

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studium v biomedicíně

Studijní obor: Farmakologie a toxikologie



**Mgr. Petr Škopek**

**Vliv stresu na expresi některých neuropeptidů  
a jejich receptorů v srdci a CNS,  
za využití biochemických a imunofluorescenčních postupů**

**Effect of stress on the expression of some neuropeptides and their receptors  
in the heart and CNS, by using biochemical and immunofluorescent procedures**

Disertační práce

**Školitel: Doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.**

**Konzultant: Prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.**

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17. 5. 2013

Petr Škopek

**Identifikační záznam:**

ŠKOPEK, Petr. *Vliv stresu na expresi některých neuropeptidů a jejich receptorů v srdci a CNS, za využití biochemických a imunofluorescenčních postupů. [Effect of stress on the expression of some neuropeptides and their receptors in the heart and CNS, by using biochemical and immunofluorescent procedures]*. Praha, 2013. 138 stran.  
Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Laboratoř neurofarmakologie ÚLBD 1. LF UK. Školitel: Doc.MUDr.Věra Klenerová,DrSc.

## **Poděkování**

Mé upřímné poděkování patří zejména mé školitelce Doc. MUDr. Věře Klenerové, DrSc. za profesionální přístup, trpělivé vedení, cenné rady, odborné informace a všestrannou pomoc nejen při řešení mé disertační práce, ale také po celou dobu mého doktorského studia.

Dále bych rád vyjádřil hluboké poděkování panu Prof. MUDr. Sixtovi Hynie, DrSc., konzultantovi disertace, za jeho podporu, pomoc a podněty při přípravě práce i po celou dobu mého studia.

Rád bych poděkoval přednostovi ÚLBLD panu Prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc., MBA, za vytvoření optimálních pracovních podmínek a umožnění postgraduálního studia na jeho pracovišti.

Můj vřelý dík patří i panu Prof. MUDr. Stanislavu Štípkovi, DrSc., přednostovi ÚLB za jeho podporu po celou dobu mého studia a také za zájem projevovaný při osobních setkáních.

Všem spolupracovníkům Laboratoře neurofarmakologie děkuji za vytvoření krásné pracovní atmosféry a za veškerou poskytnutou pomoc a podporu.

Nemalý dík patří i mé manželce, MUDr. M. Škopkové, za trpělivost a laskavost, s kterou přijímala mé pracovní vytížení.

## SOUHRN

**Úvod a cíl:** Studium neuropeptidů se stalo centrem zájmu pro rozsáhlé periferní a centrální regulační/modulační účinky, a pro možné terapeutické využití. Naše laboratoř se zabývá studiem oxytocinu (OT) a jeho analogů za fyziologického stavu a po působení stresu, od změn na molekulární a buněčné úrovni, až po změny chování. Cílem této práce bylo studium centrální regulační úlohy OT a jeho analogů, spolu s nově objevenými neuropeptidy galaninem (Gal) a galanin like peptidem (GalLP) v hypofýze. OT byl nově zařazen mezi kardiovaskulární hormony a dalším cílem bylo také studium OT, Gal, GalLP a jejich receptorů v srdci za fyziologických podmínek a po stresu. Centrální účinky těchto peptidů jsme testovali behaviorálními studii. Cílem byla rovněž syntéza OT, Gal a jejich analogů a chimérické molekuly OT s fluorescenčním markerem.

**Metody:** Vypracovali jsme nové metody fluorescenčního stanovení exprese neuropeptidů a jejich receptorů, metodu Western blot a metodu kvantitativního RT qPCR k určení exprese mRNA sledovaných genů. Pro určení centrálních účinků galaninu jsme aplikovali behaviorální testy. Byl použit animální model akutního stresu pravidelně používaný naším pracovištěm. V naší laboratoři syntetizované peptidy a chiméra oxytocinu s fluorescenčním markerem umožnily experimenty, které by byly jinak finančně nedostupné.

**Výsledky:** Prokázali jsme protistresové a anxiolytické účinky po systémovém podání Gal. Ve všech oddílech hypofýzy jsme jako první v literatuře provedli komplexní identifikaci exprese mRNA a genovou expresi Gal, GalLP a tří Gal receptorových subtypů a jejich kolokalizaci s neuronální tkání a pituicyty, za fyziologického stavu a po stresu. V adenohipofýze jsme identifikovali kolokalizaci Gal, GalLP a jejich receptorů s ACTH a v neurohypofýze s OT a vasopresinem. V srdci jsme prokázali existenci oxytocinového a galaninergního systému a změny v expresi mRNA OTR a expresi jeho genu po stresu. Dále jsme našli přesun OTR z plazmatické membrány do jádra kardiomyocytu. Prokázali jsme funkčnost chiméry OT jako vazebného ligandu, kterou lze využít pro identifikaci OTR místo specifických protilátek.

**Závěry:** Prokázali jsme protistresový a anxiolytický účinek Gal s perspektivou terapeutického využití. Jako první jsme provedli komplexní studii o výskytu Gal systému v hypofýze a v srdci za fyziologických podmínek a za stresu. Za unikátní výsledek považujeme průkaz přestupu OTR z plazmatické membrány do jader kardiomyocytů. Vlastní syntéza sledovaných peptidů a chiméry OT s fluorescenčním markerem umožnila behaviorální a vazebné studie.

**Práce byla podpořena následujícími granty:** PRVOUK25/LF1/2, GAUK 85210, SVV 266505, SVV 262502, SVV 264514, MSM 0021620806.

**Klíčová slova:** neuropeptidy, oxytocin, galanin, galanin like peptid, receptory spřažené s G-proteiny, potkan, stres, srdce, hypofýza.

## ABSTRACT

**Introduction and aim:** Investigation of neuropeptides became in the center of research activities due to extensive peripheral and central modulatory effects of these peptides and due to their possible therapeutic use. Our laboratory is involved in the study of oxytocin (OT) and its analogs under physiological state and under stress, our studies ranged from the molecular-biological to behavioral studies. The aim of this work was the study of central regulatory role of OT and its analogs together with newly discovered neuropeptides galanin and galanin like peptide in the hypophysis. Recently, OT was included into the cardiovascular hormones. The aim of this work was also the study of OT, Gal, GalLP and their receptors in the heart under physiological state and under stress. Central effects of neuropeptides we tested in the behavioral studies. Another aim was synthesis of Gal, GalLP and its analogs and chimeric molecule of oxytocin with fluorescent marker.

**Methods:** We elaborated methods for immunofluorescent estimation of expression of neuropeptides and their receptors, Western blot procedure and method of RT qPCR for the expression of mRNA of estimated genes. We used behavioral tests to detect central effects of peptides. We used acute stress developed in our lab. Peptides and chimera with OT-fluorescent marker, synthesized in our laboratory, allow experiments that would otherwise be unaffordable.

**Results:** We have shown antistress and anxiolytic effects after systemic administration of Gal. In all sections of pituitary we identified mRNA and gene expression of Gal, GalLP and three GalR subtypes and their colocalization with neuronal tissues and pituicytes under physiological condition and after stress. In anterior pituitary we identified colocalization of Gal, GalLP and their receptors with ACTH and in posterior pituitary with OT and AVP. In the heart, we have demonstrated the existence of OT and Gal systems and changes in mRNA expression of OTR and expression of its genes after stress. We found the movement of OTR from the plasma membrane to the nuclei. We have demonstrated the functionality of a chimera OT as a binding ligand that can be used to identify OTR instead of specific antibodies.

**Conclusion:** We have shown antistress and anxiolytic effect of galanin with the perspective of therapeutic uses. We first performed a comprehensive study on the prevalence galaninergic system in the pituitary and in the heart under physiological conditions and stress. For unique result is regarded OTR translocation from the plasma membrane to the nuclei of cardiomyocytes. Our synthesis investigated neuropeptides and OT chimeric molecule with fluorescent marker enabled behavioral and binding studies.

**Supported by:** PRVOUK25/LF1/2, GAUK 85210, SVV 266505, SVV 262502, SVV 264514, MSM 0021620806.

**Keywords:** Oxytocin, galanin, galanin like peptide, G-protein coupled receptors, rat, stress, heart, pituitary, chimeric molecule.



|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.3.     | Western blot .....   | 45 |
| 3.3.1.   | Příprava homogenátu tkáně .....  | 46 |
| 3.3.2.   | Elektroforéza .....  | 46 |
| 3.3.3.   | Blotování .....  | 46 |
| 3.3.4.   | Detekce cílového proteinu .....  | 46 |
| 3.3.5.   | Vyhodnocení Western blotu .....  | 47 |
| 3.4.     | Stanovení exprese mRNA .....   | 48 |
| 3.4.1.   | Izolace celkové mRNA .....   | 48 |
| 3.4.2.   | Primery .....  | 49 |
| 3.4.3.   | Kvantitativní real time qPCR reakce .....  | 49 |
| 3.4.4.   | Kvantifikace .....   | 49 |
| 3. 8.    | Behaviorální studie .....  | 51 |
| 3.8.1.   | Test v otevřeném poli .....  | 51 |
| 3.8.2.   | Test vyvýšeného bludiště .....   | 51 |
| 4.       | VÝSLEDKY .....   | 52 |
| 4. 1.    | Behaviorální studie .....  | 53 |
| 4. 2.    | Neuropeptidy v srdci .....   | 58 |
| 4.2.1.   | Oxytocinový systém .....   | 58 |
| 4.2.1.1. | Exprese mRNA OTR za fyziologických podmínek .....                                | 58 |
| 4.2.1.2. | Imunohistochemická detekce OTR za fyziologických podmínek.....                   | 61 |
| 4.2.1.3. | Exprese mRNA po aplikaci stresu .....  | 67 |
| 4.2.1.4. | Imunohistochemická detekce OTR po aplikaci stresu .....                          | 69 |
| 4.2.2.   | Atriální natriuretický peptid .....  | 70 |
| 4.2.2.1. | Imunohistochemická detekce ANP za fyziologických podmínek .....                  | 70 |
| 4.2.2.2. | Imunohistochemická detekce ANP za stresu..                                       | 71 |
| 4.2.3.   | Galaninergní systém .....  | 72 |
| 4.2.3.1. | Imunohistochemická detekce galaninu za fyziologických podmínek .....             | 73 |
| 4.2.3.2. | Imunohistochemická detekce galanin like peptidu za fyziologických podmínek ..... | 74 |
| 4.2.3.3. | Galaninové receptorové subtypy .....   | 75 |
| 4. 3.    | Neuropeptidy v hypofýze .....  | 79 |
| 4.3.1.   | Imunohistochemická detekce za fyziologického stavu...                            | 79 |



