtrací vzorků inkubovaných v přítomnosti naloxonu. Z těchto naměřených hodnot byla vypočítána specifická vazba radioligandu podle rovnice:

$$B = C - N_s \quad (2)$$

kde B je specifická vazba [dpm], C je celková vazba [dpm] a  $N_s$  je vazba nespecifická [dpm]. Koncentrace radioligandu byla určena ze stanovení alikvotu radioaktivity přidávané ke vzorkům.

Získaná data byla vyhodnocena pomocí nelineární regrese i pomocí Scatchardova vynesení v programu GraphPad Prism ver. 5.0. Hodnoty  $K_d$  a  $B_{\max}$  byly určeny nelineární regresní analýzou dat podle rovnice:

$$B = \frac{F \cdot B_{\max}}{F + K_d} \quad (3)$$

kde B je specifická vazba [ $\text{fmol mg}^{-1}$ ], F je koncentrace radioligandu [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ],  $B_{\max}$  je maximální vazebná kapacita tkáně [ $\text{fmol mg}^{-1}$ ] a  $K_d$  je rovnovážná disociační konstanta radioligandu [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ].

Linearizací rovnice (3) dostaneme rovnici pro Scatchardovo vynesení (4), ze které lze přímo určit parametry  $B_{\max}$  a  $K_d$ . Hodnota  $B_{\max}$  odpovídá úseku na ose x a  $K_d$  je záporná převrácená hodnota směrnice přímky:

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_d} B + \frac{B_{\max}}{K_d} \quad (4)$$

kde B je specifická vazba [ $\text{fmol mg}^{-1}$ ], F je koncentrace radioligandu [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ],  $K_d$  je rovnovážná disociační konstanta radioligandu [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ] a  $B_{\max}$  je maximální vazebná kapacita tkáně [ $\text{fmol mg}^{-1}$ ].

Hodnota rovnovážné inhibiční konstanty neznačeného ligandu byla určena nelineární regresí v programu GraphPad Prism 5 a vypočtena z rovnice (5):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{F}{K_d}} \quad (5)$$

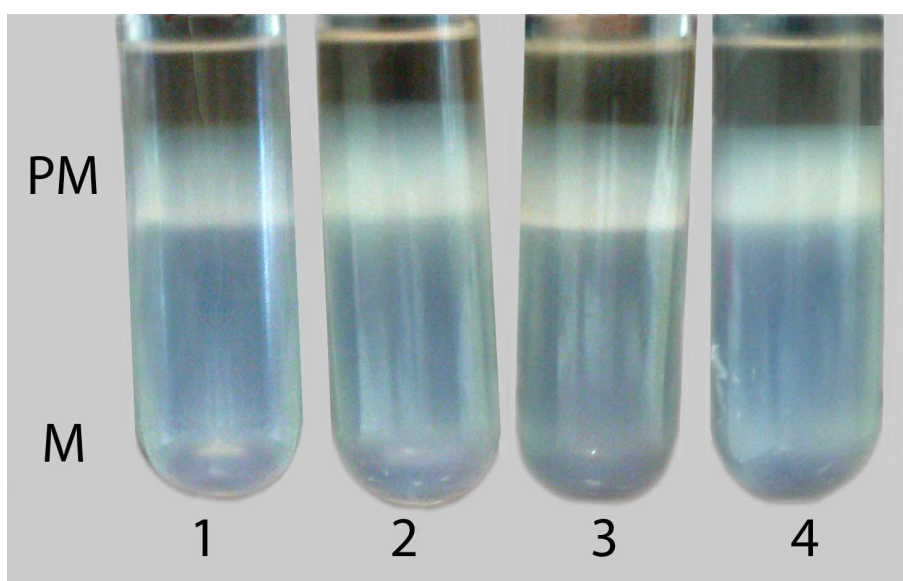
kde  $K_i$  je rovnovážná inhibiční konstanta [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ],  $IC_{50}$  je koncentrace neznačeného ligandu, která z poloviny blokuje specifickou vazbu radioligandu [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ], F je koncentrace radioligandu [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ] a  $K_d$  je rovnovážná disociační konstanta radioligandu [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ].

Výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (One-way ANOVA) a následného použití Bonferroniho testu, který zkoumá statistickou odlišnost jednotlivých skupin mezi sebou. Pokud vyšlo  $P < 0,05$ , byl rozdíl naměřených hodnot považován za signifikantní.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Zavedení a optimalizace metody přípravy plazmatických membrán

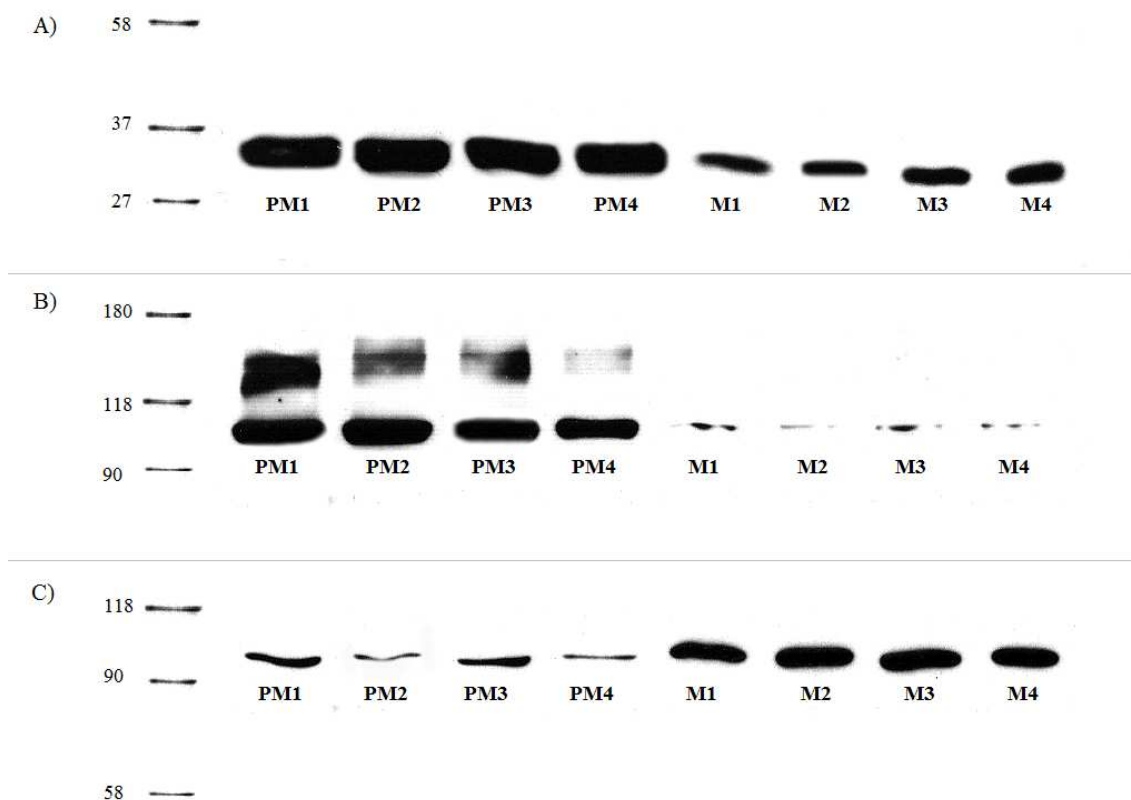
V tomto kroku byl zjišťován optimální způsob homogenizace mozkové kůry potkana při přípravě plazmatických membrán a mitochondrií. K tomuto účelu byly použity mozkové kůry potkanů kontrolní skupiny. Cílem tohoto experimentu bylo připravit co nejčistší preparát plazmatických membrán s minimální kontaminací pocházející z mitochondriální frakce. Rozložení vrstev plazmatických membrán a mitochondrií v percolovém gradientu je ukázáno na Obr. 9. Vliv různých způsobů homogenizace na čistotu a množství proteinů jednotlivých frakcí percolového gradientu při přípravě vzorků z mozkové kůry potkanů byl hodnocen SDS-PAGE elektroforézou, imunoblotem a jednobodovým stanovením. Jako markery plazmatických membrán byly použity proteiny  $G\beta$ , Na/K ATPasa (imunoblot) a opioidní receptory (jednobodové stanovení), k detekci mitochondrií byla použita detekce proteinu F1 ATPasy imunoblotem.



**Obr. 9** Gradient utvořený v 18% Percollu po 15ti minutách centrifugace při 58 000g. PM – Frakce plazmatických membrán, M – Frakce mitochondrií (M). **1:** 5 min/1200 ot.  $\text{min}^{-1}$ , **2:** 5 min/600 ot.  $\text{min}^{-1}$ , **3:** 7,5 min/ 1200 ot.  $\text{min}^{-1}$ , **4:** 7,5 min/600 ot.  $\text{min}^{-1}$  (viz. Tab. 3).

#### 4.1.1 SDS-PAGE Elektroforéza

Pomocí této metody bylo zjišťováno množství plazmatických membrán a mitochondrií ve vzorku a jejich čistota. Byla provedena celkem dvě stanovení, vždy ve třech vyhodnoceních. Vyvolané filmy byly skenovány (viz. Obr. 10) a analyzovány pomocí programu Image Quant.

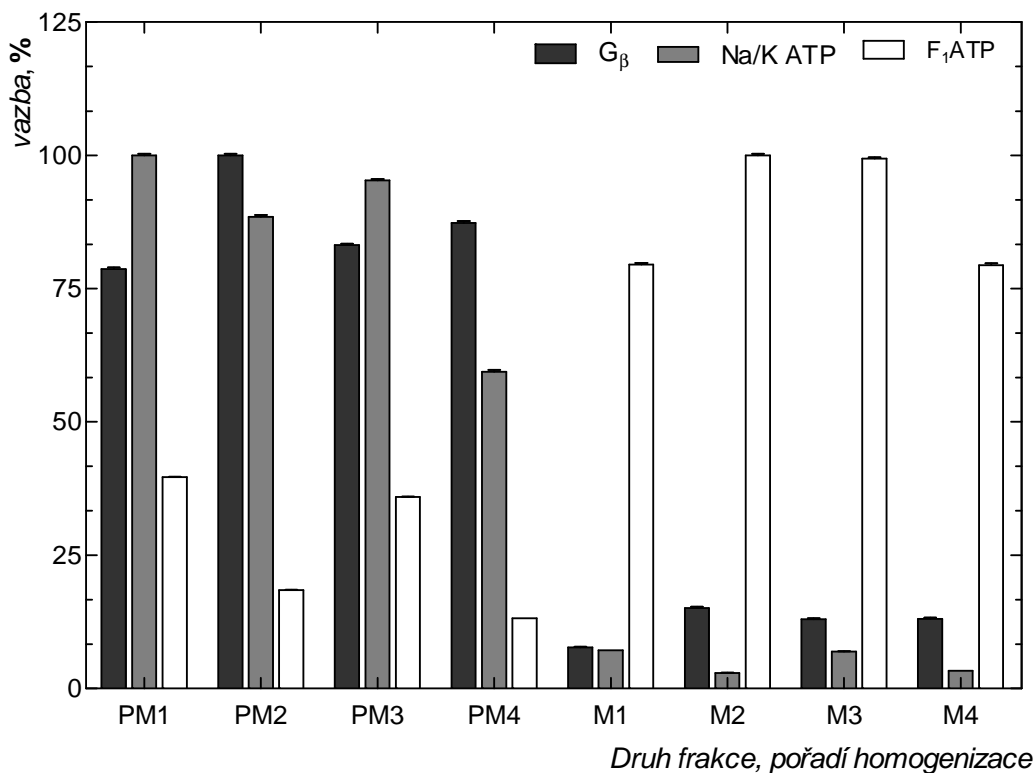


**Obr. 10** Výsledek imunoblotu za použití králičích primárních protilátek proti **A)**  $G_{\beta}$ , expozice 5 s, **B)** Na/K ATPasa, exp. 1 min, **C)**  $F_1$ ATPasa, exp. 1 min, ředění 5000x.

Nanášené vzorky: plazmatické membrány (PM1-4) a mitochondrie (M1-4) připravené čtyřmi způsoby homogenizace a oddělené na percollovém gradientu. *Podmínky homogenizace:* **1:** 5 min/1200 ot.  $\text{min}^{-1}$ , **2:** 5 min/600 ot.  $\text{min}^{-1}$ , **3:** 7,5 min/ 1200 ot.  $\text{min}^{-1}$ , **4:** 7,5 min/600 ot.  $\text{min}^{-1}$  (viz. Tab. 3).

