

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

*Studijní program – Biochemie*

*Studijní obor – Biochemie*



**Bc. Kristína Cechová**

# Studium receptorů pro opioidy

## Study of opioid receptors

---

### Diplomová práce

Konzultant: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha, 2016 Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

### *PROHLÁŠENÍ*

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Svobody DrSc. a prof. RNDr. Jiřího Hudečka CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 6. 5. 2016

### *PODĚKOVÁNÍ*

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc. za odborné vedení a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Ujčíkové, Ph.D., RNDr. Lence Roubalové, Ph.D., RNDr. Jiřině Slaninové, CSc. a Mgr. Dmytrovi Kaganovi, Ph.D. za veškerou pomoc a v neposlední řadě prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za cenné rady při sepisování této práce.

## Obsah

Seznam použitých zkratk.....	6
ABSTRAKT.....	9
ABSTRACT.....	11
1 ÚVOD.....	13
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	16
2.1 Imunitní systém a složky imunitního systému .....	16
2.1.1 Složky imunitního systému.....	16
2.2 Morfin, heroin a imunitní systém .....	21
2.3 Receptory spřažené s G-proteiny a opioidní receptory .....	23
2.3.1 Signalizace přes G-proteiny.....	25
2.3.2 Signalizace přes $\beta$ -arrestin a GRK.....	27
2.3.3 Desenzitizace/Sekvestrace/Internalizace/ Downregulace.....	28
2.4 Opioidní receptory .....	29
2.4.1 Signalizace .....	32
2.4.2 Desenzitizace, internalizace a downregulace .....	33
2.4.3 $\mu$ -OR .....	34
2.4.4 $\delta$ -OR.....	34
2.4.5 $\kappa$ -OR .....	34
2.5 Opioidní receptory v imunitním systému .....	35
3 CÍL PRÁCE .....	39
4 PRAKTICKÁ ČÁST .....	40
4.1 Materiál a metody.....	40
Stanovení množství proteinů metodou přenosu " <i>Western blot</i> " .....	40
1.1 Stanovení agonistou stimulované vazby [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S a vazby radioligandu [ $^3$ H]naloxonu na opioidní receptory v kontrolních a konkanavalinom A stimulovaných lymfocytech.....	48
4.2 Statistické vyhodnocení a grafické zpracování .....	52
4.3 Stanovení bílkoviny metodou podle Lowryho .....	52

5	VÝSLEDKY .....	53
5.1	Výsledky stanovení množství proteinů metodou "Western blot" .....	53
5.1.1	Stanovení $\mu$ -, $\delta$ - a $\kappa$ -opioidních receptorů ve vzorcích PNS připravených z kontrolních (CTR) a konkanavalinem A (ConA) -stimulovaných lymfocytů sleziny potkanů. .	54
5.1.2	Stanovení aktinu, $\beta$ -arrestinu-1/2 a kaveolinu-1 v kontrolních (CTR) a konkanavalinem A (ConA) ovlivněných vzorcích PNS z lymfocytů potkaní sleziny .....	57
5.1.3	Stanovení $\mu$ -, $\delta$ - a $\kappa$ -opioidních receptorů v kontrolních (CTR) a morfinem (MORF) ovlivněných vzorcích lymfocytů ze sleziny potkanů.....	60
5.1.4	Stanovení opioidních receptorů typu $\mu$ , $\delta$ a $\kappa$ v srdci kontrolních potkanů a zvířatech ovlivněných morfinem .....	62
5.1.5	Stanovení opioidních receptorů v kůře předního mozku potkanů ovlivněných morfinem a kontrolních zvířat .....	64
5.1.6	Imunodetekce $\mu$ -, $\delta$ - a $\kappa$ -opioidních receptorů ve vzorcích kontrolních a stimulovaných lymfocytech potkaní sleziny, vzorcích kůře předního mozku a srdce (levá komora) na jedné nitrocelulosové membráně .....	66
5.2	Výsledky stanovení agonistou stimulované vazby [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S na $\mu$ -OR, $\delta$ -OR a $\kappa$ -OR v PNS kontrolních a konkanavalinom A stimulovaných lymfocytech ze sleziny potkana .....	67
5.3	Výsledek stanovení vazby [ $^3$ H]naloxonu v post-nukleárním supernatantu kontrolních a konkanavalinem A stimulovaných lymfocytech sleziny potkana .....	68
6	DISKUSE .....	70
7	ZÁVĚR .....	78
8	Seznam použité literatury.....	80

## Seznam použitých zkratek

AC	adenylyl cyklasa/y
Ac-Bis	akrylamid - bis-akrylamid
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
AMK	aminokyselina/y
AP	adaptorový protein
APS	peroxodisíran amonný
Arr	arrestin
BSA	hovězí sérový albumin
BCR	receptor/y B-lymfocytů
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervový systém
ConA	konkanavalin A
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
CTR	kontrolní vzorky
DADLE	[D-Ala <sup>2</sup> , D-Leu <sup>5</sup> ]-Enkefalin
DAMGO	[D-Ala <sup>2</sup> ,N-MePhe <sup>4</sup> ,Gly-ol]-enkefalin
DAG	1,2-diacylglycerol
DPDPE	[D-Pen(2),D-Pen(5)]-enkefalin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EL	extracelulární smyčka
ERK	extracelulárním signálem regulované kinasy

GDP	guanosindifosfát
GEF	faktor měnící GTP/GDP
GPCR	receptor/y spřažené s G-proteiny
GRK	z ang. „ <i>G-protein coupled receptor kinases</i> “
GTP	guanosintrifosfat
HEPES	2-hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonová kyselina
HPA	hipotalamo-hipofizno-adrenální osa
HRP	křenová peroxidasa
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
JNK	Jun N-terminální kinasy
KO	z ang. „ <i>knock out</i> “ - vypnutí genu
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinasy
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MORF	vzorky z morfinem ovlivněných buněk/zvířat
Mw	molekulová hmotnost
NK	buňky přirozeně schopné zabíjet
OR	opioidní receptory

PBS	fosfátový pufr s NaCl
PKA	proteinkinasy A
PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipasa C
PNS	postnukleární supernatant
RGS	regulátory signalizace G-proteinů
RT-PCR	polymerasova řetězová reakce v reálném čase
SDS	dodecylsírán sodný
TCR	receptory T-lymfocytů
TE	Tris/EDTA pufr
TEMED	tetramethylethyldiamin
TGF	transformující růstové faktory
TM(H)	transmembránová/é doména/y (helix)
TNF	tumor nekrotizující faktor/y
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl- propan-1,3-diol



## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem opioidních receptorů typu  $\mu$ ,  $\delta$ , a  $\kappa$  v lymfocytech izolovaných ze sleziny potkanů ovlivněných konkanavalinem A a opiátem morfinem po dobu 48 hodin. Expresie opioidních receptorů je v imunitních buňkách za fyziologických podmínek velice nízká. Vliv různých faktorů jako je přítomnost opioidů, mitogenů, dlouhodobého působení stresu, může vést k nárůstu množství těchto receptorů v buňkách imunitního systému. V této studii byl prokázán kvantitativní nárůst  $\mu$ -,  $\delta$ - i  $\kappa$ -opioidních receptorů v lymfocytech stimulovaných konkanavalinem A, přičemž v kontrolních lymfocytech nebyl zaznamenán žádný signifikantní signál odpovídající  $\mu$ - a  $\delta$ -receptorům. Naproti tomu,  $\kappa$ -opioidní receptory byly ve významné míře stanoveny již v kontrolních, nestimulovaných lymfocytech. Stimulace konkanavalinem A způsobila 2,4 - násobný vzestup těchto receptorů.

V lymfocytech, kterým byl podáván pouze morfin, došlo k nárůstu pouze u  $\mu$ -opioidních receptorů, přičemž v kontrolních buňkách nebyl zaznamenán žádný signál.  $\delta$ -opioidní receptory nebyly detekovány v kontrolních ani morfinem ovlivněných buňkách.  $\kappa$ -opioidní receptory byly stanoveny v kontrolních i morfinem ovlivněných lymfocytech a jejich množství se po vystavení účinku morfinu oproti kontrolám nezměnilo.

Výše uvedené výsledky detekce  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -opioidních receptorů metodou „*Western blot*“ v lymfocytech připravených ze sleziny potkanů, které byly vystavené účinku konkanavalinu A nebo morfinu jsou publikované poprvé v této diplomové práci.

Kromě opioidních receptorů byly v kontrolních a konkanavalinem A stimulovaných slezinných lymfocytech stanoveny i další proteiny, které se účastní regulace a signalizace opioidních receptorů a to aktin, kaveolin-1 a  $\beta$ -arrestin-1/2. U všech proteinů byl zaznamenán pokles monomerní formy účinkem konkanavalinu A.

Radioligandové vazebné studie opioidních receptorů neposkytly pozitivní výsledek jak v kontrolních lymfocytech, tak i v lymfocytech stimulovaných konkanavalinem A. Jejich množství je zřejmě pod detekčním limitem této metody. Jinou možností je, že nově syntetizované receptory neváží ligand s povahou agonisty a signalizace není funkčně spojená s G-proteiny.

Největší množství opioidních receptorů je v mozkové tkáni, kde zprostředkovávají účinky endogenních peptidů = opioidů (enkefaliny, endorfiny) i exogenních opioidních látek, morfinu, kodeinu a heroinu (polosyntetický derivát morfinu). S aplikací těchto látek jsou spojené analgetické a euforizující efekty, ale při jejich opakovaném podávání vzniká

tolerance a závislost na těchto drogách. Opioidní receptory ( $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -) byly stanoveny v kůře předního mozku potkanů, kterým byl podáván morfin po dobu deseti dnů metodou „*Western blot*“. Celková hladina  $\mu$ -opioidních receptorů se nezměnila. Výsledky této práce ukazují pokles některých minoritních forem  $\delta$ - a  $\kappa$ -opioidních receptorů. Změny těchto forem je možno interpretovat jako kompenzační reakce, ke kterým dochází vlivem dlouhodobého podávání morfinu.

**Klíčová slova:** opioidní receptory, vztahy SAR, morfin, lymfocyty

## **ABSTRACT**

In this Thesis, we studied properties of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors in lymphocytes isolated from rat spleen. This splenocytes were exposed to mitogen concanavalin A or opiate morphine and cultivated for 48 hours. Under physiological conditions, level of opioid receptors in immune cells is very low. Due to various factors such as presence of opioids, mitogens, long-term exposition to stress, expression of these receptors can be amplified. In this study we demonstrated, that concanavalin A causes up-regulation of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors in lymphocytes isolated from rat spleen. In control cells no significant signal of  $\mu$ - or  $\delta$ -receptors was observed. In contrast,  $\kappa$ -opioid receptors were detected already in control cells. Concanavalin A stimulation caused a 2.4 - fold increase of these receptors.

In lymphocytes treated with morphine only  $\mu$ -opioid receptors were up-regulated, whereas in control cells, there was no signal for these receptor type.  $\delta$ -opioid receptors were not detected in control or morphine treated cells.  $\kappa$ -opioid receptors were determined in control and also in morphine affected lymphocytes but the amount of these receptors wasn't changed by morphine.

Detection of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors using Western blot technique in lymphocytes isolated from rat spleen, that were exposed to concanavalin A or morphine are published for the first time in this thesis.

Besides opioid receptors, three other proteins were established in rat spleen lymphocytes, which were exposed to concanavalin A. Actin, caveolin-1 and  $\beta$ -arrestin-1/2. These proteins participate in regulation and signaling of opioid receptors. Monomeric form of all these three proteins was down-regulated by concanavalin A.

Radioligand binding studies of opioid receptors has provided a negative result in both, control cells and in cells stimulated by concanavalin A. It's possible, that amount of opioid receptors is below the detection limit of this method. Another interpretation could be that the newly synthesized receptors do not bind ligand and/or signaling pathways are not coupled to G-proteins.

Opioid receptors are mostly widespread in brain regions. Activation of opioid receptors in CNS by endogenous opioid peptides (enkephalins, endorphins) and exogenous opioids like morphine, codeine and heroin provide analgesic and euphoric effects. Repeated administration of these drugs causes negative side effects such as tolerance and dependence. Opioid receptors ( $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -) were detected by Western blotting in rat brain

cortex. Animals were exposed to morphine or saline solution in case of control rats for 10 days. Amount of  $\mu$ -opioid receptors wasn't affected by morphine exposure. Small changes in level of minor forms of  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors were examined. Changes of these forms could be result of compensatory reactions that occur due to prolonged administration of morphine.

**Key words:** opioid receptors, structure-function relationships, morphine, lymphocytes

# 1 ÚVOD

Historie užívání i zneužívání opioidních látek je velice obsáhlá. První zmínky o pěstování máku setého a izolaci opia z jeho šťávy pocházejí z třetího tisíciletí př.n.l. od Sumerů z oblasti dnešního Iráku. Z Mezopotámie se „rostlina radosti“, jak ji Sumeři nazývali, rozšířila do celého starého světa. Dodnes jsou Irán, Afghánistán, Pákistán a Irák největšími producenty opioidů na světě.

Historickým milníkem ve využívání a následně i zneužívání opioidních drog se stal konec 19. století, když Friedrich Sertürner isoloval z opia nejaktivnější složku – alkaloid morfin. V medicíně se morfin začal využívat především jako analgetikum a anestetikum, bohužel se prokázalo, že tak jako opium vyvolává závislost. Následovalo mnoho pokusů o vytvoření nenávykového opioidu, které vedly krom jiného k syntéze heroinu – diacetylmorfinu. Heroin byl ještě poměrně dlouhou dobu předepisován jako dětská medicína proti kašli, proti bolesti, ale i na léčbu závislosti na morfinu [1,2].

Ve 20. století nastal nárůst spotřeby opia a opioidů hlavně v USA během války ve Vietnamu. Dnes je všeobecně známo, že heroin je vysoce návykový a je často považován za nejtvrďší drogu, která je lidmi naší společnosti zneužívána. Snaha o vytvoření látky se stejně silnými analgetickými účinky jako má morfin, která by nevyvolávala závislost, je stále aktuální. Bylo syntetizováno mnoho opioidních látek např. fentanyl, metadon, oxomorfon, buprenorfin aj. Morfin je však stále nejsilnějším analgetikem moderní medicíny předepisovaným hlavně při silných, chronických bolestech, u terminálních stádií rakoviny či AIDS a heroin je nejvíce zneužívaný opioid, i když se také využívá v klinické praxi.

V Evropě je prevalence vysoce rizikových uživatelů opioidů 1,3 miliónu (rok 2013) z kterých 82% užívá heroin, který je zároveň nejčastější příčinou smrti spojenou s drogami. Heroin je „potentnější verzí“ morfinu, protože je víc lipofilní a tak lépe vstupuje do mozku. Jejich účinky – analgesie, euforie, sedace, deprese dechového centra, redukce střevní – jsou ale stejné, protože heroin se v těle rychle přeměňuje na 6-acetylmorfin, který vyvolává stejný účinek jako morfin. 6-acetylmorfin se dál přemění na morfin [2-6]. V sedmdesátých letech minulého století bylo objasněno, že efekt opioidních látek na centrální nervovou soustavu je zprostředkován vazbou na opioidní receptory (OR). Posléze byla exprese tří hlavních typů těchto receptorů  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -OR prokázána i v jiných tkáních než mozku, např. srdečním svalu, plicích, střevech.

Existence  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -opioidních receptorů v buňkách imunitního systému byla dlouho pouze předpokládána, i když imunomodulační účinky byly zaznamenány v klinických studiích již od 60. let 20. století. Dnes existuje vícero prací, které popisují přítomnost mRNA  $\mu$ -,  $\delta$ - i  $\kappa$ -opioidních receptorů v buňkách imunitního systému [7] [8] [9, 10] [11-13]. Za fyziologických podmínek je exprese genů pro tyto receptory jen velice malá [14]. Ovlivněním imunitních buněk pomocí cytokinů, interleukinů, proliferačních agens, ale například i stresem a morfinem může být vyvolaná zvýšená exprese opioidních receptorů [14-19].

Imunologické účinky opioidů jsou zprostředkovány centrálními a periferními mechanismy. Potenciální mechanismus, kterým centrální opioidní receptory zprostředkovávají periferní imunomodulaci, může zahrnovat osu hypothalamus-hypofýza-nadledviny a autonomní nervový systém. Periferní imunitní buňky pod vlivem cytokinů mohou uvolňovat endogenní opioidy jako je např.  $\beta$ -endorfin, které mohou ovlivnit analgesii a zánětlivé odezvy. Kromě této odezvy, můžou tyto buňky více exprimovat opioidní receptory, což vytváří obousměrný systém, v němž opioidy, buňky imunitního systému, cytokiny a centrální nervová soustava dynamicky interagují [6]. Většina výzkumů zabývajících se účinkem morfinu se soustřeďuje na  $\mu$ -opioidní receptory v mozkové tkáni. Morfin je silný agonista  $\mu$ -OR a signalizací v CNS, přes právě tento typ receptorů, vyvolává morfin své účinky.

I když došlo k pokroku v porozumění exprese genů opioidních receptorů v nervových buňkách i buňkách imunitního systému, přenos signálu do jádra a jeho vliv na expresi genu pro opioidní receptory není dobře definován. To je obzvlášť zajímavé v lymfocytech, protože je zřejmé, že aktivací opioidních receptorů dochází k modulaci řady fyziologických procesů například buněčné proliferaci, apoptosy či migraci těchto buněk. Je prokázáno, že změny v expresi genů opioidních receptorů, především  $\mu$ -OR v lymfocytech, které vyplývají ze zneužívání opioidů, jsou důležitým faktorem progresu patologických poruch imunity, jako je např. AIDS [20]. Obecně, vazba na  $\delta$ -opioidní receptory je spojována se silnější a vazba na  $\kappa$ -opioidní receptory se sníženou imunitní odpovědí. Zatímco vazba na  $\mu$ -opioidní receptory je asociována jak se silnější tak i sníženou až inhibovanou imunitní reakcí [21-24]. V důsledku vazby jednotlivých ligandů na opioidní receptory imunitních buněk mohou být spuštěné různé signální dráhy. Ligand se může vázat i na netypické místo nebo preferovat jinou signalizační dráhu než např. v mozkové tkáni [25, 26].

Molekulární mechanismus, který reguluje expresi opioidních receptorů, jejich funkce i reakce, které probíhají po jejich aktivaci v buňkách imunitního systému, však doposud nejsou objasněny.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 *Imunitní systém a složky imunitního systému*

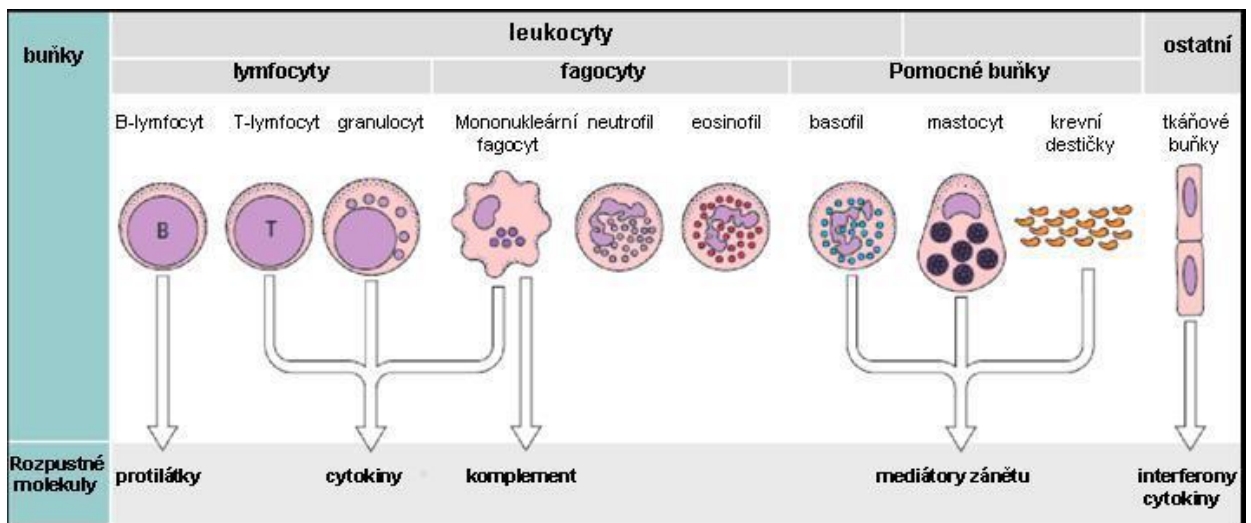
Imunitní systém patří mezi základní mechanismy nezbytné pro přežití organismů. V průběhu evoluce se imunitní systém vyvinul v silný soubor obranných mechanismů na ochranu proti potenciálním patogenům i proti poškozeným a zmutovaným buňkám vlastních tkání. Zároveň musí být tento systém tolerantní k zdravým buňkám daného organismu a také k přirozené mikroflóře v střevech, na kůži atd.

Za dobu mnoha milionů let, se vyvinuly různé typy imunitní obrany, vhodné k identifikování patogenů, v různých skupinách organismů – např. hmyz, plazi. Díky tomu se savčí imunitní systém skládá z vícevrstvé imunitní obrany: nespecifické neadaptivní obranné mechanismy lze začlenit k evolučně starším, kdežto antigenně specifické, což jsou humorální a buněčně zprostředkované mechanismy, jsou mladší.

#### 2.1.1 **Složky imunitního systému**

Imunitní odpovědi jsou zprostředkovány buňkami a rozpustnými molekulami, které tyto buňky vylučují (chemokiny, cytokiny, interleukiny...). Leukocyty jsou esenciálními buňkami v obranném systému, které se dělí na fagocyty a lymfocyty. Fagocyty jsou zásadní především v boji proti mikroorganismům, proti určitým nitrobuněčným bakteriím, virům a prvokům. Vzájemné vztahy mezi fagocyty a lymfocyty jsou nepostradatelné pro indukci imunitní odpovědi. Střet antigenu s makrofágem se zdá být důležitý, ne-li zásadní krok ve vyvolání kompletní imunitní odpovědi. Jakmile je imunitní proces vyvolán, aktivace lymfocytů závisí na fagocytech pro vytvoření silné obrany. Je zřejmé, že interakce lymfocytů a makrofágů se projevují v různých fázích vývoje imunitní reakce [27, 28]. Přehled těchto buněk podává obr. 1. na následující straně.





Obr. 1. Schĳma typų bunĳek zapojujĳcĳ se do imunitnĳ odpovĳdi organismu a rozpustnĳch molekul, kterĳe tvořĳ. (Převzato a upraveno z [27].)

Mezi fagocytárnĳ bunĳky patřĳ monocyty a neutrofily. Monocyty patřĳ pod myeloidnĳ bunĳĳnou linii a jejich funkcĳ je pohltit podezřelĳ částice a zniĳt je. Tyto imunitnĳ bunĳky migrujĳ z krve do tkĳnĳ, kde se z nich vyvinou tkĳnĳvĳ, zralĳ makrofĳgy. Neutrofily, kterĳe tvořĳ vĳtšinu krevnĳch leukocytų, se vyvinuly ze stejnĳch prekurzorų jako monocyty. Neutrofily jsou takĳ dųležitĳ pro funkci imunitnĳho systĳmu a to hlavnĳ při zĳnĳtu, kdy jsou schopnĳ migrovat z krevnĳho řĳĳištĳ do mĳsta infekce. Jelikož neutrofily jsou krĳtce ųijĳcĳ bunĳky, po fagocytose částice a jejĳm nĳslednĳm zniĳenĳ, takĳ zaniknou.

Nĳkterĳ typy bunĳek, tzv. cytotoxickĳ bunĳky, majĳ schopnost zabĳjet jinĳ bunĳky, kterĳ by se mohly stĳt infekĳnĳmi. Cytotoxickĳ bunĳky zahrnujĳ CTL (cytotoxickĳ T-lymfocyty), velkĳ granulárnĳ lymfocyty - NK bunĳky z anglickĳho "natural killer", tedy bunĳky pųirozenĳ schopnĳ zabĳjet a eozinofily. Všechny tyto typy bunĳek majĳ za ųkol poškodit cĳl uvolnĳnĳm obsahu jejich intracelulárnĳch granulĳ. Cytokiny, kterĳe jsou vyluĳovĳny cytotoxickĳmi bunĳkami, ale nejsou uskladnĳnĳ v granulĳch, takĳ pųispĳvajĳ k poškozenĳ patogennĳho objektu [27, 29].

Komplexnĳ imunitnĳ odpovĳdi se ųĳĳastnĳ i basofily a ųĳrnĳ bunĳky. Tyto bunĳky majĳ granule, kterĳe obsahujĳ celou řadu mediĳtorų schopnĳch vyvolat zĳnĳt a takĳ řĳdĳ vųvoj imunitnĳ reakce. ųĳrnĳ bunĳky leųĳ v cĳvĳch v blĳzkosti všech tkĳnĳ a nĳkterĳ z jejich

mediátorů působí i na buňky ve stěnách cév. Basofily jsou funkčně podobné žírným buňkám, ale jsou to mobilní, cirkulující buňky.

Ačkoli krevní destičky nejsou imunitní buňky, mohou být také aktivovány v průběhu imunitní odpovědi a uvolňovat mediátory zánětu [27].

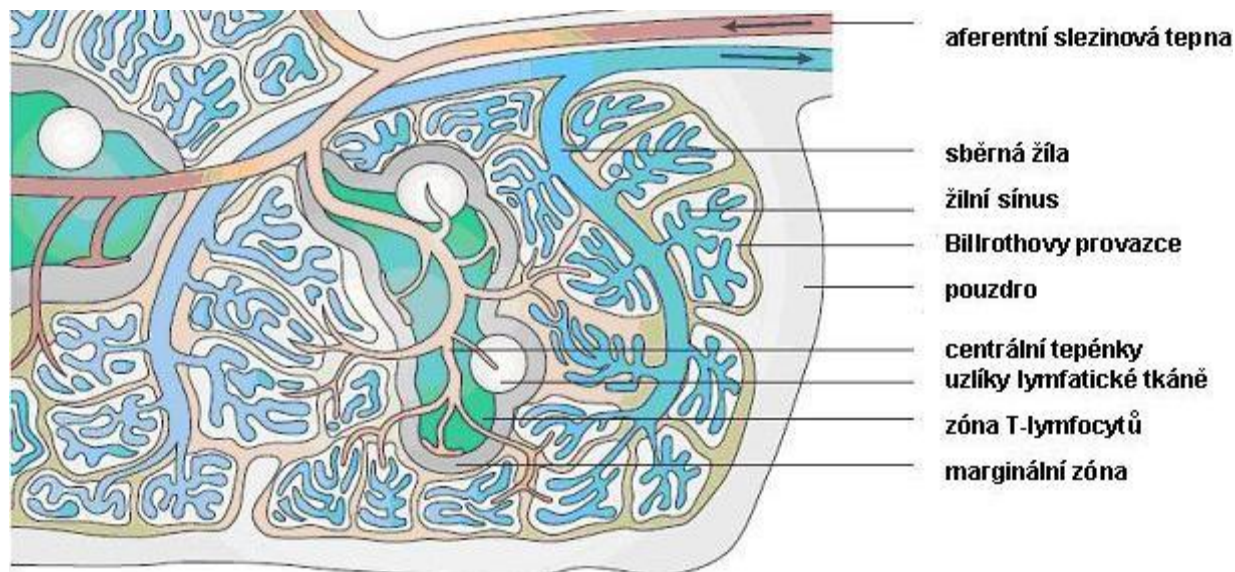
Velice významnými buňkami imunitního systému jsou lymfocyty, kterým je věnována následující kapitola.