|  |            |
|--|------------|
| <b>4. 4. Neuropeptidy v adenohypofýze .....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>4.4.1. Galaninerní systém .....</b>   | <b>83</b>  |
| <b>4.4.1.1. Imunohistochemická detekce galaninu a galanin like peptidu za fyziologického stavu, určení kolokalizace s nervovou tkání.....</b>                      | <b>83</b>  |
| <b>4.4.1.2. Imunohistochemická detekce galaninerních receptorových subtypů za fyziologických podmínek .....</b>  | <b>84</b>  |
| <b>4.4.2. Kolokalizační studie .....</b>   | <b>86</b>  |
| <b>4.4.3. Expres proteinů a exprese mRNA galaninerního systému a po aplikaci stresu .....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>4. 5. Neuropeptidy v neurohypofýze .....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>4.5.1. Detekce exprese mRNA galaninu, galanin like peptidu a jejich receptorů metodou real time qPCR v neurohypofýze za fyziologického stavu a po stresu ..</b> | <b>94</b>  |
| <b>4.5.2. Imunohistochemická detekce vybraných součástí galaninerního systému sledovaná v neurohypofýze za fyziologického stavu.....</b>                           | <b>96</b>  |
| <b>4.5.3. Kolokalizační studie s oxytocinem a vasopresinem .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>4.5.3.1. Určení kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s oxytocinem za použití elektronové mikroskopie .....</b>  | <b>107</b> |
| <b>4.5.4. Detekce exprese galaninu, galanin like peptidu a jejich receptorů v SON a neurohypofýze po stresu.....</b>   | <b>109</b> |
| <b>4.5.4.1. Výsledky stres SON .....</b>   | <b>109</b> |
| <b>4.5.4.2. Působení stresu na galaninové receptorové subtypy v neurohypofýze .....</b>  | <b>111</b> |
| <b>5. DISKUSE.....</b>   | <b>113</b> |
| <b>6. ZÁVĚRY .....</b>   | <b>126</b> |
| <b>7. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>   | <b>128</b> |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|          |   |
|----------|---|
| A488     | Alexa Fluor 488   |
| A546     | Alexa Fluor 546   |
| A633     | Alexa Fluor 633   |
| AC       | Adenylylcykláza   |
| ACTH     | Adrenokortikotropní hormon  |
| AH       | Adenohypofýza   |
| ANP      | Atriální natriuretický peptid                                       |
| ARC      | Activity-regulated cytoskeleton-associated protein, raný gen        |
| ATP      | Adenosintrifosfát   |
| AVP      | Arginin vasopresin  |
| BBB      | Blood Brain Barrier, mozkomíšní bariéra, hematoencefalická bariéra  |
| BSA      | Albumin z hovězího séra   |
| CMD      | Vzdálenost v centrální části OF                                     |
| EPM      | Elevated plus maze, Vyvýšené křížové bludiště                       |
| CRH, CRF | Kortikotropin uvolňující hormon                                     |
| DAB      | 3,3'-diaminobenzidin  |
| DAPI     | 4',6-diaminidno-2-fenylindol  |
| DDAVP    | Desmopresin   |
| DTT      | Dithitritol   |
| ER       | Epitope Retrieval, odmaskování epitopů                              |
| EPM      | Vyvýšené křížové bludiště   |
| Gal      | Galanin   |
| GallP    | Galanin like peptid   |
| GalR1    | Galaninový receptor subtyp 1  |
| GalR2    | Galaninový receptor subtyp 2  |
| GalR3    | Galaninový receptor subtyp 3  |
| GFAP     | Glial Fibrillary Acidic Protein, Gliální marker                     |
| HEK 293  | Human Embryonic Kidney 293<br>Buněčná linie ledviny lidského embrya |
| HPA osa  | Hypotalamo-hypofýzo-adrenální osa                                   |
| IF       | Imunofluorescence   |

|            |                                       |
|------------|---------------------------------------|
| IHC        | Imunohistochemie                      |
| IL         | Intermediální lalok hypofýzy          |
| IMO, IS    | Imobilizační stres                    |
| IMO+C, ICS | Imobilizační stres + ponoření do vody |
| LE         | Lewis - kmen potkanů                  |
| LK         | Levá komora                           |
| LS         | Levá síň                              |
| LVP        | Lysin vasopresin                      |
| NH         | Neurohypofýza                         |
| OF         | Open field, Otevřené pole             |
| OT         | Oxytocin                              |
| OTR        | Oxytocinový receptor                  |
| PBS        | Fosfátový pufr s NaCl                 |
| PFA        | Paraformaldehyd                       |
| PK         | Pravá komora                          |
| PLC        | Fosfolipáza C                         |
| PS         | Pravá síň                             |
| PP         | Primární protilátka                   |
| SD         | Sprague Dawley – kmen potkanů         |
| SDS        | Dodecylsulfát sodný                   |
| SHR        | Spontánně hypertenzní potkan          |
| SON        | Supraoptické jádro                    |
| SP         | Sekundární protilátka                 |
| TMD        | Celková uběhlá vzdálenost v OF        |
| WB         | Western Blot                          |

## Seznam publikací Mgr. P. Škopka se vztahem k dizertaci

### a) s impakt faktorem

**Škopek P.**, Hynie S., Chottova-Dvorakova M., Sida P., Klenerova V. Effects of acute stressors on the expression of oxytocin receptor mRNA in hearts of rats with different activity of HPA axis. *Neuroendocrinology Letters* 33: 124-132, 2012.

**IF: 1,404**

Jurasek M., Flegel M., **Škopek P.**, Flegelova, Z., Drasar P., Hynie S., Klenerova, V. Peptide-steroids chimeras synthesis and visualization of their binding to the rat brain slices. *Journal of Peptide Science* 18 (S1): S123, 2012.

**IF: 1,799**

Klenerova V., Flegel M., **Škopek P.**, Sida P., Hynie S. Galanin modulating effect on restraint stress-induced short- and long-term behavioral changes in Wistar rats. *Neuroscience Letters* 502: 147-151, 2011.

**IF: 2,055**

Klenerova V., Chottova-Dvorakova M., **Škopek P.**, Sida P., Mistrova E., Slavikova J., Hynie S. Expression of heart oxytocin receptor and its mRNA in two rat strains with different activity of HPA axis. *Neuroendocrinology Letters* 32: 101-106, 2011.

**IF: 1,404**

Další tři publikace s výsledky o galaninergním systému jsou připraveny do tisku v časopisech s impakt faktorem.

### b) bez impakt faktoru

**Škopek P.**, Hynie S., Šída P., Klenerová V. Galanin a jeho receptorové subtypy v neurohypofýze za fyziologických podmínek a za stresu pomocí fluorescenčního zobrazení. *Psychiatrie* 17 (S1): 53, 2013.

Hynie S., Dzúr-Gejdošová M., Šída P. **Škopek P.**, Klenerová V. Studium neuropeptidu galaninu v neurohypofýze pomocí exprese mRNA galaninu a galaninových receptorových subtypů. *Psychiatrie* 17 (S1): 52-53, 2013.

Jurasek M., **Škopek P.**, Flegel M., Flegelova Z., Drasar P., Lebl M., Kraus T., Hynie S., Klenerova V. Synthesis of oxytocin-steroid chimeric molecule and its visualization on the rat uterus slices. *Proceedings of 32nd European Peptide Symposium*. Atheny. 2012.

**Škopek P.**, Dzúr-Gejdošová M., Hynie S., Klenerová V. Neuropeptide oxytocin is also synthesized in the heart under basal as well as stress conditions and functions as a new cardiovascular hormone. 9th International Medical Postgraduate Conference, New Frontiers in the Research of PhD Students: 86-89, 2012.

**Škopek P.**, Hynie S., Šída P., Klenerová V. Neuropeptid oxytocin i hormon produkovaný v srdci ovlivňují stejné myokardiální oxytocinové receptory. *Psychiatrie* 16 (S1): 50, 2012.

Šída P., Klenerová V., **Škopek P.**, Hynie S. Chování potkanů v otevřeném poli po parenterální aplikaci galaninu a jeho nepeptidového analogu galnonu. *Psychiatrie* 16 (S1): 53-54, 2012.

**Škopek P.**, Džúr-Gejdošová M., Hynie S., Klenerová V. Nový kardiovaskulární hormon oxytocin má regulační úlohu v myokardu za bazálních podmínek i po akutním stresu. 13. studentská vědecká konference 1. LF UK v Praze: 40, 2012.

**Škopek P.**, Džúr-Gejdošová M., Hynie S., Klenerová V. Nový kardiovaskulární hormon oxytocin má regulační úlohu v myokardu za bazálních podmínek i po akutním stresu. 13. studentská vědecká konference 1. LF UK v Praze: 87-89, 2012.

**Skopek P.**, Hynie S., Klenerova V. Behavioral effects of galanin in stressed rats and participation of its receptor subtypes. *Proceedings of 18-th International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference (North America) "Stress and Behavior"*: p.15, New Orleans, USA, 2012.

**Škopek P.**, Džúr-Gejdošová M., Hynie S., Šída P., Klenerová V. Imunohistochemické stanovení podtypů galaninového receptoru v adenohipofýzách potkanů kmene Wistar u kontrol a po aplikaci imobilizačního stresu; korelace s expresí mRNA podtypů galaninových receptorů. *Psychiatrie* 15, (S1): 43-44, 2011.

**Škopek P.**, Džúr-Gejdošová M. Ovlivnění galaninových receptorových podtypů imobilizačním stresem; sledování mRNA exprese a imunohistochemicky detegovaných receptorů v adenohipofýze potkanů. 12. studentská vědecká konference 1. LF UK v Praze: 29, 2011.

**Skopek P.**, Hynie S., Klenerova V. Immunohistochemical detection of galanin receptor subtypes in adenohipophysis of Wistar rats; effects of acute restraint stress. Program No. 394.08. 2011 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2011. Online.

Klenerova V., Dzur-Gejdosova M., **Skopek P.**, Hynie S. Expression of mRNA of galanin receptor subtypes in adenohipophysis of Wistar rats in controls and after acute restraint stress. Program No. 394.07. 2011 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2011. Online.

**Skopek P.**, Hynie S., Sida P., Klenerova V. Effects of acute restraint stress on galanin receptor subtypes in adenohipophysis of rats. *Donders Discussions. A Conference for PhD Students in Cognition and neuroscience 2011*: 51-52, 2011.