Vlevo – marker molekulové hmotnosti, Mr.





**Obr. 11** Vyhodnocení imunoblotů programem Image Quant, zpracování GraphPad Prism 5.0.

Osa x: vzorky plazmatických membrán (PM1-4) a mitochondrií (M1-4) připravené čtyřmi způsoby homogenizace a oddělené na percollovém gradientu. *Podmínky homogenizace: 1: 5 min/1200 ot. min<sup>-1</sup>, 2: 5 min/600 ot. min<sup>-1</sup>, 3: 7,5 min/ 1200 ot. min<sup>-1</sup>, 4: 7,5 min/600 ot. min<sup>-1</sup>* (viz. Tab. 3).

Osa y: procentuální zastoupení zvoleného markeru (G<sub>β</sub>, Na/K ATPasa, F<sub>1</sub>ATPasa), jako 100 % byla zvolena vždy jeho nejvyšší hodnota.

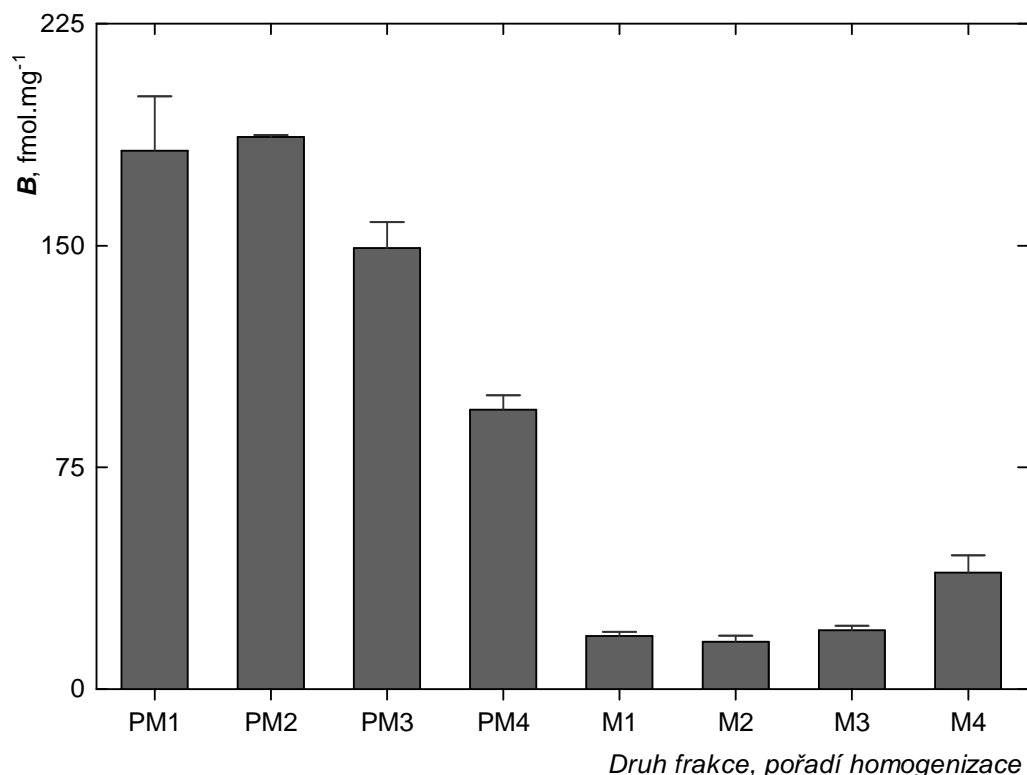
#### 4.1.2 Jednobodové stanovení

Byla určena specifická vazba [<sup>3</sup>H]Diprenorphine ke kontrolnímu vzorku plazmatických membrán a mitochondrií pocházejících z různých způsobů homogenizace (1-4).

**Tab. 5 Množství vazebných míst v jednotlivých vzorcích podle způsobu homogenizace**

Typ homogenizace	1	2	3	4
min/ot. min <sup>-1</sup>	5/1200	5/600	7,5/1200	7,5/600
B, [fmol.mg <sup>-1</sup> ], PM	182,07 ± 18,41	186,73 ± 0,62	149,15 ± 8,81	94,52 ± 4,87
B, [fmol.mg <sup>-1</sup> ], M	17,90 ± 1,57	16,02 ± 2,04	20,00 ± 1,42	39,43 ± 5,84

Výsledky jsou uvedeny ve tvaru průměr ± SEM z pokusu provedeného v triplicátu, PM jsou plazmatické membrány a M mitochondrie (viz. Tab. 3).



**Obr. 12** Grafické znázornění specifické vazby radioligandu ve vzorcích plazmatických membrán a mitochondrií připravených různými způsoby homogenizace. Stanoven byl vždy konstantní obsah proteinů, 100 µg/vzorek. [<sup>3</sup>H]Diprenorphine, c = 1 nmol dm<sup>-3</sup>.

Na ose x jsou vzorky plazmatických membrán (PM1-4) a mitochondrií (M1-4) připravené čtyřmi způsoby homogenizace a oddělené na percollovém gradientu.

*Podmínky homogenizace:* **1:** 5 min/1200 ot. min<sup>-1</sup>, **2:** 5 min/600 ot. min<sup>-1</sup>, **3:** 7,5 min/1200 ot. min<sup>-1</sup>, **4:** 7,5 min/600 ot. min<sup>-1</sup> (viz. Tab. 3).

Na osu y je vyneseno množství specificky vázaného [<sup>3</sup>H]Diprenorphine, B vyjádřené ve fmol mg<sup>-1</sup> proteinů.

## 4.2 Vazebné pokusy

### 4.2.1 Přípravný pokus

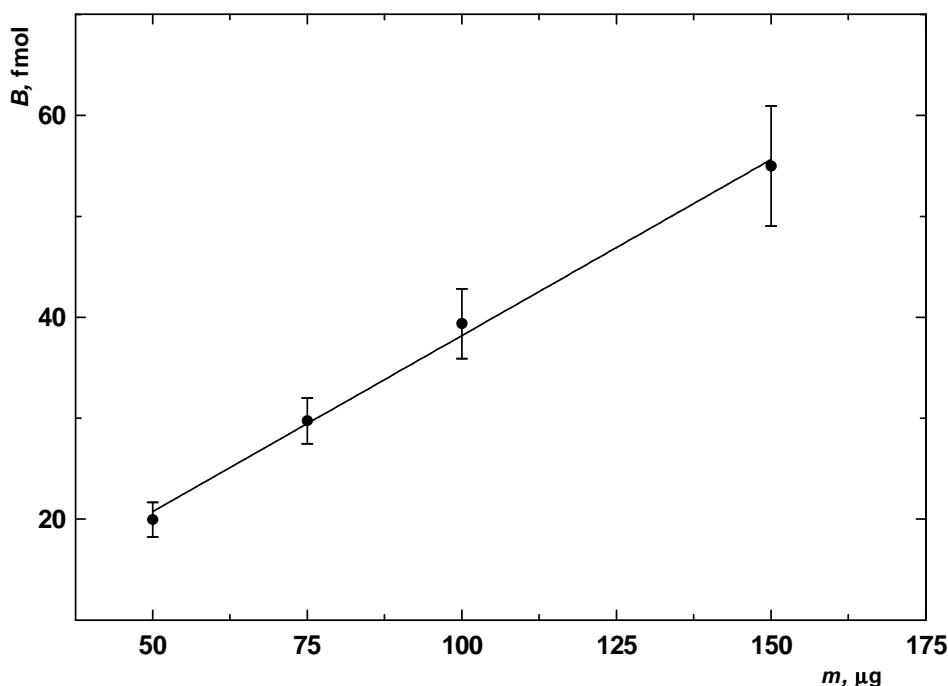
Cílem tohoto pokusu bylo nalezení vhodné koncentrace plazmatických membrán ve vzorku pro saturační a kompetiční vazebné pokusy. Sledována byla závislost vazby [<sup>3</sup>H]Diprenorphine o konstantní koncentraci 1 nmol dm<sup>-3</sup> na různém množství proteinů v kontrolním vzorku plazmatických membrán (Obr. 13).

V koncentračním rozpětí 50 – 150 μg proteinů celková, nespecifická i specifická vazba lineárně rostla, hodnoty specifické vazby jsou uvedeny v Tab. 6, nespecifická vazba se pohybovala v rozmezí (32,7 ± 2,3) % – (18,6 ± 1,2) % celkové vazby v závislosti na rostoucím obsahu plazmatických membrán ve vzorku. Jako optimální byla zvolena koncentrace mezi 50 a 70 μg, kdy je specifická vazba již dostatečně vysoká a zároveň nedochází ke zbytečně vysoké spotřebě vzorku.

**Tab. 6 Průměrné hodnoty specifické vazby [<sup>3</sup>H]Diprenorphine pro různá množství plazmatických membrán v preparátu**

Plazmatické membrány [μg prot]	50	75	100	150
<b>Specifická vazba [fmol]</b>	19,97 ± 1,71	29,74 ± 2,28	39,37 ± 3,45	54,99 ± 5,94

Hodnoty: průměr ± SEM ze dvou nezávislých pokusů provedených v triplikátu.



**Obr. 13** Graf závislosti specifické vazby [<sup>3</sup>H]Diprenorphine na množství proteinů v preparátu. Jednotlivé body reprezentují průměr ± SEM ze dvou nezávislých měření provedených v triplikátu.

Na osu x je vynášeno množství přidávaných proteinů, m [µg].

Na osu y je vynášeno množství specificky vázaného [<sup>3</sup>H]Diprenorphine, B [fmol].

#### 4.2.2 Saturační uspořádání

Vliv morfinu na opioidní receptory v mozkové kůře potkana byl sledován vazebnými pokusy v saturačním uspořádání. Vzorky plazmatických membrán připravených z mozkové kůry potkanů čtyř pokusných a jedné kontrolní skupiny byly podrobeny saturační analýze. Hodnota  $B_{max}$  reprezentuje celkový počet vazebných míst v preparátu, hodnota  $K_d$  vyjadřuje afinitu ligandu k vazebným místům, čím je  $K_d$  nižší, tím větší má ligand afinitu.

Vazba radioligandu byla sledována ve vzorcích plazmatických membrán připravených z mozkové kůry potkana čtyř pokusných a jedné kontrolní skupiny zvířat. Vždy stejné množství plazmatických membrán bylo inkubováno jednu hodinu

s [ $^3\text{H}$ ]Diprenorphine o jeho rostoucí koncentraci. Byla vybrána koncentrace 50  $\mu\text{g}$  proteinů na vzorek, koncentrace radioligandu byla v rozmezí od 2 do 0,03  $\text{nmol dm}^{-3}$  zvolena tak, aby rovnoměrně pokrývala celou křivku. Ve vybraném koncentračním rozmezí radioligandu nesespecifická vazba se pohybovala v rozmezí  $(21,0 \pm 2,2) \% - (43,2 \pm 5,3) \%$  celkové vazby v závislosti na koncentraci [ $^3\text{H}$ ]Diprenorphine. Hodnoty nesespecifické vazby shrnuje Tab. 7. Saturační křivka se blíží hodnotě maximální vazebné kapacity preparátu ( $B_{\text{max}}$ ). Data byla zpracována nelineární regresní analýzou podle rovnice (3) a jsou znázorněna na Obr. 14 - Obr. 18. Celkové množství vazebných míst ( $B_{\text{max}}$ ) v preparátu plazmatických membrán z mozkové kůry potkanů a rovnovážnou disociační konstantu ( $K_d$ ) [ $^3\text{H}$ ]Diprenorphine k opioidním receptorům obsaženým v preparátu shrnuje Tab. 8. Výsledky jsou uvedeny ve tvaru průměr  $\pm$  SEM ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu.