### **2.1.1.1 Lymfocyty**

Lymfocyty jsou zcela odpovědné za specifické mechanismy rozpoznávající patogeny a zahájení adaptivní imunitní odpovědi. Všechny lymfocyty jsou odvozeny z kmenových buněk kostní dřeně, ale T-lymfocyty se pak rozvíjejí v brzlíku, zatímco B-lymfocyty se rozvíjejí v kostní dřeni (u dospělých savců) [27, 30]. B- a T-lymfocyty mají na svém povrchu antigenně specifické receptory. B-lymfocyty mají povrchové imunoglobuliny (BCR, "B-cell receptor"), T-lymfocyty mají T-receptory (TCR); u obou typů lymfocytů jsou jejich povrchové receptory funkčně spojené se signálními molekulami a transmembránovými proteiny a dalšími kostimulačními molekulami. Funkce i struktura TCR a BCR je podobná, ale receptory B-buněk rozpoznávají antigen jako takový, zatímco receptory T-buněk reagují na komplexy MHC proteinů s peptidovými částmi antigenů. (MHC proteiny: glykoproteiny téměř na všech buňkách, mají za úkol prezentovat antigenní peptidy T-lymfocytům). Prostřednictvím B-lymfocytů jsou produkovány protilátky neboli imunoglobuliny. Mají typickou stavbu, dva těžké řetězce a jeden lehký. Podle určité konstantní části těžkých řetězců lze určit izotyp imunoglobulinu - IgG, IgA, IgM, IgD a IgE [31, 32]. Místem vzniku specifické imunitní odpovědi jsou sekundární periferní lymfatické orgány jako lymfatické uzliny, mukózní lymfatická tkáň (sliznice ústní dutiny, střev, pochvy) a slezina. V těchto tkáních je vyšší pravděpodobnost výskytu patogenů, proto se tady koncentrují i lymfocyty, aby mohlo dojít k jejich aktivaci a imunitní odpovědi [30] [27].

Slezina je v těle největší orgán filtrující krev. V podstatě je slezina organizována jako systém arteriálního větvení, ve kterém menší tepénky končí v sinusech (rozšířené úseky krevního řečiště), které hustě protkávají červenou pulpu (obr. 2. str. 19). Slezina je obalena pouzdrem z pojivové tkáně, ze které vedou vazivové trámce, které podporují vaskularitu [32, 33]. Menší cévní větve jsou obklopeny lymfatickou tkání, která tvoří bílou pulpu sleziny. U hlodavců některé arteriální větve končí v okrajovém

(marginálním) sinusu (prostor mezi bílou pulpou a marginální zónou sleziny) zatímco jiné procházejí marginální zónou do žilního systému červené pulpy [33].



Obr. 2. Schéma sleziny (převzato a upraveno z [33]).

Slezinová tepna se větví do centrálních tepének, které jsou obalené bílou pulpou. Tato bílá pulpa se skládá ze zóny T-buněk a zóny B-buněk. Tepénky končí v Billrothových provazcích v červené pulpě, odkud je krev odvedena do žilního splavu, kterým se shromažďuje do odvodní slezinné žíly.

Červená pulpa sleziny má specializovanou strukturu žilního systému, který dává této oblasti jedinečnou schopnost filtrovat krev a odstraňovat tak staré erythrocyty, či patogeny. Krev z cév přichází do cévních sinusů v červené pulpě, která se skládá z fibroblastů a retikulárních vláken (Billrothovy provazce). V této oblasti se nachází množství makrofágů, a také se tu shromažďují erythrocyty a neutofily, které se nacházejí ještě v marginální zóně [33]. Bílá pulpa je tvořena uzlíky lymfatické tkáně a periarteriálními lymfatickými pochvami, které obsahují lymfocyty. Mnoho lymfocytů migruje do bílé pulpy. B- a T-lymfocyty se nejprve pohybují podél společné dráhy, pak se rozdělí do svých příslušných oblastí (B-lymfocyty - uzlíky, T-lymfocyty - periarteriální lymfatické pochvy). Migrace B a T-buněk do bílé pulpy je považována za důležité pro účinnou imunitní reakci ve slezině, protože v této oblasti dochází k antigen-specifické interakci mezi lymfocyty a pomocnými buňkami. Správná organizace a funkce bílé pulpy je řízena pomocí specifických cytokinů (kap. 2.1.2). Exprese cytokinů, které jsou zodpovědné za migraci lymfocytů, je kontrolována dalšími cytokiny, jako např. TNF (ang. „*tumor necrosis factor*“), které zároveň ovlivňují i

hladinu cytokinů/chemokinů udržujících homeostázu sleziny [33, 34]. Jedná se o aktivní vícekrokový proces, který zahrnuje i signalizaci prostřednictvím receptorů sprážených s G-proteiny (GPCR), protože receptory pro chemokiny patří do této rodiny sedmtransmembránových proteinů [34]. Přesná molekulární interakce, kterou lymfocyty vstupují do bílé pulpy, je ještě stále neznáma [33, 35]. Marginální zóna obsahuje makrofágy, dendroidické buňky i B-lymfocyty. Kontinuální migrace krevních buněk do lymfatických orgánů a zpět do krve je účinný způsob, pro hledání patogenů a antigenů. Marginální neboli okrajová zóna ve slezině je důležitým přechodovým prostorem pro buňky, které odcházejí z krevního řečiště a vstupují do bílé pulpy [33, 35].

### 2.1.1.2 Cytokiny

Termín cytokiny obecně označuje velkou skupinu molekul podílejících se na signalizaci mezi buňkami při imunitní odpovědi. Všechny cytokiny jsou proteiny nebo glykoproteiny a dělí se na několik kategorií. Mezi hlavní podskupiny cytokinů patří interferony, interleukiny, chemokiny [27]. Přehled cytokinové sítě je na obr. 3. str. 21.

Tvorba interferonů (IFN) je důležitá hlavně při virové infekci, dokážou totiž omezit jejich šíření. Interferony se dělí podle toho, zda je produkuje infikovaná buňka -  $IFN\alpha$  a  $IFN\beta$  nebo typ -  $IFN\gamma$ , který je uvolňován aktivovanými pomocnými T-buňkami. Vyrábějí se v počáteční fázi infekce a jsou důležité pro zadržení šíření viru do doby, než imunitní systém vytvoří adekvátní odpověď [27, 36].

Interleukiny (IL) mají různé funkce a produkují je hlavně T-lymfocyty, i když některé z nich jsou také produkovány mononukleárními fagocyty nebo tkáňovými buňkami. Mnoho interleukinů zasahuje do buněčné diferenciaci a dělení - např. IL-2. Rodina interleukinů je označována čísly, nejvyšší je momentálně IL-38 [27, 30, 36].

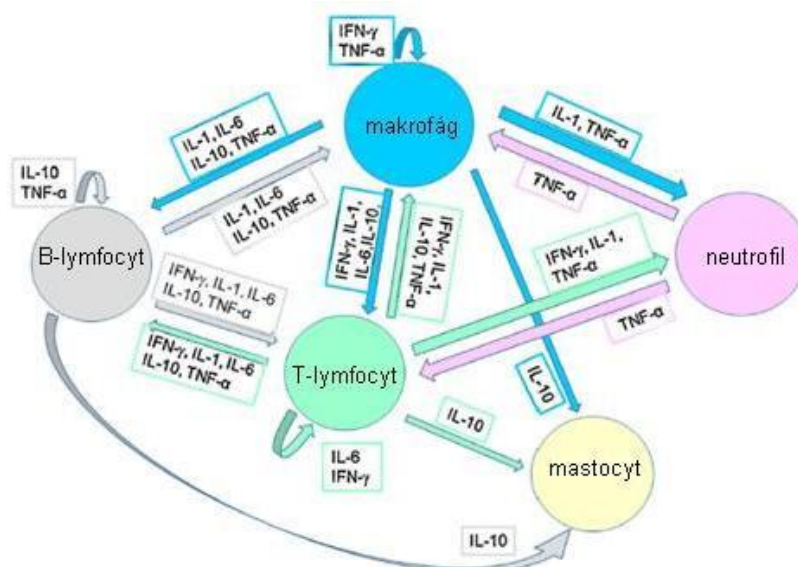
Další skupinou cytokinů jsou chemokiny - chemotaktické cytokiny. Jednou z jejich mnoha funkcí je řídit pohyb leukocytů v organismu tj. z krevního oběhu k tkáním a zpět [37].

Skupina cytokinů zahrnuje také tumor nekrotizující faktory (TNF) a to např.  $TNF-\alpha$  a  $TNF-\beta$ , a také transformující růstový faktor  $\beta$  ( $TGF-\beta$ ). Mají celou řadu funkcí, ale jsou zvláště důležité při zprostředkování vzniku zánětu a cytotoxické reakce.

Každý typ buněk uvolňuje určitou sadu cytokinů, v závislosti na typu buňky a způsobu aktivace. Neméně důležitou součástí reakce vyvolanou cytokiny je exprese

receptorů pro tyto molekuly imunitními buňkami. Jen buňka, která má odpovídající receptory, může reagovat na konkrétní cytokin. Obecně lze říci, že cytokinové receptory jsou specifické pro jejich vlastní cytokiny, ale jsou samozřejmě výjimky, kdy receptor akceptuje několik různých cytokinů [27].

Tvorba cytokinů je sledována při různých zánětových onemocněních jako AIDS, ale mají potenciál jako biomarkery i při Alzheimerové nemoci, nemocích srdce, rakoviny aj. [36].



Obr. 3. Buňky imunitního systému a cytokinová signalizace. (Převzato a upraveno z [36]). Zkrácená verze cytokinové sítě zvýrazňující komunikaci pomocí těchto molekul mezi různými typy buněk imunitního systému. IL: interleukin; IFN: interferon; TNF: tumor nekrotizující faktor.

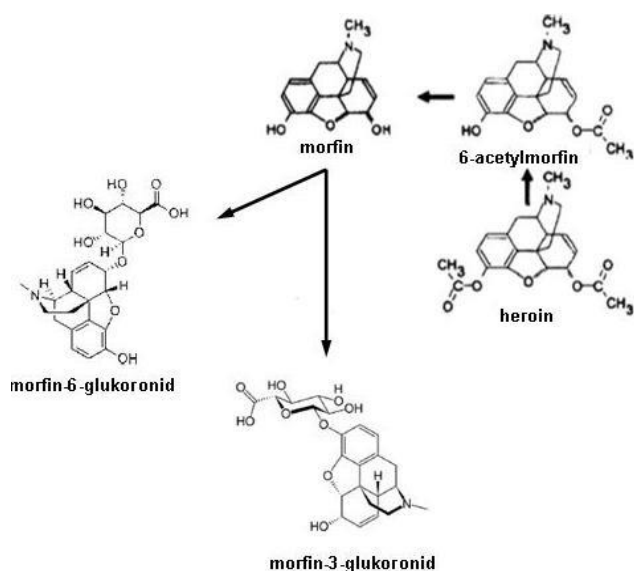
## 2.2 Morfin, heroin a imunitní systém

Morfin je alkaloid obsažený v opiu – šťávě nezralých tobolek máku setého (*Papaver somniferum*). Krom morfinu se v opiu nachází další alkaloidy kupř. kodein, papaverin, noskamin - souhrnně zvané opiáty. Termín opioidy zahrnuje přírodní i syntetické látky s účinkem na opioidní receptory, opiáty jsou látky izolované z opia. Opium bylo od nepaměti lidstvem využíváno k léčbě bolesti, v dnešní době se k těmto účelům z něho izoluje morfin, který slouží v medicíně jako nejsilnější analgetikum. Heroin, polosyntetický derivát morfinu, je nejvíce zneužívaný opioid. Má podobně silné

analgetické účinky, zato vyšší euforizující efekt, větší potenciál způsobit závislost a toleranci [38, 39].

Molekula morfinu se skládá ze tří kondenzovaných kruhů, které vytvářejí fenanthrenovou kostru. C3 a C6 hydroxylová skupina, společně s aminovou skupinou, jsou zásadní pro strukturálně rigidní molekulu a podmiňují danou chemickou aktivitu. Pro obsah hydrofilních OH-skupin je morfin špatně rozpustný v lipidech. Morfin v organismu podléhá biotransformačním reakcím. Dva kvantitativně i kvalitativně nejvíce důležité metabolity morfinu jsou morfin-3-glukuronid (produkován jako hlavní metabolit) a morfin-6-glukuronid [40].

Heroin (diacetylmorfin) je přeměňován na morfin a to deacetylací ve dvou hydrolytických krocích. Nejdříve rychlou chemickou a/nebo enzymatickou hydrolyzou na meziprodukt 6-acetylmorfin a ten je dále metabolizován na morfin účinkem esteras [41]. Schematický souhrn těchto reakcí je na následujícím obrázku.



Obr. 4. Metabolická biotransformace morfinu a heroinu (převzato a upraveno z [40] [3]).

Analgesie, nejvýznamnější pozitivní efekt, je vyvolána především reakcemi v centrální (CNS) a periferní nervové soustavě. Také nejvýznamnější negativní účinky - závislost a tolerance - vznikají působením na CNS. Morfin i heroin však významně ovlivňují i jiné orgány a systémy např. činnost srdce, plic, jater a také imunitní systém. Chroničtí uživatelé tak často trpí hypertenzí, ischemickou chorobou srdeční, diabetem mellitem 2. typu či AIDS [41, 42]. Morfin i heroin jsou molekuly, které po reakci na receptor vyvolají aktivační signální kaskádu a patří tak k tzv. plným agonistům.

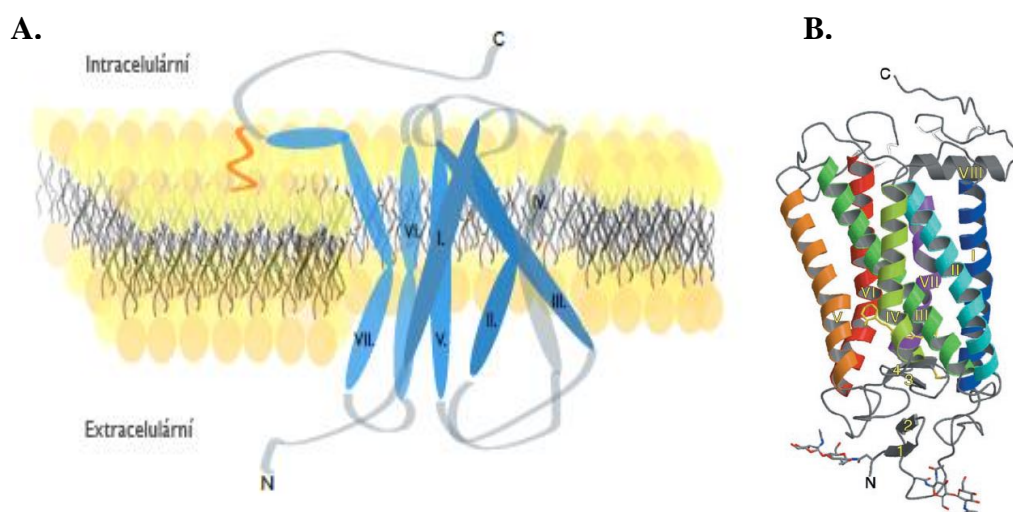
Agonisté a antagonisté vazbou na své receptory mění konformační stavy těchto receptorů a určují schopnost aktivace signálních molekul. Agonisté stabilizují aktivní konformace receptorů a schopnost vyvolat signalizaci, zatímco antagonisté stabilizují neaktivní konformační stavy a brání tak signalizaci. Agonisté jsou klasifikováni podle míry aktivace receptorů. Plný agonista způsobuje maximální aktivaci receptorů (maximální ve srovnání s nativním ligandem), zatímco částečný/parciální agonista aktivuje receptory v menším rozsahu i při nejvyšších koncentracích. Na rozdíl od agonistů inhibuje antagonist aktivaci tak, že buď zabírá vazebné místo pro přirozený ligand (orthosterická místa), nebo se váže na jiné (alosterické) místo. Tím brání, případnému agonistovi v aktivaci signalizace přes receptor. Celkově lze říci, že molekuly, které se vážou na receptor, mohou mít vliv na funkci receptoru od plné aktivace přes úplnou deaktivaci [43].

Kromě opioidních alkaloidů jako je morfin působí na imunitní systém i endogenní opioidní peptidy, včetně  $\beta$ -endorfinu a dynorfinu. Tyto peptidy modulují funkci lymfocytů i ostatních buněk zapojených do obranné imunitní reakce. Výsledky několika laboratoří ukázaly, že opioidy mohou působit jako cytokiny a že jsou také tvořeny imunitními buňkami [44]. Pokud tedy opioidy mají přímý vliv na funkce imunitních buněk, dá se předpokládat, že se jedná o reakci přes opioidní receptory exprimovanými těmito buňkami [45].

### **2.3 Receptory spřažené s G-proteiny a opioidní receptory**

Receptory pro opioidy patří do největší nadrodiny proteinů v cytoplasmatické membráně buňky, rodiny receptorů spřažených s GTP vázající proteiny (GPCR - z ang. "*GTP-binding protein coupled receptors*" nebo "*G-protein coupled receptors*") i když v posledních letech byly zaznamenány také na G-proteinu (GTP (guanin nukleotid trifosfát)-vázající protein) nezávislé signální dráhy, jako jsou například aktivace arrestinu, nebo extracelulární signál regulující kinasy - ERK1/2 (z ang. "*extracellular signal-regulated kinases*") či dalších kinas [46, 47]. GPCR jsou všudypřítomné v savčích buňkách a jsou součástí složitých mechanismů buněčné signalizace a komunikace. GPCR jsou transmembránové molekuly, mohou být aktivovány rozmanitými extracelulárními signály, jako jsou biogenní aminy, aromatické látky, lipidy, ionty, nukleotidy, peptidy a dokonce i fotony. Proto je široký rozsah

fyziologických funkcí regulován právě pomocí GPCR (neurotransmise, vizuální vnímání, vůně, chuť, růst, chod metabolismu a imunitní a zánětlivé reakce). GPCR proto představují hlavní cíle pro vývoj léčiv [46, 48]. Nadrodina GPCR se dělí na tři hlavní rodiny. GPCR v těchto rodinách mezi sebou nesdílejí významnou sekvenční podobnost, i když všechny mají sedm transmembránových domén (7TM). Rodina C jsou tzv. receptory podobné metabotropnímu glutamátovému receptoru, rodina B jsou sekretinu podobné receptory [49, 50]. Největší rodinou GPCRs je rodina proteinů podobných rhodopsinu (rodina A), kam patří i receptory pro opioidy. Receptory této rodiny se vyznačují několika vysoce konzervovanými aminokyselinami a disulfidickým můstkem, který spojuje první a druhou extracelulární smyčku. Většina z těchto receptorů je palmitoylovaná na cysteinu na karboxylovém konci (intracelulární), který slouží jako kotva v plasmatické membráně (obr. 5. A.). Určení krystalové struktury rhodopsinu ukázalo, že transmembránové domény tohoto typu receptorů jsou "nakloněné" a "zalomené", v důsledku přítomnosti aminokyselin, jako je prolin, které narušují  $\alpha$ -helikální transmembránovou doménu (obr. 5. B.) [49-51].

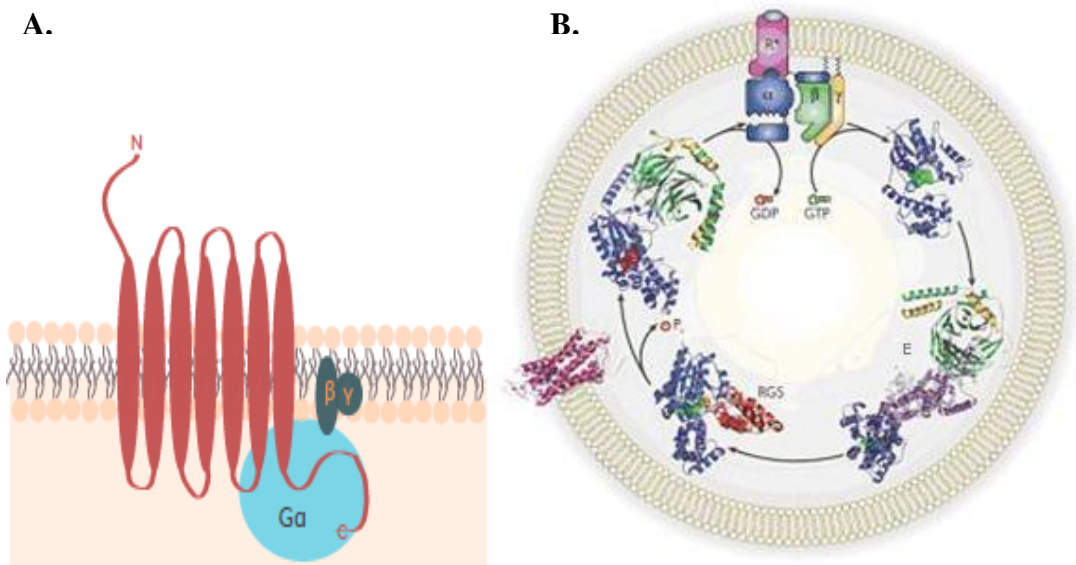


Obr. 5. A. Strukturální znázornění 7TM GPCRs rhodopsinové rodiny. B. Grafické znázornění krystalové struktury rhodopsinu. A. Schematické znázornění zalomení transmembránových domén. Jednotlivé domény jsou označeny římskými číslicemi (I.-VII.). Oranžová vlnovka na intracelulární straně membrány na C-konci reprezentuje palmitoylaci (vlastní). B. Krystalová struktura rhodopsinu. "C" (karboxylový konec se nachází v intracelulárním prostoru, "N" (aminoskupinový) konec je v prostoru extracelulárním. Jednotlivé smyčky jsou označeny žlutými římskými číslicemi (I.-VII.). Převzato z [52], upraveno.



### 2.3.1 Signalizace přes G-proteiny

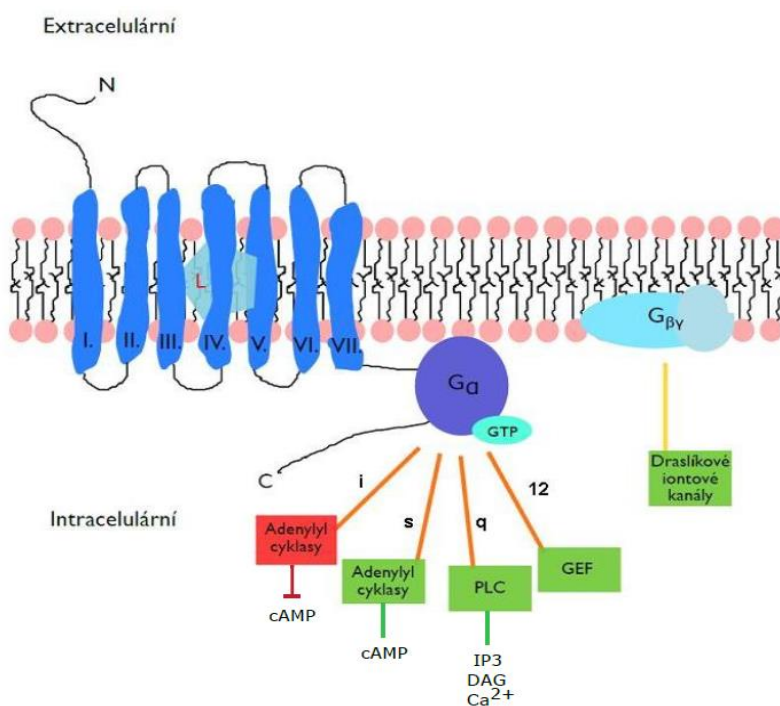
Funkční spojení s trimerními (podjednotky  $\alpha, \beta, \gamma$ ) G-proteiny může být selektivní, ale 7TM receptory jsou často "promiskuitní" v této signální dráze. Heterotrimerní G-proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin na základě homologie a funkční podobnosti jejich  $G\alpha$  podjednotky -  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{q/11}$  a  $G\alpha_{12/13}$ , která je v deaktivovaném stavu spojená s GDP a podjednotkami  $\beta$  a  $\gamma$ . Při aktivaci je GDP vyměněno za GTP a trimerní struktura podjednotek  $\alpha\beta\gamma$  se v důsledku konformačních změn na receptoru rozpadne na  $\alpha$ -GTP a  $\beta\gamma$  komplex, které dále interagují a spouští různé signální kaskády [53, 54]. Aktivaci a schematickou strukturu GPCR podává obr. 6. Je pravděpodobné, že signalizační repertoár GPCR odpovídá souborům možných konformací receptoru. Molekulární principy, podle kterých receptor převádí chemické vlastnosti ligandu do určité signalizační dráhy, jsou stále nevyřešené [55].



Obr. 6. Uspořádání GPCR a G-proteinu v membráně a jeho regulace. Převzato a upraveno z A (vlastní); B. [56]. A: spojení GPCR s trimerním G-proteinem (podjednotky  $\alpha$  a  $\beta\gamma$ ) přes C-konec na vnitřní straně buněčné membrány. N-konec se nachází na extracelulární straně. B: signalizace podjednotek  $\alpha$  a  $\beta\gamma$ . Po aktivaci receptoru ( $R^*$ ) dojde k disociaci trimerní struktury podjednotek, které se následně vážou na daný efektor (E). Pomocí proteinů regulujících signalizaci G-proteinů (RGS) dojde k opětovnému spojení podjednotek do trimerního komplexu a také s receptorem.

Aktivace G-proteinu je závislá na primární stimulaci GPCR. Pokud nedochází k vazbě GPCR s agonistou, jsou tyto membránové receptory neaktivní a G-protein má

typickou trimerní konformací. Při aktivaci GPCRs mají svou úlohu i faktory usnadňující výměnu guanosenových nukleotidů (GEF – z ang. „*guanine nucleotid exchanchge factor*“) - sprostředkují výměnu GDP za GTP na  $\alpha$ -podjednotce G-proteinu [56, 57]. Tato výměna stimuluje disociaci podjednotek z trimerní konformace na  $\alpha$ -GTP a  $\beta\gamma$ -podjednotkový komplex.  $\alpha$ -GTP dále spouští aktivaci efektorů jako adenyllyl cyklasy, fosfolipasy C, což vede k zvýšenému množství nitrobuněčných druhých posílů – cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), nebo IP<sub>3</sub> (inositol-3-fosfát), DAG (diacylglycerol). Podjednotka  $\beta\gamma$  také aktivuje několik efektorů jako draslíkové kanály, proteinkinasy jako např. GRK2 (z ang. „*G protein-coupled receptor kinase-2*“). Pro návrat do neaktivního stavu je GTP na  $\alpha$ -podjednotce hydrolyzován na GDP. Následně  $\alpha$ -GDP oddisocijuje od efektorů a znovu se spojí s  $\beta\gamma$ -podjednotkovým komplexem. Tím, že se  $\alpha$  i  $\beta\gamma$  podjednotky uvolnily z vazby na svých efektorech, je ukončená celá signalizační kaskáda [56, 58-60]. Přehled signalizačních kaskád je na obr. 7.