**Skopek P.**, Vavra V., Zemkova H., Klenerova V. An attempt to detect oxytocin receptor in the rat brain using an antibody for human oxytocin receptor. Abstract book, Carolinum Prague: 35, 2010.

**Škopek P.** Imunohistochemické stanovení oxytocinových receptorů v jádrech hypotalamu potkana. 11. studentská vědecká konference 1. LF UK v Praze: 31, 2010.

## 1. ÚVOD

V posledních desetiletích stoupl zájem o studium neuropeptidů, u nichž byly prokázány jak periferní tak centrální účinky. Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá studiem neuroendokrinních regulací včetně účasti neuropeptidů za fyziologického stavu a za působení různých stresorů, od změn na molekulární a buněčné úrovni až po změny chování. Centrálním účinkům neuropeptidů a jeho analogů se tak přisuzuje stále větší úloha v patogenezi celé řady psychiatrických onemocnění, především s ohledem na jejich možné terapeutické využití. Další pozoruhodnou vlastností neuropeptidů a jejich analogů jsou jejich dlouhodobé behaviorální účinky. Stále jsou objevovány nové neuropeptidy, o nichž je však v literatuře jen nevelké množství údajů, jsou však velmi často protichůdné.

Nové nazírání na stres umožňuje využívat tento stav jako experimentální nástroj pro studium mozku a naopak nové poznatky umožňují hledání cílových struktur pro terapeutické a preventivní zákroky. Ukazuje se, že v současné době je nejvhodnější výzkum, který kombinuje přístup behaviorální s buněčným a molekulárním, se zaměřením na vztah mezi strukturou a funkcí mozku. Behaviorální studie potvrzují, zda sledovaný neuropeptid působí v CNS, zda proniká mozkomíšní bariérou po systémové aplikaci, zda má protistresový účinek a zda má sledovaný neuropeptid anxiolytický účinek.

Naše pracoviště se dlouhodobě zabývá studiem mechanismu účinku neurohormonů oxytocinu a vasopresinu, a dalších peptidů - kortikotropin uvolňujícího hormonu, galaninu, natriuretických peptidů, neuropeptidu S a jejich analogů, a to jak v CNS, tak v některých periferních tkáních (Hynie a Klenerová, 2010; Klenerova et al., 2011). Jsme zapojeni do výzkumu centrálních účinků neuropeptidů a jejich analogů, se zaměřením na oxytocin a v posledním období především na galaninergní systém.

Nejnověji byl oxytocin označen také jako kardiovaskulární hormon (Gutkowska et al., 2000). Byly prokázány jeho farmakologické účinky i jeho syntéza v myokardu, ale nebyly zde plně charakterizovány jeho receptory a jejich možná účast na stresové odpovědi. Zaměřili jsme se proto na průkaz jeho kardiovaskulárního působení a na charakteristiku změn oxytocinového systému v srdci a v hypotalamo-neuro-hypofysárním systému za fyziologických podmínek a za stresu.

Z těchto důvodů jsme sledovali produkci oxytocinu a expresi jeho receptorů v myokardu za pomoci určení exprese mRNA a určení exprese příslušných genů. Ke stanovení mRNA jsme použili kvantitativní real time qPCR a ke stanovení syntézy de novo sledovaných proteinů imunohistochemické metody a metodu Western blot. Expresi mRNA a expresi genů sledovaných neuropeptidů testujeme na různých úrovních hypotalamo-hypofýzo-adrenální (HPA) osy za fyziologického stavu a po aplikaci akutního stresu (Klenerová et al., 2003). V naší laboratoři byl vypracován dobře definovaný animální model akutního stresu s převahou emocionální resp. fyzické složky účinku (Klenerová et al., 2002; Klenerová et al., 2007).

## 1. 1. BEHAVIORÁLNÍ STUDIE

Neuropeptidy vasopresin (AVP) a oxytocin (OXY) vykazují nejen typické fyziologické periferní účinky, ale mají také důležitou centrální regulační úlohu jako neurotransmitery a neuromodulátory. Bylo u nich prokázáno, že moduluji řadu neurofyziologických fenoménů, jako chování, sociální cítění, učení, paměť, a ovlivňují stresové odpovědi. Behaviorální studie poskytují informaci o centrálním působení testovaných látek a využití antagonistů poskytuje důležitou informaci o zapojení příslušných receptorů a o možnosti jejich ovlivnění s terapeutickým využitím.

Centrální regulační úlohu AVP a OXY a jeho dlouhodobě působícího karba-analogu karbetocinu po systémové aplikaci jsme studovali u potkanů za fyziologických podmínek a po působení různých stresorů a výsledky z těchto experimentů byly publikovány v řadě časopisů (Klenerová et al., 2006; 2007; 2009a; 2009b; 2010; 2011a).

Centrální účinky oxytocinu (OT) byly objeveny později než jeho účinky periferní. V letošním roce bylo publikováno několik prací, sledujících možné terapeutické účinky oxytocinu, i po intranasálním podání nejen u potkanů, ale u lidí, které by mohly být využity v terapii výše zmíněných poruch (Wudarczyk et al., 2013; Davis et al., 2013; MacDonald a Feifel, 2013).

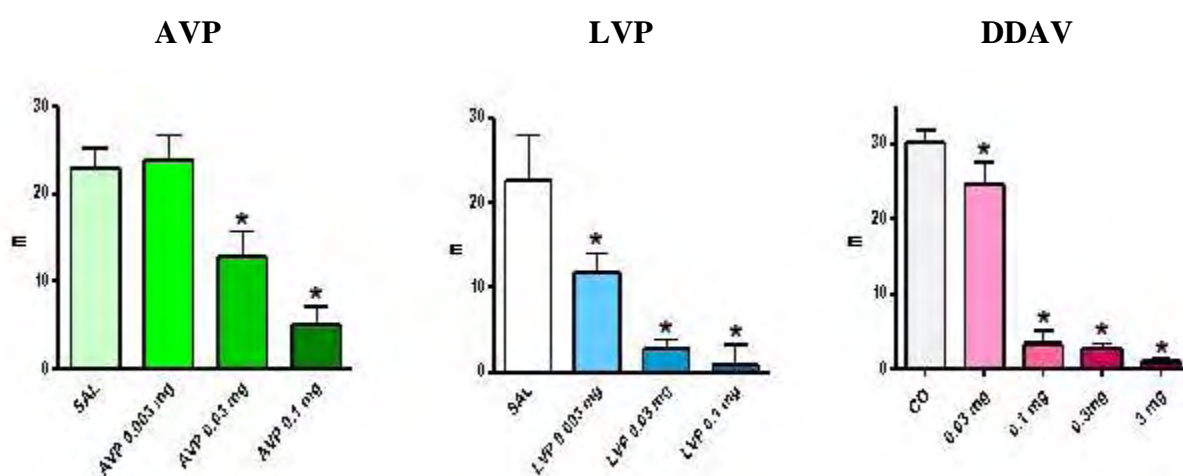
Do terapie byl zaveden také oxytocinový analog karbetocin (CT), který má prolongované účinky. O centrálních účincích tohoto analogu se ví relativně málo, přesto však byl označen za molekulu s anxiolytickými účinky, který má potenciální uplatnění v léčbě některých psychických poruch, včetně autismu. V našich předchozích pokusech jsme zjistili, že CT vykazuje protistresové účinky, a to i při parenterální aplikaci po proběhlém stresu.

Cílem této práce bylo zjistit v sérii pokusů sledujících opakovaně chování po stresu a stresu ovlivněného karbetocinem, zda dochází po jeho podání k adaptačním změnám v chování, které přetrvávají i bez jeho další aplikace.

Přestože peptidy málo pronikají mozkomíšní bariérou, naše laboratoř prokázala, že peptidy neurohypofýzy mají při systémové aplikaci významné behaviorální účinky. Sledovali jsme účinky jak vasopresinu a jeho analogů, tak účinky oxytocinu a jeho analogu karbetocinu. Oba přirozeně se vyskytující antidiuretické peptidy, AVP a LVP (lysin vasopresin), mají silný inhibiční účinek na spontánní explorační chování potkanů v otevřeném poli po systémové aplikaci. Na rozdíl od Tendise et al. (1987), kteří zjistili aktivační účinek na motorické chování po AVP a inhibiční účinek po LVP, v našich pokusech obě látky vykazovaly jen inhibiční účinky. AVP měl pozorovatelně vyšší účinnost než LVP, projevující se inhibicí



celkové horizontální explorační aktivity (TMD) a aktivity vertikální (rearing, data neuvedena). Účinky dávek vyšších než 0.1 mg nebyly už tolerovány pravděpodobně pro silný vasokonstrikční účinek. Desmopresin (DDAVP), s potlačenými presorickými účinky, vykazoval účinky podobné jako AVP a LVP, ale jeho efekty byly zhruba o 1 řád nižší. Dalším pozoruhodným rysem byla skutečnost, že zvířata vykazovala silnou inhibici explorační aktivity a přitom tolerovala dávky až 3 mg/kg. Obr. 1 ukazuje, že u vasopresinu tento jev nenacházíme. Test v OF opakovaný za 24 hod neprokázal u AVP, LVP a DDAVP přetrvávající efekt, ale naopak s dávkou se zvyšující inhibiční účinek explorační aktivity, na obrázku uveden jako příklad změn parametr TMD.



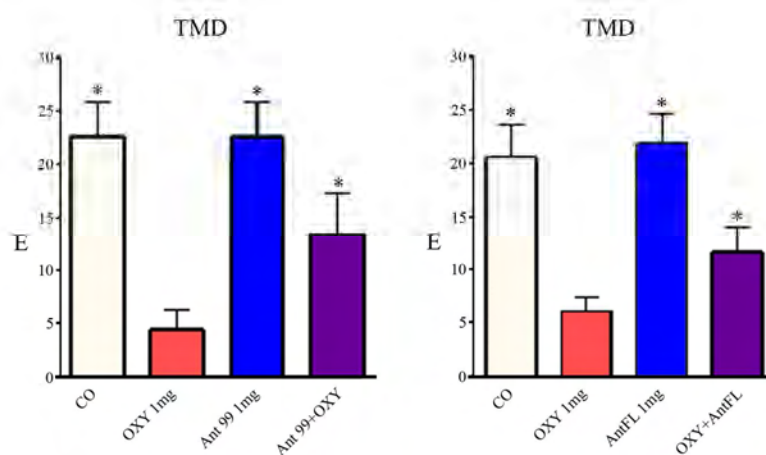
**Obr. 1. Horizontální explorační aktivita TMD u tří vasopresinových derivátů**

AVP, LVP a DDAVP. \*  $p < 0.05$  vs kontroly .