**Tab. 7 Hodnoty nesespecifické vazby pro jednotlivé skupiny saturačních pokusů**

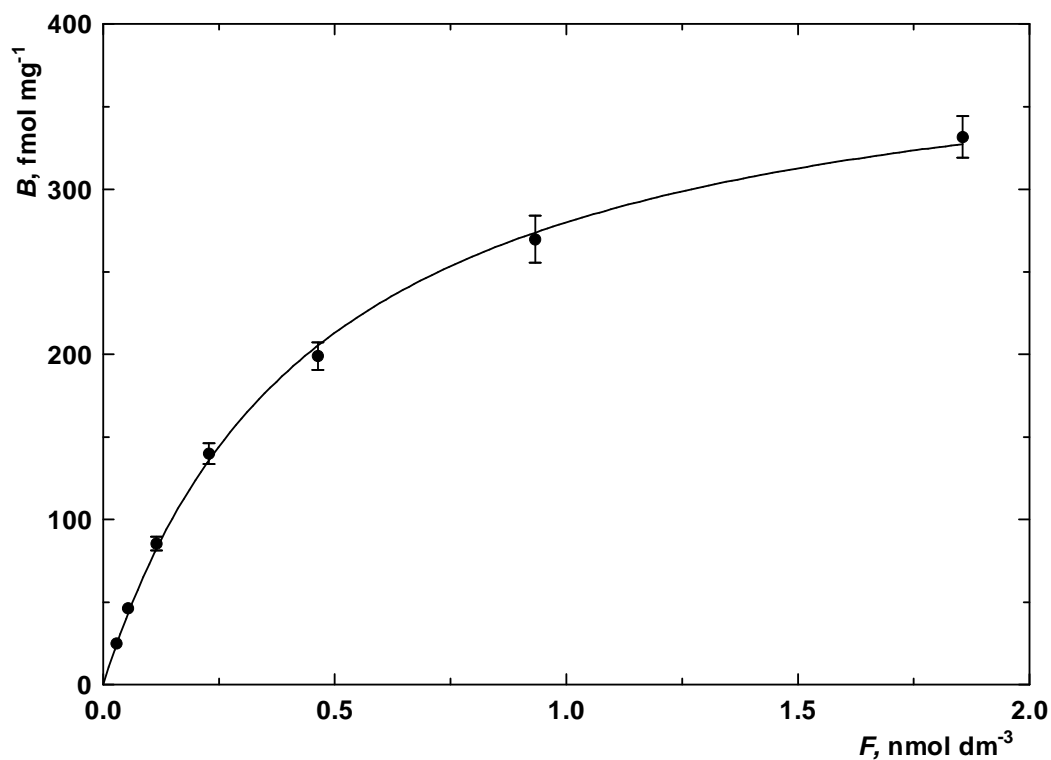
Vzorek	K	M-10	M-28	RM-10	RM-28
Spodní mez [% K]	$26,5 \pm 2,5$	$18,7 \pm 2,4$	$18,3 \pm 3,6$	$20,3 \pm 2,8$	$21,0 \pm 2,0$
Horní mez [% K]	$48,5 \pm 7,5$	$38,7 \pm 4,9$	$34,3 \pm 7,1$	$45,3 \pm 6,3$	$49,0 \pm 7,3$

**Tab. 8 Hodnoty celkového počtu vazebných míst a disociační konstanty radioligandu pro jednotlivé pokusné skupiny**

Vzorek	Kontrola	M-10	M-28	RM-10	RM-28
$B_{\text{max}}$ [fmol $\text{mg}^{-1}$ ]	$411 \pm 8$	$363 \pm 9$	$327 \pm 5$	$283 \pm 5$	$274 \pm 3$
$K_d$ [pmol $\text{dm}^{-3}$ ]	$474 \pm 25$	$365 \pm 25$	$383 \pm 17$	$422 \pm 18$	$387 \pm 12$

Uvedené hodnoty jsou ve tvaru průměr  $\pm$  SEM ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu.

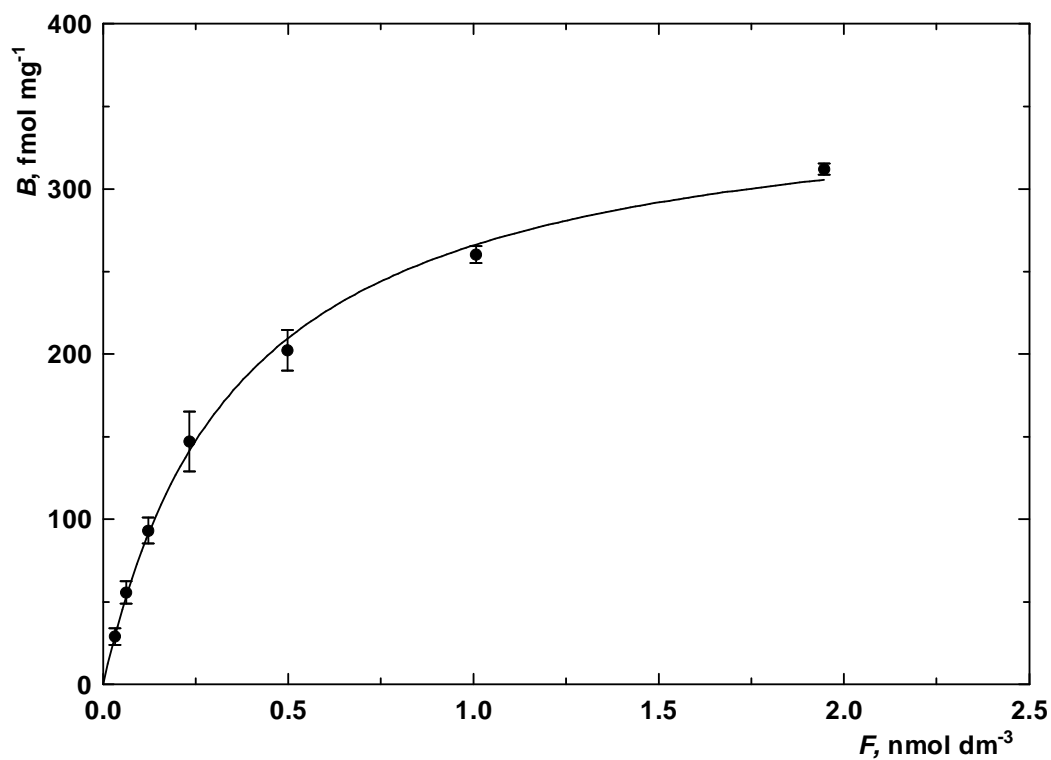
Výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA). Hodnota kritéria (P) pro  $B_{\text{max}}$  vyšla menší než  $10^{-4}$ , což je menší než 0,05. Z toho vyplývá, že rozdíl v celkovém počtu vazebných míst je signifikantní. Pro hodnotu rovnovážné disociační konstanty  $K_d$  vyšlo kritérium  $P=0,33$ , což je větší než 0,05 a rozdíl mezi naměřenými hodnotami signifikantní není. Aplikací Bonferroniho testu bylo zjištěno, že hodnoty  $B_{\text{max}}$  statisticky významně klesají oproti kontrole při podávání morfinu a pak dále v době abstinence, neliší se však mezi skupinami M-10, M-28 a RM-10, RM-28.



**Obr. 14** Saturační křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán kontrolní skupiny K v závislosti na jeho rostoucí koncentraci (množství proteinů: 50μg/vzorek). Jednotlivé body reprezentují průměr ± SEM ze tří nezávislých měření provedených v triplikátu.

Na osu x je vynášena koncentrace volného radioligandu,  $F$  [nmol dm<sup>-3</sup>]

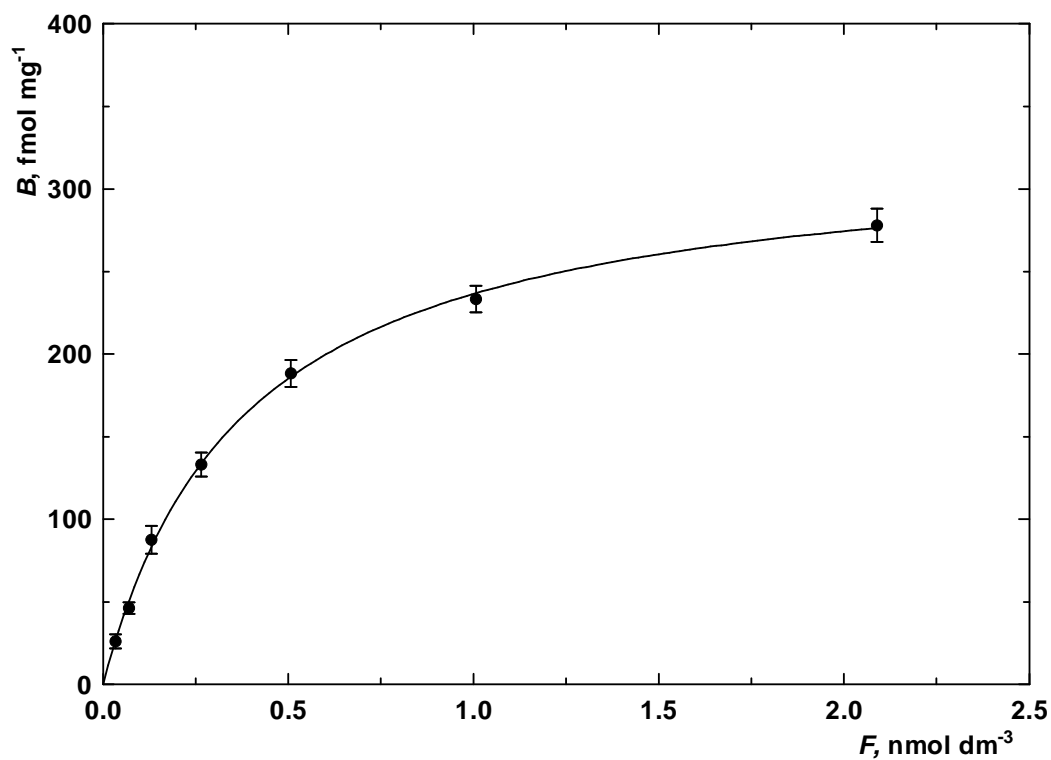
Na osu y je vynášena koncentrace specificky vázaného radioligandu,  $B$  [fmol mg<sup>-1</sup>].



**Obr. 15** Saturační křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry pokusné skupiny potkanů M-10 (10 dní podávání morfinu) v závislosti na rostoucí koncentraci radioligandu (množství proteinů: 50μg/vzorek). Jednotlivé body reprezentují průměr ± SEM ze tří nezávislých měření provedených v triplikátu.

Na osu x je vynášena koncentrace volného radioligandu,  $F$  [nmol dm<sup>-3</sup>]

Na osu y je vynášena koncentrace specificky vázaného radioligandu,  $B$  [fmol mg<sup>-1</sup>].

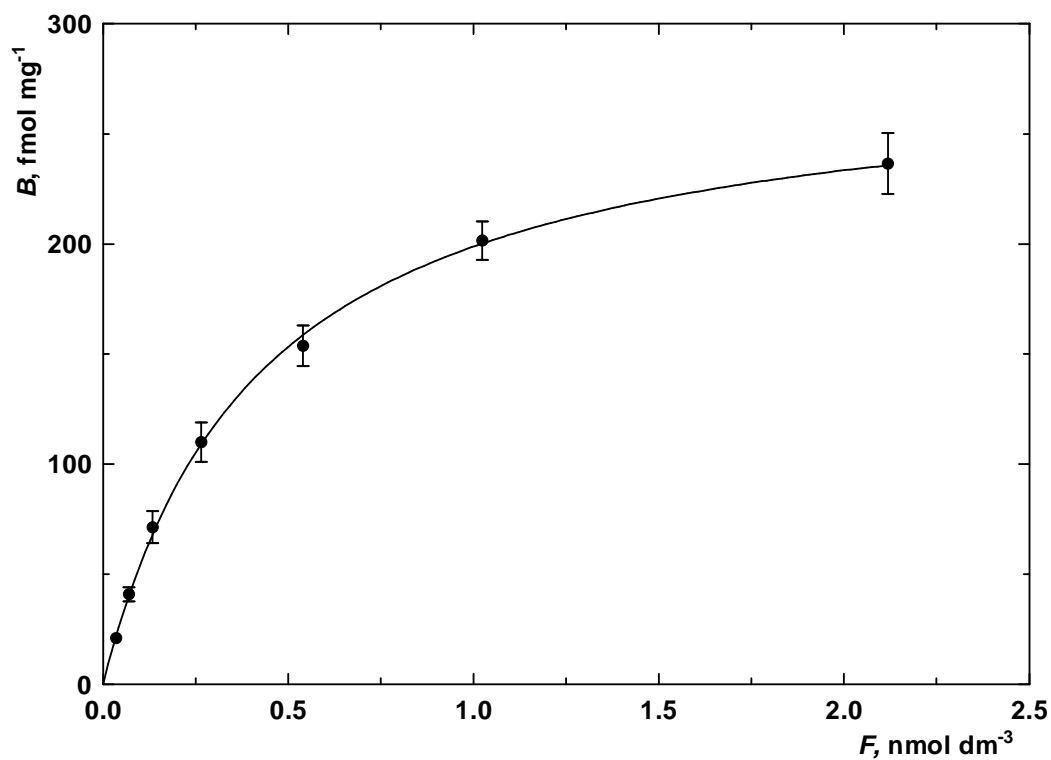


**Obr. 16** Saturační křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry pokusné skupiny potkanů M-28 (28 dní podávání morfinu) v závislosti na rostoucí koncentraci radioligandu (množství proteinů: 50μg/vzorek). Jednotlivé body reprezentují průměr ± SEM ze tří nezávislých měření provedených v triplikátu.