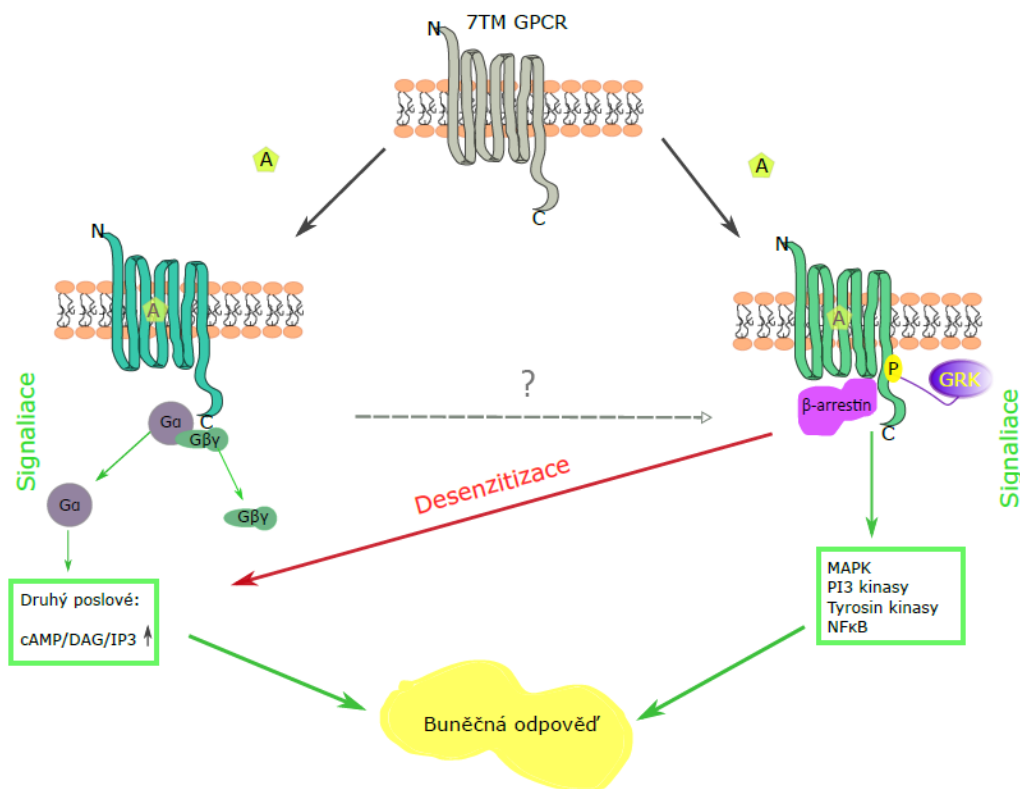


Obr. 7. Schematické znázornění 7TM GPCR v membráně a signalizační kaskády podle typu  $G\alpha$  podjednotky a  $G\beta\gamma$  (vlastní - inspirace z [43]).

Jednotlivé transmembránové domény jsou označeny řeckými číslicemi. „L“ - modrý pětiuhelník = ligand. Aktivací  $G\alpha_q$  dojde k aktivaci PLC a následně druhých posílů IP<sub>3</sub>, DAG, Ca<sup>2+</sup>. Signalizací přes  $G\alpha_i$  dochází k inhibici adenyllyl cyklasy a tím cAMP, zatímco signalizací přes  $G\alpha_s$  jsou AC stimulovány. Podjednotkový komplex  $G\beta\gamma$  ovlivňuje funkci draslíkových kanálů.

### 2.3.2 Signalizace přes $\beta$ -arrestin a GRK

Arrestiny byly původně diskutované v spojitosti s GPCR pro jejich schopnost "znecitlivět" neboli desenzitizovat signalizační dráhu GPCR a to interakcí s fosforylovanými, ligandem aktivovanými receptory spřaženými s G-proteiny. Při aktivaci agonistou GPCR aktivují G-proteiny a jsou fosforylovány účinkem kinas pro GPCR tzv. GRK (z ang. „*G protein-coupled receptor kinases*“). Studie na rhodopsinových GPCR prokázaly, že agonistou aktivované GPCR reagují s arrestinem, což vede k jejich desenzitizaci, ale jen při reakci s  $\beta$ -arrestinem dochází i k internalizaci (viz dále) [61-63]. V následujících studiích se objevilo, že  $\beta$ -arrestiny interagují nejen se samotnými GPCR a transportními molekulami, ale i mnohými signálními molekulami jako jsou MAPK (mitogenem aktivované protienové kinasy - z ang. „*mitogen activated protein kinases*“), ERK1/2 (z ang. „*Extracellular signal regulated kinase*“), JNK3 (z ang. „*c-Jun NH2-terminal kinase-3*“), ubikvitinligasy, cAMP, fosfodiesterasy, diacylglycerolkinasy, regulátory nukleárního faktoru- $\kappa$ B, komplex aktinu a dělicích filament [64]. Nedávné studie uvádějí předpoklad, že arrestiny spouští pro GPCR netradiční signální dráhy právě přes aktivaci těchto receptorů, ale také i jinými cestami (obr. 8. str. 28) [47, 65].



Obr. 8. Schéma signální dráhy 7TM GPCRů přes G-proteiny i  $\beta$ -arrestin. Po navázání agonisty „A“ dojde k aktivaci receptoru a spuštění signální dráhy přes G-proteiny nebo  $\beta$ -arrestin, které vedou k celkové buněčné odpovědi (jako exprese genů aj.). Při aktivaci  $\beta$ -arrestinové dráhy dochází k fosforylaci („P“) receptoru pomocí GRK. N-konec receptoru je v extracelulárním prostoru, C-konec se nachází uvnitř buňky.

### 2.3.3 Desenzitizace/Sekvestrace/Internalizace/ Downregulace

Množství ligandu, který stimuloval GPCR, určuje průběh signální kaskády uvnitř buňky. Čím větší množství agonisty, tím větší je odpověď. Protože stimulace GPCR je reakce, která je následně mnohonásobná, stačí malé množství ligandu vázícího se na frakci receptorů a dojde k maximální odpovědi. Každý receptorový systém však zároveň disponuje jakousi „pamětí“ předchozí aktivace, která ovlivňuje schopnost receptoru být aktivován při budoucí stimulaci. Také množství receptorů, které musí být aktivované k dosažení plné odpovědi, závisí na tom, jak moc byl systém nedávno stimulován. Buňky s receptory, které byly aktivovány v poslední době, reagují tím, že se stávají méně citlivé k další stimulaci. Tento fenomén se nazývá desenzitizace [66-68].

Schopnost měnit citlivost GPCR na určité ligandy je rozhodující pro buněčnou odpověď jako je chemotaxe, kdy buňka reaguje na gradient tvořený chemotaktickým

agonistou [69]. Imunitní buňky využívají tento mechanismus s cílem migrovat směrem k poraněným tkáním tak, že sledují gradient cytokinů (které jsou ligandy GPCR) tkáňových buněk [70].

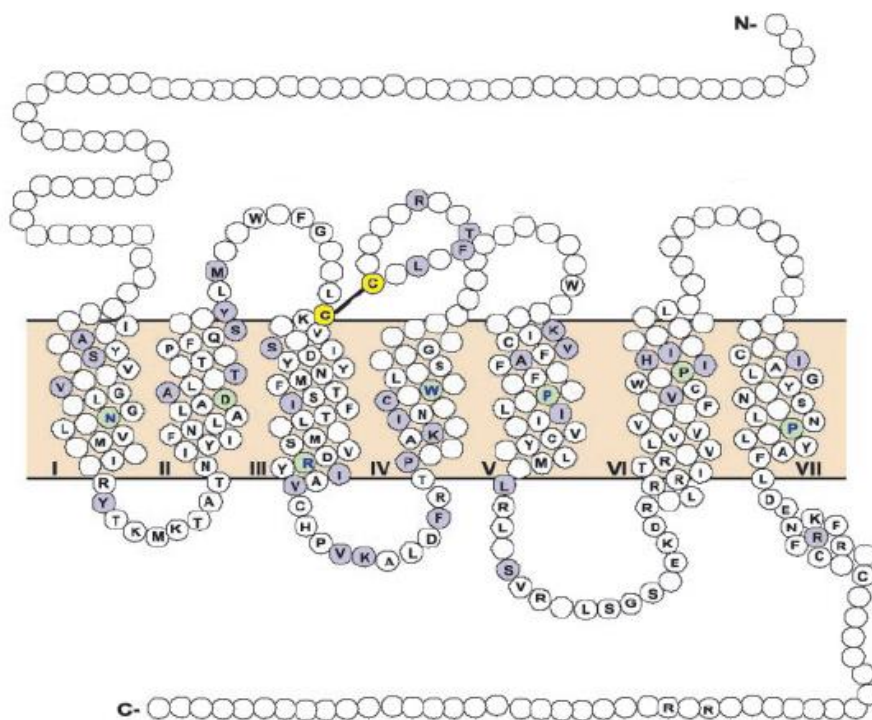
Množství receptoru v plasmatické membráně se dynamicky mění a závisí i na tom, či došlo k stimulaci receptoru. Receptory jsou po aktivaci dočasně odstraněné z membrány a k jejich návratu dochází, když se sníží koncentrace agonisty. Tento proces je nazýván sekvestrace [71]. K dalšímu procesu - internalizaci receptorů rovněž dochází po jejich aktivaci. Vynětí receptorů z membrány se ale (podle typu receptoru) účastní klatrinové váčky nebo kaveoly, které umožňují receptorovou endocytosu. Internalizované receptory putují ve váčcích řadou intracelulárních kompartmentů (endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát atd.), což nakonec vede k uvolnění receptoru zpět do membrány v aktivovatelném stavu. To, či dojde k receptorové internalizaci, závisí však i schopnosti daného ligandu vyvolat tuto akci [72-74].

Dlouhodobá nadměrná aktivace GPCR může vést k trvalému snížení počtu receptoru na povrchu buněk neboli downregulaci. Mechanismus downregulace zahrnuje odstranění receptoru z membrány a označení receptorů pro vnitřní degradaci v lysozomech. Obnovení normálního počtu receptorů na buněčném povrchu pak vyžaduje syntézu nového receptoru [47, 75].

## **2.4 Opioidní receptory**

Opioidní receptory (OR) patří právě do výše diskutované rhodopsinové rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Existují tři hlavní typy opioidních receptorů a to  $\mu$ -opioidní receptory,  $\delta$ -opioidní receptory a  $\kappa$ -opioidní receptory. Aktivace opioidních receptorů endogenními a exogenními ligandy má za následek velké množství efektů, které zahrnují analgesii, respirační depresi, euforii, příjem potravy, uvolňování hormonů, inhibice gastrointestinálního tranzitu a potlačení úzkosti. Obecně platí, že agonisté selektivní pro  $\mu$ -OR, nebo  $\delta$ -OR způsobují analgesii a euforii, zatímco  $\kappa$ -OR selektivní agonisté mají dysforický účinek. Podtypy opioidních receptorů jsou z 60% sekvenčně identické. Nejvíce homologní jsou transmembránové šroubovice (TM) a největší rozmanitost je na jejich amino-(N)-konci (extracelulární) a karboxy-(C)-konci (intracelulárním) a extracelulárních smyčkách mezi TM [74, 76, 77]. Kromě toho mají

všechny tři typy opioidních receptorů dva konzervované cysteiny mezi první a druhou extracelulární smyčkou, které tvoří typický disulfidický můstek. Všechny typy opioidních receptorů mohou být modifikovány, a to glykosylované na asparágové kyselině na různých místech jejich N-terminální domény [78]. Rozdíly v sekvenci mezi jednotlivými typy OR jsou znázorněny na obr. 9.

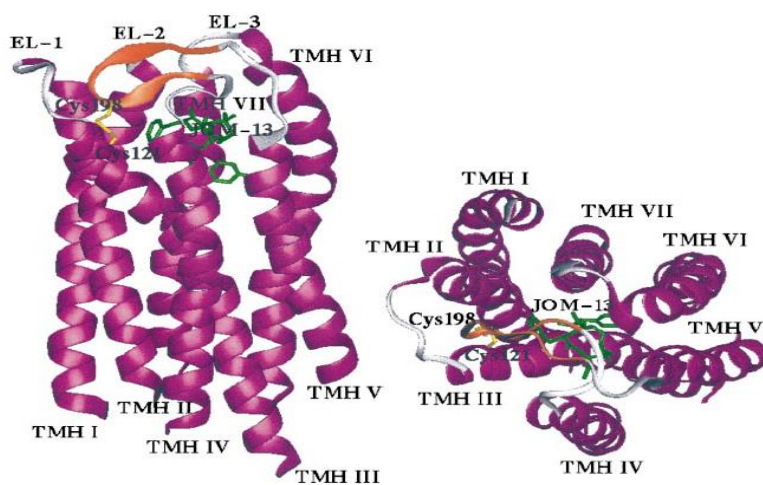


Obr. 9. Sinusoidní model opioidního receptoru. (Převzato a upraveno z [74]).

Každý transmembránový helix je označen římskou číslicí. Bílé prázdné kruhy představují nekonzervované neboli variabilní aminokyseliny mezi  $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR. Bílé a fialové kruhy s písmenem představují identické aminokyseliny mezi všemi opioidními receptory. Zelené kruhy zdůrazňují vysoce konzervované aminokyseliny v receptorové rodině (rhodopsinová rodina 7TM GPCR). Žluté kruhy znázorňují dva konzervované cysteiny v extracelulárních smyčkách I. a II., které mohou tvořit disulfidový můstek. "C" označuje karboxylový intracelulární konec, "N" aminoskupinový konec v extracelulárním prostoru.

Na základě různých studií struktury (mutační analýzy, počítačové modelování) opioidních receptorů je zřejmé, že opioidní receptory mají některé společné znaky definující vazebné místo pro opioidy, ale také vícero odlišných aspektů, které vymezují vysokou afinitu a selektivitu určitého ligandu pro daný typ opioidního receptoru [76, 79] [77, 80]. Stejná část OR je "vazebná dutina" pro ligand, která se nachází ve vnitřním konzervovaném regionu III., IV., V., VI. a VII. transmembránové šroubovice. "Vazebná dutina" je částečně zakryta částmi extracelulárních smyček -  $\beta$ -vlásky (ang.  *$\beta$ -hairpin*)

spojující TM doménu IV. a V. Extracelulární část smyček je odlišná u  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -opioidních receptorů a spolu s extracelulárními segmenty ostatních transmembránových smyček (I., II.) hraje roli v selektivitě ligandů, zejména pro peptidy (endorfiny, enkefaliny, dynorfiny...). Menší molekuly alkaloidních agonistů jako je například morfin, se vážou převážně v dolní části vazebné dutiny. Alkaloidní antagonisté (jako je naloxon) se pravděpodobně vážou ještě hlouběji než agonisté, čímž stericky brání posunu TM3 a TM7, v důsledku toho také brání aktivaci receptoru. Pro komplementaritu opioidů a jejich vazebných míst v modelech opioidních receptorů jsou důležitá dvě různá kritéria. Dobrá geometrická kompatibilita; ligandy se mohou vázat do spodní části vazebné dutiny, aniž by vznikaly významné překážky nebo mezery v oblasti kontaktu. Druhým faktorem je dobrá prostorová komplementarita skupin s podobnou polaritou, takže téměř všechny polární skupiny ligandů tvoří vodíkové vazby s odpovídajícími polárními skupinami aminokyselin postranních řetězců v rámci vazebné dutiny. Všechny nepolární skupiny ligandů jsou v kontaktu s nepolárními částmi řetězců [79]. Následující obrázek (obr. 10.) znázorňuje uspořádání transmembránových domén a extracelulárních smyček rhodopsinu v krystalové struktuře.



Obr. 10. Grafická podoba krystalové struktury  $\mu$ -opioidního receptoru s ligandem JOM-13. EL – extracelulární smyčka; TMH – transmembránový helix, převzato a upraveno z [79].

### 2.4.1 Signalizace

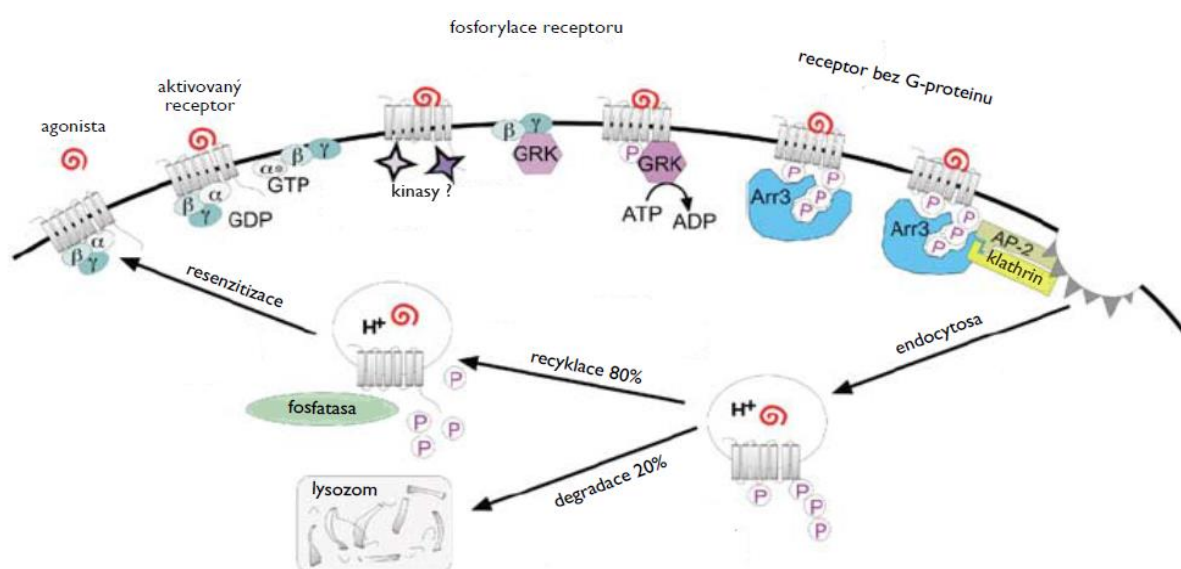
Jak již je zmíněno v kapitole zabývající se rhodopsinovými 7TM GPCR, proteiny této rodiny, do které opioidní receptory (OR) patří, spouští signalizační kaskádu přes G-protein nebo  $\beta$ -arrestin. Opioidní receptory jsou spřaženy s G-proteiny třídy  $G\alpha_{i/o}$  a  $G\alpha_z$  [81]. V přítomnosti pertusiss toxinu je signalizace přes  $G\alpha_{i/o}$  inhibována, ale  $G\alpha_z$  není PTX senzitivní. Studie na buňkách mozku a neuroblastomových buněčných liniích již v osmdesátých letech minulého století prokázaly inhibici adenyl cyclas prostřednictvím  $G\alpha_{i/o}$  spřažených s OR [82]. Inhibice adenyl cyclas (AC) má za následek pokles intracelulární koncentrace druhého posla - cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Na druhé straně,  $G\beta\gamma$  může stimulovat AC a také aktivovat několik dalších signálních molekul [83, 84]. Po dlouhodobé stimulaci receptorů však může nastat proces tzv. superaktivace AC, tedy jejich zvýšení. Studie s morfinem prokázaly, že při dlouhodobé expozici organismu vzrostou isoformy AC I. a II. a tím dochází k syntéze cAMP a zvýšení jeho koncentrace v buňce [84, 85]. Krom adenyl cyclas, navázání agonisty na OR a signalizace přes inhibiční G-proteiny ovlivňuje i  $Ca^{2+}$  kanály,  $K^+$  kanály, fosfolipasu C, proteinkinasu A,  $Na^+/K^+$  ATPasu, cAMP proteinkinasu, aj. [77, 84, 86].

Funkční aktivita opioidních receptorů je krom inhibičních G-proteinů spojena i s  $\beta$ -arrestinem.  $\beta$ -arrestin se váže na fosforylovaný OR, což vede k aktivaci mitogenem aktivovaných proteinkinas (MAPK). Takto aktivované MAPK putují z cytosolu do jádra, kde se fosforylují a aktivují transkripční faktory, které regulují proces transkripce vedoucí k proliferaci, diferenciaci a regulaci mnoha dalších buněčných procesů. MAPK však mohou fosforylovat i různé cytosolické substráty, což vede k odlišným změnám - jako změna tvaru buňky, pohyblivosti. Proces těchto změn však zatím není dobře objasněn [47, 87]. Reakce s  $\beta$ -arrestinem způsobuje také blokaci  $G_{i/o}$ -proteinové dráhy a také internalizaci a endocytosu opioidních receptorů. Míra těchto procesů závisí na jednotlivých ligandech [88, 89].



## 2.4.2 Desenzitizace, internalizace a downregulace

Procesy desenzitizace, internalizace a downregulace opioidních receptorů jsou skloňovány ve studiích zabývajících se vznikem závislosti (psychická - touha po droze, fyzická - fyziologické změny, změny na buněčné úrovni jako zvýšení hladiny cAMP) a tolerance (postupně snížená odpověď na stejnou dávku agonisty). Vyvolání těchto reakcí závisí na daném ligandu. Například agonista DAMGO vyvolává rapidní endocytosu  $\mu$ -opioidního receptoru, zatímco morfin ne. Přesný mechanismus vzniku závislosti není objasněn. Za nejvýznamnější proces se považuje internalizace receptorů - dochází k ní i za účasti arrestinů a fosforylaci receptorů [88, 90, 91]. Obecně pro procesy desenzitizace, internalizace a downregulace OR platí popis těchto procesů v kapitole o GPCR – kap. 2.3.3. Sled těchto procesů a jejich pravděpodobný průběh shrnuje obr. 11.



Obr. 11. Schéma procesů recyklace a degradace  $\mu$ -opioidního receptoru po signalizaci.

Agonista  $\mu$ -OR - opioidní peptid nebo léčivo (morfin). G-protein může být buď  $G_i$  nebo  $G_o$ , po navázání agonisty spouští efektorové dráhy ovlivňující iontové kanály, adenyllyl cyklasy atd. Proces desenzitizace zahrnuje fosforylaci a vazbu arrestinů. Kinasy, které fosforylují receptor, nejsou přesně známy, ale mohly by zahrnovat PKA, PKC, kalmodulin dependentní protein kinasy atd. Vazba arrestinů na receptor napomáhá tvorbě klathrinových, případně kaveolinových endocytických váček. Po endocytose dochází k třídění receptorů. Buď dojde k resenzitizaci, tedy recyklaci receptorů a návratu na membránu (proces internalizace) nebo downregulaci, tj. degradaci v lysozomech. AP-2 = adaptér protein 2; Arr3 = arrestin 3; GRK= G-proteinem regulované proteinkinasy; P = fosfát (převzato a upraveno z [92, 93]).

### 2.4.3 $\mu$ -OR

Klonovaný  $\mu$ -opioidní receptor má vysokou afinitu k morfinu (agonista), naloxonu (antagonista) a  $\mu$ -OR selektivnímu ligandu, agonistovi DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>,MePhe<sup>4</sup>,Gly(ol)<sup>5</sup>]enkefalin). Receptor se také vyskytuje v různých sestřihových (z ang. *splicing*) variantách a prochází také posttranslačními modifikacemi (př. glykosylace) [94-96].

### 2.4.4 $\delta$ -OR

První opioidní receptor, který byl naklonován, byl myší  $\delta$ -opioidní receptor v roce 1992 z buněčné linie se NG108-15.  $\delta$ -OR specifické ligandy jsou např. opioidní ligandy DPDPE ([D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>] enkefalin), DADLE ([D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>] enkefalin). V závislosti na farmakologických attributech  $\delta$ -OR se uvažovalo o existenci alespoň dvou podtypů  $\delta$ -OR, nově se různé farmakologické odpovědi vysvětlují různými sestřihovými varianty jako u  $\mu$ -OR [74, 76, 95, 96].

### 2.4.5 $\kappa$ -OR

Klonovaný  $\kappa$ -opioidní receptor má vysokou afinitu k endogennímu peptidu dynorfinu a také k více selektivním syntetickým agonistům (ketocyklazocin, U50,488 a U69,593), stejně jako  $\mu$ -OR a  $\delta$ -OR podléhá sestřihu a posttranslačním modifikacím.

Opioidní receptory mohou mezi sebou vytvářet také homo-/heterodimery i oligomery. Tento jev má vliv na farmakologické vlastnosti OR a také může být odrazem dlouhodobé stimulace OR opioidy [96-98].

## 2.5 Opioidní receptory v imunitním systému

Při léčbě závislosti na morfinu a heroinu byla již v 60. letech minulého století pozorována u těchto pacientů imunosuprese. Výskyt opioidních receptorů v buňkách imunitního systému tak byl předpokládán dlouhou dobu. Farmakologicky potvrdily výskyt OR vazebné studie na Mehrishiho a Millse v destičkách a lidských periferních krevních lymfocytech [99]. Zavedením metody RT-PCR (polymerasová řetězová reakce v reálném čase, z ang. *real-time polymerase chain reaction*) byla prokázána existence mRNA všech tří hlavních typů opioidních receptorů v různých lymfoidních liniích i savčích imunitních buňkách [7-13]. Množství mRNA pro opioidní receptory je v těchto buňkách však velice malé [100]. Miller a kol. detekovali v lidských periferních lymfocytech pouze mRNA pro  $\kappa$ -OR [101]. Gaveriaux a kol. zaznamenali v myších imunitních buňkách ze sleziny přítomnost transkriptů pro  $\delta$ - a  $\kappa$ -OR ne však pro  $\mu$ -OR [12]. Je tak zřejmé, že distribuce opioidních receptorů v buňkách imunitního systému se liší podle typu OR a závisí i na typu buněk.

Immunofluorescenční metody spojené s průtokovou cytometrií jsou citlivým nástrojem, přímé fluorescenční barvení pomocí konjugovaného naltrexonu však selhalo při stanovení opioidních receptorů v lymfocytech ze sleziny a brzlíku myši [102]. Stimulací lymfocytů pomocí mitogenu, dochází k amplifikaci OR. Známým mitogenem, který působí na lymfocyty, je konkanavalin A, rostlinný lektin z *Canavalia ensiformis* [103, 104]. Využitím jeho vlastností byla přítomnost opioidních receptorů prokázána i metodou „*Northern blot*“ v lidských periferních lymfocytech [10, 11]. Vazebné radioligandové studie, RT-PCR, „*Northern blotting*“ a další metody prokázaly přítomnost opioidních receptorů v různých typech lymfoidních buněčných linií, ale i v lymfocytech, monocytech/makrofázích a dendritických buňkách různých savců i jejich různých tkání a krve [105].

Funkce opioidních receptorů v imunitních buňkách je zatím z větší části neznámá, bylo však pozorováno vícero procesů, které ovlivňují expresi OR v lymfocytech i jiných buňkách imunitního systému a buněčných liniích. Vystavení organismu/buněk působení opioidů jako morfin, methadon, ale i endogenním opioidním peptidům ( $\beta$ -endorfin) reguluje expresi opioidních receptorů v imunitních buňkách. V lidských T-lymfocytech vlivem opioidů vázajících se na  $\mu$ -opioidní receptory dochází k indukci cytokinu

interleukinu-4 (IL-4) [14]. Podání morfinu (agonista hlavně  $\mu$ -OR) potkanům způsobilo snížení proliferační odpovědi krevních lymfocytů na konkanavalin A, a současně došlo k zvýšení hladiny cirkulujícího IL-6. Změněny obou parametrů byly blokovány účinkem opioidního antagonisty naltrexonu. Tyto výsledky naznačují, že také aktivace opioidních receptorů CNS se podílí na inhibici růstu lymfocytů pod vlivem morfinu, jakož i zvýšení hladin IL-6 [106].

Předpokládá se že, centrální imunomodulace spojená s aktivovanými opioidními receptory je buď vedena prostřednictvím neuroendokrinní osy [(hypothalamus-hypofýza-nadledviny (HPA)], nebo sympatickým nervovým systémem. Jeví se však, že akutní a chronické podávání morfinu mění imunitní odpověď prostřednictvím různých cest. Akutní podávání exogenních opioidů primárně reguluje imunitní funkce přes sympatický nervový systém, zatímco chronické podávání aktivuje spíše HPA osu [107]. Dalšími cytokiny, které hrají roli v regulaci exprese  $\mu$ -opioidního receptoru, jsou TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, také transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a IL-7. IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 a zejména TGF- $\beta$  vyvolávají významné zvýšení množství  $\mu$ -OR, TNF $\alpha$  a IL-7 vykazovaly mnohem slabší účinky. Tyto výsledky ukazují, že exprese  $\mu$ -opioidních receptorů v maturovujících T-lymfocytech je silně regulována těmito cytokiny, zapojenými do vývoje T-buněk v brzlíku [108].