Vzhledem k tomu, že výše uvedené výsledky našich experimentů neprokázaly protistresové účinky u testovaného arginin vasopresinu, lysin vasopresinu, derivátu desmopresinu, ale naopak v závislosti na dávce behaviorální parametry snižovaly a měly prostresový efekt, v těchto pokusech jsme nepokračovali.

V dalších behaviorálních studiích jsme se zaměřili na druhý neurohormon oxytocin a jeho analog karbetocin. Testovali jsme v OF po i.p. podání oxytocin v dávce 1 mg, která však měla sedativní účinek, což odpovídá údajům z literatury (Uvnas-Moberg et al., 1994; Gimpl a Fahrenholz, 2001) a dávky (0.3 mg/kg) (Tab. 1). Za účelem zjištění, zda oxytocinem a karbetocinem indukované změny v horizontální a vertikální exploraci jsou zprostředkovány specifickým oxytocinovým receptorem, testovali jsme účinky tří antagonistů na chování potkanů, které bylo indukováno i.p. aplikací oxytocinem nebo karbetocinem.

Námi použité antagonisty oxytocinového receptoru (viz kap. Materiál) inhibovaly horizontální a vertikální explorační aktivitu oxytocinu jen částečně, zatímco antagonistický účinek na chování byl úplný. Uvádíme příklad účinku antagonisty Ant99 a v naší laboratoři syntetizovaného antagonisty AntFL. Oba antagonisty vrátily snížené hodnoty TMD, vyvolané oxytocinem v dávce 1 mg, ke kontrolním hodnotám, viz Obr.2.



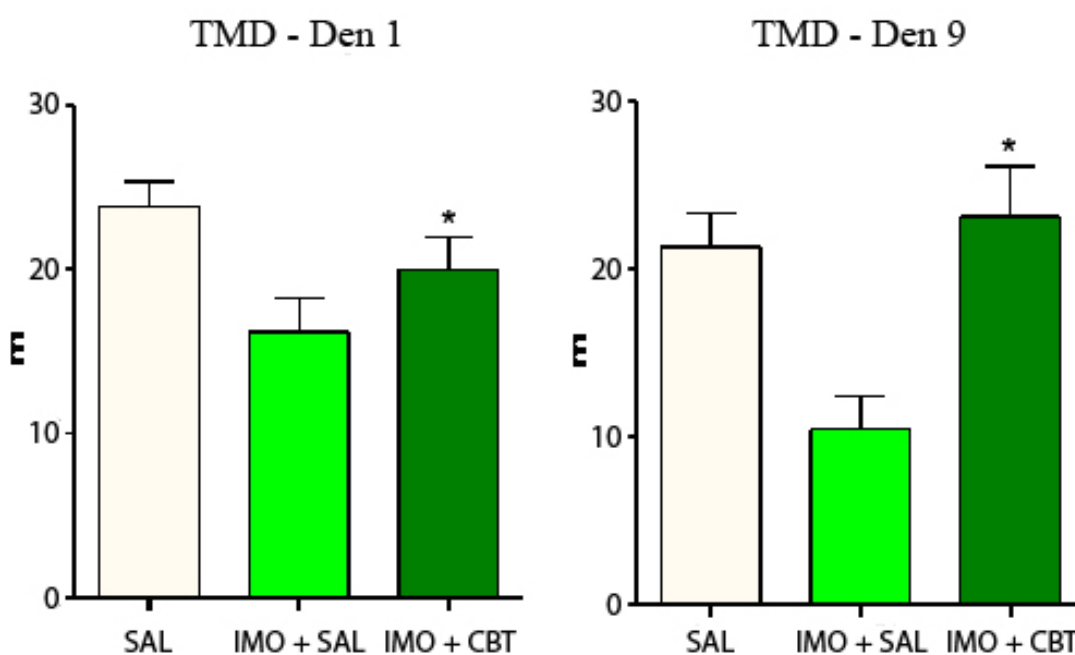
**Obr. 2. Antagonistický účinek Ant99 a AntFL na TMD na oxytocinem indukované snížení TMD**

**Tab. 1. Změny behaviorálních parametrů indukované ip. aplikací nízké dávky oxytocinu a karbetocinu (0.3 mg/kg)**

| Měřené parametry              | Experimentální skupiny |              |              |
|-------------------------------|------------------------|--------------|--------------|
|                               | CO                     | OXY          | CBT          |
| Celková vzdálenost pohybu     | 13.95±2.27             | 23.23±3.24*  | 24.35±2.20*  |
| Celkový čas pohybu            | 75.80±10.9             | 117.00±14.1* | 130.86±10.5* |
| Pohyb v centrální části arény | 1.22±0.72              | 2.14±0.69    | 1.29±0.25    |
| Počet panáčkování             | 25.86±5.77             | 25.71±2.71   | 26.00±1.43   |
| Čas groomingu                 | 3.50±1.67              | 12.31±9.43   | 11.66±4.77   |

Některé projevy spontánního chování po oxytocinu a především jeho dlouhodobě účinného derivátu karbetocinu mají přetrvávající účinky po několik dnů až týdnů. Oxytocin i karbetocin signifikantně zvyšovaly exploraci a některé parametry chování, jako je grooming (sebepéče, výsledky neuvedeny). Pro přehled uvádíme tyto výsledky v tabulce 1.

V dalších experimentech jsme testovali účinky oxytocinu u potkanů vystavených akutnímu stresu v různých dávkách a prokázali jsme u nízkých dávek (0.3 mg/kg) signifikantní protistresový a anxiolytický účinek. Podle stejného protokolu jsme testovali i účinek analogu oxytocinu karbetocinu. Výsledky z pokusu s behaviorálním testováním deterioračního působení stresu a protistresový účinek karbetocinu jsou uvedeny na Obr. 3. Karbetocin vykazoval vysoce signifikantní protistresové a anxiolytické účinky s protražovaným působením bez aplikace této látky i několik týdnů od poslední aplikace.



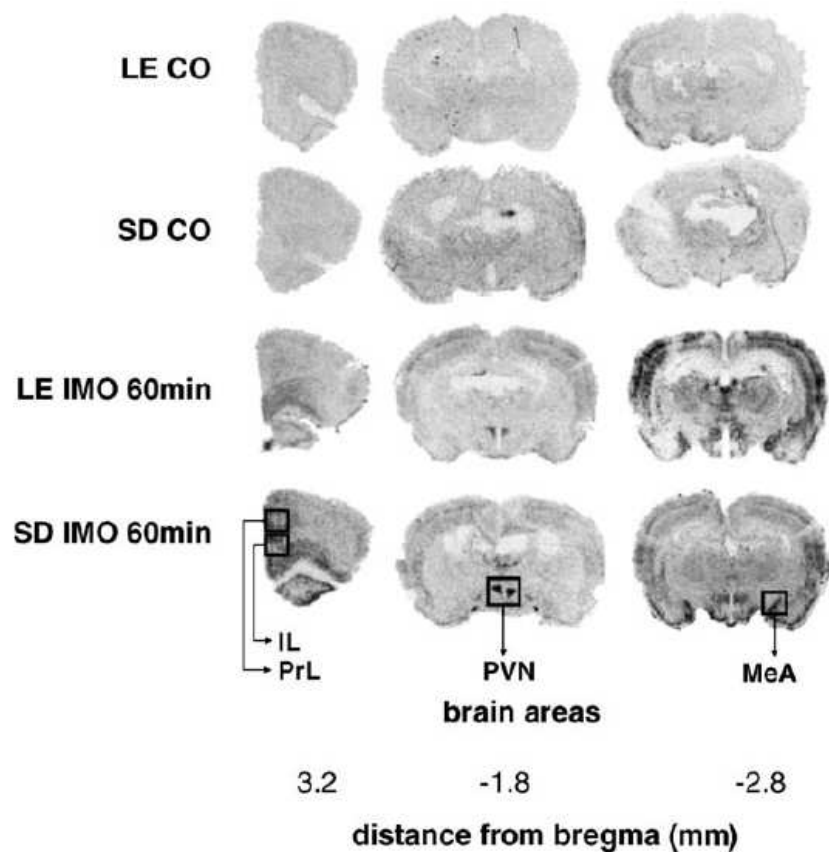
**Obr. 3. Deteriorační účinek stresu na TMD a protistresový účinek karbetocinu**

## 1. 2. STRES

Přestože o stresu bylo publikováno mnoho tisíc vědeckých článků, neexistuje dosud žádná přesná vědecká definice stresu, která by mohla být všeobecně akceptována. Hans Selye (1936) zavedl pojem stres pro nespecifické odpovědi organismu na různé škodlivé podněty. Chrousos (Chrousos, 1992) považuje stres za porušenou homeostázu organismu, a rozlišuje stresový podnět (tzv. stresor) a stresovou odpověď organismu, která je označována jako stres. V poslední době se ukazuje, že existují stresorově specifické odpovědi, které lze vysvětlit aktivací různých neuroendokrinních regulačních mechanismů (Charmandari et al., 2005). Dnes je známo, že se na stresu podílejí především dva systémy: sympatoadrenální systém (SAS) (Sabban a Květnanský, 2001) a hypotalamo-hypofýzo-adrenální systém (HPA osa). Aktivace HPA osy vede nakonec k uvolnění glukokortikoidů, které mají významné zpětno-vazebné účinky na různé struktury a funkce v mozku (viz de Kloet et al., 2005). Jejich působením dochází k tzv. strukturně-funkčním změnám, které se uplatňují při vzniku dlouhodobých projevů a mohou mít za následek i vznik celé řady stresem navozených nemocí (McEven, 1998, Petterson a Abizaid, 2013).

Strukturálně funkční změny u stresu a následné poruchy chování se studují na řadě animálních modelů. Mezi nejčastěji používané experimentální stresory patří imobilizace (restraint), vystavení působení chladu, krvácení, bolesti a hypoglykémie (viz Steckler 2001). V naší laboratoři pracujeme s dobře definovaným animálním modelem stresu, který jsme vyvinuli, a je popsán v metodické části a který je založen na aplikaci imobilizace (Klenerová a Šída, 1994).