Na osu x je vynášena koncentrace volného radioligandu, F [nmol dm<sup>-3</sup>]

Na osu y je vynášena koncentrace specificky vázaného radioligandu, B [fmol mg<sup>-1</sup>].

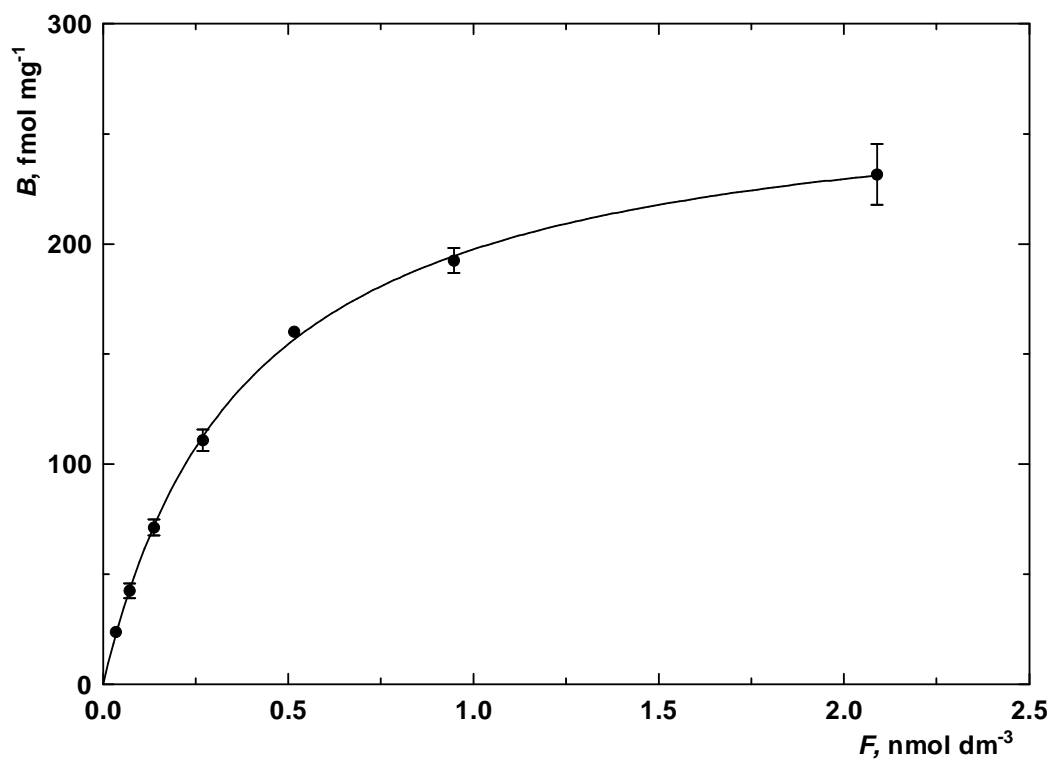




**Obr. 17** Saturační křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry pokusné skupiny potkanů RM-10 (10 dní podávání morfinu a 7 dní regrese) v závislosti na rostoucí koncentraci radioligandu (množství proteinů: 50μg/vzorek). Jednotlivé body reprezentují průměr ± SEM ze tří nezávislých měření provedených v triplikátu.

Na osu x je vynášena koncentrace volného radioligandu, F [nmol dm<sup>-3</sup>]

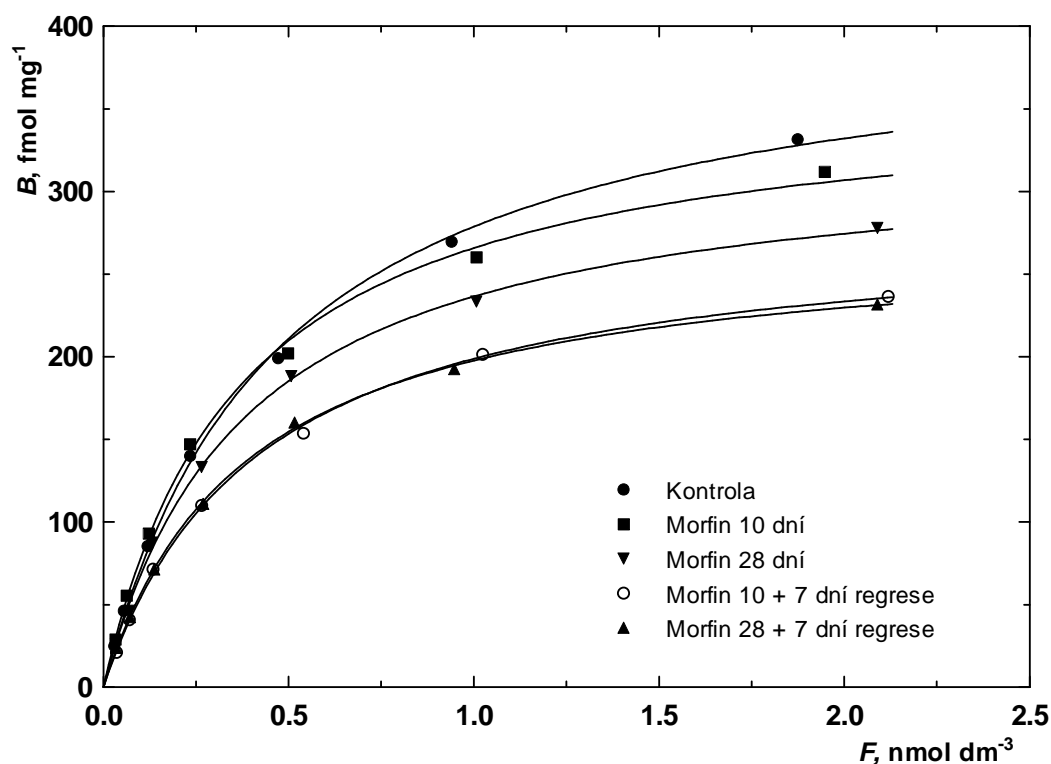
Na osu y je vynášena koncentrace specificky vázaného radioligandu, B [fmol mg<sup>-1</sup>].



**Obr. 18** Saturační křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry pokusné skupiny potkanů RM-28 (28 dní podávání morfinu a 7 dní regrese) v závislosti na rostoucí koncentraci radioligandu (množství proteinů: 50μg/vzorek). Jednotlivé body reprezentují průměr ± SEM ze tří nezávislých měření provedených v triplikátu.

Na osu x je vynášena koncentrace volného radioligandu, F [nmol dm<sup>-3</sup>]

Na osu y je vynášena koncentrace specificky vázaného radioligandu, B [fmol mg<sup>-1</sup>].



**Obr. 19** Souhrný graf znázorňující specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry jednotlivých pokusných skupin potkanů v závislosti na rostoucí koncentraci radioligandu (množství proteinů: 50μg/vzorek). Jednotlivé body reprezentují průměr hodnot ze tří nezávislých měření provedených v triplicátu.

Na osu x je vynášena koncentrace volného radioligandu, F [nmol dm<sup>-3</sup>]

Na osu y je vynášena koncentrace specificky vázaného radioligandu, B [fmol mg<sup>-1</sup>].

#### 4.2.3 Kompetiční uspořádání

Hodnocení vlivu podávání morfinu na množství μ-receptorů ve sledovaných skupinách bylo studováno v kompetičním uspořádání. Byl použit neselektivní radioaktivně značený ligand [<sup>3</sup>H]Diprenorphine a neznačený ligand DAMGO, který je selektivní pro μ-receptor. Zjištěná hodnota rovnovážné inhibiční konstanty K<sub>i</sub> je disociační konstantou neznačeného ligandu a určuje míru jeho schopnosti vázat se na receptor.

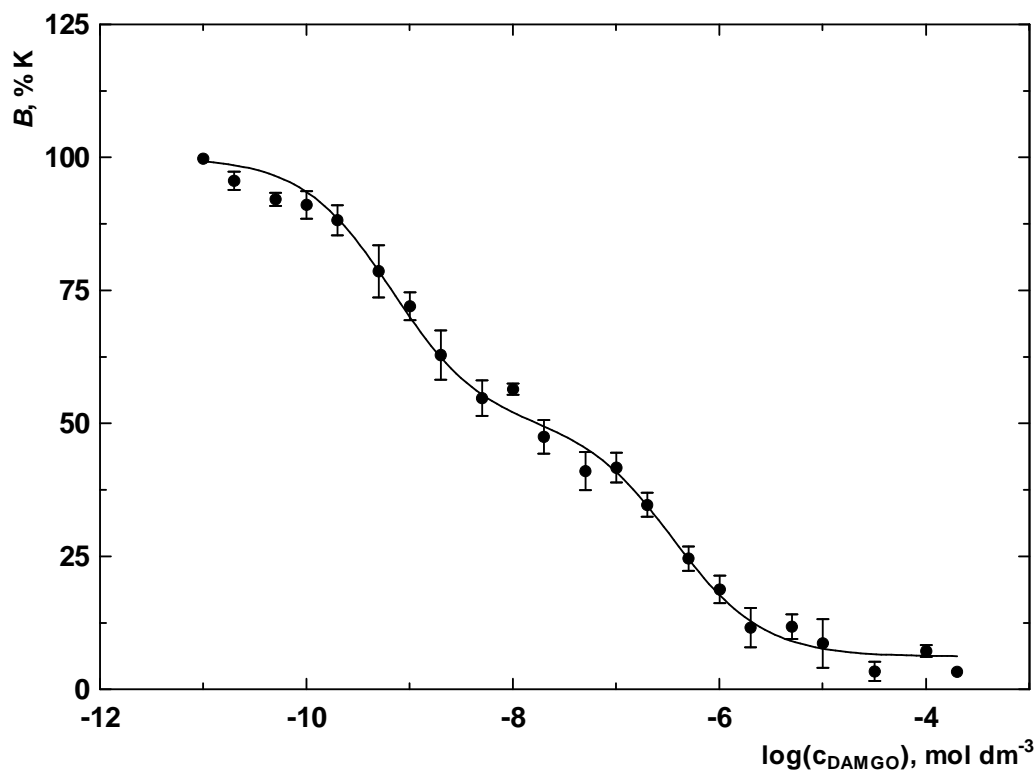
V tomto uspořádání byla sledována specifická vazba radioligandu v pěti různých vzorcích mozkové kůry potkana (viz. 3.5.3) v závislosti na měnící se koncentraci kompetitoru DAMGO a stanovena byla i kontrolní hodnota vazby. Kontrola je specifická vazba radioligandu v nepřítomnosti kompetitoru. Vždy 70  $\mu\text{g}$  plazmatických membrán bylo inkubováno jednu hodinu s 0,5  $\text{nmol dm}^{-3}$  [ $^3\text{H}$ ]Diprenorphine a příslušnou koncentrací kompetitoru z koncentračního rozmezí  $10^{-4} - 10^{-11}$   $\text{mol dm}^{-3}$ . Nespecifická vazba radioligandu byla ( $44,6 \pm 9,1$ ) % celkové vazby. Z inhibiční křivky byla podle rovnice (5) vypočítána nelineární regresní analýzou hodnota  $K_i$  a určeno procentuální zastoupení  $\mu$ -receptorů v jednotlivých vzorcích. Grafické zpracování těchto dat je znázorněno na Obr. 20 – Obr. 24. Hodnoty naměřených rovnovážných inhibičních konstant ( $K_i$ ) a procentuální zastoupení  $\mu$ -receptorů v jednotlivých preparátech plazmatických membrán shrnuje Tab. 9. Výsledky jsou uvedeny ve tvaru průměr  $\pm$  SEM, počty opakování měření jsou uvedeny u konkrétních skupin v tabulce.