Studie Liu a kol. prokázala na hybridních liniích lidských T- a B-lymfocytů, že zapojení fosfatidylinositol-kinasové signalizační dráhy může být zásadní v morfinem indukované genové expresi  $\mu$ -opioidních receptorů v lymfocytech [20]. Podle Suzukiho a kol. je účinkem morfinu zvýšená exprese všech tří typů opioidních receptorů v opičích krevních lymfocytech a lidských lymfoidních liniích [16, 109]. Studie na makrofágové buněčné linii P388D1 prokázaly, že vazba  $\kappa$ -selektivního opioidního agonistu U50,488 inhibuje syntézu IL-1 a TNF- $\alpha$ , ale neovlivňuje produkci IL-6 v těchto buňkách. Makrofágy (i T-lymfocyty) jsou ovlivněny i endogenním  $\kappa$ -OR agonistou dynorfinem, jehož účinkem se zvyšuje produkce IL-1 [110, 111]. T-buňky a makrofágy jsou cílem pro  $\kappa$ -opioidní agonisty, které inhibují T-buňkami zprostředkovanou produkci protilátek. Tyto studie naznačují, že  $\kappa$ -opioidní receptory na T-buňkách a makrofázích jsou zapojeny do udržování homeostasy těchto buněk. Nadměrná stimulace  $\kappa$ -opioidních receptorů v T-buňkách a makrofázích exogenními nebo endogenními

opioidy (opioidními peptidy) tak může měnit hladinu cytokinů, což se projeví potlačením tvorby protilátek [45].

Expresi  $\delta$ -opioidních receptorů v T-lymfocytech může být zvýšená v důsledku aktivace CD3 (receptor cytotoxických T-lymfocytech, podílí se na aktivaci imunitní odpovědi) [25, 112]. Agonisté  $\delta$ -opioidních receptorů mají rozmanité imunomodulační účinky na T-lymfocyty, včetně proliferace T-buněk, produkce cytokinů (IL-2), chemotaxe. Také se předpokládá, že endogenní  $\delta$ -selektivní opioidní peptidy mají vliv na vývoj zralých T-buněk v brzlíku a modulaci apoptotických signálů [113, 114].

Další proces, který souvisí s regulací tvorby opioidních receptorů v imunitních buňkách, je stres. Stres ovlivňuje náš každodenní život a je nevyhnutný pro přežití a řešení nepředvídaných situací. Nicméně, chronický stres, jako je dlouhodobý emoční stres, může snížit imunitní funkce. Yin a kol. prokázali, že chronický stres snižuje počet imunitních buněk sleziny myši, a že tento proces souvisí s endogenními opioidy a jejich vazbou na opioidní receptory [115, 116]. Ve studii na  $\mu$ -OR-KO myších (KO - z ang. "knock-out" - vypnutí genu (pro  $\mu$ -OR) a "normálních" myších pozorovali pokles množství imunitních buněk sleziny po vystavení stresu jen u kontrolních zvířat (s genem pro  $\mu$ -OR). Krom toho došlo také k inhibici produkce IL-2 a IFN- $\gamma$  lymfocyty v stresovaných "normálních" myších, zatímco u KO-myši nebyl tento účinek pozorován téměř vůbec. Oba typy zvířat vykazovaly významně vyšší koncentrace plasmatického kortikosteronu v porovnání s kontrolami, přičemž u "normálních" myších byla vyšší než v KO-myších. U KO-myši však nedošlo k imunosupresivním účinkům. Tyto údaje jasně prokázaly, že  $\mu$ -opioidní receptory jsou zapojené do stresem vyvolaných imunitních změn prostřednictvím mechanismu apoptické buněčné smrti.

Do odpovědi na stres se zapojují i  $\delta$ - a  $\kappa$ -opioidní receptory. Účinkem naloxonu (antagonista všech tří typů OR) byla HPA osa a tím koncentrace kortikosteronu v stresovaných KO-myších úplně inhibována. Mechanismy, které řídí expresi a funkci opioidních receptorů v buňkách imunitního systému, zatím nejsou dobře známy [19, 20, 117].

Opioidní receptory v lymfocytech i ostatních imunitních buňkách jsou genově shodné s opioidními receptory v mozku i jiných tkáních, mohou se ale lišit preferenční variantou sestříhu [94]. Výzkum opioidních receptorů je zaměřen na OR v mozkové

tkání, kde se OR se řadí k receptorům spřaženým s G-proteiny, které ale spouští signalizaci i přes  $\beta$ -arrestin. V nervových buňkách se tak po navázání morfinu (agonista) spustí pomocí G-proteinu signální dráha vedoucí k navození analgesie. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3, aktivace opioidních receptorů vede k regulaci několika intracelulárních efektorů, např. adenylyl cyklas (AC), kdy po dlouhodobé stimulaci OR dojde k tzv. superaktivaci AC, což vede k zvýšení intracelulární koncentrace cAMP [81, 118].

Cyklické AMP je u T-lymfocytů negativním regulátorem jejich aktivace. Zvýšená intracelulární koncentrace cAMP inhibuje i indukovanou mitogenezi různými agonisty i pomocí interleukinu-2. Chronické vystavení T-buněk morfinu způsobuje tak jako u nervových buněk zvýšení adenylyl cyklas a následné zvýšení intracelulárního cAMP. Tento děj ústí v imunosupresi a je spojený s inhibičními G-proteiny. Je možné, že kromě hladiny cAMP ovlivňuje morfin vazbou na OR (převážně  $\mu$ -OR) i aktivitu promotoru genové exprese INF- $\gamma$  jako další mechanismus imunosuprese vyvolané morfinem [119]. Naproti tomu Suzuki a kol. popisují mitogenní/antiapoptické účinky morfinu na periferní opičí a lidské lymfocyty [109]. Je také známé, že aktivací opioidních receptorů imunitních buněk dojde k aktivaci signalizačních drah MAPK i ERK (PKC, PKA) [120].

Poznání o funkci, signalizaci a expresi opioidních receptorů v buňkách imunitního systému je v současnosti zárodku, i když se jeví jako významný faktor ve funkci imunitního systému a vývoji imunitní odpovědi.

### 3 CÍL PRÁCE

- detekce opioidních receptorů metodou "*Western blot*" v primárních a mitogenem stimulovaných lymfocytech potkaní sleziny, a tím potvrzení schopnosti lymfocytů potkaní sleziny produkovat tyto receptory.
- zaznamenání případných změn v množství dalších proteinů (aktin, kaveolin-1,  $\beta$ -arrestin-1/2) po stimulaci konkanavalinem A metodou "*Western blot*".
- zaznamenání případných změn v expresi opioidních receptorů v T- a B- lymfocytech potkaní sleziny po aplikaci morfinu metodou "*Western blot*".
- měření funkční aktivity opioidních receptorů v konkanavalinem A stimulovaných potkaních lymfocytech pomocí radioligandových vazebných studií.
- srovnání tvorby opioidních receptorů v buňkách různých tkání potkana - mozku, srdci, lymfocytech ze sleziny.
- Celkovým cílem je tak přispět k objasnění funkcí opioidních receptorů v buňkách imunitního systému.

## 4 PRAKTICKÁ ČÁST

### 4.1 Materiál a metody

#### Stanovení množství proteinů metodou přenosu "*Western blot*"

##### Přístroje

- Elvehjm-Potterův pístový homogenizátor (teflon-sklo), B Braun Biotech International
- Centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen
- Spektrofotometr BioPhotometer Plus, Eppendorf
- Elektroforetická aparatura/Blotovací aparatura: Mini-PROTEAN Tetra system, BioRad
- Vyvolávací přístroj OPTIMAX X-Ray Film Processor, Optimax
- Termoblok BBD2, Grand Boekel
- Třepačka MiniMix 3D, Enduro

##### Chemikálie a roztoky

- Morfin sulfát, Tris-HCl, STEM, EDTA, PMSF, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, vínan sodno-draselný, CuSO<sub>4</sub>, glycerol, Sigma-Aldrich
- TEMED, bromfenolová modř, Serva
- Butanol, Penta
- Pufř STEM: (0,25M sacharóza, 1mM EDTA, 1M Tris-HCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, pH = 7,6)



- Gel elektroforetický dělicí 10%: (2 ks) (5 ml 1,5M Tris-HCl pH = 8,8, 6,7 ml 30% Ac-Bis, 200 µl 10% SDS, 8 µl TEMED, 90 µl 10% APS, 8 ml H<sub>2</sub>O)
- Gel elektroforetický zaostřovací: (2 ks) (2,5 ml 0,5M Tris-HCl pH = 6,8, 1,3 ml 30% Ac-Bis, 100 µl 10% SDS, 8 µl TEMED, 90 µl 10% APS, 6 ml H<sub>2</sub>O)
- COMPLETE tableta, směs inhibitorů proteas, Roche Diagnostic
- Fyziologický roztok: (0,9% NaCl v H<sub>2</sub>O)
- PBS pufr: (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O)
- Lowryho roztoky A (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1M NaOH), B (2% vlnan sodno-draselný), C (1%CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O)
- Folinovo-Ciocalteuovo fenolové reagens, Sigma
- Standard BSA, Sigma-Aldrich
- Vzorkový pufr: LDS Sample Buffer 4x koncentrovaný, Invitrogen
- Elektroforetický pufr 10x koncentrovaný: (30,3 g Tris-HCl, 141,1 g glycin, 10 g SDS, doplněno do 1000 ml H<sub>2</sub>O)
- Tris-EDTA (TE) pufr: (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA)
- Fosfátový (PBS) pufr: 1 tableta do 200 ml vody, P4417-100TAB, Sigma
- Médium-RPMI-1640, R8758, Sigma
- Sérum-FCS (foetal calf serum): 10270, Gibco
- Ficoll-Paque PLUS, 17-1440-02, GE Healthcare
- Kompletní médium RPMI-1640 pro kultivaci: (10% FCS, 10mM HEPES pH = 7,4; 5\*10<sup>-5</sup>M 2-merkapt ethanol, 100 U/ml penicilin, 100 µg/µl streptomycin)
- Konkanavalin A: C2272, Sigma
- Standard molekulových hmotností (SDS7B2), Sigma-Aldrich

- TBS pufr 10x koncentrovaný: (45 ml 4M NaCl, 12 ml 1M Tris-HCl, 63 ml H<sub>2</sub>O)
- Blotovací pufr: (15 g Tris, 72 g glycin, 1000 ml methanol, 5000 ml H<sub>2</sub>O)
- Blokovací pufr: (2,5 g sušené mléko, 50 ml TBS pufr pH = 8, 50 µl Tween 20)
- Ředící pufr: (0,5 g sušené mléko, 50 ml TBS pufr , 50 µl Tween 20)
- Promývací pufr: (200 ml TBS pufr, 600 µl Tween 20)
- Protilátka sekundární: IgG-HRP, sc-2004, goat-antirabbit, Santa Cruz Biotechnology
- Protilátka sekundární: IgG-HRP, NA931V, sheep-antimouse, GE Healthcare
- Protilátka primární: Aktin (I-19), sc-1616-R, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology
- Protilátka primární:β-arrestin-1/2 (H-290), sc-28869, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology
- Protilátka primární: δ-OR-1 (H-60), sc-9111, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology
- Protilátka primární: κ-OR-1 (H-70), sc-9112, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology
- Protilátka primární: kaveolin-1, 610060, rabbit polyclonal, Transduction Laboratories
- Protilátka primární: μ-OR-1 (H-80), sc-15310, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology
- Protilátka primární: μ-OR-1 (C-20), sc-7488, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology
- Pozitivní kontrola: k kaveolin-1, Human endothelial cell lysate, Transduction Laboratories

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

### Vzorky

- Postnukleární supernatant: lymfocyty ze sleziny (směsný vzorek, 3 potkani), frontální kortexy mozku (směsný vzorek, 15 (CTR) a 12 (MORF) potkanů), levá srdeční komora (směsný vzorek, 15 (CTR) a 12 (MORF) potkanů).

### Příslušenství

- Skla, stojánky, držáky a ostatní příslušenství k nalití elektroforetických gelů, BioRad
- Injekční stříkačky
- Ruční skleněný homogenizátor, nůžky, pinzeta, laboratorní sklo
- Autoradiografická kazeta, Hypercassette RPN 13642, 18 x 24 cm, Amersham Biosciences UK
- Film 13x18 (Medical X-Ray film blue), Agfa
- Nitrocelulózová membrána, Whatman Protran BA 83, Koneko

Příprava vzorků mozku a srdce. Potkaním samcům (Wistar) byl intramuskulárně podáván morfin jednou denně po dobu deseti dnů. Dávka byla postupně zvyšována dle rozpisu v tabulce č. 2. Kontrolním potkanům byl stejným způsobem podáván fyziologický roztok.

Tab. 1. Počet a hmotnost potkanů (CTR – kontrola, MORF – podáván morfin).

	počet	hmotnost (g)
před aplikací	15 CTR + 15 MORF	420
po aplikací	15 CTR + 12 MORF	500

Tab. 2. Rozpis dávek morfinu během deseti dnů.

Den	Morfin/fyziologický roztok (μl)	Koncentrace roztoku morfinu (mg/ml)	Dávka (mg/kg)
1	265	10	10
2	265	10	10
3	400	10	15
4	400	10	15
5	256	20	20
6	256	20	20
7	400	20	30
8	400	20	30
9	350	30	40
10	350	30	40

Potkani byli usmrceni dekapitací v etherové narkóze během 24 hodin po poslední dávce.

Usmrcení zvířat a odběr tkání (mozek-kůra, srdce) bylo vykonáno pod vedením Mgr. Dmytra Kagana, Ph.D. Množství odebrané tkáně je uvedeno v tab. 3.

Tab. 3. Vlhká hmotnost odebraných tkání od kontrolních (CTR) a morfinem ovlivněných zvířat (MORF).

	mozek-kůra	srdce
potkani CTR	~15 g	~6 g
potkani MORF	~14 g	~6,5 g

Vzorky tkání byly následně zmrazeny tekutým dusíkem a uloženy při - 80°C.

Homogenizace tkání, frakcionace buněčného homogenátu a příprava postnukleárního supernatantu mozku a srdce.

*Příprava homogenátu tkání (srdce, mozek):* vzorky tkání byly volně rozmrazeny na ledu. Tkáně byly rozstříhané na menší kousky. Ke 2 g (vlhká hmotnost) tkáně bylo

přidáno 10 ml 1mM PMSF naředěného v pufru STEM s rozpuštěnou tabletou COMPLETE (1 tableta v 50 ml STEM pufru) pro získání 20% homogenátu. Homogenizace probíhala po dobu 7 minut Elvehjm-Potterovým sklo-teflonovým pístovým homogenizátorem (1000 rpm). Veškerá práce se vzorky probíhala na ledu.

*Příprava postnukleárního supernatantu (PNS) (srdce, mozek):* rotor centrifugy byl předem vychlazen na 4°C. Objem homogenátu (cca 10 ml) byl rozdělen na 2 stejné díly a centrifugován po dobu 7 minut při 3500 rpm (Hettich Universal 320R, rotor 1619). Následně bylo odebráno cca 9 ml PNS. 5 µl PNS bylo odebráno pro stanovení bílkovin Lowryho metodou, zbytek byl zmražen tekutým dusíkem a uchováván při - 80°C.

#### Izolace sleziny

Potkani (Wistar, samec, 250-300g - 3 kusy) byli podrobena éterové narkóze a pak usmrceni dekapitací. Slezina byla vypreparována bez tuku a šlach a vložena do sterilní nádoby s RPMI-1640 médiem (+ 5% FCS).

#### Izolace lymfocytů - separace pomocí gradientové centrifugace.

Celý postup byl prováděn ve sterilním laminárním boxu za použití sterilních nástrojů.

Slezina (1 ks) byla rozstříhaná na velmi malé kousíčky (1-2 mm) v malém množství média (RPMI-1640 + 5% FCS). Následně byla tkáň homogenizována v ručním skleněném homogenizátoru v celkovém objemu média cca 7 ml. Poté byl homogenát přefiltrován přes síto vložené v nálevce do sterilních zkumavek a homogenizátor byl vypláchnutý ještě cca 3 ml média. Uzavřené zkumavky byly centrifugovány 8 min při 1020 rpm (170 x g) (Hettich Universal 320R, rotor 1619), při laboratorní teplotě. Supernatant byl oddělen. Pellet byl rozvolněn a resuspendován do 8 ml sterilního PBS. Do zkumavek na připravený a temperovaný Ficoll (3 ml, 18-20°C) bylo navrstveno 4 ml suspenze buněk v PBS. Následná centrifugace probíhala po dobu 35 min při 19°C, 2180 rpm (800 x g), bez brzdy. Po centrifugaci byla opatrně odstraněna vrchní vrstva supernatantu a následně odebrán prsteneček lymfocytů z rozhraní Ficollu. Frakce lymfocytů byly spojené a převedené do čisté zkumavky a naředěné médiem do objemu cca 8-10ml. Opět byly vzorky centrifugovány 8 min, 170 x g při laboratorní teplotě. Supernatant byl slit, pellet rozvolněn. Následně bylo přidáno 8 ml média a pellet byl resuspendován. Promytí bylo opakováno 2-3x. Nakonec

byl pellet naředěn do cca 8 ml média. Množství buněk bylo spočteno v počítací komůrce podle Bürkera.

Část lymfocytů byla dále promyta v PBS, pak resuspendována v malém množství PBS (1-2 ml) a zamrazená v  $-80^{\circ}\text{C}$  (kontrolní buňky).

Část připravených čerstvých lymfocytů ( $400 \times 10^6$  buněk) byla kultivována v kompletním médiu RPMI za přidání konkanavalinu A ( $1,5 \mu\text{g/ml}$ ) / morfinsulfátu ( $10^{-5}$  M) po dobu 48 hodin při  $37^{\circ}\text{C}$  v 5%  $\text{CO}_2$ .

#### Příprava homogenátu a postnukleárního supernatantu z lymfocytů

*Příprava homogenátu z lymfocytů:* zamražené vzorky buněk byly pozvolna rozmrazeny na ledu. Následně byly převedeny do malého množství TE pufru s inhibitory proteáz (1mM PMSF, 1x Complete). Homogenizace probíhala po dobu 7 minut Elvehjm-Potterovým pístovým homogenizátorem (1300 rpm). Získáno bylo 1,5 ml homogenátu (z kontrolních i konkavalinem A stimulovaných lymfocytů). Veškerá práce se vzorky probíhala v ledové tříšti.

*Příprava postnukleárního supernatantu (PNS) z lymfocytů:* rotor centrifugy byl předem vychlazen na  $4^{\circ}\text{C}$ . Homogenát (cca 1,5 ml) byl centrifugován po dobu 7 minut při  $1000 \times g$  (Hettich Universal 320R, rotor 1619). Následně bylo odebráno cca 1,4 ml PNS. 5  $\mu\text{l}$  PNS bylo odebráno pro stanovení bílkovin Lowryho metodou, zbytek byl zmražen tekutým dusíkem a uchováván při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Celkové množství proteinů bylo stanoveno ve všech vzorcích Lowryho metodou [121]. K vytvoření kalibrační řady při stanovení bílkovin byl použit standard BSA (1mg/ml).

*Detekce proteinů metodou „Western blot“ – elektroforetická technika v prostředí SDS s následním přenosem na nitrocelulosoivu membránu a imunodetekcí (detekce za užití protilátek)*

#### Pracovní postup metody „Western blot“

Nejdříve byly připraveny elektroforetické gely. Skla byla očištěna a umístěna do držáku a stojánku. Separační gel byl připraven smícháním všech složek, kdy na konec bylo přidáno APS. Hned následně, byl roztok gelu pomocí injekční stříkačky nalit mezi skla v stojánku a ihned převrstven 600  $\mu\text{l}$  butanolu s vodou (4:1). Gel byl ponechán v klidu asi 40

minut, do úplné polymerace. Pak byl butanol s vodou slit a byl připraven zaostřovací gel stejným způsobem jako separační, a hned byl nalit na vrstvu tuhého separačního gelu. Okamžitě po nalití byly do zaostřovacího gelu zanořeny "hřebínky" pro vytvoření jamek, kam se nanášejí vzorky. Zaostřovací gel polymeroval asi 20 min. Polymerace obou gelů proběhla při pokojové teplotě.

Vzorky byly rozmrazeny na ledu a naředěné na stejnou koncentraci bílkoviny a byl k nim přidán vzorkový pufr. Po přípravě vzorků k elektroforéze, byly vzorky zahřáté v termoboxu ( $T = 95^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 3$  min). Následně byly promíchané na vortexu a opět uloženy na led. Vzorky a standard (případně pozitivní kontrola) byly nanесeny do jamek v elektroforetickém gelu zalitým „*running*“ pufrem pro elektroforézu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V, po dobu 35-45 minut. Po ukončení elektroforézy byly proteiny pomocí metody „*Western blot*“ přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Gely byly vyjmuty ze skel a ve vaničce, pod hladinou přenosového pufru byl sestaven „sendvič“ v blotovací kazetě: porézní houbička filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Po vytěsnění vzduchu byly kazety umístěny do aparatury s přenosovým pufrem. Přenos probíhal při konstantním napětí 100 V, vždy po dobu 60 minut. Po dokončení procesu byly membrány vyjmuté ze „sendviče“ s gelem, třikrát propláchnuté destilovanou vodou a pak vloženy do blokovacího pufru na 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po blokaci byly membrány opět propláchnuté 3x destilovanou vodou. Pak následovala inkubace s primární protilátkou (naředěnou dle návodu výrobce) v prostředí ředícího pufru. Membrány se inkubovaly přes noc v chladové místnosti ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Druhý den byl ředící pufr s primární protilátkou odstraněn, a membrány byly opět 3x promyty destilovanou vodou. Následně byly membrány promývány ještě třikrát v promývacím pufrem, vždy po dobu 10 minut. Pak byly umístěny do ředícího pufru, který obsahoval naředěnou sekundární protilátku. Inkubace trvala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly membrány znova promyty 3x destilovanou vodou a pak třikrát promývacím pufrem vždy 10 minut. Následně se membrány jemně osušily filtračním papírem a byl nanесen chemiluminiscenční substrát, připravený podle návodu výrobce, který se nechal působit 1 minutu. Poté byl odsát filtračním papírem a membrány byly zabaleny do fólie a umístěny do vyvolávací kazety. Chemiluminiscenční reakcí byly experimentální výsledky z membrány zachyceny na světlocitlivý film, který byl vyvolán za

použití přístroje OPTIMAX. Doba inkubace filmu s membránami se lišila podle detekovaných proteinů a protilátek pro dosažení zřetelných dat.

Do jedné jamky na gelu při elektroforéze bylo nanášeno 20 µg bílkoviny v případě vzorků kontrolních a konknavalinem A ovlivněných (stimulovaných) lymfocytů a vzorků mozku a srdce (kontrolní, ovlivněné morfinem). 35 µg bílkoviny na jamku bylo nanášeno u pokusů se vzorky lymfocytů ovlivněných morfinem a jejich kontrol.

*Ředění jednotlivých protilátek:* protilátky primární: Aktin sc-1616-R: 5000x; β-arrestin-1/2 sc-28869: 1000x; δ-OR-1 sc-9111: 1000x; κ-OR-1 sc-9112: 1000x; kaveolin-1 610060: 5000x; μ-OR-1 sc-15310: 1000x; μ-OR-1 sc-7488 1000x.

Protilátky sekundární: sc-2004: 10 000x; NA931V: 10 000x

### **1.1 Stanovení agonistou stimulované vazby [<sup>35</sup>S]GTPγS a vazby radioligandu [<sup>3</sup>H]naloxonu na opioidní receptory v kontrolních a konkanavalinom A stimulovaných lymfocytech**

Izolace, kultivace a příprava PNS z lymfocytů je popsána výše u metody "Western blot", tímto způsobem byly připraveny i vzorky lymfocytů pro stanovení vazby [<sup>35</sup>S]GTPγS a [<sup>3</sup>H]naloxonu.

#### Přístroje

- Filtrovací přístroj: Cell Harvester, Brandel
- Třepací vodní lázeň, ČSAV

#### Chemikálie

- Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, Carl Roth
- DAMGO: Sigma-Aldrich
- DADLE: Sigma-Aldrich
- U-69593: Sigma-Aldrich
- [<sup>3</sup>H]naloxon, specifická radioaktivita 51,1 Ci/mmol, ARC Radiochemicals



- [<sup>35</sup>S]GTPγS (*Stock solution*), Perkin-Elmer, specifická radioaktivita 1250 Ci/mmol
- Promývací pufr: (50mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7,4)
- MIX pufr: 10x koncentrovaný (200mM HEPES, 30mM MgCl<sub>2</sub>, 1M NaCl, 2mM kyselina askorbová, 20μM GDP)
- Pufr TE: (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH = 7,4)
- NaCl, MgCl<sub>2</sub>, kyselina askorbová: BDH
- GDP, HEPES: Sigma-Aldrich

### Vzorky

- postnukleární supernatant z lymfocytů potkaní sleziny stimulovaných konkanavalinem A a kontrolních lymfocytů.

### Příslušenství

- Skleněné mikrovláknové filtry: (GF/C; GF/B), Whatman®

### Pracovní postup stanovení agonistou stimulované vazby [<sup>35</sup>S]GTPγS

Vzorky PNS z kontrolních a stimulovaných lymfocytů byly rozmrazeny na ledu a byly naředěny na stejnou koncentraci bílkoviny (5 mg/ml) pufrém TE. 10x koncentrovaný roztok MIX byl smíchán s vodou v poměru 1:4, zároveň byl přidán radioligand [<sup>35</sup>S]GTPγS (výsledná koncentrace radioligandu byla 1,5 nM). Následně byly vzorky smíchané s připraveným pufrém 2x MIX s radioligandem, s (vodou) naředěným agonistou (výsledná koncentrace 10<sup>-4</sup>M) pro stanovení stimulované vazby (stimul) a do celkového objemu 100 μl v každé zkumavce byl doplněn pufr TE. Podobně byly připraveny také vzorky bez agonisty - pro stanovení bazální vazby (basal) – pipetovací schéma viz tab. 4. na následující straně Výslední koncentrace bílkoviny ve všech vzorcích byla 100 μg/μl. Nespecifická vazba (nsp) byla stanovena v přítomnosti 10<sup>-4</sup>M neradioaktivního GTPγS. Veškerá práce přípravy vzorků probíhala v ledové tříšti.

Filtrační přístroj Cell Harvester byl předem promytý vychlazeným promývacím pufrům. Po 30 minutové inkubaci (v třepací lázni) vzorků při 30°C byl odstraněn nenavázaný radioligand [<sup>35</sup>S]GTPγS filtrací na přístroji Cell Harvester přes skleněné filtry GF/C. Kroužky filtru (filtrační zóny) se vzorkem byly přeneseny do označených scintilačních lahvíček. K filtrům bylo přidáno 5 ml scintilačního roztoku Rotiszint Eco plus. Takto upravené vzorky byly odeslány na odd. radiometrie FGÚ AV ČR pro stanovení radioaktivity metodou kapalinové scintigrafie.

Agonisté a jejich specifita: DAMGO - μ-opioidní receptory; DADLE - δ-opioidní receptory, U69593-κ-opioidní receptory.

Tab. 4. Pipetovací schéma pro stanovení agonistou stimulované vazby [<sup>35</sup>S]GTPγS.

	č.	vzorek	GTPγS	agonista	pufr TE	2xMIX/[ <sup>35</sup> S]GTPγS	
<b>CTR</b>	1	basal	20 μl	-	-	30 μl	50 μl
	2	basal	20 μl	-	-	30 μl	50 μl
	3	basal	20 μl	-	-	30 μl	50 μl
	4	stimul	20 μl	-	10 μl	20 μl	50 μl
	5	stimul	20 μl	-	10 μl	20 μl	50 μl
	6	stimul	20 μl	-	10 μl	20 μl	50 μl
	7	nsp	20 μl	10 μl	-	20 μl	50 μl
	8	nsp	20 μl	10 μl	-	20 μl	50 μl
	9	nsp	20 μl	10 μl	10 μl	10 μl	50 μl
	10	nsp	20 μl	10 μl	10 μl	10 μl	50 μl
<b>ConA</b>	11	basal	20 μl	-	-	30 μl	50 μl
	12	basal	20 μl	-	-	30 μl	50 μl
	13	basal	20 μl	-	-	30 μl	50 μl
	14	stimul	20 μl	-	10 μl	20 μl	50 μl
	15	stimul	20 μl	-	10 μl	20 μl	50 μl
	16	stimul	20 μl	-	10 μl	20 μl	50 μl
	17	nsp	20 μl	10 μl	-	20 μl	50 μl
	18	nsp	20 μl	10 μl	-	20 μl	50 μl

	19	nsp	20 µl	10 µl	10 µl		10 µl	50 µl
	20	nsp	20 µl	10 µl	10 µl		10 µl	50 µl

CTR-vzorky kontrolních lymfocytů, ConA-vzorky konkanavalinem A ovlivněných lymfocytů.