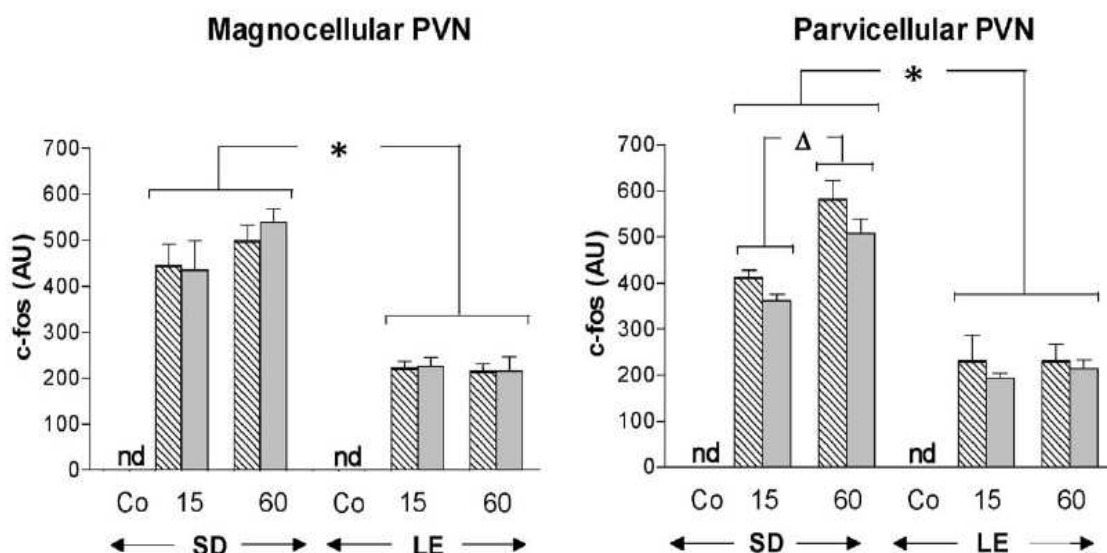
Řada výzkumných prací ukázala významnou heterogenitu neuroendokrinních odpovědí na různé stresory (Aguilera et al., 2004; Charmandari et al., 2005), a pro zjišťování cílových struktur zodpovědných za stresové odpovědi existuje řada metod. Jednou z nich je sledování neuronální aktivity pomocí exprese raných genů, např. exprese mRNA pro c-fos, po různých patologických podnětech (viz Kaczmarek a Robertson, 2002). Zabývali jsme se sledováním exprese mRNA c-fos a Arc u dvou typů stresu, s převahou emocionální nebo fyzické složky (Trnečková et al., 2005; 2006; Klenerová et al., 2005). Získané výsledky svědčí pro velmi dobré působení stresorů u našich modelů stresu a umožňují kontrolu většiny struktur v CNS, zda došlo ke změnám vyvolaným aplikovaným stresem (Obr. 4, Obr. 5).



**Obr. 4. Příklady exprese c-fos mRNA markeru neuronální aktivity v některých po IMO oblastech mozku potkanů SD a LE. potkanů SD a LE**

Čísla pod obrázky určují vzdálenost od bregma. CO = kontroly, LE = potkani kmene Lewis, SD = potkani kmene Sprague Dawley, IL = infra- limbická oblast mediálního prefrontálního kortexu (mPFC), PrL = prelimbická oblast mPFC, PVN = paraventrikulární jádro, MeA = mediální amygdala (Trneckova et al., 2006).

Expresce c-fos mRNA byla kvantifikována in situ hybridizací v oblastech mozku, které reprezentují důležité části neuronálních okruhů aktivovaných stresem. Zatímco u kontrol exprese mRNA c-fos nebyla detekovatelná, oba typy aplikovaného stresu vyvolaly velmi silnou expresi testovaného raného genu v oblastech zapojených ve stresové odpovědi. Na Obr. 5 uvádíme příklad grafického vyjádření těchto změn.



**Obr. 5. Expresse c-fos mRNA v oblasti PVN po stresu.**

Expresse mRNA c-fos v magnocelulárních a parvicelulárních oblastech PVN u potkanů SD a LE u kontrol (nd – nedetekovatelný signál) a po aplikaci dvou typů stresu IMO (čárovaný sloupec) a IMO+C (šedý sloupec). Oba druhy stresu aplikované 15 a 60 min. Hodnoty udávané v arbitrárních jednotkách jsou vyjádřeny jako průměry a SEM (n=4-6 ve skupině). \*Signifikantní hodnota SD oproti LE ( $P<0,001$ ) pro obě oblasti;  $\Delta$  signifikantní vliv času, 60 min oproti 15 min ( $P<0,05$ ), pro parvicelulární oblast PVN u SD. ANOVA analýza ukázala také signifikantní vliv stresu ( $P<0,04$ ) v parvicelulární oblasti PVN. (Trneckova et al., 2006).

Tyto nálezy rozšiřují naše dřívější pozorování o odlišnosti chování potkanů v různých behaviorálních testech, které ukazují na stresorovou specifitu i odlišnou vulnerabilitu potkanů v závislosti na aktivitě jejich HPA osy (Klenerova et al., 2002; 2003).

V této disertaci vycházíme z výše popsaných výsledků.

Důležitým poznatkem je skutečnost, že po stresu za normálních okolností následuje úprava homeostázy. Jde o adaptační změny, které vrací organismus k vyváženému stavu. Dochází k tomu aktivací specifických okruhů, které jsou geneticky naprogramované a ovlivnitelné též prostředím. Není-li organismus schopen návratu k homeostáze, dochází k patologickým fixovaným změnám, které mohou nakonec vyústit v rozmanité chorobné stavy (viz McEwen, 2003), např. posttraumatickou stresovou poruchu (PTSD) (viz přehledový

článek Hynie a Klenerová, 2004). V současné době je nesmírně rozsáhlá literatura týkající se neurobiologie a neuroendokrinologie stresu (viz Chrousos, 1992, 1995; Charmandari et al., 2005; de Kloet et al., 2005; McEwen, 1998; Petterson a Abizaid, 2013 aj.). V naší laboratoři je výzkum zaměřen na nalezení takových neuropeptidů a jejich peptidových a především nepeptidových analogů, které po podání po proběhlém stresu vrátí deteriorační účinky stresu k normálním hodnotám.

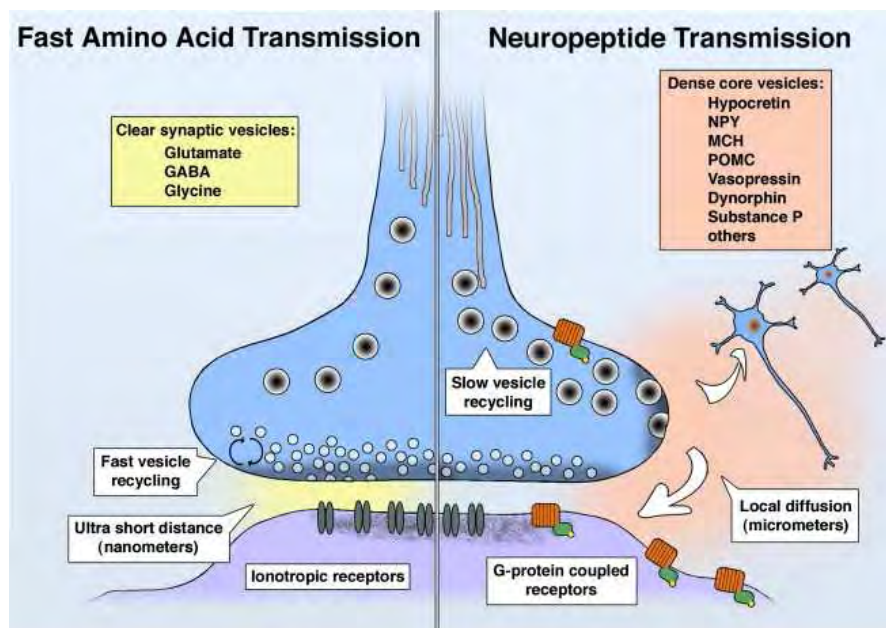
### 1. 3. NEUROPEPTIDY

Neuropeptidy mohou působit v CNS jako neurotransmitery nebo neuromodulátory, některé mohou být uvolněny do krve, kde pak působí jako hormony. Jsou tvořeny 3 až 100 rezidui aminokyselin a jsou tedy větší než klasické neurotransmitery, jako jsou aminokyseliny nebo monoaminy.

Jsou syntetizovány převážně v subkortikálních strukturách mozku, včetně hypotalamu, bed nucleus stria terminalis a komplexu amygdaly, jako součást velkých prekurzorových molekul. Bylo popsáno více než 200 neuropeptidů zapojených v signalizaci CNS, z nichž více než 50 je intenzivně studováno. V lidském genomu bylo rozlišeno cca 70 genů kódujících prekurzory neuropeptidů a řadu bioaktivních neuropeptidů. Ve srovnání s klasickými neurotransmitery uvádíme některé rozdíly: neuropeptidů je vyšší počet, mají větší velikost, jejich koncentrace v extracelulární tekutině je nižší, mají vysokou selektivitu, receptory jsou vně synapse, místa jejich účinku jsou vzdálená a mají mnohočetný a proměnný způsob komunikace, doplňují se syntézou de novo. Receptory neuropeptidů jsou spřažené s G proteiny (GPCR) (Obr. 6, převzato van den Pol, 2012) .

Receptory spřažené („coupled“) s G-proteiny představují největší rodinu membránových receptorů, které jsou zodpovědné za přenos signálů. Tyto receptory hrají klíčovou fyziologickou úlohu; při jejich dysfunkci dochází k mnoha nemocem. Dále je třeba si uvědomit, že tyto receptory tvoří cílové místo pro přes 50 % v současné době terapeuticky používaných látek.





Obr. 6

Přestože koncepce o mechanismech aktivace receptorů je dnes již velmi dobře známa, stále se nacházejí nové možnosti, jak připravit ligandy, které budou mít vhodnější agonistické účinky, a dokonce i selektivně zaměřené na léčbu určité nemoci. Jak již bylo řečeno, většina klinicky užívaných látek působí na receptory spřažené s G regulačními proteiny a mechanismus jejich aktivace je dopodrobna popsán v učebnicích farmakologie. Vlastní stimulační kaskáda je však dosti složitá a většinou se uplatňuje i aktivace dalších komponent, např. beta arestinu.