**Tab. 9 Hodnoty rovnovážné inhibiční konstanty a procentuální zastoupení  $\mu$ -receptorů v jednotlivých vzorcích plazmatických membrán.**

Vzorek	Kontrola (n=5)	M-10 (n=3)	M-28 (n=4)	RM-10 (n=4)	RM-28 (n=5)
$K_i$ [ $\text{nmol dm}^{-3}$ ]	$0,779 \pm 0,324$	$2,56 \pm 0,86$	$0,686 \pm 0,296$	$1,13 \pm 0,53$	$1,08 \pm 0,88$
% $\mu$	$51,9 \pm 2,0$	$54,0 \pm 0,4$	$56,3 \pm 2,6$	$48,8 \pm 1,6$	$50,1 \pm 2,2$

n = počet opakování měření. Hodnota představuje průměr  $\pm$  SEM z příslušného počtu měření provedených v duplikátu.

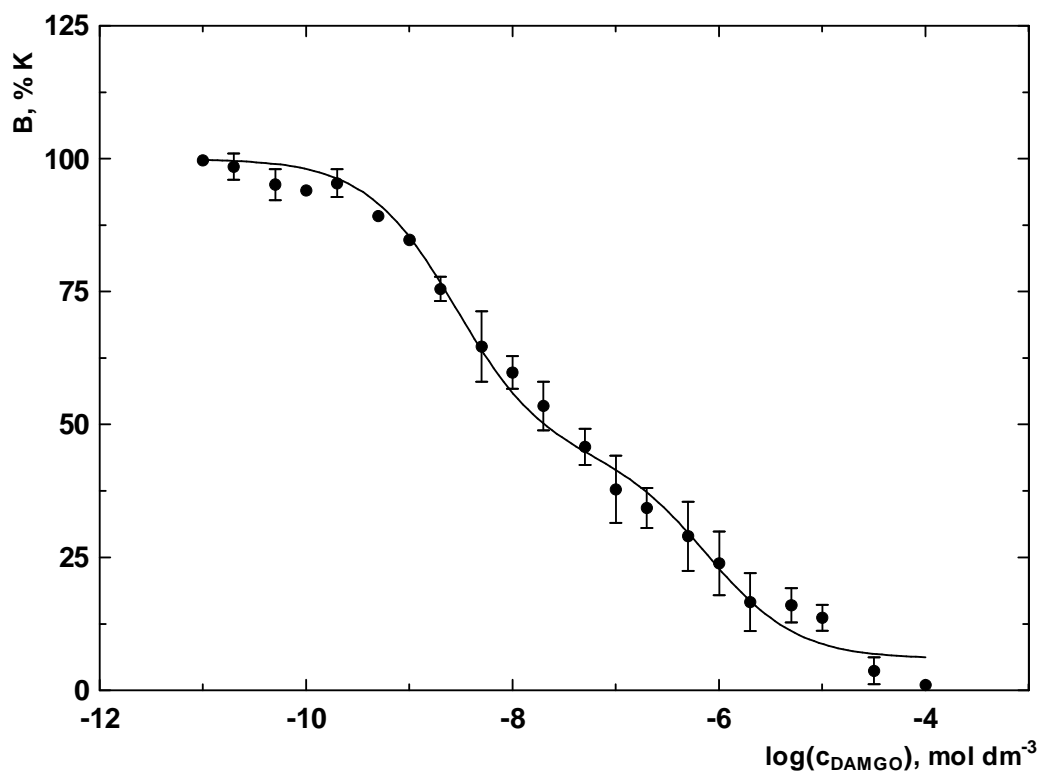
Výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA). Hodnota kritéria (P) pro %  $\mu$ -receptoru vyšla  $P=0,0057$ , což je menší než 0,05, z čehož vyplývá, že rozdíl v procentuálním zastoupení  $\mu$ -receptorů je signifikantní. Pro hodnotu rovnovážné inhibiční konstanty  $K_i$  vyšlo kritérium  $P=0,22$ , což je větší než 0,05 a rozdíl mezi naměřenými hodnotami rovnovážné inhibiční konstanty signifikantní není. Aplikací Bonferroniho testu bylo zjištěno, že hodnoty nárůst procentuálního zastoupení  $\mu$ -receptoru u pokusných skupin M-10, M-28 se statisticky významně neliší od hodnot naměřených pro kontrolní skupinu potkanů, opětovný pokles  $\mu$ -receptorů u skupin RM-10, RM-28 byl statisticky významný.



**Obr. 20** Inhibiční křivka znázorňující vytěsnění specifické vazby [<sup>3</sup>H]Diprenorphine ( $c=0,5 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán kontrolní skupiny potkanů rostoucí koncentrací kompetitoru DAMGO ( $c=10^{-4} - 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$ ), množství proteinů bylo  $70\mu\text{g/vzorek}$ . Jednotlivé body reprezentují průměr  $\pm$  SEM z pěti nezávislých měření provedených v duplikátu.

Na osu x je vynášen logaritmus koncentrace kompetitoru,  $\log(c_{\text{DAMGO}}) [\text{mol dm}^{-3}]$ .

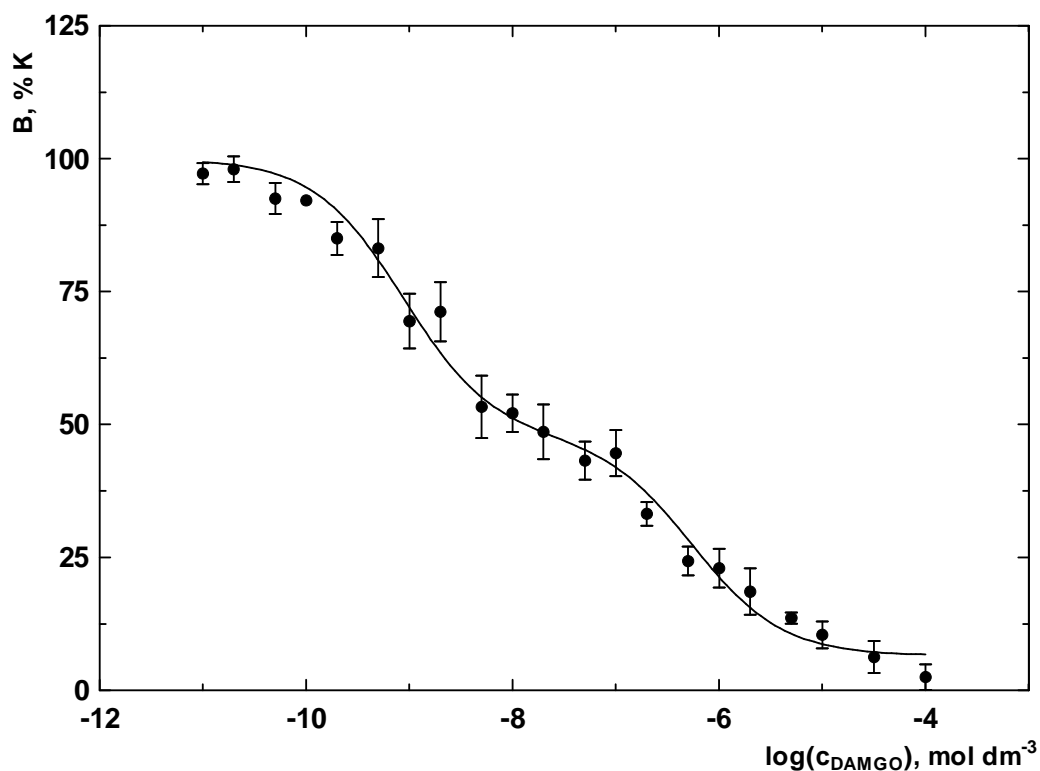
Na osu y je vynášeno procento vazby konroly,  $B [\%]$ .



**Obr. 21** Inhibiční křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine ( $c=0,5 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry pokusné skupiny potkanů M-10 (10 dní podávání morfinu) v závislosti na koncentraci kompetitoru DAMGO ( $c=10^{-4} - 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$ ), množství proteinů bylo  $70\mu\text{g/vzorek}$ . Jednotlivé body reprezentují průměr  $\pm$  SEM ze tří nezávislých měření provedených v duplikátu.

Na osu x je vynášen logaritmus koncentrace kompetitoru,  $\log(c_{\text{DAMGO}}) [\text{mol dm}^{-3}]$ .

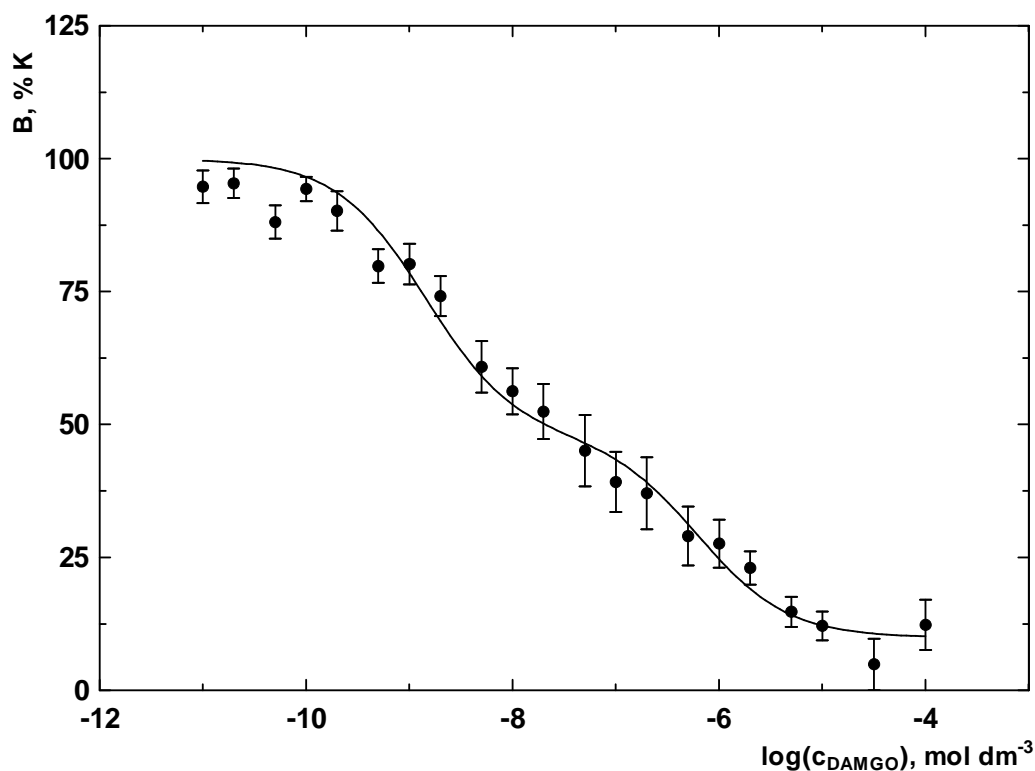
Na osu y je vynášeno procento vazby konroly, B [%].



**Obr. 22** Inhibiční křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine ( $c=0,5 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry pokusné skupiny potkanů M-28 (28 dní podávání morfinu) v závislosti na koncentraci kompetitoru DAMGO ( $c=10^{-4} - 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$ ), množství proteinů bylo  $70\mu\text{g/vzorek}$ . Jednotlivé body reprezentují průměr  $\pm$  SEM ze čtyřech nezávislých měření provedených v duplikátu.

Na osu x je vynášen logaritmus koncentrace kompetitoru,  $\log(c_{\text{DAMGO}}) [\text{mol dm}^{-3}]$ .

Na osu y je vynášeno procento vazby konroly, B [%].