#### Pracovní postup stanovení vazby [<sup>3</sup>H]naloxonu v PNS lymfocytů

Vzorky byly rozmrazeny na ledu a naředěny na stejnou koncentraci bílkoviny roztokem TE, z nichž následně byly připraveny vzorky s radioligandem pro stanovení vazby podle tabulky č. 5. Výsledná koncentrace bílkoviny ve všech vzorcích byla 60 µg/µl. Nespecifická vazba byla stanovena v přítomnosti 10<sup>-4</sup>M neradioaktivního naloxonu. Veškerá práce přípravy vzorků probíhala v ledové tříšti.

Filtrační přístroj Cell Harvester byl předem promytý vychlazeným promývacím pufrem. Po 60 minutové inkubaci vzorků při 30°C byl odstraněn nenavázaný radioligand filtrací na přístroji Cell Harvester. Filtry se vzorkem byly rozděleny do označených scintilačních lahvíček. K filtrům bylo přidáno 5 ml scintilačního roztoku. Ve vzorcích byla změřena radioaktivita.

Tab. 5. Pipetovací schéma pro stanovení [<sup>3</sup>H]naloxonu.

	č.		vzorek	naloxon		pufř TE	[ <sup>3</sup> H]naloxon
<b>CTR</b>	1	total	20 µl	-		40 µl	50 µl
	2	total	20 µl	-		40 µl	50 µl
	3	total	20 µl	-		40 µl	50 µl
	4	total	20 µl	-		40 µl	50 µl
	5	nsp	20 µl	10 µl		30 µl	50 µl
	6	nsp	20 µl	10 µl		30 µl	50 µl
<b>ConA</b>	7	total	20 µl	-		40 µl	50 µl
	8	total	20 µl	-		40 µl	50 µl
	9	total	20 µl	-		40 µl	50 µl
	10	total	20 µl	-		40 µl	50 µl
	11	nsp	20 µl	10 µl		30 µl	50 µl
	12	nsp	20 µl	10 µl		30 µl	50 µl

CTR-vzorky kontrolních lymfocytů, ConA-vzorky konkanavalinem A ovlivněných lymfocytů.

## **4.2 Statistické vyhodnocení a grafické zpracování**

Hodnocení relativních signálních intenzit definovaných proužků u všech výše zmíněných pokusů provedených metodou „*Western blot*“ bylo provedeno v programu *AidaImageAnalyzer3*. Grafy reprezentují míru relativních signálních intenzit proužků v daném experimentu pro zkoumaný typ vzorku (CTR, ConA nebo MORF) a byly vytvořeny v programu *GraphPad Prism 4*. Statistická významnost změn intenzity signálů definovaných proužků byla ověřena Studentovým T-testem s 95% intervalem spolehlivosti, rovněž v programu *GraphPad Prism 4*.

## **4.3 Stanovení bílkoviny metodou podle Lowryho**

Množství proteinů ve vzorcích bylo stanoveno vždy ve třech paralelních ředěních a vícekrát ověřeny. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí výpočetního programu *GraphPad Prism4*. Průběh kalibrační křivky byl určen nelineární regresí s polynomem druhého stupně, s odpovídající rovnicí  $y = ax^2 + bx + c$ . Z tří hodnot pro dané ředění byl udělán průměr. Podrobný popis metody v [122].

## 5 VÝSLEDKY

Množství bílkoviny bylo stanoveno Lowryho metodou. Veškeré vzorky nanášené na elektroforetický gel pro separaci v prostředí SDS i pro radioligandové studie byly naředěny tak, aby koncentrace celkové bílkoviny v obou typech vzorků užívaných v pokusu byla stejná.

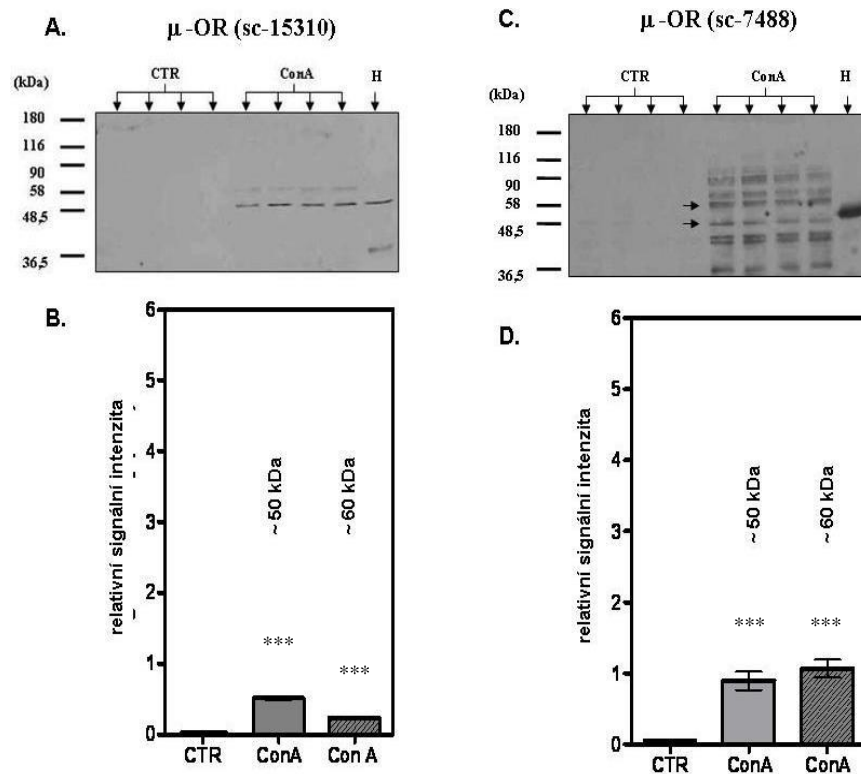
### 5.1 Výsledky stanovení množství proteinů metodou "Western blot"

Výsledkem stanovení množství proteinů metodou "Western blot" je membrána ve které je daný protein nejprve zachycený a následně rozpoznán (identifikován) s pomocí specifické vazby příslušné primární protilátky. Místo vazby primární protilátky (tedy místo vazby daného proteinu v membráně) je v následujícím kroku „označeno“ tak, že se na primární protilátku váže konjugát sekundární protilátky s peroxidasou. Vlastní detekce signálu proteinu probíhá při „vyvolání“, kdy po přidání chemiluminiscenčního substrátu získáme signál dané bílkoviny na světlocitlivém filmu. Velikost signálu je úměrná množství zkoumané bílkoviny v daném vzorku. Vyvolaný film je obrazem imunoblotu. Následující Obr. 12. – 21. (22) jsou sestaveny tak, že k danému imunoblotu (horní část) je přiřazen graf (dolní část), který vyjadřuje kvantitativní míru intenzity definovaných signálů – proužků, které odpovídají danému proteinu.

### **5.1.1 Stanovení $\mu$ -, $\delta$ - a $\kappa$ -opioidních receptorů ve vzorcích PNS připravených z kontrolních (CTR) a konkanavalinem A (ConA) -stimulovaných lymfocytů sleziny potkanů.**

#### **Stanovení $\mu$ -opioidního receptoru v lymfocytech**

Na obrázku 12. sekce (A.) byly detekovány proužky molekulové váhy ~50 kDa a ~60 kDa, které odpovídají možným formám  $\mu$ -OR i pozitivní kontrole (vzorek srdce) [123, 94]. U kontrol (CTR) nebyl rozpoznán žádný signifikantní signál, ale u konkanavalinem A ovlivněných vzorcích jsou vidět dva řádky zřetelných proužků odpovídající receptorům. Použita byla protilátka sc-15310 proti N-konci  $\mu$ -OR-1. V oddílu (C.) v CTR opět nebyl detekován žádný signifikantní signál odpovídající  $\mu$ -OR, po konkanavalinu A bylo ale zaznamenáno mnoho (pravděpodobně nespecifických) proužků různé molekulové váhy. Použita byla protilátka sc-7488 proti C-konci  $\mu$ -OR-1. Po srovnání výsledků s protilátkou sc-15310 a pozitivní kontrolou, byly jako  $\mu$ -OR vyhodnoceny proužky s molekulovou hmotností ~50 kDa a ~60 kDa. Oddíl (A.) i (C.) jsou reprezentativní obrázky (výřez z filmů po imunodetekci). Každý pokus byl proveden třikrát. Sekce (B.) je grafickým vyhodnocením tří pokusů s protilátkou sc-15310, které vyjadřuje míru signálních intenzit proužků v kontrolních a konkanavalin A stimulovaných vzorcích lymfocytů. Výsledek detekce  $\mu$ -OR protilátkou sc-7488 [obr. 12. (C.)], odpovídá graf (D.).

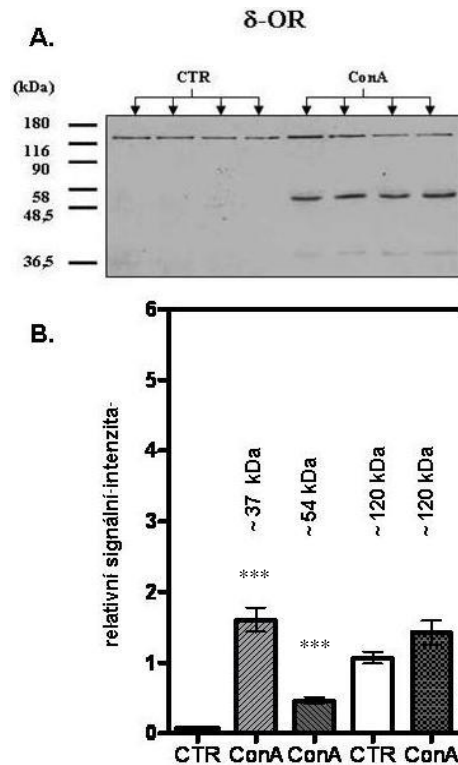


Obr. 12. Výsledky imunodetekce  $\mu$ -opioidního receptoru v lymfocytech a grafické vyhodnocení imunoblotů. CTR - kontrolní vzorky; ConA - konkanavalinom A ovlivněné vzorky. H-vzorek srdce (kontrolní potkani). (A.) Pro imunodetekci byla použita primární protilátka proti  $\mu$ -OR-1 sc-15310. (B.) Grafické, kvantitativní zpracování experimentálních výsledků reprezentovaných sekci (A.). (C.) Pro imunodetekci byla použita primární protilátka sc-7488 proti  $\mu$ -OR-1. (D.) Grafické zpracování výsledků pokusů s protilátkou sc-7488.

### Stanovení $\delta$ -opioidního receptoru v lymfocytech

Obrázek 13. sekce (A.) odpovídá výřezu z filmu, na kterém byly zobrazeny výsledky imunodetekce  $\delta$ -OR. Byly detekovány proužky molekulové váhy (Mw)  $\sim 37$  kDa,  $\sim 54$  kDa a  $\sim 120$  kDa, což odpovídá možným formám  $\delta$ -OR [124]. U kontrol (CTR) i ConA stimulovaných vzorků lymfocytů jsou viditelné proužky s vysokou molekulovou hmotností (120 kDa), které by mohly být trimerem  $\delta$ -OR, ale lze také uvažovat o nescifickém proteinu. Žádný signifikantní signál nebyl zaznamenán v kontrolních vzorcích při Mw  $\sim 37$  kDa a  $\sim 54$  kDa odpovídajících monomerním formám  $\delta$ -opioidních receptorů. Použita byla protilátka sc-9111 proti N-konci  $\delta$ -ORs-1. Oddíl (A.) obr. 13 je reprezentativním imunoblotem ze série tří pokusů detekce  $\delta$ -opioidních receptorů. Sekce (B.) obr. 13 je grafickým vyhodnocením míry signálních intenzit proužků z tří imunoblotů, pro kontrolní

a konkanavalinem A stimulované lymfocyty. Nárůst množství  $\delta$ -OR s molekulovou váhou  $\sim 37$  kDa a  $\sim 54$  kDa u vzorků ovlivněných konkanavalinom A je signifikantní.

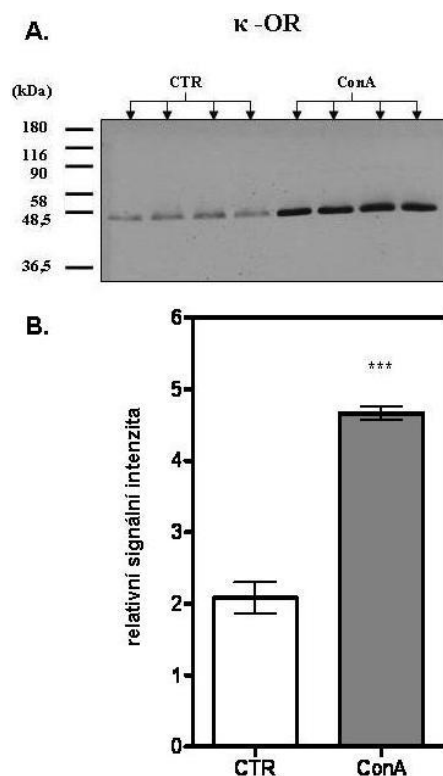


Obr. 13. Imunodetekce  $\delta$ -opioidních receptorů v lymfocytech a grafické zpracování získaných výsledků. CTR - kontrolní vzorky; ConA - konkanavalinom A ovlivněné vzorky lymfocytů. (B.) Grafické zpracování experimentálních výsledků ze tří stanovení  $\delta$ -OR.

### Stanovení $\kappa$ -opioidního receptoru v lymfocytech

Obrázek 14. sekce (A.) je imonoblot, na kterém jsou detekované  $\kappa$ -OR. Byly detekovány proužky molekulové váhy  $\sim 48$  kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti těchto receptorů i výsledkům [125]. Přítomnost  $\kappa$ -OR je evidována jak u kontrolních, tak i u konkanavalinem ovlivněných vzorcích. Použitá byla protilátka sc-9112 proti N-konci  $\kappa$ -ORs-1. Oddíl (A.) obr. 12 je typický výsledek detekce  $\kappa$ -ORs, která byla provedena v triplikátu. Sekce (B.) je grafickým vyhodnocením průměrné hodnoty intenzity signálu z tří imunoblotů. Množství  $\kappa$ -OR v CTR i ConA vzorcích ovlivněných bylo vyhodnoceno jako relativní intenzita signálů proužků. Nárůst intenzity a tedy množství  $\kappa$ -ORs v ConA vzorcích oproti kontrolním je statisticky vysoce signifikantní.



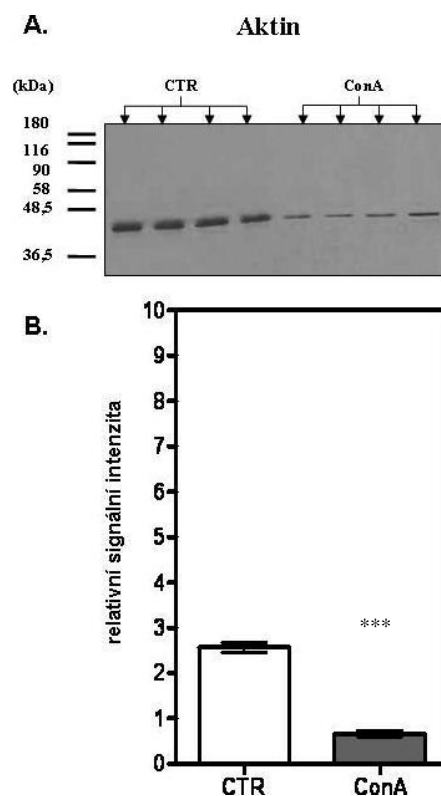


Obr. 14. (A.) Imunoblot  $\kappa$ -opioidních receptorů na lymfocytech a (B.) grafické vyhodnocení výsledků experimentů. CTR - kontrolní vzorky; ConA - konkanavalinom A ovlivněné vzorky lymfocytů.

### 5.1.2 Stanovení aktinu, $\beta$ -arrestinu-1/2 a kaveolinu-1 v kontrolních (CTR) a konkanavalinem A (ConA) ovlivněných vzorcích PNS z lymfocytů potkaní sleziny

#### Stanovení množství aktinu

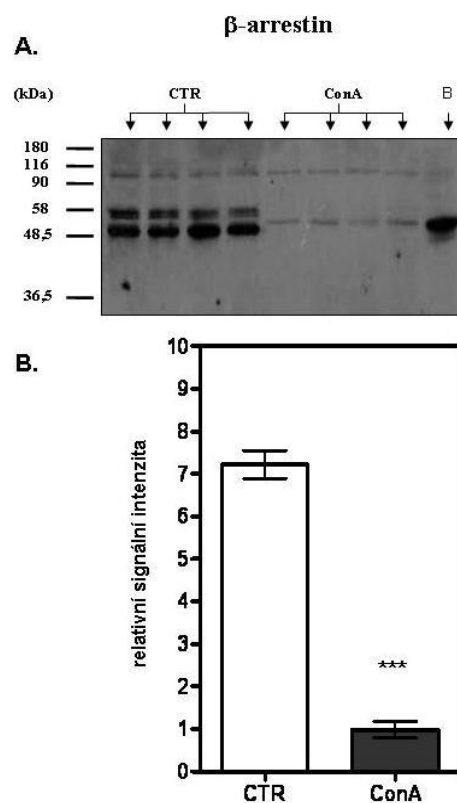
Na obrázku 15. v sekci (A.) je vybráný výsledek „Western blot“ stanovení aktinu v kontrolních a konkanavalinem A ovlivněných potkaních lymfocytech. Proužky reprezentující aktin se nachází při  $\sim 43$  kDa, což odpovídá Mw stanovovaného proteinu. Část (B.) je grafickým vyhodnocením velikosti relativní intenzity signálů proužků aktinu ze série tří pokusů. Kvantitativní změny v expresi aktinu v ConA vzorcích, oproti kontrolním jsou vysoce signifikantní.



Obr. 15. (A.) Výsledek stanovení aktinu metodou „*Western blot*“. (B.) Kvantitativní vyhodnocení stanovení aktinu. Kontrolní vzorky – CTR, konkanavalinem A stimulované vzorky – ConA.

### Stanovení množství $\beta$ -arrestinu-1/2

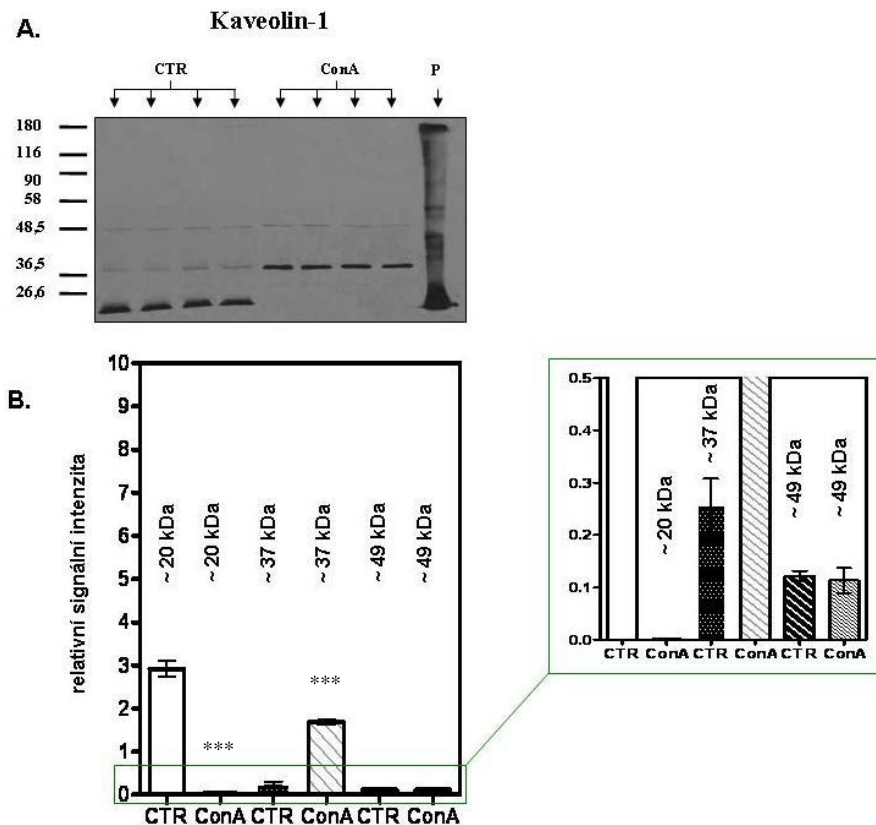
Obrázek 16. sekce (A.) reprezentuje stanovení množství proteinu  $\beta$ -arrestinu-1/2. Rozdíly intenzit proužků na filmu odpovídají rozdílům v množství tohoto proteinu v CTR a ConA vzorcích. Pokles  $\beta$ -arrestinu-1/2 v konkanavalinem A ovlivněných vzorcích lymfocytů oproti kontrolním byl vysoce signifikantní. Vyhodnocena byla oblast ~ 49 kDa až ~58 kDa, která zahrnuje oblast Mw arrestinu-1/2 (~55 kDa) a odpovídá pozitivní kontrole. Graf (B.) je kvantitativním vyhodnocením velikosti signálních intenzit proužků odpovídajících kontrolám (CTR, bílý sloupec) a konkanavalinem A ovlivněným vzorkům (ConA, šedý sloupec).



Obr. 16. Detekce  $\beta$ -arrestinu-1/2. (A.) Výřez z filmu, který je výsledkem imunodetekce  $\beta$ -arrestinu-1/2. Pozitivní kontrolou (označení písmenem B v obrázku v sekci (A.)) byl vzorek kortexu potkaního mozku. (B.) Grafické zpracování výsledků zaznamenaných na imunoblotu (sekce (A.)). CTR - vzorky kontrolních lymfocytů, ConA - vzorky konkanavalinem A ovlivněných buněk.

### Stanovení množství kaveolinu-1

Stanovení množství kaveolinu-1 vyjadřuje obr. 17. sekce (A.) - monomer tohoto proteinu má cca 20 kDa a pomocí pozitivní kontroly a standardu molekulových hmotností byl identifikován pouze v kontrolních vzorcích. Proužky při vyšších molekulových vahách (~37 kDa a ~49 kDa) mohou být také formou kaveolinu-1 (agregáty mezi monomery, s jinými proteiny) a byly proto také vyhodnoceny. V zeleném čtverci je přiblížení části grafu (B.) na formy s menší intenzitou signálu. Míra relativní intenzity jednotlivých proužků je graficky vyjádřena v sekci (B.) obr. 17. V případě proužků s  $M_w$  ~37 kDa a ~20 kDa jsou změny v síle intenzity těchto proužků a tedy v množství bílkoviny v ConA vzorcích oproti CTR vysoce signifikantní. Množství formy s hmotností ~49 kDa nebylo účinkem konkanavalinu A změněno.

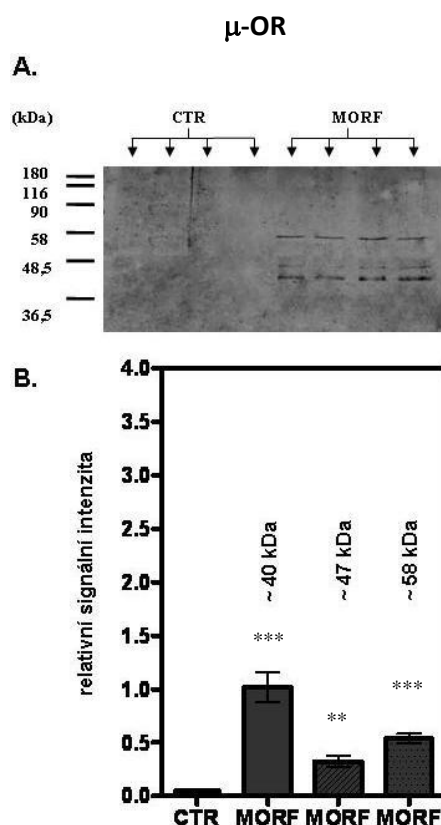


Obr. 17. (A.) Imunoblot získaný detekcí kaveolinu-1 v lymfocytech metodou "Western blot". Písmeno „P“ označuje pozitivní kontrolu ke kaveolinu-1 (caveolin-1 positive control: Human endothelial cell lysate; Transduction Laboratories). (B.) Grafické vyjádření změn množství kaveolinu-1 z imunoblotu z části (A.). (A. B.) Zkratkou CTR jsou označeny kontrolní vzorky, ConA označuje vzorky ovlivněné konkanavalinem A.

### 5.1.3 Stanovení $\mu$ -, $\delta$ - a $\kappa$ -opioidních receptorů v kontrolních (CTR) a morfinem (MORF) ovlivněných vzorcích lymfocytů ze sleziny potkanů

#### Detekce $\mu$ -opioidního receptoru

Pomocí metody "Western blot" byla stanovena exprese  $\mu$ -opioidních receptorů v lymfocytech z potkaní sleziny. (A.) Ve vzorcích z buněk vystavených morfinu byla pozorována přítomnost těchto receptorů, na rozdíl od kontrolních vzorků, kde nebyl zaznamenán žádný signál odpovídající  $\mu$ -OR. Vyhodnoceny byly proužky s molekulovou hmotností přibližně 40 kDa, 47 kDa a 58 kDa, které odpovídají možným formám  $\mu$ -OR [123]. Sekce (B.) obr 18. je grafickým vyhodnocením signálních intenzit proužků zaznamenaných na imunoblotu v sekci (A.).



Obr. 18. Detekce množství  $\mu$ -opioidních receptorů v PNS z lymfocytů kontrolních a ovlivněných morfinem. (A.) Výsledek stanovení  $\mu$ -OR metodou "Western blot". (A. B.) CTR - kontrolní vzorky, MORF - morfinem ovlivněné vzorky. Sekce B. je grafickým vyhodnocením výsledků v části A.

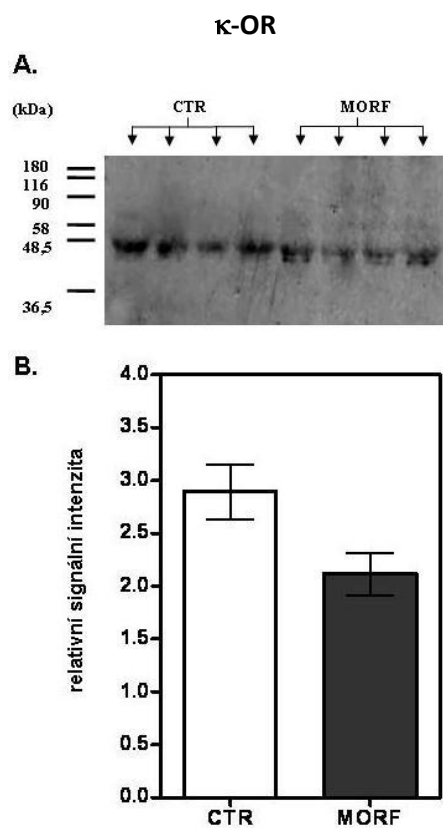
### Stanovení $\delta$ -opioidního receptoru

Stanovení  $\delta$ -opioidních receptorů v lymfocytech kontrolních a ovlivněných morfinem proběhlo stejným způsobem jako  $\mu$ -OR i  $\kappa$ -OR. V primárních (kontrolních) i morfinu vystavěných buňkách nebyl zaznamenán žádný signál odpovídající  $\delta$ -opioidním receptorům, jak v CTR, tak v MORF vzorcích. Použitá byla protilátka sc-9111 proti N-konci  $\delta$ -OR-1.