V literatuře nacházíme neustále častěji nové strategie k přípravě nových ligandů s využitím GPCRs a tato problematika patří mezi „Hot topics“. Využívá se tzv. „biased“ ligandů, které neaktivují nebo neinhibují všechny komponenty G protein transdukčního signálního systému. V poslední době bylo zveřejněno mnoho tzv. „biased“ ligandů, které např. neaktivují již zmíněný beta arestin a které nemají některé nežádoucí účinky. Velmi vhodnými cílovými strukturami pro tvorbu molekul se selektivními terapeutickými účinky se zdají být některé peptidy. Dosud byly publikovány některé léky použitelné u Alzheimerovy choroby, u parkinsonismu, při diabetu, u kardiovaskulárních nemocí, při léčbě bolesti a další. Nejnovější informace jsou dostupné na internetu z materiálů pravidelně konaných kolokvií „GPCR Colloquium at the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic meeting“.

Přenos signálu příslušného neuropeptidu probíhá kaskádovitě: receptor generuje v buňce nový signál, zapojením souboru intracelulárních signálních molekul dojde k amplifikaci signálu, aktivaci klíčového enzymu, expresi příslušného genu a odpovědi buňky. Ruku v ruce s výzkumem terapeutického využití GPCR jdou i studie lokalizace, denzity a dalších parametrů receptorů pro neuropeptidy.

V této disertaci je zaměřena pozornost na možnou úlohu některých výše uvedených neuropeptidů a jejich analogů syntetizovaných v naší laboratoři, v propojení behaviorálních, neurohormonálních a kardiovaskulárních odpovědí na stres. Zajímá nás především oxytocin a jeho analog karbetocin, u kterých jsme již publikovali jejich protistresové účinky po systémovém podání. V našem výzkumu jsme prokázali behaviorální účinky oxytocinu, karbetocinu (Klenerova et al., 2009; Klenerova et al., 2009a; Klenerova et al., 2010) a také galaninu, kde tato studie je součástí této disertace (Klenerová et al., 2011). Dále proto blíže popíšeme studované neuropeptidy oxytocin, atriální natriuretický peptid, galaninergní neuropeptidy a jejich receptory.

## 1. 4. OXYTOCIN A OXYTOCINOVÝ RECEPTOR

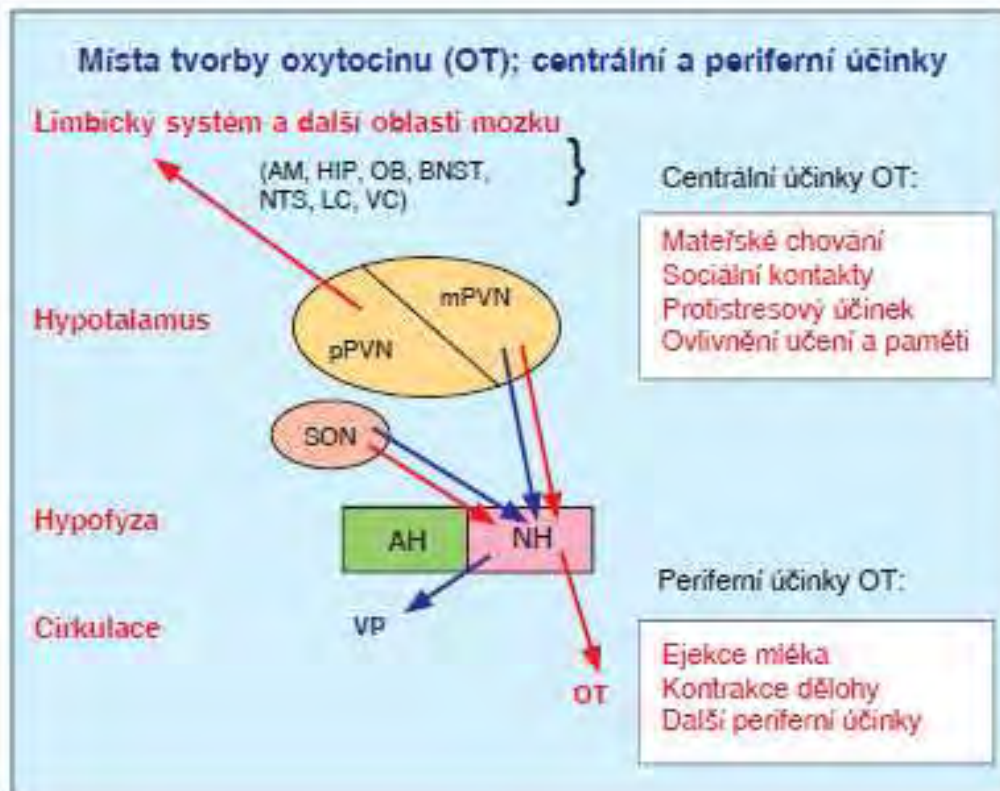
Neurohypofyzární nonapeptid oxytocin (OT) je znám především pro periferní účinek, kdy po uvolnění do systémové cirkulace stimuluje ejekci mléka při kojení a kontrakci dělohy při porodu. Tyto klasické účinky OT byly donedávna uváděny jako jediné funkce OT v učebnicích fyziologie, farmakologie i porodnictví.

Funkce oxytocinu a druhého neurohormonu vasopresinu (VP) jsou velmi komplexní, působí v CNS na mnoha místech a jejich účinky jsou složitě regulovány zpětnovazebními mechanismy; tyto mechanismy jsou především viditelné u oxytocinu, jehož regulační úloha je významně modulována ženskými pohlavními hormony (viz přehledový článek Gimpl a Fahrenholz, 2001; Brunton a Russell, 2008).

I když byly behaviorální účinky OT popsány již v šedesátých letech (viz Gimpl a Fahrenholz, 2001), centrální účinky VP a jeho biologický význam byly odhaleny dříve než neurobiologická úloha OT. Vasopresin hraje významnou úlohu především při stresu (viz přehledové články McEwen, 1998; de Kloet et al., 2005). Přestože je OT strukturně velmi podobný VP, jeho účast při stresu je zcela odlišná a mnohdy ne zcela jasná. Více pozornosti je věnováno účasti OT na behaviorálních projevech v mateřství, při sociálních kontaktech a jeho účasti na učení a paměti.

Jejich studium je zpomalováno skutečností, že peptidové látky pronikají jen omezeně do CNS mozkomíšní bariérou. Z těchto důvodů pochází nejvíce poznatků o centrální regulační úloze OT a VP z experimentů na zvířatech, kde se neuropeptidy aplikují intracerebroventrikulárně (i.c.v.), nebo se používají látky, které nemají peptidovou strukturu.

V posledních desetiletích však byla odhalena pozoruhodná regulační úloha OT v mozku, kde se tento peptid uplatňuje jako neurotransmitter a neuromodulátor v procesu učení, paměti, sociálního chování, vytváření partnerských vztahů, mateřského chování, stresu aj. (viz přehledový článek Hynie a Klenerová, 2008; viz přehled Olff et al., 2013). OT je vytvářen několika různými typy neuronů. Magnocelulární neurony v paraventriculárním jádře (mPVN) a neurony supraoptického jádra (SON) syntetizující OT se projikují do neurohypofýzy (NH), odkud je oxytocin uvolňován do cirkulace. Kromě toho existuje rozsáhlá oxytonerní nervová síť, která se projikuje z parvicelulárních neuronů PVN (pPVN) do různých oblastí mozku (Obr. 7, viz Hynie a Klenerová, 2008).



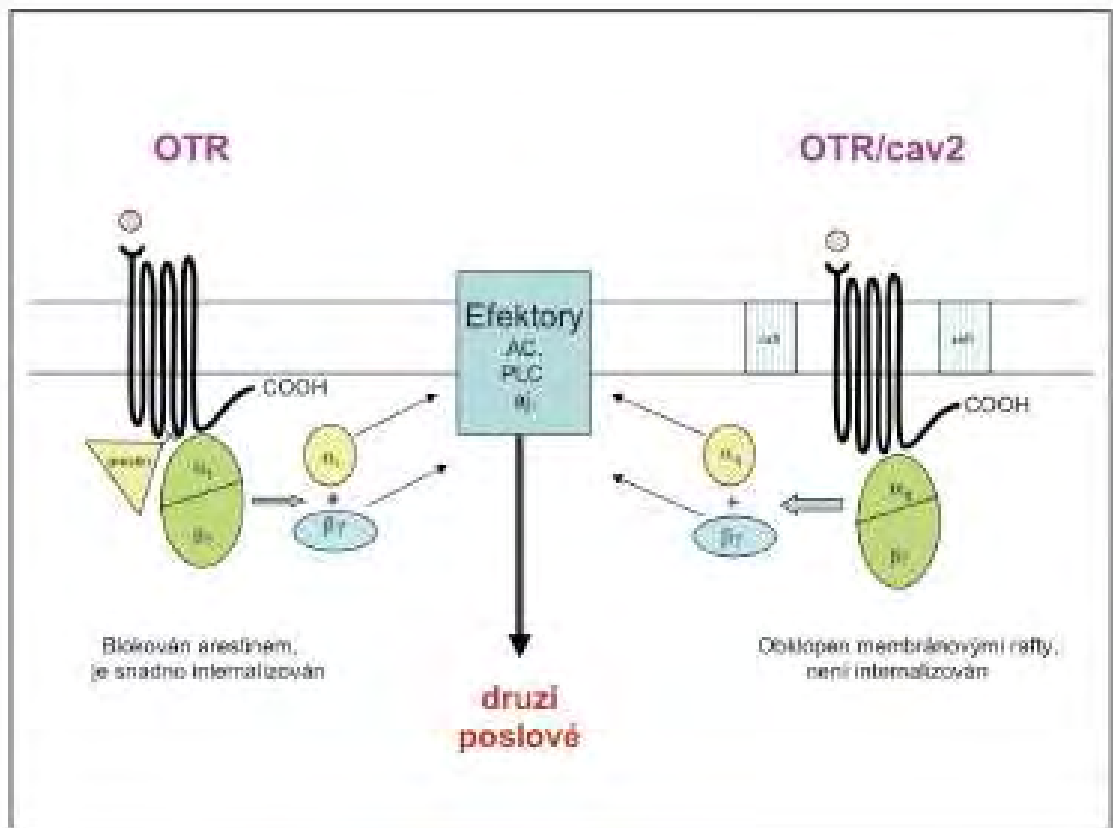
**Obr. 7. Místa tvorby oxytocinu (OT); periferní a centrální účinky OT**

OT a vasopresin (VP), vytvářené v supraoptickém jádru (SON) a magnocelulárních neuronech paraventriculárního jádra (mPVN), jsou skladovány v zadním laloku hypofýzy (NH, neurohypofýza). Odtud jsou uvolňovány řadou stimulů do periferní cirkulace a vyvolávají specifické periferní účinky. Z parvicelulárních neuronů paraventriculárního jádra (pPVN) hypotalamu jdou axony vytvářející OT do limbického systému a dalších oblastí mozku, odkud vyvolávají celou řadu centrálních účinků (Hynie a Klenerová, 2008).