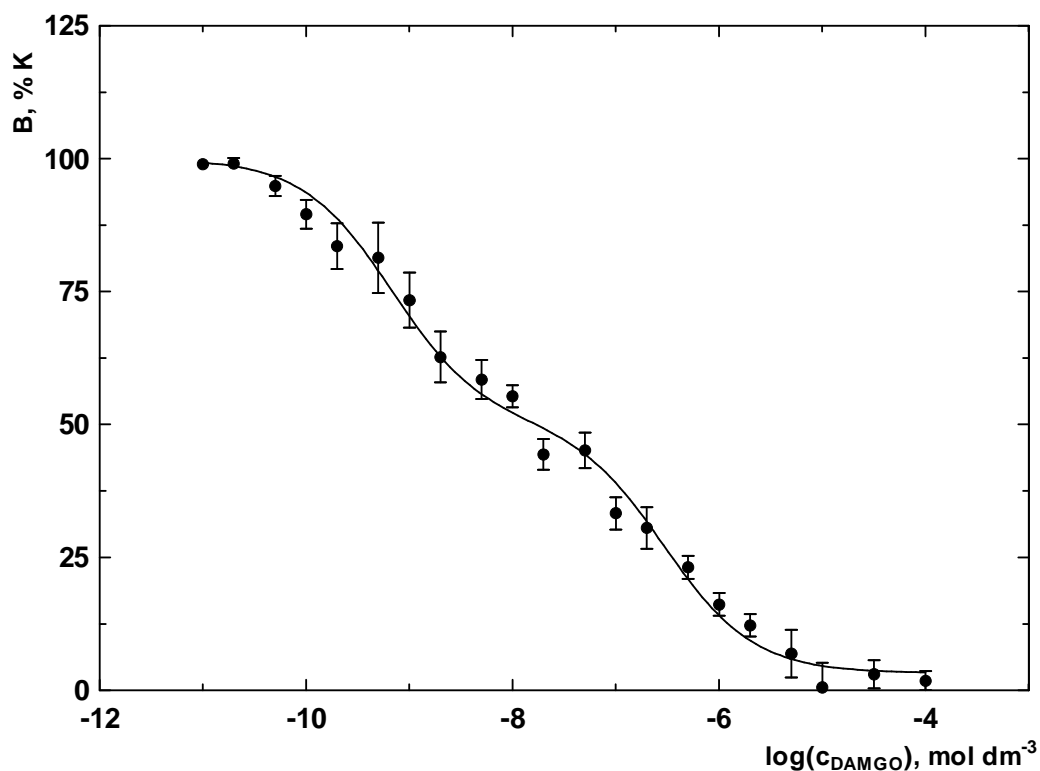


**Obr. 23** Inhibiční křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine ( $c=0,5 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry pokusné skupiny potkanů RM-10 (10 dní podávání morfinu a 7 dní regrese) v závislosti na koncentraci kompetitoru DAMGO ( $c=10^{-4} - 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$ ), množství proteinů bylo  $70\mu\text{g/vzorek}$ . Jednotlivé body reprezentují průměr  $\pm$  SEM ze čtyřech nezávislých měření provedených v duplikátu.

Na osu x je vynášen logaritmus koncentrace kompetitoru,  $\log(c_{\text{DAMGO}}) [\text{mol dm}^{-3}]$ .

Na osu y je vynášeno procento vazby konroly, B [%].

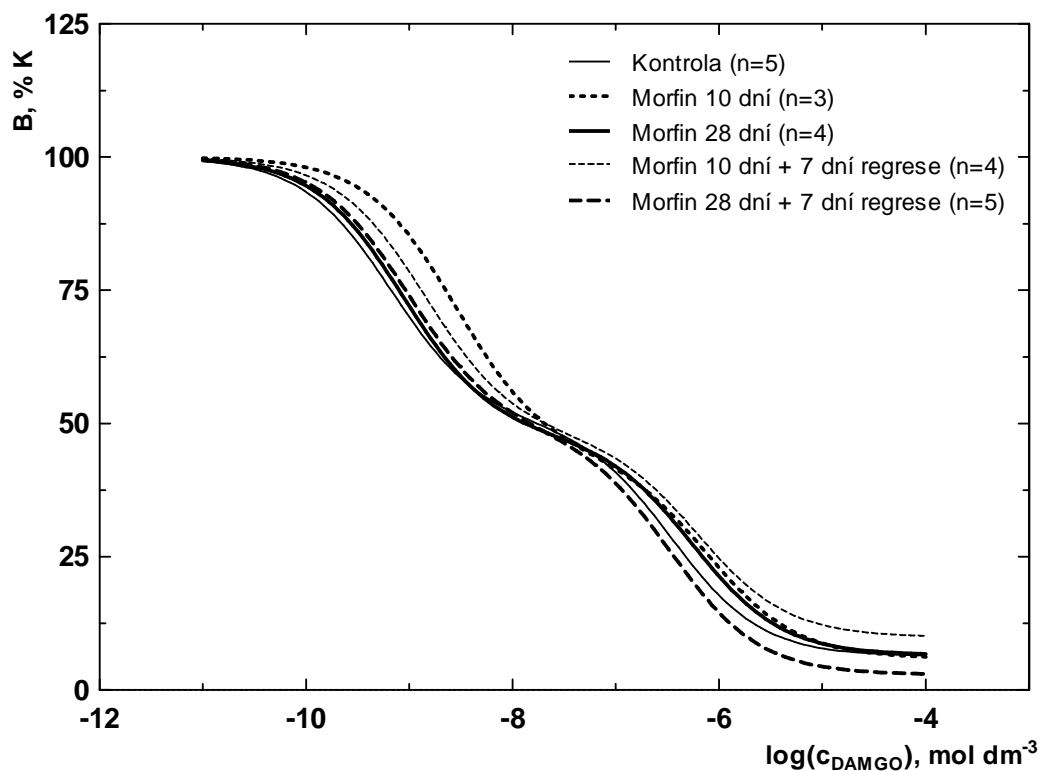




**Obr. 24** Inhibiční křivka pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine ( $c=0,5 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry pokusné skupiny potkanů RM-28 (28 dní podávání morfinu a 7 dní regrese) v závislosti na koncentraci kompetitoru DAMGO ( $c=10^{-4} - 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$ ), množství proteinů bylo  $70\mu\text{g/vzorek}$ . Jednotlivé body reprezentují průměr  $\pm$  SEM z pěti nezávislých měření provedených v duplikátu.

Na osu x je vynášen logaritmus koncentrace kompetitoru,  $\log(c_{\text{DAMGO}}) [\text{mol dm}^{-3}]$ .

Na osu y je vynášeno procento vazby konroly, B [%].



**Obr. 25** Souhrný graf pro specifickou vazbu [<sup>3</sup>H]Diprenorphine ( $c=0,5 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) k vazebným místům v preparátu plazmatických membrán mozkové kůry jednotlivých pokusných skupin potkanů v závislosti na koncentraci kompetitoru. Jednotlivé body reprezentují průměr hodnot z několika nezávislých měření provedených v duplikátu. Hodnota  $n$  uvedená v závorce představuje počet nezávislých experimentů.

Na osu x je vynášen logaritmus koncentrace kompetitoru,  $\log(c_{\text{DAMGO}}) [\text{mol dm}^{-3}]$ .

Na osu y je vynášeno procento vazby konroly, B [%].

## 5 DISKUZE

V této práci byla diskutována problematika vlivu dlouhodobého podávání morfinu na opioidní receptory v souvislosti s rozvojem tolerance a závislosti. Jedním z cílů praktické části byla optimalizace metody pro izolaci frakce obohacené o plazmatické membrány z mozkové kůry potkanů kmene Whistar. Důležitým bodem tohoto kroku byla čistota připravených plazmatických membrán. Protože izolované plazmatické membrány sloužily pro vazebné studie, bylo důležité, aby vzorky plazmatických membrán nebyly kontaminované proteiny z ostatních frakcí. Čím čistší je preparát plazmatických membrán, tím přesnější a reprodukovatelnější výsledky lze získat. Jednoduchý percollový gradient byl vybrán pro snadnost jeho příravy a manipulace s ním. Během optimalizace byly zkoušeny čtyři různé druhy homogenizace tkáně a sledována byla především kontaminace plazmatických membrán mitochondriální frakcí a poměrné množství přístupných vazebných míst – opioidních receptorů. K tomuto účelu byla využita metoda SDS-PAGE elektroforéza v kombinaci s imunodekcekcí proteinů pomocí Western blotu a metoda jednobodového stanovení se značeným antagonistou opioidních receptorů [<sup>3</sup>H]Diprenorphine. Pomocí gelové elektroforézy a následného imunoblotu byl zjišťován obsah plazmatických membrán ve vzorku a jejich čistota, množství vazebných míst bylo určeno jednobodovým stanovením. Kombinací těchto metod byl vybrán způsob homogenizace, který poskytoval dostatečně čistou frakci plazmatických membrán s nejvyšším obsahem vazebných míst v preparátu. Homogenizace při rychlosti 1200 otáček pístu za minutu byla zcela vyloučena, protože při této rychlosti docházelo k rozbití mitochondrií, které neklesly do spodní frakce a kontaminovaly tak vrstvu plazmatických membrán, což lze pozorovat zvýšenou přítomností mitochondriálního markeru F1 ATPasy na Obr. 11 (str. 41) ve vzorcích PM pocházejících z homogenizace 1 a 3. Dalším důsledkem vyšší rychlosti bylo zničení receptorů, což se projevilo snížením počtu vazebných míst viditelným na Obr. 12 (str. 42) u skupin 1 a 3. Dlouhá doba homogenizace se také neukázala jako výhodná, nedošlo sice k porušení mitochondrií (viz. Obr. 11, sk. 4), které by kontaminovaly frakci plazmatických membrán, ale došlo k velikému poklesu vazebných míst a to až o jednu třetinu (viz. Obr. 12, sk. 4). Jako optimální způsob homogenizace byla zvolena rychlost otáčení pístu 600 otáček za minutu po dobu pět minut, specifická vazba v takto

připraveném vzorku plazmatických membrán byla  $186,7 \pm 0,6$  fmol na milligram proteinů, přítomnost mitochondriálního markeru byla nízká (viz. Obr. 11, sk. 2).

Hlavním těžištěm práce bylo zjistit vliv dlouhodobého podávání morfinu na opioidní receptory v mozkové kůře potkana. Sledovány byly čtyři skupiny pokusné a jedna kontrolní. Dvě skupiny dostávaly chronicky dávku morfinu po dobu deset a dvacet osm dní, druhé dvě skupiny prošly po ukončení dávkování morfinu ještě sedmidenní regresí, kdy jim nebyly podávány žádné látky. Po deseti dnech již byli potkani plně závislí, další podávání morfinu umožnilo sledovat, zdali dochází k dalším změnám i u potkanů již závislých. V době regrese bylo sledováno, co se děje při vysazení chronicky podávané látky. V případě morfinu a dalších opioidů, u kterých při jejich vysazení dochází k abstinčním příznakům, jsou tyto informace zvláště důležité. Vhodnou metodou pro splnění tohoto cíle byla zvolena metoda vazebných pokusů s radioligandy v saturačním uspořádání, pomocí které bylo sledováno celkové množství opioidních receptorů ve vzorcích a afinita radioligandu k nim. K tomuto účelu byly použity plazmatické membrány izolované z mozkové kůry z výše popsaných pokusných skupin potkanů. Jako radioaktivně značený ligand byl použit [<sup>3</sup>H]Diprenorphine, což je neselektivní antagonist všech typů opioidních receptorů. Experimentální vzorky byly připraveny centrifugační metodou na Percollovém gradientu podle způsobu vybraného v optimalizačním kroku metody. Touto metodou přípravy byla získána frakce obohacená o plazmatické membrány (v textu zkráceně označena jako frakce plazmatických membrán) a frakce mitochondrií. K vazebným pokusům byly použity pouze vzorky plazmatických membrán, nikoli mitochondrií.

Nejprve byl proveden předběžný pokus, jehož cílem bylo určení vhodného množství proteinu ve vzorku pro vlastní experimenty. Je třeba zvolit takové množství proteinů, aby nebylo zbytečně plýtváno tkání, ale výsledky byly měřeny s dostatečnou přesností a reprodukovatností. Sledována byla závislost celkové, nespecifické a specifické vazby [<sup>3</sup>H]diprenorphine na množství proteinů ve vzorku. Všechny tři typy vazby radioligandu lineárně rostly ve zvoleném rozpětí obsahu proteinů (50 - 150  $\mu$ g prot.) ve vzorcích. Za optimální množství proteinů ve vzorku pro sérii saturačních pokusů bylo zvoleno 50  $\mu$ g proteinů na vzorek, pro kompetiční pokusy byla tato koncentrace zvýšena na 70  $\mu$ g, aby bylo dosaženo srovnatelné kvality výsledků. Při tomto množství proteinů byla nespecifická vazba ještě přijatelně vysoká, okolo

34 – 49 % vazby celkové, a představuje tedy vhodný poměr mezi celkovou a nespecifickou vazbou. Celková spotřeba tkáně je poměrně nízká.