### Stanovení $\kappa$ -opioidního receptoru

Metodou "Western blot" byla stanovena i exprese  $\kappa$ -opioidních receptorů v lymfocytech z potkaní sleziny. ((A.) obr. 12) Ve vzorcích z buněk vystavěných morfinu i v kontrolních vzorcích byl pozorován signál odpovídající  $\kappa$ -opioidním receptorům (~48 kDa) [125]. Sekce (B.) obr 19. je grafickým vyhodnocením míry signálních intenzit proužků

zaznamenaných na imunoblotu v sekci (A.), které odpovídají množství exprimovaných  $\kappa$ -OR. Mírný pokles množství  $\kappa$ -OR v morfinem ovlivněných lymfocytech, který je vidět v grafu byl vyhodnocen jako statisticky nesignifikantní.

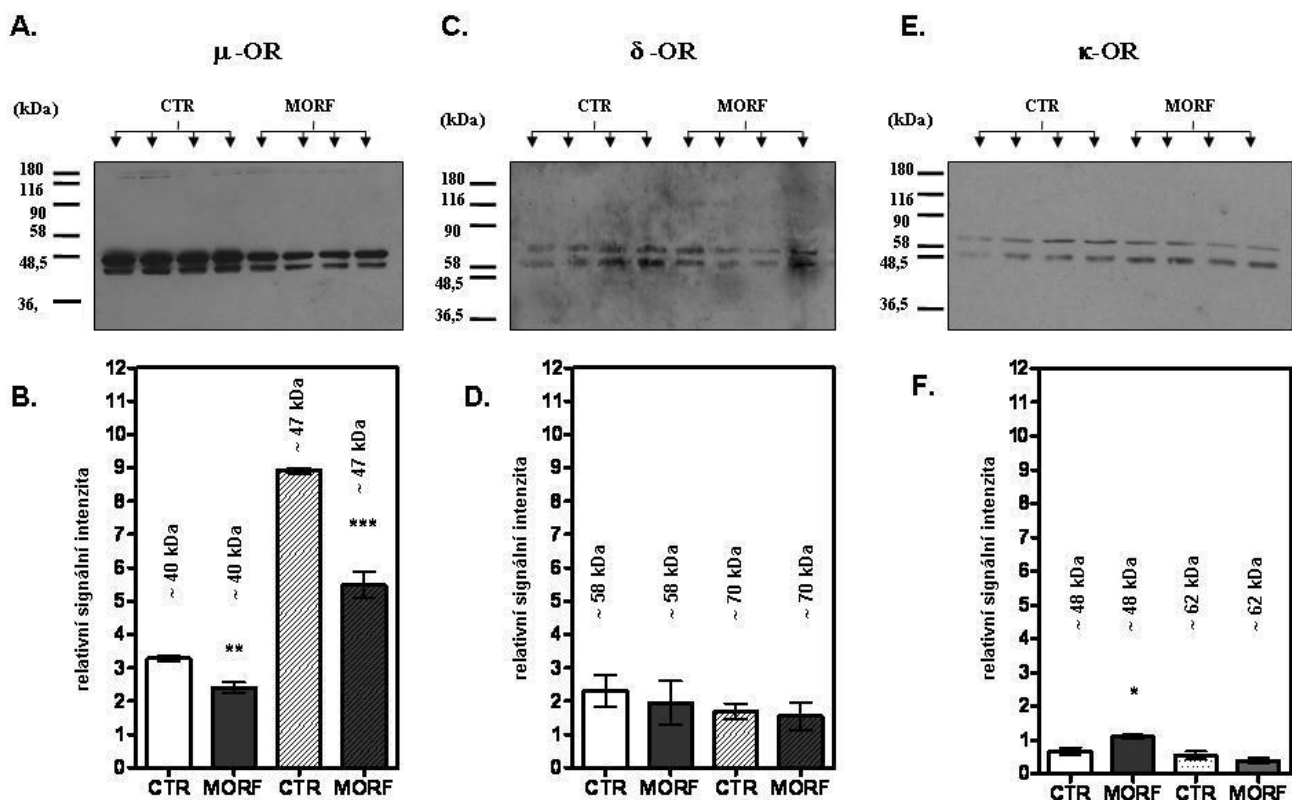


Obr. 19. Stanovení množství exprimovaných  $\kappa$ -opioidních receptorů v kontrolních a morfinem ovlivněných lymfocytech. (A.) Výřez filmu s detekovanými  $\kappa$ -OR. (A. B.) CTR - kontrolní vzorky, MORF - morfinem ovlivněné vzorky. (B.) Grafické vyhodnocení kvantitativních změn v signální intenzitě proužku ze sekce (A.).

#### 5.1.4 Stanovení opioidních receptorů typu $\mu$ , $\delta$ a $\kappa$ v srdci kontrolních potkanů a zvířatech ovlivněných morfinem

Na obrázku 20. se nachází výsledek imunodetekce všech tří hlavních typů opioidních receptorů v postnukleárním supernatantu z potkaních srdcí. Vzorky pochází buď z kontrolních zvířat, nebo z potkanů, kterým byl podáván roztok morfinu (rozpis tab. 2.). První část obrázku - sekce (A.) je výsledný imunoblot a (B.) je grafickým zpracováním detekce  $\mu$ -opioidních receptorů. Proužky v oblasti  $\sim 40$  kDa a  $\sim 47$  kDa odpovídají formám

$\mu$ -OR. Pro detekci  $\mu$ -OR byla použita protilátka sc-7488. Graf (B.) je kvantitativní vyhodnocení intenzity signálů/proužků detekovaných na imunoblotu (A.). Tyto změny intenzit signálu představují změny v počtu  $\mu$ -opioidních receptorů po podání morfinu. Pokles byl jak u formy  $\sim 40$  kDa, tak i u  $\sim 47$  kDa vyhodnocen jako statisticky velmi signifikantní. Sekce (C.) a (D.) obrázku 20. odpovídají stanovení  $\delta$ -opioidních receptorů. ((C.) obr. 20.) Výsledek imunodetekce  $\delta$ -OR. Signálem  $\delta$ -OR jsou definované proužky s Mw cca 58 kDa a cca 70 kDa, což odpovídá možným formám  $\delta$ -opioidních receptorů. Sekce (D.) je grafické zpracování imunodetekce  $\delta$ -OR, kde je kvantitativně vyjádřená míra intenzity proužků  $\delta$ -OR. Při detekci  $\kappa$ -opioidních receptorů ((E.) obr. 20.) byly opět zaznamenány dvě formy - proužky s Mw kolem 48 kDa a 62 kDa. Grafickým zpracováním části imunoblotů  $\kappa$ -OR (E.) je graf označený (F.). Graf vyjadřuje, jak intenzivní jsou signály  $\kappa$ -OR v kontrolních a morfinem ovlivněných vzorcích. Statistické hodnocení signálů ukázalo na malý, lež signifikantní vzestup minoritní 48kDa formy  $\kappa$ -opioidních receptorů účinkem morfinu.



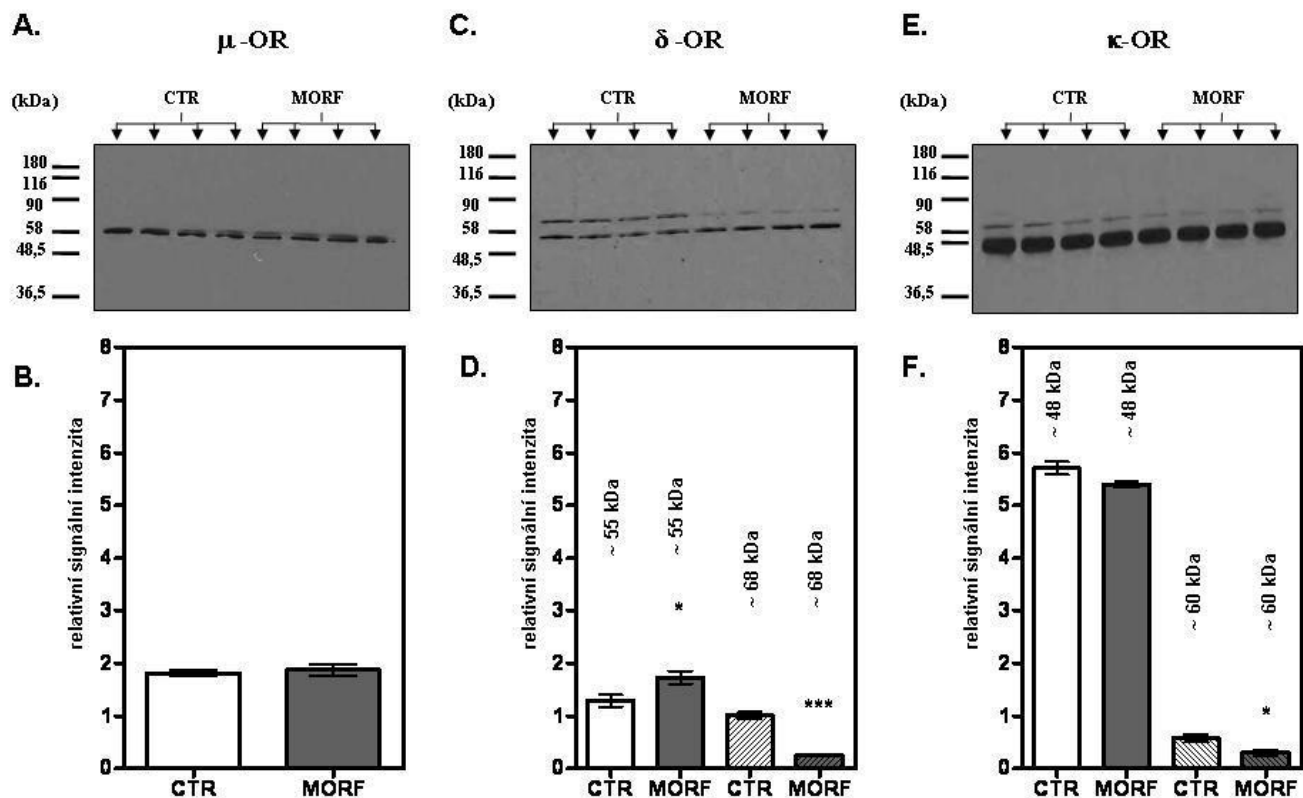
Obr. 20. Detekce množství opioidních receptorů v srdcích potkanů, kterým byl podáván morfin a kontrolních potkanů. Výsledky imunodetekce (A.)  $\mu$ -opioidních receptorů, (C.)  $\delta$ -opioidních receptorů, (E.)  $\kappa$ -opioidních receptorů. Výsledky v částech (A.); (C.) a (E.) byly zpracovány do grafů. Části (A.) odpovídá graf (B.). Části (C.) odpovídá graf (D.) K (E.) patří graf (F.). Pro všechny sekce platí, že "CTR" jsou označeny kontrolní vzorky a "MORF" vzorky ze srdcí potkanů, kterým byl podáván morfin.

### 5.1.5 Stanovení opioidních receptorů v kůře předního mozku potkanů ovlivněných morfinem a kontrolních zvířat

Obrázek číslo 21. reprezentuje výsledek detekce tří hlavních typů opioidních receptorů v kortexu potkanů, kterým byl podáván morfin a v kortexu mozku kontrolních zvířat. Sekce (A.) a (B.) obr. 21. jsou výsledkem a grafickým zpracováním detekce  $\mu$ -opioidních receptorů. (A.) Proužky s molekulovou váhou cca 58 kDa odpovídají  $\mu$ -OR stanovených imunotekcí [123]. Pro detekci  $\mu$ -OR byla použita protilátka sc-7488. Sekce (B.) je grafickým vyhodnocením relativních intenzit proužků odpovídajících  $\mu$ -OR a tím relativnímu množství  $\mu$ -OR ve vzorcích kontrol i morfinem ovlivněných zvířatech. Statistické vyhodnocení neukázalo žádné změny v množství exprimovaných  $\mu$ -OR v CTR



a MORF vzorcích. Sekce (C.) a (D.) obr. 21. odpovídají stanovení  $\delta$ -opioidních receptorů. (C.) - imunodetekce, (D.) je grafické zpracování imunodetekce  $\delta$ -OR, kde byly vyhodnoceny relativní intenzity proužků odpovídajících  $\delta$ -OR a tím množství  $\delta$ -OR ve vzorcích kontrol a ve vzorcích s morfinem. Signálem  $\delta$ -OR jsou definované proužky s Mw  $\sim 55$  kDa a  $\sim 68$  kDa, což odpovídá reálným možným formám  $\delta$ -opioidních receptorů [124]. Při statistickém vyhodnocení se změny v expresi  $\delta$ -OR při  $\sim 55$  kDa neprokázaly. U formy s  $\sim 68$  kDa byl pokles vyhodnocen jako vysoce signifikantní. Při detekci  $\kappa$ -opioidních receptorů (E.) byly opět zaznamenány dvě formy - proužky s Mw kolem 48 kDa a 60 kDa. Grafické zpracování relativních intenzit proužků (pro CTR i MORF vzorky) odpovídajících  $\kappa$ -OR z části (E.) je graf v sekci obr. 21. označen jako (F.). Statistické hodnocení signálů ukázalo na malý pokles formy  $\kappa$ -opioidních receptorů s Mw cca 60 kDa. Množství majoritní formy s  $\sim 48$  kDa se nezměnilo.



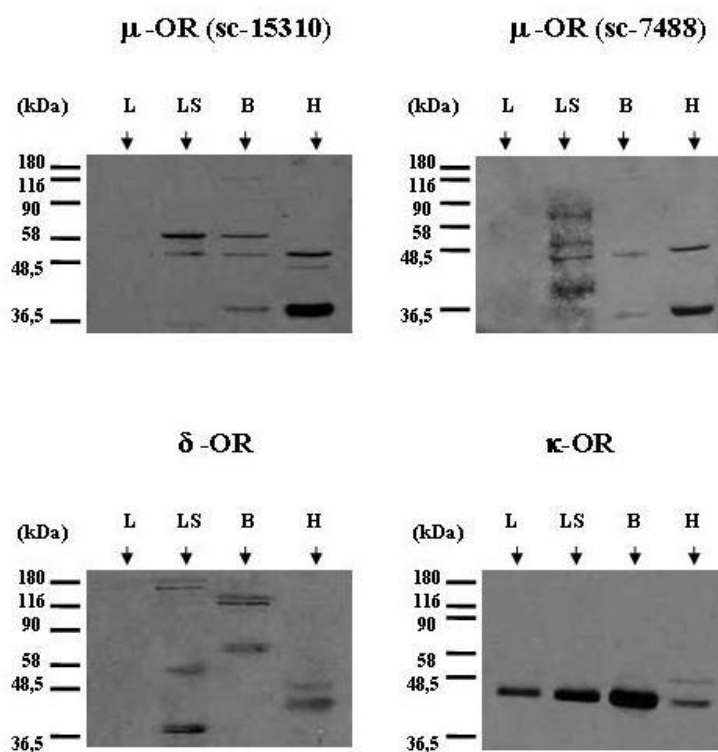
Obr. 21. Detekce  $\mu$ -,  $\delta$ -, a  $\kappa$ -opioidních receptorů v kůře předního mozku potkanů. CTR - kontrolní vzorky, MORF - vzorky z potkanů ovlivněných morfinem. Výsledky imunodetekce (A.)  $\mu$ -opioidních receptorů, (C.)  $\delta$ -opioidních receptorů, (E.)  $\kappa$ -opioidních receptorů. Výsledky v částích (A.); (C.) a (E.) byly kvantitativně zpracovány do grafů. Části (A.) odpovídá graf (B.). Části (C.) odpovídá graf (D.) K sekci (E.) patří graf (F.).

### 5.1.6 Imunodetekce $\mu$ -, $\delta$ - a $\kappa$ -opioidních receptorů ve vzorcích kontrolních a stimulovaných lymfocytech potkaní sleziny, vzorcích kůře předního mozku a srdce (levá komora) na jedné nitrocelulosové membráně

Test citlivosti protilátek orientovaných proti  $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR v různých tkáních potkana (primární a stimulované lymfocyty ze sleziny, kůra předního mozku a levá komora srdečního svalu).

**Stanovení  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -opioidních receptorů ve vzorcích kontrolních (primárních) a konkanavalinem A (Con A) -stimulovaných lymfocytů sleziny, srdce a kůry předního mozku potkana**

Obrázek 22. přibližuje mírné rozdíly v množství exprimovaných opioidních receptorů a jejich forem mezi jednotlivými tkáněmi a také funkčnost použitých protilátek. Rozdíly v expresi OR jsou mezi různými tkáněmi známé [94]. Definované proužky na jednotlivých výřezech filmů odpovídají možným formám daného typu receptoru.

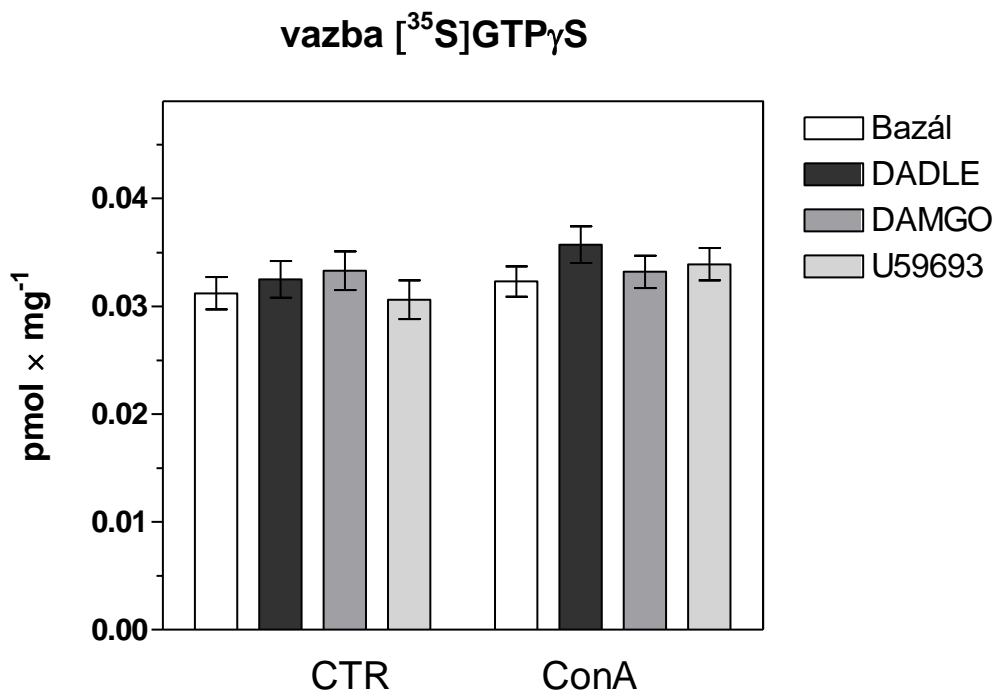


Obr. 22. Detekce opioidních receptorů metodou "Western blot" v kontrolních lymfocytech (L), stimulovaných lymfocytech (LS), mozku (B) a srdce (H) potkana.  $\mu$ -opioidní receptor byl stanoven pomocí protilátky sc-15310 zaměřené na N-konec  $\mu$ -OR-1 a pomocí protilátky sc-7488 zaměřené na C-konec  $\mu$ -OR-1 (horní část obrázku). V spodní části obrázku je stanovení  $\delta$ -opioidních receptorů (protilátky sc-9111) a  $\kappa$ -opioidních receptorů (sc-9112).

## 5.2 Výsledky stanovení agonistou stimulované vazby [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S na $\mu$ -OR, $\delta$ -OR a $\kappa$ -OR v PNS kontrolních a konkanavalinem A stimulovaných lymfocytech ze sleziny potkana

Z grafu na obr. 23 je zjevné, že vazba [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S oproti bazální (bez ligandů) je velice malá u všech použitých ligandů, jak u kontrolních tak i u konkanavalinem A stimulovaných lymfocytů. Změna stimulované vazby oproti bazální hodnotě je minimální a nejsou signifikantní. Možným vysvětlením negativních výsledků je, že buď se daný ligand na receptor neváže (DADLE -  $\delta$ -OR, DAMGO  $\mu$ -OR, U59693 -  $\kappa$ -OR), nebo množství receptorů je pod detekčním limitem metody, anebo nedochází k výraznější stimulaci G-proteinu vlivem vazby agonisty a tím významné výměně GDP za radioaktivní [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S, a tudíž výraznějšímu zvýšení stimulované vazby. Naměřené hodnoty v dpm ("*desintegrations per minute*") byly přepočteny na pmol podle hodnot specifické

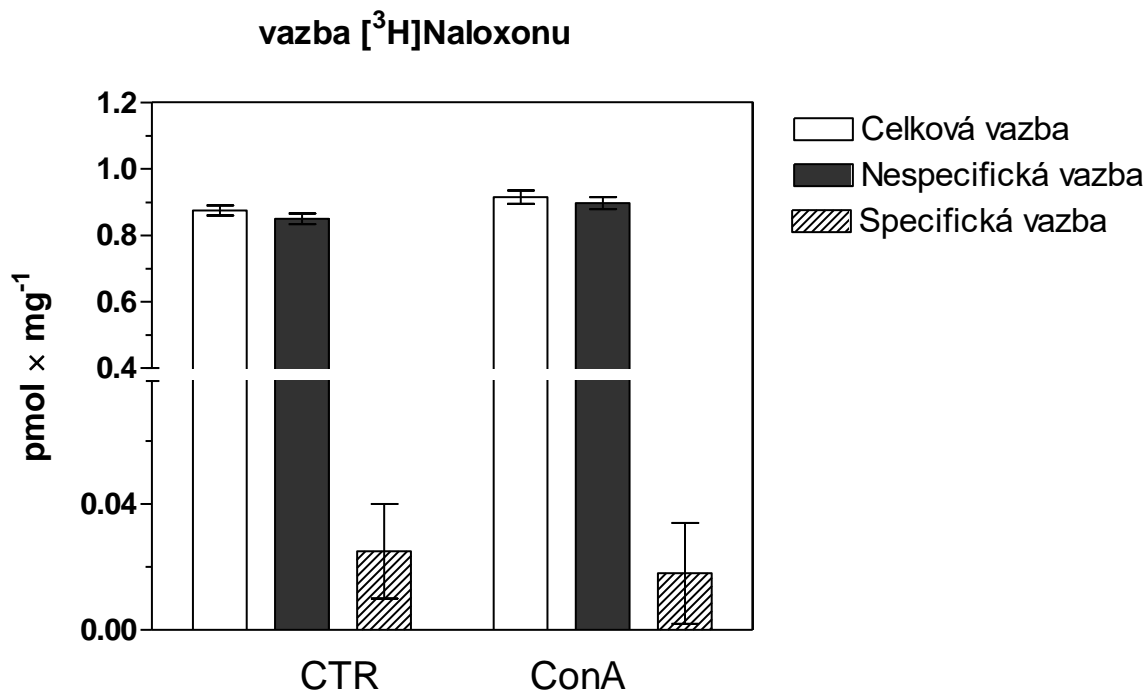
radioaktivity (udávané v Ci/mmol) [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S ( $2,22 \cdot 10^{12}$  dpm = 1 Ci ; 1 pmol = spec. radioaktivita  $\cdot 10^{-9}$  Ci). Grafické zpracování a vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 4.



Obr. 23. Vazba [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S vyjádřená v pmol/mg proteinu, s 2  $\mu\text{M}$  GDP. Legenda při grafu uvádí, který agonista byl použit. CTR-kontrolní vzorky, ConA-vzorky konkanavalinem ovlivněných lymfocytů. Graf ukazuje výsledky stanovení vazby ze dvou pokusů.

### **5.3 Výsledek stanovení vazby [ $^3\text{H}$ ]naloxonu v post-nukleárním supernatantu kontrolních a konkanavalinem A stimulovaných lymfocytch sleziny potkana**

Z grafu na obr. 24. který je zjevné, že specifická vazba [ $^3\text{H}$ ]naloxonu je velice malá jak v kontrolních, tak i v konkanavlinem A stimulovaných lymfocytch. Změna celkové vazby oproti nespecifické vazbě je minimální, specifická vazba je velmi malá. To může znamenat, že buď se antagonist [ $^3\text{H}$ ]naloxon na opioidní receptory ( $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -OR) moc neváže, nebo množství receptorů ve vzorcích je pod detekčním limitem použité metody. Naměřené hodnoty v dpm ("*desintegrations per minute*") byly přepočteny na pmol, stejně jako u stanovení vazby [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S. Grafické zpracování a vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 4.



Obr. 24. Vazba [<sup>3</sup>H]naloxonu vyjádřená v pmol/mg proteinu. Legenda při grafu označuje, který sloupec patří specifické, nespecifické a celkové vazbě. CTR-kontrolní vzorky, ConA- vzorky konkanavalinem A ovlivněných lymfocytů. Stanovení vazby bylo provedeno dvakrát.

## 6 DISKUSE

Výzkumné práce zaměřené na opioidní receptory se soustřeďují převážně na problematiku závislosti, tolerance, analgesie a tím na hlavní oblast působení opioidních látek - centrální nervovou soustavu. Organismus je složitou sítí reakcí, kde vše se vším souvisí. Přítomnost opioidů i endogenních opioidních molekul tak ovlivňuje i další fyziologické procesy a soustavy, jako je i imunitní systém. Hlavní funkcí imunitního systému je odolnost (z lat. "*immunitas*") vůči cizorodým látkám a jeho selhání je pro organismus fatální. V mnoha směrech je tento systém doposud neprobádaný. Funkce, signalizace a regulace exprese opioidních receptorů v buňkách imunitního systému patří právě do málo prozkoumané oblasti. Tato práce se proto věnuje výzkumu opioidních receptorů v lymfocytech izolovaných z potkaní sleziny.

Metodou přenosu (z ang. „*Western blot*“) byly stanovovány tři hlavní typy opioidních receptorů -  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -opioidní receptory (-OR). V první části experimentální práce byl lymfocytům (B-lymfocyty + T-lymfocyty), izolovaným z potkaní sleziny, podáván konkanavalin A. Tento mitogen je známý svými stimulačními účinky na lymfocyty [126, 127] a jeho aplikací se měl potvrdit předpoklad o zvýšené expresi opioidních receptorů v těchto buňkách. U všech tří detekovaných typů OR došlo k nárůstu množství těchto receptorů u stimulovaných lymfocytů. Přítomnost  $\kappa$ -opioidních receptorů byla zaznamenána v menším množství i u primárních, kontrolních lymfocytů, zatímco opioidní receptory typu  $\mu$  neposkytly v primárních buňkách žádný signál. Při detekci  $\delta$ -opioidního receptoru byl danou protilátkou rozpoznán protein o Mw cca 120 kDa. Vzhledem k molekulové hmotnosti by mohlo jít o trimer  $\delta$ -OR. Tento signál byl detekován jak u kontrolních, tak i stimulovaných buněk. Výskyt opioidních receptorů za normálních podmínek je velmi nízký, takže se v případě  $\delta$ -OR (u 120 kDa) jedná spíše o nespecifickou bílkovinu [128]. Malý počet OR odpovídá tedy i našim výsledkům. Přítomnost  $\kappa$ -opioidních receptorů již v primárních lymfocytech může být odrazem fyziologických podmínek.  $\kappa$ -opioidní receptory byly ve větším množství, za normálních podmínek, nalezeny v T-lymfocytech ve vývoji v brzlíku. Také bylo pozorováno, že agonisté  $\kappa$ -OR indukují tvorbu IL-7, který je důležitým cytokinem pro vývoj lymfocytů. Endogenním  $\kappa$ -OR agonistou je např. dynorfin. U myši postrádajících  $\kappa$ -OR (KO-myši) byl pozorován pokles počtu lymfocytů oproti kontrolním myším. Na základě těchto studií lze předpokládat účast  $\kappa$ -OR v regulaci vývoje lymfocytů. Podle studie Guan a kol. [129] se

$\kappa$ -opioidní receptory se podílejí na udržování homeostasy T-lymfocytů a makrofágů. Naše pokusy byly prováděny na lymfocytech ze sleziny dospělých jedinců, kde jsou maturované lymfocyty, což podporuje účast  $\kappa$ -OR na regulaci homeostasy.