Vysvětlivky: AM = amygdala, HIP = hipokampus; OB = čichový (olfaktorní) bulbus; BNST = bed nucleus striae terminalis; NTS = nucleus tractus solitarii; LC = locus coeruleus; VC = vagová centra.

Výzkumy posledních let přinesly informace nejen o expresi OT, ale i o expresi jeho receptoru (OTR) v CNS, tak i v mnoha periferních tkáních. Tyto objevy významně rozšířily možné spektrum účinků OT kromě jeho klasické úlohy.

**Oxytocinový receptor** patří mezi receptory spřažené s G- regulačními proteiny (GPCR). Na rozdíl od jiných membránových receptorů je unikátní v tom, že existuje jen jeden jeho typ. Diverzita jeho účinků je dána nejen odlišnou expresí v různých tkáních, lokalizací OTR v rozmanitých doménách plazmatické membrány (viz Klenerová a Hynie, 2008; Strunecká et al., 2009), ale především i diverzitou signálních cest, jak je znázorněno na obrázku 8.



**Obr. 8. Signální cesty oxytocinového systému**

Hlavní signální kaskádou je cesta využívající  $G_{q/11}$  protein vedoucí ke stimulaci fosfolipázy C (PLC); dosud bylo identifikováno 13 izoform tohoto enzymu. Vedle aktivace PLC je OTR schopen aktivovat další signální cesty prostřednictvím různých G-proteinů (Obr. 8). Zůstává však nejasná otázka, jakým způsobem OT ovlivňuje tvorbu cyklického AMP, a tak i jiné signalizační kaskády. Jsou i úvahy o tom, zda OT neovlivňuje V2 podtyp vasopresinového receptoru. Důležité jsou i nálezy o přítomnosti PLC v jádře, kde může ovlivnit procesy transkripce a tudíž i nádorový růst.

Kromě výše uvedených účinků má OT celou řadu dalších periferních účinků, které nacházíme i u samců. V mnoha studiích byla popsána úloha OT při regulaci kardiovaskulárních funkcí. U potkanů bylo prokázáno, že řada axonů obsahujících OT končících v jádrech mozkového kmene je zapojena do kontroly kardiovaskulárních funkcí. Vysoké koncentrace OT byly nalezeny v nucleus tractus solitarii, jehož neurony dostávají sensorické impulzy z vnitřních orgánů. Injekce OT do dorsálního motorického jádra vagu redukovaly srdeční frekvenci, a tento efekt byl zrušen podáním OT antagonistů. U lidí i u potkanů bolusové i.v. podání OT snižuje krevní tlak. Citace viz Gympl a Fahrenholz, 2001.

Nejnověji byl oxytocin označen také jako **kardiovaskulární hormon** (Gutkowska et al., 2000). V roce 1998 Jankowski a Gutkowska (Jankowski et al., 1998) popsali tvorbu OT v srdci a jeho vazbu na srdeční OTR. Uvedení autoři našli nejvyšší koncentrace OT v pravé síni, tyto koncentrace se pohybovaly řádově ve stejných mezích jako koncentrace v hypothalamu. Přes uvedená fakta přetrvávají kontroverze ohledně produkce OT v srdci a vlivu OT na kardiovaskulární systém. Byly prokázány jeho farmakologické účinky i jeho syntéza v myokardu, ale nebyly zde blíže charakterizovány jeho receptory, tj. lokalizace, denzita, změny za stresu, za různé aktivity HPA osy aj. Zatím není jasné, jaká je úloha HPA osy na expresi OTR, zda stres ovlivňuje expresi OTR a kde jsou OTR lokalizovány. Proto jsme se pokusili sledovat expresi OTR pomocí kvantitativního real time qPCR a pomocí imunohistochemického stanovení exprese jeho genu. Studie byla provedena u dvou kmenů potkanů a to Sprague-Dawley a Lewis, který je známý sníženou aktivitou HPA osy.

Odhalení alternativních cest signalizace OTR umožňuje vývoj nových agonistů a antagonistů působících na OT-stimulované funkce, které nejsou omezeny jen na klasicky uváděné ovlivnění dělohy a mléčné žlázy. Nové výzkumy ukázaly, že řada ligandů pro OT signalizaci může stimulovat specifické signální cesty a vyvolat tak odlišné agonistické nebo antagonistické účinky podle ovlivněné signální cesty využívané stejným receptorem. Uvedené údaje o OTR signalizaci jsou důležité pro farmakoterapii.

## 1. 5. ATRIÁLNÍ NATRIURETICKÝ PEPTID

Z dalších peptidů, které se uplatňují v udržení elektrolytové a volumové homeostázy jsou natriuretické peptidy. Tuto rodinu tvoří atriální natriuretický peptid (ANP) a mozkový natriuretický peptid (BNP), které jsou produkovány kardiomyocyty, ANP primárně v pravé síni a BNP v levé komoře, a C natriuretický peptid, který je tvořen v endotelu cév a v renálním endotelu. Natriuretické peptidy mají řadu fyziologických účinků, stimulují natriurézu a diurézu, mají vasodilatační účinek a také inhibují buněčný růst. Působí také v mozku, kde se syntetizují všechny tři peptidy. Natriuretické peptidy se uplatňují u některých onemocnění, především u srdečního selhání, kde je zvýšena jejich sekrece spolu s některými dalšími neuropeptidy. Dalším onemocněním, které postihuje srdeční síně bez postižení komor, je atriální srdeční amyloidosa, u které dochází u starších osob k fibrilární agregaci ANP.

V naší práci jsme sledovali **atriální natriuretický peptid A (ANP)**, který je tvořen v srdečních síních a má velmi úzký vztah k oxytocinu při zajištění kardiovaskulární homeostázy. Cirkulující OT uvolněný z neurohypofýzy se váže na jeho receptory v pravé srdeční síni a stimuluje další uvolnění ANP z atriálních kardiomyocytů (Gutkowska et al., 1997).

ANP je produkován kardiomyocyty srdečních síní ve formě prohormonu (pro-ANP), který je tvořen 126 aminokyselinami a který je štěpen na dva fragmenty – vlastní ANP, který je biologicky aktivní, a je tvořen 28 aminokyselinami, a N-terminální fragment (N-BNP, biologicky inaktivní). Stimulem pro sekreci ANP je zvýšené napětí ve stěně srdečních síní při tlakovém a objemovém přetížení srdce. Peptidy se dostávají do krevního oběhu a váží se na specifické receptory (NPR-A, NPR-B, NPR-C) na povrchu cílových buněk.

Po působení stresu je zvýšená kardiovaskulární odpověď, se zvýšeným krevním tlakem a tachykardií, která souvisí s uvolněním ANP. Oxytocin v odpovědi na stres má protistresové účinky a lze předpokládat společný mechanismus s ANP po působení stresu, ANP i OT mají oba negativní chronotropní a inotropní účinky. Mechanismus společných účinků ANP a OT po aplikaci stresu však není dosud objasněn a lze předpokládat účast nejen centrálně uvolněného OT, ale i možnost sekrece OT přímo v srdci, a zapojení oxytocinových receptorů v jednotlivých srdečních oddílech. Na základě této hypotézy jsme v našich experimentech sledovali i tyto možnosti.

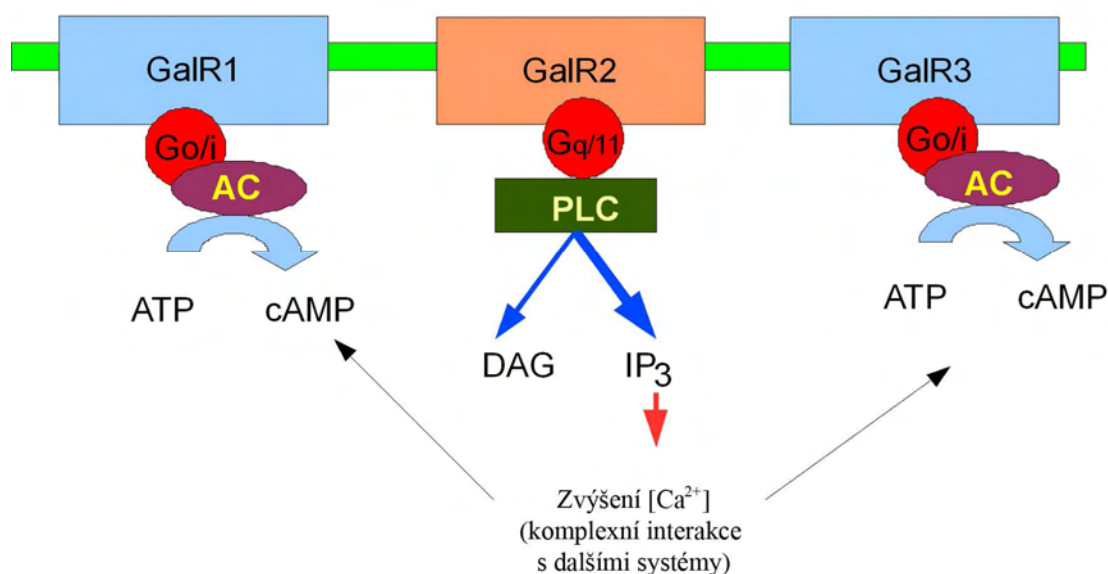
## 1. 6. GALANINERGNÍ SYSTÉM

### 1. 6 .1. Galanin

Neuropeptid galanin (Gal) byl původně objeven jako gastrointestinální peptid (Tatemoto et al., 1983) a následně byl postupně nalezen ve všech orgánech a také v mozku. Následoval rozsáhlý nárůst studií sledujících jeho velmi rozmanité funkce. Díky tomu je galanin často označován jako „multitalentový peptid“.

Postupně byly nalezeny i další galaninergní peptidy tzv. galaninergního systému: galanin-like peptid (Gal LP), galanin-message-associate peptid a alarin, a lze předpokládat nalezení dalších členů této neuropeptidové rodiny. Tyto neuropeptidy se vyskytují v periférii a v CNS, kde mají široký rozsah fyziologických účinků, jsou např. zapojeny v regulaci příjmu potravy, v kognitivních funkcích, spánku, u stresových podnětů, v regulaci krevního tlaku, srdeční frekvence a j. Úloha galaninu byla prokázána i u řady patologických stavů, jako je Alzheimerova choroba, epilepsie, deprese a další (viz Fang et al., 2012, přehledový článek Lang a Kofler, 2011). Podílí se na modulaci a regulaci uvolnění některých dalších neuropeptidů, neurotransmiterů a neuromodulátorů, ale o tomto systému zůstává stále více neznámých i přes intenzivní výzkum.