Cílem saturačních pokusů bylo zjištění celkového počtu vazebných míst pro [<sup>3</sup>H]diprenorphine a tedy celkový počet opioidních receptorů v preparátech plazmatických membrán připravených z kortexů potkanů, kterým byl po různou dobu podáván morfin. Tyto hodnoty byly srovnány s celkovým počtem vazebných míst v kontrolním vzorku. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (One-way ANOVA) a následného použití Bonferroniho testu, který hodnotí jednotlivé skupiny mezi sebou. Hodnoty mající  $P < 0,05$  byly považovány za signifikantně rozdílné. Při těchto vazebných pokusech byla sledována specifická vazba [<sup>3</sup>H]Diprenorphine k receptorům obsaženým v preparátu plazmatických membrán v závislosti na měnící se koncentraci tohoto radioligandu. Naměřená data byla zpracována nelineární regresní analýzou podle rovnice (3) a jejich správnost byla ověřena lineárním vynesemím podle Scatcharda. Byl stanoven celkový obsah vazebných míst pro jednotlivé skupiny ( $B_{max}$ ) a to  $411 \pm 8$ ;  $363 \pm 9$ ;  $327 \pm 5$ ;  $283 \pm 5$ ;  $274 \pm 3$  fmol.mg<sup>-1</sup> pro kontrolní vzorek, deset dní morfinu, dvacet osm dní morfinu, deset dní morfinu s regresí sedm dní a dvacet osm dní morfinu s regresí sedm dní, v tomto pořadí. Z uvedených hodnot vyplývá, že po deseti dnech podávání morfinu se signifikantně snížil počet vazebných míst a při dalším podávání morfinu počet vazebných míst ještě lehce klesal. Po úplném vysazení morfinu došlo k dalšímu signifikantnímu poklesu v množství vazebných míst. Celkem tedy došlo ke snížení množství receptorů přibližně o jednu třetinu oproti kontrolní skupině. Statistickou analýzou pomocí ANOVA testu se ukázalo, že hodnoty jsou statisticky rozdílné a následným Bonferroniho testem bylo zjištěno, že se vzájemně signifikantně odlišují, což neplatilo pro dvojice M-10, M-28 a RM-10, RM-28. Z provedeného měření vyplývá, že chronické podávání morfinu má za následek snížení celkového počtu vazebných míst v mozkové kůře potkana. V době regrese (abstinence) se počet vazebných míst nezvyšuje, naopak nadále klesá. Hodnoty  $B_{max}$  naměřené pro kontrolní vzorek jsou v přímé shodě s literárními údaji [71] a [72], kde byl použit jiný radioligand, ale bylo dosaženo srovnatelného výsledku a s metodou [73], kde hodnota  $B_{max}$  byla o něco nižší, což mohlo vzniknout v důsledku odlišného uspořádání vazebného pokusu. Experimentální data naměřená pro chronické podávání morfinu se liší. Existuje shoda v tvrzení, že chronické podávání morfinu snižuje počet

vazebných míst [72][74][75][76]. V rozporu s tímto tvrzením jsou především starší články [77][78], které pracovaly s celým mozkiem potkana, a došly k zjištění, že se počet vazebných míst vlivem podávání morfinu nemění. Největší neshody panují v otázce regrese, kde některé zdroje uvádí, že se hodnota  $B_{\max}$  vrací na úroveň kontroly [72]. Tato skutečnost byla zaznamenána v případě pokusů na celých buňkách, při pokusech plazmatických membránách připravených homogenizační metodou byl zaznamenán pokles počtu vazebných míst v době regrese [72]. Tato skutečnost ukazuje, že homogenizační krok by mohl mít vliv na získané výsledky. Dále byla naměřena hodnota rovnovážné disociační konstanty ( $K_d$ ), čili afinity ligandu [ $^3\text{H}$ ]Diprenorphine k opioidním receptorům a to  $0,474 \pm 0,044$ ;  $0,365 \pm 0,030$ ;  $0,383 \pm 0,024$ ;  $0,422 \pm 0,041$ ;  $0,387 \pm 0,011 \text{ nmol dm}^{-3}$  pro kontrolní vzorek, deset dní morfinu, dvacet osm dní morfinu, deset dní morfinu s regresí sedm dní a dvacet osm dní morfinu s regresí sedm dní, v tomto pořadí. Statistickou analýzou pomocí ANOVA testu a následnou aplikací Bonferroniho testu se ukázalo, že výsledky nejsou signifikantně rozdílné. Je tedy možno říct, že  $K_d$  se při chronickém podávání morfinu nemění. Toto tvrzení i naměřené hodnoty disociační konstanty vycházejí srovnatelně, jako v již dříve provedených pokusech [76] a to i v případě odlišné přípravy tkáně [71], provedení pokusu na celých buňkách [53], a nebo při použití výrazně vyšší koncentrace radioligandu [79].

Dalším cílem bylo určit, jak se mění procentuální zastoupení  $\mu$ -receptorů v závislosti na době podávání morfinu, srovnat tyto hodnoty s kontrolní skupinou a určit rovnovážnou inhibiční konstantu pro neznačený kompetitor. Pro tyto pokusy bylo použito kompetiční uspořádání vazebných pokusů, jako značený ligand byl použit neselektivní antagonist  $^3\text{H}$ ]Diprenorphine a jako neznačený kompetitor byl použit ligand DAMGO, což je selektivní agonista  $\mu$ -typu opioidních receptorů. Naměřená data byla zpracována nelineární regresní analýzou podle rovnice (5). Procentuální zastoupení  $\mu$ -receptorů u jednotlivých skupin bylo zjištěno, a to  $51,9 \pm 2,0$ ;  $54,0 \pm 0,4$ ;  $56,3 \pm 2,6$ ;  $48,8 \pm 1,6$ ;  $50,1 \pm 2,2$  % pro kontrolní vzorek, deset dní morfinu, dvacet osm dní morfinu, deset dní morfinu s regresí sedm dní a dvacet osm dní morfinu s regresí sedm dní, v tomto pořadí. Jak výsledky ukazují, dochází během podávání morfinu k signifikantnímu zvýšení poměrného zastoupení  $\mu$ -receptorů, vzhledem ke skupině kontrolní. Po regresi se poměr opioidních receptorů vrací opět na hodnoty kontrolní skupiny. Shodné procentuální zastoupení  $\mu$ -receptorů v kontrolním vzorku bylo určeno

jak pomocí vazebných studií [71][79][80], tak i za využití autoradiografie [81][59], kde byl poměr receptorů o něco nižší. Jak vyplývá z literatury [1076], morfin není schopen způsobit internalizaci  $\mu$ -receptoru, který tak zůstává přítomen v plazmatické membráně delší dobu, než  $\delta$ -receptory, které jsou po internalizaci transportovány k degradaci v lysosomech [59]. Právě tato skutečnost by mohla vysvětlit proměnlivé procentuální zastoupení  $\mu$ -receptorů v mozkové kůře potkana v průběhu chronického podávání morfinu. Pro lepší pochopení těchto mechanismů by bylo vhodné provést vazebné studie se specifickými značenými ligandy a určit tak přesné množství jednotlivých podtypů těchto receptorů v průběhu opakovaného podávání morfinu. Hodnota rovnovážné inhibiční konstanty ( $K_i$ ) pro neznačený ligand DAMGO se v průběhu pokusů mezi skupinami statisticky nelišila a činila  $0,779 \pm 0,324$ ;  $2,56 \pm 0,86$ ;  $0,686 \pm 0,296$ ;  $1,13 \pm 0,53$ ;  $1,08 \pm 0,88$  nmol dm<sup>-3</sup> pro kontrolní vzorek, deset dní morfinu, dvacet osm dní morfinu, deset dní morfinu s regresí sedm dní a dvacet osm dní morfinu s regresí sedm dní, v tomto pořadí. Je tedy možno vyvodit závěr, že  $K_i$  se vlivem chronického podávání morfinu nemění, což je v přímé shodě s literaturou [53][80] a [82], ale i s hodnotami získanými pokusy na celém mozku [83], a nebo metodou autoradiografie [84]. Poměr  $\mu$ -receptorů byl sledován i u jiných pokusných zvířat, srovnatelné hodnoty byly získány pro vzorky plazmatických membrán pocházející z mozkové kůry koně [80] a myši [85], na rozdíl od pokusných skupin morčat, kde tato shoda pozorována nebyla [80].

## 6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly shrnuty poznatky o  $\mu$ -typu opioidních receptorů z morfologického a farmakologického hlediska s ohledem na jeho interakce s ostatními typy opioidních receptorů. Byla zavedena metoda pro izolaci plazmatických membrán na Percollovém gradientu a tato metoda byla optimalizována tak, aby bylo dělení frakcí nejvíce účinné a nedocházelo tak ke kontaminaci vrstvy plazmatických membrán mitochondriální frakcí. Metodou vazebných pokusů s radioaktivně značenými ligandy byl určen celkový počet opioidních receptorů všech tří podtypů u skupin potkanů, kterým byl po různou dobu chronicky podáván morfin. Bylo zjištěno, že u závislých jedinců dochází ke statisticky významnému poklesu celkového počtu vazebných míst, který při dalším podávání morfinu nadále klesá. V době abstinence se toto množství dále významně snižuje, což je pravděpodobně v důsledku změn trvalejšího charakteru, které morfin způsobuje. Lze tedy prohlásit, že chronické podávání morfinu signifikantně snižuje celkový počet vazebných míst v mozkové kůře potkana. Dále bylo sledováno, jak se při chronickém podávání morfinu mění procentuální zastoupení  $\mu$ -receptorů v mozkové kůře potkana. Výsledky ukázaly, že podávání morfinu vede k signifikantnímu zvýšení poměrného zastoupení  $\mu$ -receptorů a, že po regresi se poměr opioidních receptorů vrací opět na hodnoty kontrolní skupiny. Lze tudíž předpokládat, že se poměrné zastoupení receptorů mění v čase, což by naznačovalo, že odbourávací dráha  $\mu$ -receptorů je jiná, než u ostatních podtypů. Pro další zkoumání této problematiky by byly užitečné vazebné pokusy se selektivními radioligandy, pomocí kterých by bylo možné přímo sledovat množství receptorů vždy pouze jednoho podtypu. Cíle vytyčené v úvodu této práce se podařilo splnit.



## SEZNAM CITACÍ

- [1] Van Ree J.M., Gerrits M.A., Vanderschuren L.J.: **Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine.** *Pharmacological Reviews* 1999, **51**:341–396
- [2] Kieffer B.L., Evans C.J.: **Opioid Receptors: From Binding Sites To Visible Molecules *In Vivo*.** *Neuropharmacology* 2009, **56**:205–212
- [3] Pert C.B., Snyder S.H.: **Opiate Receptor: demonstration in nervous tissue.** *Science* 1973, **179**:1011–1014
- [4] Simon E.J., Hiller J.M., Edelman I.: **Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1973, **70**:1947–1949
- [5] Evans C.J. and others: **Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.** *Science* 1992, **258**:1952–1955
- [6] Henriksen G., Willoch F.: **Imaging of opioid receptors in the central nervous system.** *Brain* 2007, **131**:1171–1196
- [7] Cox B.M., Borsodi A., Caló G., Chavkin C., Christie M.J., Civelli O., Devi L.A., Evans C., Höllt V., Henderson G., Kieffer B., Kitchen I., Kreek M., Liu-Chen L., Meunier J., Portoghese P. S., Shippenberg T. S., Simon E.J., Toll L., Traynor J. R., Ueda H., Wong Y. H.: **IUPHAR DATABASE.** Dostupné z URL: <<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=50>> [cit. 10.5.2012]
- [8] Satoh M., Minami M.: **Molecular pharmacology of the opioid receptors.** *Pharmacology & Therapeutics* 1995, **68**:343–364
- [9] Mollereau C. and others: **ORL1: a novel member of the opioid receptor family.** *FEBS Letters* 1994, **341**:33–38
- [10] Williams J. T., Christie M. J., O Manzoni: **Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence.** *Physiological Reviews* 2001, **81**:299–343
- [11] Trescot A. M. and others: **Opioid pharmacology,** *Pain Physician* 2008, **11**:133–153
- [12] Dickenson T.: **Opiates,** *Encyclopedia of Life Sciences,* 2001, Dostupné z URL: <<http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0000251>> [cit. 23. 9. 2011].
- [13] Vaccarino A.L., Kastin A.J.: **Endogenous opiates: 2000.** *Peptides* 2001, **22**:2257–2328
- [14] Mollereau C. and others: **Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**:8666–8670.