Kromě opioidních receptorů byly metodou přenosu stanoveny ve vzorcích lymfocytů ovlivněných konkanavalinem A a kontrolních, ještě tři další proteiny a to aktin,  $\beta$ -arrestin-1/2 a kaveolin-1.

Z detekce aktinu bylo zjištěno, že dochází k poklesu monomerní formy (43 kDa) tohoto proteinu u konkanavalinem A (ConA) ovlivněných lymfocytech oproti kontrolním buňkám. Použitá protilátka detekovala jak  $\alpha$ -aktin, tak i  $\beta$ - a  $\gamma$ -formu. Při pokusech s konkanavalinem A bylo zjištěno, že membrány buněk jsou schopny tvořit tzv. (z ang.) "*cup formations*", dochází tedy k formaci útvarů podobných číším. V těchto útvarech dochází k rigidizaci (inhibici mobility) receptorů pro ConA, což pravděpodobně reguluje navázání velkého množství jeho dalších molekul. Kromě receptorů pro konkanavalin A se však v těchto membránových útvarech nacházejí i další membránové receptory a molekuly, jejichž mobilita je také omezena. K vytvoření takových útvarů samozřejmě musí docházet k přestavbám v cytoplasmatické membráně, kterých se účastní mikrotubuly a mikrofilamenta (aktin). Změny v distribuci těchto cytoskeletárních prvků jsou vysoce korelované se změnami v distribuci membránových receptorů [130, 131]. Stejnou změnu v množství monomerního aktinu pozorovali Varani a kol. v lidských periferních krevních lymfocytech a peritoneálních leukocytech z Sprague-Dawley potkanů [132]. Při tomto procesu dochází k polymerizaci aktinu a jeho pevné vazby v "*cup formations*", což se projeví jako pokles monomerní formy aktinu v konkanavalinem A stimulovaných lymfocytech [132, 133]. Námi zaznamenaný pokles monomerní formy tedy spíše ukazuje na polymeraci aktinu, než na jeho degradaci/sníženou produkci.

Stanovení množství  $\beta$ -arrestinu-1/2 v ConA a kontrolních lymfocytech přineslo podobný výsledek jako u aktinu a to pokles množství  $\beta$ -arrestinu-1/2 u ConA ovlivněných buňkách.  $\beta$ -arrestiny se ukazují jako multifunkční proteiny, které stojí i za regulací GPCR, především jejich endocytosy. Mezi GPCR lymfocytů patří chemokinové receptory i námi zkoumané opioidní receptory. Přesné zapojení  $\beta$ -arrestinů do regulace funkce imunitních buněk není známé. Studie ukazují, že  $\beta$ -arrestiny mohou hrát širší roli v regulaci migrace, chemotaxe lymfocytů a signálních molekul v přirozené imunitní odpovědi [134]. Podle

Fong a kol. [135]  $\beta$ -arrestin-2 zvyšuje chemotaktickou aktivitu lymfocytů. Při stimulaci proliferace lymfocytů konkanavalinem A dochází k zvýšené tvorbě migračně inhibičních faktorů v lymfocytech, přičemž nedochází k ovlivnění stimulačního účinku na růst [136, 137]. Konkanavalin A vyvolává protichůdný účinek k  $\beta$ -arrestinu-2, a tak by hypoteticky mohlo dojít k ovlivnění tvorby  $\beta$ -arrestinu-2 v stimulovaných buňkách. V této práci by vyvození takového závěru jen na základně těchto experimentů bylo spekulativní.  $\beta$ -arrestiny mají širokou působnost, stejně tak i konkanavalin A ovlivňuje mnoho buněčných procesů.

Kaveoliny jsou proteiny, za jejichž primární funkci se považuje výstavba kaveol - membránových domén bohatých na různé signální molekuly. Přítomnost kaveolinů v lymfocytech i neuronech byla dlouho hypotetizována, protože útvary odpovídající kaveolám nebyly v těchto buňkách pozorovány. V posledním desetiletí je ale možno najít vícero prací, které uvádí, že kaveolin je v buňkách imunitního systému i v neuronech a to nezávisle na tvorbě kaveol [138-142]. Kaveolin tedy může přispět k regulaci buněk v jiných oblastech, než v souvislosti s kaveolami, a to v regulaci signálních proteinů zapojených do tvorby cAMP, při buněčné adhezi, změnách neuronové plasticity indukované poškozením, aktivaci T-lymfocytů, diapedéze leukocytů (pohyb buněk přes intaktní stěny kapilár do okolních tkání), modulaci odpovědi leukocytů na zánět, oxidačním stresu aj. [142-148]. Další nedávné studie ukazují, že cytoskeletální složky (aktin, tubulin) interagují s kaveolinem a ovlivňují interakci kaveolinu a G-proteinů a tím produkci cAMP [149, 150]. Udávaná molekulová hmotnost ( $M_w$ ) monomeru kaveolinu-1 je 17-24 kDa [151]. Při této  $M_w$  byl v našem experimentu zaznamenán signál pouze u kontrolních a nikoli v konkanavalinem A stimulovaných lymfocytech. Množství monomeru kaveolinu-1 bylo účinkem konkanavalinu A snižené pod detekční limit metody. U obou typů vzorků však byly detekovány proužky u cca 37 a 49 kDa, které by mohly odpovídat dimeru a trimeru. V buňkách kaveoliny tvoří různé oligomery, které jsou resistantní vůči působení SDS [152]. Výrazný vzestup formy s 37 kDa ve stimulovaných vzorcích by mohl teoreticky souviset s tvorbou "*cup formations*" účinkem konkanavalinu A, protože kaveolin-1 interaguje s aktinem při změnách v cytoskeletu [149]. Molekulová hmotnost kolem 37 kDa a 49 kDa by ale také mohla odpovídat ubikvitinovaným formám kaveolinu-1, které jsou určeny k degradaci. Vícero studií se zabývá funkcí kaveolinu-1 jako antiproliferační, nebo proapoptické regulační molekuly [152-154]. Kaveolin by tak



teoreticky mohl působit proti mitogenu konkanavalinu A. Je také známo, že kaveoliny interagují s G-proteiny, čímž regulují GPCR, mezi které patří jak cytokinové, tak i opioidní receptory [155]. V mozkové tkáni u potkanů, kterým byl podáván morfin, došlo k nárůstu kaveolinu-1, což podporuje účast kaveolinů i na procesech vyvolaných morfinem [122]. Dalším možným vysvětlením je, že použitá protilátka rozpoznává nespecifické proteiny s Mw 37 kDa a 49 kDa. Obecně kaveoliny a jejich funkce jsou nejen v lymfocytech málo probádanou oblastí a budou předmětem našich dalších studií.

Stanovení  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -opioidních receptorů proběhlo i ve vzorcích lymfocytů z potkaní sleziny, které nebyly ovlivněny mitogenem, ale opioidem morfinem. Při kultivaci buněk s morfinem nedocházelo k stimulaci proliferace, spíše naopak k apoptose lymfocytů. Podávání morfinu těmto buňkám ale způsobilo zvýšenou expresi  $\mu$ -opioidních receptorů.  $\mu$ -OR neposkytly žádný signifikantní signál ve vzorcích z kontrolních buněk. Morfin má afinitu ke všem třem uvedeným typům opioidních receptorů, nejvýznamnější účinky v CNS jsou spojovány s vazbou právě na  $\mu$ -opioidní receptory. Je proto možné, že podávání morfinu ovlivní nejvíce expresi  $\mu$ -OR. Zvýšené množství  $\mu$ -opioidního receptorů po podání morfinu lymfocytům uvádějí i práce Suzuki a kol. [156] s experimenty na lidských lymfoidních buněčných liniích. Nárůst mRNA  $\mu$ -OR účinkem morfinu byl pozorován i v lymfoidních buňkách Jurkat a byl zjištěn také nárůst IL-4, který pozitivně ovlivňuje tvorbu a antiproliferační efekt TNF. Právě nárůst IL-4 vedl k indukci exprese  $\mu$ -opioidního receptoru. IFN- $\gamma$  je dalším cytokinem, který hraje významnou roli v expresi  $\mu$ -OR v lymfocytech. Po aplikaci morfinu na T-lymfocyty (myši) dochází k poklesu hladiny IFN- $\gamma$ , přičemž morfin moduluje promotor genu pro IFN- $\gamma$  a tím snižuje jeho množství [119]. Práce Kraus a kol. popisuje represi transkripce genů  $\mu$ -opioidních receptorů působením IFN- $\gamma$  [157]. Krom IFN- $\gamma$  dochází také k poklesu IL-2 - interleukin posilující růst a vývoj lymfocytů [15]. Morfin má také negativní efekt na stimulační odpověď lymfocytů na přítomnost mitogenu konkanavalinu A. Slezinné lymfocyty potkanů, kterým byl podáván morfin byly méně stimulované konkanavalinem A než lymfocyty z kontrolních zvířat [158]. Stimulace konkanavalinem A podporuje tvorbu IL-2 a tím aktivuje lymfocyty [104]. Protichůdným účinkem morfinu na IL-2 tak může být odezva na ConA snižená. Negen cytokiny mohou ovlivnit expresi  $\mu$ -opioidních receptorů v imunitních buňkách. Stres jest dalším faktorem, který ovlivňuje tvorbu  $\mu$ -OR. Při dlouhodobém stresu u myši došlo k apoptose lymfocytů [19]. Je známé, že morfin má imunosupresivní účinky a snižuje počet

lymfocytů. U stresovaných myší došlo k zapojení alternativní apoptické dráhy, která zahrnuje signalizaci přes  $\mu$ -opioidní receptory [19, 115]. Tato dráha by mohla probíhat i morfinem indukované apoptose lymfocytů, která byla v našem experimentu pozorována.

$\delta$ -opioidní receptory nebyly detekovány ani u kontrolních ani u morfinem ovlivněných lymfocytů. Nepřítomnost  $\mu$ -OR a  $\delta$ -OR v primárních kontrolních lymfocytech odpovídá přirozeným podmínkám, kdy je exprese těchto receptorů v lymfocytech velice nízká. Morfin má afinitu i k  $\delta$ -OR, ale je možné, že v lymfocytech nemá stejné působení jako v CNS a tak neovlivňuje expresi  $\delta$ -OR, tak aby poskytly dostatečně signifikantní odezvu při stanoveních metodou "Western blot".

$\kappa$ -opioidní receptory byly detekovány jak v kontrolních buňkách, tak i v lymfocytech, kterým byl podáván morfin. Množství  $\kappa$ -opioidních receptorů nebylo nijak signifikantně ovlivněno účinkem morfinu. Přítomnost  $\kappa$ -OR v primárních lymfocytech koreluje s našimi výsledky z experimentů s konkanavalinem A. Takže je tady rovněž možné předpokládat, že exprese  $\kappa$ -opioidních receptorů je důležitá pro základní procesy jako udržování homeostasy lymfocytů.

Všechny tři typy opioidních receptorů byly metodou "Western blot" stanoveny i na vzorcích potkaního mozku (kortexu) a srdce (levá srdeční komora).

Detekce  $\mu$ -opioidních receptorů,  $\delta$ -OR i  $\kappa$ -OR potvrdila přítomnost těchto receptorů v mozkové tkáni. V případě  $\mu$ -OR byl zaznamenán signál u molekulové váhy ~58 kDa. Teoretická Mw podle aminokyselinové sekvence je pro všechny OR kolem 43 kDa [159]. Vyšší molekulovou váhu  $\mu$ -opioidních receptorů uvádí vícero prací. Opioidní receptory podléhají posttranslačním úpravám, nejčastější je glykosylace, která se udává jako důvod menší pohyblivosti při elektroforetickém dělení a tak vyšší Mw receptorů. Míra glykosylace je různá u různých organismů i mezi tkáněmi či oddíly tkání (př. u CNS) a tím se liší i Mw opioidních receptorů [94, 160, 161]

Protilátkou proti  $\delta$ -opioidním receptorům byly rozpoznány v kortexu CNS dva proužky o molekulové hmotnosti ~55 kDa a ~68 kDa. Jak již bylo popsáno u detekce  $\mu$ -OR, opioidní receptory jsou glykosylované, což zvyšuje Mw receptorů. Oba proužky odpovídají  $\delta$ -OR, jak je zmíněno i v dalších pracích [124, 159]. U formy s vyšší molekulovou váhou, byl pozorován statisticky významný pokles po podání morfinu, což

by mohlo odpovídat adaptivním procesům vyvolaných opakovanou stimulací opioidních receptorů morfinem.

$\kappa$ -opioidní receptory detekované metodou „*Western blot*“ v kortexu potkaního mozku poskytly signál v podobě dvou proužků. Majoritní formu s  $M_w \sim 48$  kDa, která přibližně odpovídá teoretické  $M_w$  receptoru. Množství  $\kappa$ -OR 48kDa nebylo změněno vlivem morfinu. Minoritní forma s  $\sim 60$  kDa, u které byl pozorován mírný pokles, představuje pravděpodobně glykosylované  $\kappa$ -OR.

Důkazu přítomnosti opioidních receptorů v srdečním svalu není mnoho. V souvislosti opioidních receptorů v srdci je často zmiňován pozitivní efekt aktivace těchto receptorů a tím protektivní účinek u ischemických chorob a srdečního selhání [162-164]. Pomocí metody „*Western blot*“ byla prokázána přítomnost všech tří typů opioidních receptorů.  $\mu$ -opioidní receptory poskytly signál u dvou různých molekulových vah -  $M_w \sim 40$  a  $\sim 47$ , přičemž došlo k poklesu množství obou forem těchto receptorů v morfinem ovlivněných vzorcích. Molekulová hmotnost obou signálů je téměř shodná s teoretickou vahou ( $\sim 43$  kDa) a tak by spíše než o glykosylaci mohlo jít o různé sestřihové varianty, jejichž výskyt v organismu je normální [94]. Detekci  $\delta$ -OR byly také zaznamenány dva proužky. Molekulová hmotnost těchto signálů odpovídá nejspíše glykosylovaným formám těchto receptorů, protože jejich  $M_w$  je cca 58 kDa a 70 kDa. Změny v množství  $\delta$ -opioidních receptorů nebyly pozorovány. Při stanovení  $\kappa$ -opioidních receptorů byly tak jako u  $\delta$ -OR a  $\mu$ -OR detekovány dvě formy  $\kappa$ -OR ( $\sim 48$  kDa;  $\sim 62$  kDa). Dá se předpokládat, že proužky u  $\sim 62$  kDa jsou glykosylované  $\kappa$ -receptory a jejich množství se nezměnilo. U  $\sim 48$  kDa  $\kappa$ -OR došlo ke kvantitativnímu malému nárůstu účinkem morfinu. Příčina změn v distribuci a množství opioidních receptorů v buňkách srdce zatím není známá. Obecně se kardioprotektivní účinek připisuje převážně  $\delta$ -opioidním receptorům, které jako jediné v našem experimentu nebyly zaznamenány. Efekt  $\kappa$ -opioidních receptorů je někdy popisován jako protektivní, jindy právě naopak, tedy že aktivací  $\kappa$ -OR dochází k silnějšímu srdečnímu infarktu a poškození. I studie s morfinem připisují pozorované kardioprotektivní účinky hlavně  $\delta$ - a  $\kappa$ -opioidním receptorům, i když je morfin známý svou nejvyšší afinitou k  $\mu$ -OR. Exprese  $\mu$ -OR v srdci je poměrně kontroverzní, a ne všechny práce se shodují na jejich přítomnosti v tomto orgánu [164-167]. V této práci poskytly  $\mu$ -OR při detekci dobrý signál. Práce Li a kol. uvádí zapojení také  $\mu$ -OR v kardioprotektivních procesech [168]. Výrazný pokles množství  $\mu$ -OR naznačuje zapojení

těchto receptorů do morfinem vyvolaných reakcí. Tato změna může být způsobená downregulací receptorů po dlouhodobém vlivu morfinu.

Pro detekci opioidních receptorů metodou „*Western blot*“ byly použité protilátky vytvořeny podle vlastností opioidních receptorů vyskytujících se v mozku ang. „*brain derivated antibodies*“. Jejich účinnost na jiných tkáních, tedy srdci a lymfocytech byla porovnána se vzorky mozku - na jeden elektroforetický gel byly vedle sebe nanášeny vzorky postnukleárního supernatantu primárních lymfocytů, stimulovaných lymfocytů, mozku a srdce (oba vzorky z kontrolních zvířat). V takto uspořádaném experimentu byly stanoveny  $\mu$ -,  $\delta$ - i  $\kappa$ -opioidní receptory. Na výsledných výřezech z filmů (obr. č. 22.) je také možné pozorovat určité rozdíly v molekulové hmotnosti v jednotlivých vzorcích. Míra glykosylace a také preferované sestřihové varianty receptorů se mohou mezi tkáněmi lišit, což prezentují i tyto experimenty [94, 160, 161].

Vazebné radioligandové pokusy s [ $^3\text{H}$ ]naloxonem byly provedeny na kontrolních a konkanavalinem A (ConA) stimulovaných lymfocytech. [ $^3\text{H}$ ]naloxon má afinitu k  $\mu$ -,  $\delta$ - i  $\kappa$ -opioidním receptorům. Podle detekce metodou „*Western blot*“ došlo k nárůstu množství všech tří typů zkoumaných opioidních receptorů. Vazebné pokusy neprokázaly tuto změnu a jak u kontrolních tak i u stimulovaných lymfocytů nebyla stanovena téměř žádná specifická vazba ligandu. Tento výsledek byl předpokládán u kontrolních lymfocytů, kde je počet opioidních receptorů velice malý a nachází se pod detekčním limitem této metody. Navzdory zvýšení množství OR v případě ConA ovlivněných lymfocytů, detekovaném metodou „*Western blot*“, při radioligandové studii nedošlo k signifikantnímu nárůstu specifické vazby v těchto vzorcích. Je možné, že i toto větší množství je stále pod detekčním limitem metody v tomto typu vzorku (PNS). Optimalizace podmínek této metody bude dále předmětem našich prací. Stejný negativní výsledek byl zaznamenán i při stanovení agonistou stimulované vazby [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S rovněž v kontrolních a konkanavalinem A ovlivněných lymfocytech. Agonisté DAMGO pro  $\mu$ -opioidní receptory, DADLE pro  $\delta$ -OR ani U59693 pro  $\kappa$ -OR nestimulovali vazbu [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S v kontrolních ani ConA ovlivněných lymfocytech. Lze z toho vyvodit stejný závěr jako u stanovení vazby radioligandem [ $^3\text{H}$ ]naloxonem a bude zapotřebí pokusit se optimalizovat podmínky při stanovení agonistou stimulované vazby [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S. Také by se dalo uvažovat, že vazba ligandů na opioidní receptory lymfocytů spouští preferenčně jinou signalizační dráhu než přes G-proteiny. Stanovení opioidních receptorů pomocí

radioligandových vazebných studií na buňkách imunitního systému (vyjma lymfoidní linie) se zdá jako nelehký úkol. Obtíže se stanovením OR pomocí vazby radioligandů na lymfocytech popisuje např. práce Bidlack a kol. [45]. Zmínka o úspěšném pokusu je v studii Sarkar a kol. na potkaních NK-buňkách [169] a v práci Mehrishi a Mills na periferních lidských krevních lymfocytech [99]. Potíže s detekcí těchto receptorů vazebnými pokusy jsou způsobeny pravděpodobně nízkým počtem opioidních receptorů v těchto buňkách [10, 45, 128].

## 7 ZÁVĚR

V lymfocytech dochází k nárůstu množství  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -opioidních receptorů účinkem konkanavalinu A. V primárních lymfocytech byly detekovány pouze  $\kappa$ -opioidní receptory, kterých množství bylo 2.4 krát zvýšeno po stimulaci mitogenem.

Vazebné studie s radioligandem [ $^3\text{H}$ ]naloxonem a stanovení vazby [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S byly provedeny ve vzorkách konkanavalinem A ovlivněných a kontrolních lymfocytech. Funkční spojení s G-proteiny, prokázáno nebylo pravděpodobně kvůli malému množství receptorů. Optimalizace podmínek této metody bude předmětem dalšího výzkumu. K podobným výsledkům došli v minulosti i další autoři. [10, 45].

Stanovení aktinu ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -formy) detekovalo pokles monomerní formy aktinu v konkanavalinem A stimulovaných lymfocytech oproti kontrolám. Předpokládáme, že nedochází k snížení produkce aktinu, ale k jeho polymerizaci účinkem mitogenu, což se odrazí jako menší množství monomeru. Podobný výsledek uvádí i Varani a kol. [132].

Detekce  $\beta$ -arrestinu-1/2 a kaveolinu-1 přinesla stejný výsledek jako u aktinu a to pokles množství monomeru tohoto proteinu v konkanavalinem A ovlivněných lymfocytech ve srovnání s kontrolními buňkami. Jejich funkce a spojení s receptory pro opioidy v lymfocytech není dobře prozkoumána. Pokud je nám známo, obdobné pozorování nebylo dosud nikým publikováno.

Vlivem morfinu jsme pozorovali změnu pouze u  $\mu$ -opioidních receptorů – u kterých došlo k nárůstu oproti kontrolnímu vzorku, v němž tyto receptory nebyly vůbec detekovatelné. Naproti tomu  $\delta$ -opioidní receptory zůstávají pod mezí detekce v lymfocytech i po ovlivnění morfinem, a množství  $\kappa$ -opioidních receptorů se vlivem morfinu neměnilo

Detekce opioidních receptorů potvrdila přítomnost těchto receptorů v mozkové tkáni. Kvantitativní pokles  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR byl zaznamenán u minoritních forem těchto receptorů, množství  $\mu$ -OR nebylo účinkem morfinu ovlivněno.

V srdci byly rovněž detekovány všechny tři typy opioidních receptorů, přičemž došlo k výraznému poklesu množství  $\mu$ -opioidních receptorů a malému nárůstu  $\kappa$ -opioidních receptorů vlivem morfinu. Změny v množství  $\delta$ -opioidních receptorů nebyly pozorovány. Příčina změn v distribuci a množství opioidních receptorů v buňkách srdce zatím není známa.

Změny v množství opioidních receptorů v lymfocytech potkaní sleziny po stimulaci mitogenem prokazují schopnost imunitních buněk exprimovat tyto receptory. Nárůst množství  $\mu$ -opioidních receptorů účinkem morfinu poukazuje na jejich zapojení do reakcí imunitního systému na přítomnost morfinu a důležitost regulované exprese opioidních receptorů v lymfocytech. Není nám známa žádná jiná práce, která by dokumentovala podobné výsledky.

## 8 Seznam použité literatury

- [1] M. de Ridder, Heroin od léku k droze, Argo 2002.
- [2] M.J. Brownstein, A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors, Proc Natl Acad Sci U S A 90 (1993) 5391-5393.
- [3] E.J. Cone, H.A. Heit, Y.H. Caplan, D. Gourlay, Evidence of morphine metabolism to hydromorphone in pain patients chronically treated with morphine, J Anal Toxicol 30 (2006) 1-5.
- [4] emcdda.europa, <http://www.emcdda.europa.eu/http://www.emcdda.europa.eu/>.
- [5] M.C. Chang, S.Z. Fan, P.N. Hsiao, W.F. Cheng, W.Z. Sun, Influence of morphine on host immunity, Acta Anaesthesiol Taiwan 49 105-108.
- [6] R. Benyamin, A.M. Trescot, S. Datta, R. Buenaventura, R. Adlaka, N. Sehgal, S.E. Glaser, R. Vallejo, Opioid complications and side effects, Pain Physician 11 (2008) S105-120.
- [7] L.F. Chuang, T.K. Chuang, K.F. Killam, Jr., Q. Qiu, X.R. Wang, J.J. Lin, H.F. Kung, W. Sheng, C. Chao, L. Yu, et al., Expression of kappa opioid receptors in human and monkey lymphocytes, Biochem Biophys Res Commun 209 (1995) 1003-1010.
- [8] L.F. Chuang, T.K. Chuang, K.F. Killam, Jr., A.J. Chuang, H.F. Kung, L. Yu, R.Y. Chuang, Delta opioid receptor gene expression in lymphocytes, Biochem Biophys Res Commun 202 (1994) 1291-1299.
- [9] T.K. Chuang, K.F. Killam, Jr., L.F. Chuang, H.F. Kung, W.S. Sheng, C.C. Chao, L. Yu, R.Y. Chuang, Mu opioid receptor gene expression in immune cells, Biochem Biophys Res Commun 216 (1995) 922-930.
- [10] B.M. Sharp, Expression of opioid receptor by immune cells, Journal of Neuroimmunology 69 (1996) 3-13.
- [11] M.J. Wick, S.R. Minnerath, S. Roy, S. Ramakrishnan, H.H. Loh, Differential expression of opioid receptor genes in human lymphoid cell lines and peripheral blood lymphocytes, J Neuroimmunol 64 (1996) 29-36.
- [12] C. Gaveriaux, J. Peluso, F. Simonin, J. Laforet, B. Kieffer, Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells, FEBS Lett 369 (1995) 272-276.
- [13] J.J. Madden, W.L. Whaley, D. Ketelsen, Opiate binding sites in the cellular immune system: expression and regulation, J Neuroimmunol 83 (1998) 57-62.
- [14] C. Borner, S. Lanciotti, T. Koch, V. Hollt, J. Kraus, mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes, J Neuroimmunol 263 35-42.
- [15] C. Borner, J. Kraus, A. Bedini, B. Schraven, V. Hollt, T-cell receptor/CD28-mediated activation of human T lymphocytes induces expression of functional mu-opioid receptors, Mol Pharmacol 74 (2008) 496-504.
- [16] S. Suzuki, T. Miyagi, T.K. Chuang, L.F. Chuang, R.H. Doi, R.Y. Chuang, Morphine upregulates mu opioid receptors of human and monkey lymphocytes, Biochem Biophys Res Commun 279 (2000) 621-628.
- [17] S. Suzuki, T.K. Chuang, L.F. Chuang, R.H. Doi, R.Y. Chuang, Morphine upregulates kappa-opioid receptors of human lymphocytes, Adv Exp Med Biol 493 (2001) 81-87.
- [18] S. Suzuki, L.F. Chuang, R.H. Doi, J.M. Bidlack, R.Y. Chuang, Kappa-opioid receptors on lymphocytes of a human lymphocytic cell line: morphine-induced up-regulation as evidenced by competitive RT-PCR and indirect immunofluorescence, Int Immunopharmacol 1 (2001) 1733-1742.
- [19] J. Wang, R. Charboneau, R.A. Barke, H.H. Loh, S. Roy, Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis, J Immunol 169 (2002) 3630-3636.
- [20] H. Liu, H. Li, L. Guo, M. Li, C. Li, S. Wang, W. Jiang, X. Liu, M.A. McNutt, G. Li, Mechanisms involved in phosphatidylinositol 3-kinase pathway mediated up-regulation of the mu opioid receptor in lymphocytes, Biochem Pharmacol 79 516-523.