- 
- [15] Smith A.P., Lee N.M.: **Opioid receptor interactions: local and nonlocal, symmetric and asymmetric, physical and functional.** *Life Sciences* 2003, **73**:1873–1893.
- [16] Gray A.C., Coupar I.M., White P. J.: **Comparison of opioid receptor distributions in the rat central nervous system.** *Life Sciences* 2006, **79**:674–685
- [17] Narita M., Funada M., Suzuki T.: **Regulations of opioid dependence by opioid receptor types.** *Pharmacology & Therapeutics* 2001, **89**:1–15
- [18] Meunier J.C. and others: **Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor.** *Nature* 1995, **377**:532–535
- [19] Reinscheid R. K. and others: **Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor.** *Science* 1995, **270**:792–794
- [20] Zaratin P. F. and others: **Modification of nociception and morphine tolerance by the selective opiate receptor-like orphan receptor antagonist (-)-cis-1-methyl-7-[[4-(2,6-dichlorophenyl)piperidin-1-yl]methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ol (SB-612111).** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004, **308**:454–461
- [21] Andersen G., Christrup L., Sjøgren P.: **Relationships among morphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update.** *Journal of Pain and Symptom Management* 2003, **25**:74–91
- [22] Vater M. and others: **Pharmacokinetics and analgesic effect of slow-release oral morphine sulphate in volunteers.** *British Journal of Anaesthesia* 1984, **56**:821–827
- [23] Säwe J.: **High-dose morphine and methadone in cancer patients. Clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment.** *Clinical Pharmacokinetics* 1986, **11**:87–106
- [24] Yeh S.Y., Gorodetzky C.W., Krebs H.A.: **Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-etheral sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1977, **66**:1288–1293
- [25] Knapp R.J. and others: **Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors.** *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1995, **9**:516–525
- [26] Levac B.A.R., O'Dowd B.F., George S.R.: **Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units.** *Current Opinion in Pharmacology* 2002, **2**:76–81

- 
- [27] Binyaminy B. and others: **Agonist-specific down regulation of mu-opioid receptors: Different cellular pathways are activated by different opioid agonists.** *Life Sciences* 2008, **82**:831–839
- [28] Minami M., Satoh M.: **Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions.** *Neuroscience Research* 1995, **23**:121–145
- [29] Pasternak G.W.: **Molecular Insights Into  $\mu$  Opioid Pharmacology.** *The Clinical Journal of Pain* 2010, **26**:S3–S9
- [30] Xu J. and others: **Identification and characterization of seven new exon 11-associated splice variants of the rat  $\mu$  opioid receptor gene, OPRM1.** *Molecular Pain* 2011, **7**:9
- [31] Pan Y.: **Diversity and Complexity of the Mu Opioid Receptor Gene: Alternative Pre-mRNA Splicing and Promoters.** *DNA and Cell Biology* 2005, **247**:36–750
- [32] Law P., Loh H.H.: **Opiate Receptors.** V *Encyclopedia of Life Sciences*, ed. by John Wiley & Sons, Ltd 2001 [cit. 23.9.2011]
- [33] Tanowitz M., Hislop J.N., von Zastrow M.: **Alternative Splicing Determines the Post-endocytic Sorting Fate of G-protein-coupled Receptors.** *Journal of Biological Chemistry* 2008, **283**:35614–35621
- [34] Hislop J.N., Henry A.G., von Zastrow M.: **Ubiquitination in the First Cytoplasmic Loop of  $\mu$ -Opioid Receptors Reveals a Hierarchical Mechanism of Lysosomal Down-regulation.** *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**:40193–40204
- [35] Pasternak G.W., Davis M.: **Opioid receptors and opioid pharmacodynamics.** V *Opioid in Cancer Pain*, MMV
- [36] Neves S.R., Ram P.T., Iyengar R.: **G protein pathways.** *Science* 2003, **296**:1636–1639
- [37] Connor M., Christie M.J.: **Opioid receptor signalling mechanisms.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1999, **26**:493–499
- [38] Gomes B.A. and others: **Mu-opioid receptor down-regulation and tolerance are not equally dependent upon G-protein signaling.** *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 2002, **72**:273–278
- [39] Ikeda K. and others: **Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys.** *Neuroscience Research* 2002, **44**:121–131
- [40] Alberts B.: *Molecular biology of the cell.* Garland Science 2002
- [41] Chakrabarti S., Oppermann M., Gintzler A.R.: **Chronic morphine induces the concomitant phosphorylation and altered association of multiple signaling proteins: a novel mechanism for modulating cell signaling.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**:4209–4214

- 
- [42] Doll C. and others: **Agonist-selective patterns of  $\mu$ -opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies.** *British Journal of Pharmacology* 2011, **164**:298–307
- [43] Alvarez V.A. and others: **Mu-Opioid receptors: Ligand-dependent activation of potassium conductance, desensitization, and internalization.** *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 2002, **22**:5769–5776
- [44] Bailey C.P., Connor M.: **Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence.** *Current Opinion in Pharmacology* 2005, **5**:60–68
- [45] Tsao P.: **Diversity and specificity in the regulated endocytic membrane trafficking of G-protein-coupled receptors.** *Pharmacology & Therapeutics* 2001, **89**:139–147
- [46] Schulz S. and others: **Morphine induces terminal  $\mu$ -opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375.** *The EMBO Journal* 2004, **23**:3282–3289
- [47] Tsao P., Cao T., von Zastrow Mark: **Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors.** *Trends in Pharmacological Sciences* 2001, **22**:91–96
- [48] H.-J. Hippe and others, ‘The interaction of nucleoside diphosphate kinase B with G dimers controls heterotrimeric G protein function’, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**:16269–16274
- [49] Murray S.R.: **Morphine Activates Opioid Receptors without Causing Their Rapid Internalization.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**:19021–19024
- [50] Sternini C. and others: **Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons *in vivo*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **93**:9241–9246.
- [51] Tsao, P. I.: **Type-specific Sorting of G Protein-coupled Receptors after Endocytosis.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**:11130–11140
- [52] Hislop J. N. and others: **Ubiquitination Regulates Proteolytic Processing of G Protein-coupled Receptors after Their Sorting to Lysosomes.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**:19361–19370
- [53] Chakrabarti S. and others: **The mu-opioid receptor down-regulates differently from the delta-opioid receptor: requirement of a high affinity receptor/G protein complex formation.** *Molecular Pharmacology* 1997, **52**:105–113
- [54] Gaudriault G. and others: **Receptor-induced internalization of selective peptidic mu and delta opioid ligands.** *The Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**:2880–2888

- 
- [55] Kabli N. and others: **Agonists at the  $\delta$ -opioid receptor modify the binding of  $\mu$ -receptor agonists to the  $\mu$ - $\delta$  receptor hetero-oligomer.** *British Journal of Pharmacology* 2010, **161**:1122–1136
- [56] Fan T. and others: **A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers.** *The Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**:38478–38488
- [57] Gomes I. and others: **A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**:5135–5139
- [58] Gomes I. and others: **Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy.** *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 2000, **20**:RC110
- [59] He S. and others: **Facilitation of  $\mu$ -opioid receptor activity by preventing  $\delta$ -opioid receptor-mediated codegradation.** *Neuron* 2011, **69**:120–131
- [60] Tan M. and others: **p38 MAPK and beta-arrestin 2 mediate functional interactions between endogenous micro-opioid and alpha2A-adrenergic receptors in neurons.** *The Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**:6270–6281
- [61] Kaufman D.L. and others: **Characterization of the murine mu opioid receptor gene.** *The Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**:15877–15883
- [62] Arvidsson U. and others: **Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord.** *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 1995, **15**:3328–3341
- [63] Goodman R.R.: **Differentiation of Delta and Mu Opiate Receptor Localizations by Light Microscopic Autoradiography.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1980, **77**:6239–6243
- [64] Tempel A., a Zukin R.S.: **Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**:4308–4312
- [65] Mansour A. and others: **Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications.** *Trends in Neurosciences* 1995, **18**:22–29
- [66] 'DBS: **The Basal Ganglia**'. Dostupné z URL: <[http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108\\_2003\\_Groups/Deep\\_Brain\\_Stimulation/basalganglia.html](http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2003_Groups/Deep_Brain_Stimulation/basalganglia.html)> [cit. 12.5.2012]

- 
- [67] Jurna I., Heinz G.: **Differential effects of morphine and opioid analgesics on A and C fibre-evoked activity in ascending axons of the rat spinal cord.** *Brain Research* 1979, **171**:573–576
- [68] Abbadie C., Pasternak G.W.: **Chapter I Opioid receptors.** v *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 2002, 1–29 Dostupné z URL: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924819602800033>> [cit.13.5.2012]
- [69] Smith P. and others: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Analytical Biochemistry* 1985, **150**:76–85
- [70] Motulsky H.: **Analyzing Radioligand Binding Data.** v *graphPad Guide*, MCMXCV-VI.
- [71] Tao P L., Law P Y., Loh H.H.: **Decrease in delta and mu opioid receptor binding capacity in rat brain after chronic etorphine treatment.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1987, **240**:809–816
- [72] Rogers N.F., el-Fakahany E.: **Morphine-induced opioid receptor down-regulation detected in intact adult rat brain cells.** *European Journal of Pharmacology* 1986, **124**:221–230
- [73] Cunningham V.J. and others: **Compartmental analysis of diprenorphine binding to opiate receptors in the rat in vivo and its comparison with equilibrium data in vitro.** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1991, **11**:1–9
- [74] Bhargava H.N., Gulati A.: **Down-regulation of brain and spinal cord mu-opiate receptors in morphine tolerant-dependent rats.** *European Journal of Pharmacology* 1990, **190**:305–311
- [75] De Vries T. J. and others: **Effect of chronic prenatal morphine treatment on  $\mu$ -opioid receptor-regulated adenylate cyclase activity and neurotransmitter release in rat brain slices.** *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 1991, **208**:97–104
- [76] Afify E.A. and others: **Role of carboxyl terminus of mu-and delta-opioid receptor in agonist-induced down-regulation.** *Molecular Brain Research* 1998, **54**:24–34
- [77] Höllt V. and others: **Comparison of in vivo and in vitro parameters of opiate receptor binding in naive and tolerant/dependent rodents.** *Life Sciences* 1975, **16**:1823–1828
- [78] KLEE W.A. a STREATY R.A.: **Narcotic Receptor Sites in Morphine-dependent Rats.** *Nature* 1974, **248**:61–63
- [79] Tao P.L. and others: **Decrease in delta-opioid receptor density in rat brain after chronic [D-Ala<sup>2</sup>,D-Leu<sup>5</sup>]enkephalin treatment.** *Brain Research* 1988, **462**:313–320

- 
- [80] Thomasy S.M., Moeller B.C., Stanley S.D.: **Comparison of opioid receptor binding in horse, guinea pig, and rat cerebral cortex and cerebellum.** *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 2007, **34**:351–358
- [81] Vilpoux C. and others: **Differential effects of chronic antidepressant treatments on micro- and delta-opioid receptors in rat brain.** *European Journal of Pharmacology* 2002, **443**:85–93
- [82] Christoffers K.H. and others: **Purification and mass spectrometric analysis of the  $\mu$  opioid receptor.** *Molecular Brain Research* 2003, **118**:119–131
- [83] Nielsen C.K. and others: **Oxycodone and morphine have distinctly different pharmacological profiles: radioligand binding and behavioural studies in two rat models of neuropathic pain.** *Pain* 2007, **132**:289–300
- [84] Sharif N.A., Hughes J.: **Discrete mapping of brain Mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors.** *Peptides* 1989, **10**:499–522
- [85] Bernstein M.A., Welch S.P.: **mu-Opioid receptor down-regulation and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation in a mouse model of chronic morphine tolerance.** *Brain Research. Molecular Brain Research* 1998, **55**:237–242