- [21] C. Gaveriaux-Ruff, F. Simonin, D. Filliol, B.L. Kieffer, Enhanced humoral response in kappa-opioid receptor knockout mice, *J Neuroimmunol* 134 (2003) 72-81.
- [22] I. Martin-Kleiner, T. Balog, J. Gabrilovac, Signal transduction induced by opioids in immune cells: a review, *Neuroimmunomodulation* 13 (2006) 1-7.
- [23] K. Fecho, D.T. Lysle, Morphine-induced enhancement in the granulocyte response to thioglycollate administration in the rat, *Inflammation* 26 (2002) 259-271.
- [24] C. Borner, J. Kraus, Inhibition of NF-kappaB by opioids in T cells, *J Immunol* 191 4640-4647.
- [25] J. Gabrilovac, B. Cupic, E. Zapletal, A. Brozovic, IFN-gamma up-regulates kappa opioid receptors (KOR) on murine macrophage cell line J774, *J Neuroimmunol* 245 56-65.
- [26] J.J. Madden, W.L. Whaley, D. Ketelsen, R.M. Donahoe, The morphine-binding site on human activated T-cells is not related to the mu opioid receptor, *Drug Alcohol Depend* 62 (2001) 131-139.
- [27] D. Male, *Immunology*, MOSBY ELSEVIER 2006.
- [28] E.R. Unanue, J.M. Kiely, J. Calderon, The modulation of lymphocyte functions by molecules secreted by macrophages. II. Conditions leading to increased secretion, *J Exp Med* 144 (1976) 155-166.
- [29] J.B. Zabriskie, . *Essential Clinical Immunology*, Cambridge University Press 2009.
- [30] R.M. Steinman, M. Pack, K. Inaba, Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs, *Immunol Rev* 156 (1997) 25-37.
- [31] V. Horejsi, *Základy imunologie*, Triton, Prague, 2013.
- [32] B. Steiniger, *Microanatomy and Function of the Spleen*, Springer Science & Business Media 1999.
- [33] R.E. Mebius, G. Kraal, Structure and function of the spleen, *Nat Rev Immunol* 5 (2005) 606-616.
- [34] J.G. Cyster, C.C. Goodnow, Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords, *J Exp Med* 182 (1995) 581-586.
- [35] G. Kraal, Cells in the marginal zone of the spleen, *Int Rev Cytol* 132 (1992) 31-74.
- [36] J.A. Stenzen, A.J. Poschenrieder, Bioanalytical chemistry of cytokines--a review, *Anal Chim Acta* 853 95-115.
- [37] D.J. Campbell, C.H. Kim, E.C. Butcher, Chemokines in the systemic organization of immunity, *Immunol Rev* 195 (2003) 58-71.
- [38] Lullmann H., *Barevny atlas farmakologie*, Grada 2012.
- [39] Beckova I, *Farmakologie drogovych zavislosti*, Karolinum 1999.
- [40] G. Andersen, L. Christrup, P. Sjogren, Relationships among morphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update, *J Pain Symptom Manage* 25 (2003) 74-91.
- [41] M.J. Kreek, G. Bart, C. Lilly, K.S. LaForge, D.A. Nielsen, Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments, *Pharmacol Rev* 57 (2005) 1-26.
- [42] S. Roy, J. Ninkovic, S. Banerjee, R.G. Charboneau, S. Das, R. Dutta, V.A. Kirchner, L. Koodie, J. Ma, J. Meng, R.A. Barke, Opioid drug abuse and modulation of immune function: consequences in the susceptibility to opportunistic infections, *J Neuroimmune Pharmacol* 6 442-465.
- [43] J.B. Black, R.T. Premont, Y. Daaka, Feedback regulation of G protein-coupled receptor signaling by GRKs and arrestins, *Semin Cell Dev Biol* 50 95-104.
- [44] P.K. Peterson, T.W. Molitor, C.C. Chao, The opioid-cytokine connection, *J Neuroimmunol* 83 (1998) 63-69.
- [45] J.M. Bidlack, Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system, *Clin Diagn Lab Immunol* 7 (2000) 719-723.

- [46] S.K. Wong, G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs, *Neurosignals* 12 (2003) 1-12.
- [47] R.J. Lefkowitz, S.K. Shenoy, Transduction of receptor signals by beta-arrestins, *Science* 308 (2005) 512-517.
- [48] A.S. Pupo, D.A. Duarte, V. Lima, L.B. Teixeira, E.S.L.T. Parreiras, C.M. Costa-Neto, Recent updates on GPCR biased agonism, *Pharmacol Res.*
- [49] E. Jacoby, R. Bouhelal, M. Gerspacher, K. Seuwen, The 7 TM G-protein-coupled receptor target family, *ChemMedChem* 1 (2006) 761-782.
- [50] T. Bartfai, Pharmacogenomics in drug development: societal and technical aspects, *Pharmacogenomics J* 4 (2004) 226-232.
- [51] D.T. Chalmers, D.P. Behan, The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics, *Nat Rev Drug Discov* 1 (2002) 599-608.
- [52] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, *Science* 289 (2000) 739-745.
- [53] M.I. Simon, M.P. Strathmann, N. Gautam, Diversity of G proteins in signal transduction, *Science* 252 (1991) 802-808.
- [54] N. Tuteja, Signaling through G protein coupled receptors, *Plant Signal Behav* 4 (2009) 942-947.
- [55] A. Bock, N. Merten, R. Schrage, C. Dallanocce, J. Batz, J. Klockner, J. Schmitz, C. Matera, K. Simon, A. Kebig, L. Peters, A. Muller, J. Schrobang-Ley, C. Trankle, C. Hoffmann, M. De Amici, U. Holzgrabe, E. Kostenis, K. Mohr, The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling, *Nat Commun* 3 1044.
- [56] W.M. Oldham, H.E. Hamm, Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 60-71.
- [57] M. Freissmuth, P.J. Casey, A.G. Gilman, G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling, *Faseb J* 3 (1989) 2125-2131.
- [58] Y. Daaka, J.A. Pitcher, M. Richardson, R.H. Stoffel, J.D. Robishaw, R.J. Lefkowitz, Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 2180-2185.
- [59] R.E. Menard, R.R. Mattingly, Gbetagamma subunits stimulate p21-activated kinase 1 (PAK1) through activation of PI3-kinase and Akt but act independently of Rac1/Cdc42, *FEBS Lett* 556 (2004) 187-192.
- [60] C.L. Huang, P.A. Slesinger, P.J. Casey, Y.N. Jan, L.Y. Jan, Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation, *Neuron* 15 (1995) 1133-1143.
- [61] S.S. Ferguson, W.E. Downey, 3rd, A.M. Colapietro, L.S. Barak, L. Menard, M.G. Caron, Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization, *Science* 271 (1996) 363-366.
- [62] S.S. Ferguson, L.S. Barak, J. Zhang, M.G. Caron, G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins, *Can J Physiol Pharmacol* 74 (1996) 1095-1110.
- [63] O.B. Goodman, Jr., J.G. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, J.L. Benovic, Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor, *Nature* 383 (1996) 447-450.
- [64] E. Reiter, S. Ahn, A.K. Shukla, R.J. Lefkowitz, Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52 179-197.
- [65] J.Y. Park, S.Y. Lee, H.R. Kim, M.D. Seo, K.Y. Chung, Structural mechanism of GPCR-arrestin interaction: recent breakthroughs, *Arch Pharm Res* 39 293-301.
- [66] W.P. Hausdorff, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function, *Faseb J* 4 (1990) 2881-2889.

- [67] J.A. Pitcher, N.J. Freedman, R.J. Lefkowitz, G protein-coupled receptor kinases, *Annu Rev Biochem* 67 (1998) 653-692.
- [68] C.S. Pao, J.L. Benovic, Phosphorylation-independent desensitization of G protein-coupled receptors?, *Sci STKE* 2002 (2002) pe42.
- [69] J. Xu, M. Chalimoniuk, Y. Shu, A. Simonyi, A.Y. Sun, F.A. Gonzalez, G.A. Weisman, W.G. Wood, G.Y. Sun, Prostaglandin E2 production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69 (2003) 437-448.
- [70] Z. Liu, Y. Jiang, Y. Li, J. Wang, L. Fan, M.J. Scott, G. Xiao, S. Li, T.R. Billiar, M.A. Wilson, J. Fan, TLR4 Signaling augments monocyte chemotaxis by regulating G protein-coupled receptor kinase 2 translocation, *J Immunol* 191 857-864.
- [71] C.A. Moore, S.K. Milano, J.L. Benovic, Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins, *Annu Rev Physiol* 69 (2007) 451-482.
- [72] M.T. Drake, S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Trafficking of G protein-coupled receptors, *Circ Res* 99 (2006) 570-582.
- [73] K.M. Krueger, Y. Daaka, J.A. Pitcher, R.J. Lefkowitz, The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification, *J Biol Chem* 272 (1997) 5-8.
- [74] M. Waldhoer, S.E. Bartlett, J.L. Whistler, Opioid receptors, *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 953-990.
- [75] P. Tsao, T. Cao, M. von Zastrow, Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors, *Trends Pharmacol Sci* 22 (2001) 91-96.
- [76] R.M. Quock, T.H. Burkey, E. Varga, Y. Hosohata, K. Hosohata, S.M. Cowell, C.A. Slate, F.J. Ehler, W.R. Roeske, H.I. Yamamura, The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy, *Pharmacol Rev* 51 (1999) 503-532.
- [77] M. Satoh, M. Minami, Molecular pharmacology of the opioid receptors, *Pharmacol Ther* 68 (1995) 343-364.
- [78] T. Waldhoer, G. Haidinger, O. Feenstra, R. Plank, C. Vutuc, The influence of genetic predisposition on the prevalence of atopic diseases in Carinthian school children, *Acta Med Austriaca* 27 (2000) 141-144.
- [79] I.D. Pogozheva, A.L. Lomize, H.I. Mosberg, Opioid receptor three-dimensional structures from distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints, *Biophys J* 75 (1998) 612-634.
- [80] C. Chavkin, J.P. McLaughlin, J.P. Celver, Regulation of opioid receptor function by chronic agonist exposure: constitutive activity and desensitization, *Mol Pharmacol* 60 (2001) 20-25.
- [81] P.Y. Law, Y.H. Wong, H.H. Loh, Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40 (2000) 389-430.
- [82] J.A. Hsia, J. Moss, E.L. Hewlett, M. Vaughan, ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding, *J Biol Chem* 259 (1984) 1086-1090.
- [83] N. Gautam, G.B. Downes, K. Yan, O. Kisselev, The G-protein betagamma complex, *Cell Signal* 10 (1998) 447-455.
- [84] P. Fan, Z. Jiang, I. Diamond, L. Yao, Up-regulation of AGS3 during morphine withdrawal promotes cAMP superactivation via adenylyl cyclase 5 and 7 in rat nucleus accumbens/striatal neurons, *Mol Pharmacol* 76 (2009) 526-533.
- [85] H. Ujcikova, K. Dlouha, L. Roubalova, M. Vosahlikova, D. Kagan, P. Svoboda, Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal, *Biochim Biophys Acta* 1810 1220-1229.

- [86] Z.Q. Wu, M. Li, J. Chen, Z.Q. Chi, J.G. Liu, Involvement of cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway in regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase upon activation of opioid receptors by morphine, *Mol Pharmacol* 69 (2006) 866-876.
- [87] N. Frolich, C. Dees, C. Paetz, X. Ren, M.J. Lohse, V.O. Nikolaev, M.H. Zenk, Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor, *Biochem Pharmacol* 81 1248-1254.
- [88] J. McPherson, G. Rivero, M. Baptist, J. Llorente, S. Al-Sabah, C. Krasel, W.L. Dewey, C.P. Bailey, E.M. Rosethorne, S.J. Charlton, G. Henderson, E. Kelly, mu-opioid receptors: correlation of agonist efficacy for signalling with ability to activate internalization, *Mol Pharmacol* 78 756-766.
- [89] P. Molinari, V. Vezzi, M. Sbraccia, C. Gro, D. Riitano, C. Ambrosio, I. Casella, T. Costa, Morphine-like opiates selectively antagonize receptor-arrestin interactions, *J Biol Chem* 285 12522-12535.
- [90] B.L. Kieffer, C.J. Evans, Opioid tolerance-in search of the holy grail, *Cell* 108 (2002) 587-590.
- [91] J.T. Williams, S.L. Ingram, G. Henderson, C. Chavkin, M. von Zastrow, S. Schulz, T. Koch, C.J. Evans, M.J. Christie, Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance, *Pharmacol Rev* 65 223-254.
- [92] M. Connor, P.B. Osborne, M.J. Christie, Mu-opioid receptor desensitization: is morphine different?, *Br J Pharmacol* 143 (2004) 685-696.
- [93] M. von Zastrow, Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway, *Life Sci* 74 (2003) 217-224.
- [94] J. Garzon, J.L. Juarros, M.A. Castro, P. Sanchez-Blazquez, Antibodies to the cloned mu-opioid receptor detect various molecular weight forms in areas of mouse brain, *Mol Pharmacol* 47 (1995) 738-744.
- [95] Y. Feng, X. He, Y. Yang, D. Chao, L.H. Lazarus, Y. Xia, Current research on opioid receptor function, *Curr Drug Targets* 13 230-246.
- [96] M. Busch-Dienstfertig, C. Stein, Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain--basic and therapeutic aspects, *Brain Behav Immun* 24 683-694.
- [97] A. Gupta, J. Mulder, I. Gomes, R. Rozenfeld, I. Bushlin, E. Ong, M. Lim, E. Maillet, M. Junek, C.M. Cahill, T. Harkany, L.A. Devi, Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration, *Sci Signal* 3 ra54.
- [98] Y. Shang, M. Filizola, Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling, *Eur J Pharmacol* 763 206-213.
- [99] J.N. Mehrishi, I.H. Mills, Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man, *Clin Immunol Immunopathol* 27 (1983) 240-249.
- [100] B.M. Sharp, M.D. Li, S.G. Matta, K. McAllen, N.A. Shahabi, Expression of delta opioid receptors and transcripts by splenic T cells, *Ann N Y Acad Sci* 917 (2000) 764-770.
- [101] B. Miller, delta opioid receptor expression is induced by concanavalin A in CD4<sup>+</sup> T cells, *J Immunol* 157 (1996) 5324-5328.
- [102] A.G. Karaji, N. Khansari, B. Ansary, A. Dehpour, Detection of opioid receptors on murine lymphocytes by indirect immunofluorescence: mature normal and tumor bearing mice lymphocytes, *Int Immunopharmacol* 5 (2005) 1019-1027.
- [103] H. Kiefer, A.J. Blume, H.R. Kaback, Membrane potential changes during mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980) 2200-2204.
- [104] R. Palacios, Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation, *J Immunol* 128 (1982) 337-342.
- [105] M. Jaume, S. Laffont, E. Chapey, C. Blanpied, G. Dietrich, Opioid receptor blockade increases the number of lymphocytes without altering T cell response in draining lymph nodes in vivo, *J Neuroimmunol* 188 (2007) 95-102.

- [106] R.A. Houghtling, R.D. Mellon, R.J. Tan, B.M. Bayer, Acute effects of morphine on blood lymphocyte proliferation and plasma IL-6 levels, *Ann N Y Acad Sci* 917 (2000) 771-777.
- [107] A. Odunayo, J.R. Dodam, M.E. Kerl, A.E. DeClue, Immunomodulatory effects of opioids, *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 20 376-385.
- [108] L. Zhang, J.S. Belkowski, T. Briscoe, T.J. Rogers, Regulation of mu opioid receptor expression in developing T cells, *J Neuroimmune Pharmacol* 7 835-842.
- [109] S. Suzuki, L.F. Chuang, R.H. Doi, R.Y. Chuang, Identification of opioid-regulated genes in human lymphocytic cells by differential display: upregulation of Kruppel-like factor 7 by morphine, *Exp Cell Res* 291 (2003) 340-351.
- [110] S.M. Belkowski, C. Alicea, T.K. Eisenstein, M.W. Adler, T.J. Rogers, Inhibition of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synthesis following treatment of macrophages with the kappa opioid agonist U50, 488H, *J Pharmacol Exp Ther* 273 (1995) 1491-1496.
- [111] C. Alicea, S.M. Belkowski, J.K. Sliker, J. Zhu, L.Y. Liu-Chen, T.K. Eisenstein, M.W. Adler, T.J. Rogers, Characterization of kappa-opioid receptor transcripts expressed by T cells and macrophages, *J Neuroimmunol* 91 (1998) 55-62.
- [112] M.D. Li, K. McAllen, B.M. Sharp, Regulation of delta opioid receptor expression by anti-CD3-epsilon, PMA, and ionomycin in murine splenocytes and T cells, *J Leukoc Biol* 65 (1999) 707-714.
- [113] L.E. McCarthy, J.F. Nitsche, J.E. Pintar, T.J. Rogers, The delta-opioid receptor participates in T-cell development by promoting negative selection, *J Neuroimmunol* 153 (2004) 91-98.
- [114] N.A. Shahabi, K. McAllen, B.M. Sharp, delta opioid receptors stimulate Akt-dependent phosphorylation of c-jun in T cells, *J Pharmacol Exp Ther* 316 (2006) 933-939.
- [115] D. Yin, D. Tuthill, R.A. Mufson, Y. Shi, Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression, *J Exp Med* 191 (2000) 1423-1428.
- [116] D. Yin, R.A. Mufson, R. Wang, Y. Shi, Fas-mediated cell death promoted by opioids, *Nature* 397 (1999) 218.
- [117] S.V. Gein, Dynorphins in regulation of immune system functions, *Biochemistry (Mosc)* 79 397-405.
- [118] V.C. Yu, S. Eiger, D.S. Duan, J. Lameh, W. Sadee, Regulation of cyclic AMP by the mu-opioid receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *J Neurochem* 55 (1990) 1390-1396.
- [119] J. Wang, R.A. Barke, R. Charboneau, H.H. Loh, S. Roy, Morphine negatively regulates interferon-gamma promoter activity in activated murine T cells through two distinct cyclic AMP-dependent pathways, *J Biol Chem* 278 (2003) 37622-37631.
- [120] Z. Zhang, S.M. Xin, G.X. Wu, W.B. Zhang, L. Ma, G. Pei, Endogenous delta-opioid and ORL1 receptors couple to phosphorylation and activation of p38 MAPK in NG108-15 cells and this is regulated by protein kinase A and protein kinase C, *J Neurochem* 73 (1999) 1502-1509.
- [121] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193 (1951) 265-275.
- [122] K. Cechova, Funkcni aktivita opioidnich receptoru v membranovych domenach, *INSTITUTE OF PHYSIOLOGY CAS vol. bc., Charles University, Prague, 2014, p. 43.*
- [123] S. Kasai, H. Yamamoto, E. Kamegaya, G.R. Uhl, I. Sora, M. Watanabe, K. Ikeda, Quantitative Detection of micro Opioid Receptor: Western Blot Analyses Using micro Opioid Receptor Knockout Mice, *Curr Neuropharmacol* 9 219-222.
- [124] A.I. Persson, T. Thorlin, P.S. Eriksson, Comparison of immunoblotted delta opioid receptor proteins expressed in the adult rat brain and their regulation by growth hormone, *Neurosci Res* 52 (2005) 1-9.

- [125] L.W. Fan, L.T. Tien, S. Tanaka, T. Ma, N. Chudapongse, S. Sinchaisuk, R.W. Rockhold, I.K. Ho, Changes in the brain kappa-opioid receptor levels of rats in withdrawal from physical dependence upon butorphanol, *Neuroscience* 121 (2003) 1063-1074.
- [126] J. Andersson, G. Moller, O. Sjoberg, B lymphocytes can be stimulated by concanavalin A in the presence of humoral factors released by T cells, *Eur J Immunol* 2 (1972) 99-101.
- [127] C. Hawrylowitz, Activation and proliferation signals in mouse B cells, *Immunology*, vol. 53, 1984.
- [128] J.M. Bidlack, M. Khimich, A.L. Parkhill, S. Sumagin, B. Sun, C.M. Tipton, Opioid receptors and signaling on cells from the immune system, *J Neuroimmune Pharmacol* 1 (2006) 260-269.
- [129] L. Guan, T.K. Eisenstein, M.W. Adler, T.J. Rogers, Inhibition of T cell superantigen responses following treatment with the kappa-opioid agonist U50,488H, *J Neuroimmunol* 75 (1997) 163-168.
- [130] D.F. Albertini, E. Anderson, Microtubule and microfilament rearrangements during capping of concanavalin A receptors on cultured ovarian granulosa cells, *J Cell Biol* 73 (1977) 111-127.
- [131] G.M. Edelman, I. Yahara, J.L. Wang, Receptor mobility and receptor-cytoplasmic interactions in lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (1973) 1442-1446.
- [132] J. Varani, J.A. Wass, K.M. Rao, Actin changes in normal human and rat leukocytes and in transformed human leukocytic cells, *J Natl Cancer Inst* 70 (1983) 805-809.
- [133] J. Condeelis, Isolation of concanavalin A caps during various stages of formation and their association with actin and myosin, *J Cell Biol* 80 (1979) 751-758.
- [134] J. Barlic, J.D. Andrews, A.A. Kelvin, S.E. Bosinger, M.E. DeVries, L. Xu, T. Dobransky, R.D. Feldman, S.S. Ferguson, D.J. Kelvin, Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1, *Nat Immunol* 1 (2000) 227-233.
- [135] A.M. Fong, R.T. Premont, R.M. Richardson, Y.R. Yu, R.J. Lefkowitz, D.D. Patel, Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 7478-7483.
- [136] A.J. Gorski, B. Dupont, J.A. Hansen, R.A. Good, Leukocyte migration inhibitory factor (LMIF) induced by concanavalin A: standardized microassay for production in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (1975) 3197-3200.
- [137] L. McCarthy, I. Szabo, J.F. Nitsche, J.E. Pintar, T.J. Rogers, Expression of functional mu-opioid receptors during T cell development, *J Neuroimmunol* 114 (2001) 173-180.
- [138] J. Harris, D. Werling, M. Koss, P. Monaghan, G. Taylor, C.J. Howard, Expression of caveolin by bovine lymphocytes and antigen-presenting cells, *Immunology* 105 (2002) 190-195.
- [139] F.A. Medina, T.M. Williams, F. Sotgia, H.B. Tanowitz, M.P. Lisanti, A novel role for caveolin-1 in B lymphocyte function and the development of thymus-independent immune responses, *Cell Cycle* 5 (2006) 1865-1871.
- [140] H. Feng, L. Guo, Z. Song, H. Gao, D. Wang, W. Fu, J. Han, Z. Li, B. Huang, X.A. Li, Caveolin-1 protects against sepsis by modulating inflammatory response, alleviating bacterial burden, and suppressing thymocyte apoptosis, *J Biol Chem* 285 25154-25160.
- [141] S. Lin, X.M. Wang, P.E. Nadeau, A. Mergia, HIV infection upregulates caveolin 1 expression to restrict virus production, *J Virol* 84 9487-9496.
- [142] S.B. Gaudreault, J.F. Blain, J.P. Gratton, J. Poirier, A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity, *J Neurochem* 92 (2005) 831-839.
- [143] B.P. Head, H.H. Patel, D.M. Roth, N.C. Lai, I.R. Niesman, M.G. Farquhar, P.A. Insel, G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes, *J Biol Chem* 280 (2005) 31036-31044.

- [144] M.A. del Pozo, N. Balasubramanian, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, A. Grande-Garcia, R.G. Anderson, M.A. Schwartz, Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization, *Nat Cell Biol* 7 (2005) 901-908.
- [145] K. Ohnuma, T. Yamochi, M. Uchiyama, K. Nishibashi, N. Yoshikawa, N. Shimizu, S. Iwata, H. Tanaka, N.H. Dang, C. Morimoto, CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 14186-14191.
- [146] J. Millan, L. Hewlett, M. Glyn, D. Toomre, P. Clark, A.J. Ridley, Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains, *Nat Cell Biol* 8 (2006) 113-123.
- [147] X. Li, X. Gu, T.M. Boyce, M. Zheng, A.M. Reagan, H. Qi, N. Mandal, A.W. Cohen, M.C. Callegan, D.J. Carr, M.H. Elliott, Caveolin-1 increases proinflammatory chemoattractants and blood-retinal barrier breakdown but decreases leukocyte recruitment in inflammation, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55 6224-6234.
- [148] E.M. Khan, J.M. Heidinger, M. Levy, M.P. Lisanti, T. Ravid, T. Goldkorn, Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking, *J Biol Chem* 281 (2006) 14486-14493.
- [149] B.P. Head, P.A. Insel, Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae?, *Trends Cell Biol* 17 (2007) 51-57.
- [150] P.A. Insel, M.E. Maguire, A.G. Gilman, H.R. Bourne, P. Coffino, K.L. Melmon, Beta adrenergic receptors and adenylate cyclase: products of separate genes?, *Mol Pharmacol* 12 (1976) 1062-1069.
- [151] C. Tran, C.M. Stary, J.M. Schilling, B. Bentley, H.H. Patel, D.M. Roth, Role of caveolin-3 in lymphocyte activation, *Life Sci* 121 35-39.
- [152] P. Kirchner, M. Bug, H. Meyer, Ubiquitination of the N-terminal region of caveolin-1 regulates endosomal sorting by the VCP/p97 AAA-ATPase, *J Biol Chem* 288 7363-7372.
- [153] J. Thyberg, Caveolin-1 and caveolae act as regulators of mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003) 1481-1483.
- [154] P. Gargalovic, L. Dory, Cellular apoptosis is associated with increased caveolin-1 expression in macrophages, *J Lipid Res* 44 (2003) 1622-1632.
- [155] P.A. Insel, B.P. Head, H.H. Patel, D.M. Roth, R.A. Bunday, J.S. Swaney, Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae, *Biochem Soc Trans* 33 (2005) 1131-1134.
- [156] C. Borner, R. Stumm, V. Holtt, J. Kraus, Comparative analysis of mu-opioid receptor expression in immune and neuronal cells, *J Neuroimmunol* 188 (2007) 56-63.
- [157] J. Kraus, C. Borner, U. Lendeckel, V. Holtt, Interferon-gamma down-regulates transcription of the mu-opioid receptor gene in neuronal and immune cells, *J Neuroimmunol* 181 (2006) 13-18.
- [158] T.K. Eisenstein, M.E. Hilburger, Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations, *J Neuroimmunol* 83 (1998) 36-44.
- [159] J.J. Lackman, P.M. Markkanen, M. Hogue, M. Bouvier, U.E. Petaja-Repo, N-Glycan-dependent and -independent quality control of human delta opioid receptor N-terminal variants, *J Biol Chem* 289 17830-17842.
- [160] P. Huang, C. Chen, S.D. Mague, J.A. Blendy, L.Y. Liu-Chen, A common single nucleotide polymorphism A118G of the mu opioid receptor alters its N-glycosylation and protein stability, *Biochem J* 441 (2012) 379-386.
- [161] T.M. Cho, J. Hasegawa, B.L. Ge, H.H. Loh, Purification to apparent homogeneity of a mu-type opioid receptor from rat brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 4138-4142.
- [162] J.E. Schultz, E. Rose, Z. Yao, G.J. Gross, Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts, *Am J Physiol* 268 (1995) H2157-2161.

- [163] P. Sobanski, M. Krajnik, M. Shaqura, E. Bloch-Boguslawska, M. Schafer, S.A. Mousa, The presence of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors in human heart tissue, *Heart Vessels* 29 855-863.
- [164] K. Tanaka, J.R. Kersten, M.L. Riess, Opioid-induced cardioprotection, *Curr Pharm Des* 20 5696-5705.
- [165] S. Treskatsch, A. Feldheiser, M. Shaqura, L. Dehe, H. Habazettl, T.K. Ropke, M. Shakibaei, M. Schafer, C.D. Spies, S.A. Mousa, Cellular localization and adaptive changes of the cardiac delta opioid receptor system in an experimental model of heart failure in rats, *Heart Vessels* 31 241-250.
- [166] J.J. Schultz, A.K. Hsu, G.J. Gross, Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart, *J Mol Cell Cardiol* 29 (1997) 2187-2195.
- [167] J.J. Schultz, A.K. Hsu, G.J. Gross, Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart, *J Mol Cell Cardiol* 29 (1997) 1355-1362.
- [168] R. Li, G.T. Wong, T.M. Wong, Y. Zhang, Z. Xia, M.G. Irwin, Intrathecal morphine preconditioning induces cardioprotection via activation of delta, kappa, and mu opioid receptors in rats, *Anesth Analg* 108 (2009) 23-29.
- [169] D.K. Sarkar, A. Sengupta, C. Zhang, N. Boyadjieva, S. Murugan, Opiate antagonist prevents mu- and delta-opiate receptor dimerization to facilitate ability of agonist to control ethanol-altered natural killer cell functions and mammary tumor growth, *J Biol Chem* 287 16734-16747.