Galanin je tvořený 29 aminokyselinami u potkana a 30ti u člověka. Působí prostřednictvím zatím známých třech subtypů galaninového receptoru GalR1, GalR2 a GalR3 (obr. 9).



**Obr. 9. Schéma galaninových receptorů a mechanismů transdukce signálu viz text..**



Galaninové receptory jsou spřažené s různými G-proteiny. Galaninový receptor 1 (GalR1) a galaninový receptor 3 (GalR3) aktivací Gi/o inhibují aktivitu adenylylcyklázy a galaninový receptor 2 (GalR2) spojený s Gq/11 aktivuje fosfolipázu C (Tortorella et al., 2007). Rozdílnou distribucí a denzitou těchto receptorů v různých oblastech a aktivací rozdílných signálních soustav lze vysvětlit širokou škálu účinků galaninu. GalR subtypy lokalizované na neuronech mohou tvořit heteromery z jednoho typu GalR neb s dalšími typy GalR. Tyto heteromery mohou být jedním z dalších molekulárních mechanismů širokého spektra Gal funkcí.

Řada prací popisuje interakci galaninu s funkcí hypotalamo-neurohypofyzárního systému a možný modulační účinek na funkci oxytocinu. Dosud však nebyla prokázána jednoznačná přítomnost galaninergních receptorů v adenohipofýze a neurohypofýze za fyziologických podmínek. Nejsou ani jednoznačné údaje o Gal systému po aktivaci HPA osy stresem. Údaje z publikací se značně rozcházejí. Přestože galanin a jeho receptory jsou dle některých laboratoří exprimovány ve všech anatomických složkách HPA osy, tj. hypotalamu (PVN), adenohipofýze a adrenální kůře, jsou údaje o úloze galaninu ve fyziologii a patofyziologii HPA osy stále kontraverzní (viz přehledový článek Tortorella et al., 2007). Rovněž nejsou známy údaje o kotransmisi galaninu s vasopresinem a oxytocinem v jednotlivých částech hypofýzy za fyziologického stavu a po působení akutního stresu.

Z dalších periferních tkání byl popsán kardiovaskulární účinek galaninu v srdci (viz Diaz-Cabiale et al., 2005; Diaz-Cabiale et al., 2010), kde byly údaje získány z experimentů sledujících zapojení galaninu a jeho receptorů v centrální kardiovaskulární regulaci. Nebyly však dosud publikovány žádné údaje o účasti galaninergního systému na regulaci/modulaci přímo v srdci a ani v jednotlivých srdečních oddílech.

### 1. 6. 2. Galanin like peptid

Dalším intenzivně sledovaným neuropeptidem je v r. 1999 nově objevený peptid galanin like peptid (GalLP) (Ohtaki et al., 1999). Byl izolován a klonován z hypotalamu prasete jako endogenní ligand galaninového receptoru R2 a následné studie prokázaly, že jeho distribuce v CNS je omezena. Na rozdíl od rozsáhlé distribuce galaninu, který byl identifikován ve většině oblastí CNS a ve většině hypotalamických jádrech, galanin like peptid byl popsán v neuronech hypotalamického jádra nc. arcuatus a v pituicytech neurohypofýzy, což je gliální tkáň (viz Saito et al., 2005; viz Lawrence a Fraley, 2011). Fyziologické a patologické funkce u obou tkání nejsou dosud objasněny.

GalLP je tvořen 60ti aminokyselinami a je strukturálně podobný galaninu, s kterým má shodnou část peptidového řetězce 13ti aminokyselin v poloze 9 až 21 na N terminálu. Zatím však nebyl nalezen jeho specifický receptor a ve vztahu k galaninovým receptorům existuje řada kontroverzních nálezů.

V poslední dekádě enormně vzrostl počet publikací zabývajících se funkcí a mechanismech účinku GalLP. Galanin like peptid je zapojen v centrálním nervovém systému v regulaci příjmu potravy, termoregulaci, v reprodukci uvolnění luteinizační hormon-uvolňujícího hormonu (LHRH), v imunoreaktivitě a dalších funkcích. Někteří autoři označují GalLP jako „Hypotalamický regulátor energetické homeostázy a reprodukce“ (Lawrence a Fraley, 2011).

Řada výše uvedených pracovišť se také zabývá otázkou stresu. Stres jako škodlivý podnět působí uvolnění vasopresinu, oxytocinu a ACTH u potkanů z hypofýzy do systémové cirkulace. V neurohypofýze popsal Kawasaki expresi mRNA GalLP po dehydrataci a solné náloži (Kawasaki et al., 2007). Stejná laboratoř testovala účinek akutního a chronického stresu vyvolaném aplikací endotoxinu LPS na expresi mRNA GalLP v nc. arcuatus, po akutním podání došlo k zvýšení exprese mRNA. Japonská skupina našla u potkanů po i.c.v. aplikaci galanin like peptidu signifikantní zvýšení plazmatické koncentrace AVP a OT (viz Suzuki et al., 2010). Žádná z publikací však nedospěla k závěru, jaká je funkce GalLP v neurohypofýze. Naše hypotéza je, GalLP může být v neurohypofýze zapojen v uvolňování oxytocinu a vasopresinu.

## 2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

**Disertační práce vychází z aktuálnosti a závažnosti výzkumu neuropeptidů a problému působení stresorů, s cílem terapeutického využití těchto poznatků. Dosud není objasněn mechanismus regulačních/modulačních účinků neuropeptidů a tyto mezery v našich znalostech pak ztěžují možnost jejich terapeutického ovlivnění. Tato disertační práce se zabývá studiem centrálních a periferních účinků neuropeptidů oxytocinu a galaninu.**

Předpokládáme, že po systémové aplikaci neuropeptidu se jeho část dostává do mozku, kde vyvolá centrální behaviorální účinky.

**Cílem** této dizertace bylo zjištění, zda systémově aplikovaný neuropeptid galanin má centrální behaviorální účinky a jaké.

Pokud předpokládáme, že centrální účinek galaninu je zprostředkován vazbou na galaninergní receptory v mozku, je nutné prokázat tuto vazbu.

**Cílem** byl průkaz pomocí systémové aplikace antagonistů galaninu vázajících se na galaninergní receptory, kdy tato aplikace by měla antagonizovat centrální behaviorální účinky galaninu.

Oxytocin byl zařazen mezi kardiovaskulární hormony a lze předpokládat, že je syntetizován přímo v srdci nebo je uvolněn stresovými podněty z hypotalamo-neurohypofyzárního systému do krevního oběhu.

**Cílem** bylo zjištění, zda jsou v srdci exprimovány oxytocinové receptory, pokud ano, tak jejich charakteristika za bazálních podmínek a po aplikaci dvou typů stresu s emocionální nebo fyzickou komponentou.

Velmi důležitá je úloha HPA osy, která determinuje odpověď organismu na stresové podněty; není známo, zda výsledná odpověď závisí na genetickém vybavení transdukčních systémů.

**Cílem** bylo zjistit, zda u potkanů kmene Sprague-Dawley a Lewis s odlišnou aktivitou HPA osy dojde k odlišné odpovědi oxytocinového systému v srdci na stres.

Byl popsán účinek galaninu na kardiovaskulární systém in vivo, ale není známo, zda se galaninergní systém v srdci vyskytuje.

**Cílem** byla identifikace neuropeptidu galaninu, galanin like peptidu a jejich receptorů v srdci za fyziologických podmínek.

Hypofýza je významnou součástí HPA osy a podílí se na stresových odpovědích. Otázkou je, zda se galaninergní systém účastní na těchto regulacích a zda jsou exprimovány galaninergní peptidy a jejich receptory v jednotlivých oddílech hypofýzy.

**Cílem** bylo identifikovat jednotlivé komponenty galaninergního systému, tj. galanin, galanin like peptid a galaninové receptory v adenohipofýze, neurohipofýze a intermediálním laloku a určení jejich vzájemných interakcí s oxytocinem a vasopresinem a dále určení jejich kolokalizace s pituicyty a neuronální tkání.

Dalším **cílem** pro splnění vytýčených úkolů je syntéza testovaných peptidů a jejich antagonistů z finančních důvodů. Dalším **cílem** nalezení takových látek, které pronikají snadněji hematoencefalickou bariérou. Řešením je syntéza chimérické molekuly oxytocinu s fluorescenčním markerem.

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3. 1. MATERIÁL**

Studované neuropeptidy, jejich analogy a antagonisté byly syntetizovány M. Flegelem z naší laboratoře. Díky vlastní syntéze velice nákladných peptidů bylo možné uskutečnit studie, které by jinak byly nerealizovatelné pro vysoké komerční náklady. Konkrétně se jednalo o tyto látky: arginin vasopresin (AVP); oxytocin (OT); karbetocin (CT, dlouhodobě působící analog OT); galanin (Gal); peptidový antagonist galaninu M40; antagonist amid  $-(\text{desGly-NH}_2\text{-d}(\text{CH}_2)_5[\text{D-Tyr}^2, \text{Thr}^4] \text{OVT})$  (AntFL). Dále jsme připravili chiméru oxytocinu s různými fluorescenčními markery a chiméru amid - peptidu galaninu-(1-13) s neuropeptidem Y (25-36).

Další látky byly z následujících zdrojů: Diazepam byl z Biotica (SR), lysin vasopresin (LVP), desmopresin (DDAVP) a atosiban (ATO) z Polypeptide Labs (ČR), nepeptidový antagonist OT receptoru nonpeptide drug L-368899 (Ant99) z Tocris Bioscience, USA.

Pro stanovení exprese mRNA jsme použili TRI Reagent (Sigma, USA), DNAsu (Invitrogen, USA), Superscript III Reverse Transcriptasu (Invitrogen, USA), iQ SYBR Green Supermix (Biorad, USA).

Dále byly použity běžně komerčně dostupné chemikálie, protilátky a kity.

#### **3. 2. POKUSNÁ ZVÍŘATA**

Pokud není uvedeno jinak, použili jsme dospělé samce potkanů kmene Wistar (Velaz, ČR) s počáteční tělesnou hmotností 210-240 g a s počtem potkanů v pokusné skupině 8-10. Dále byl použit outbrední kmen potkanů Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfield, Německo) a inbrední kmen potkanů Lewis (Charles River Laboratories, Sulzfield, Německo) se změněnou aktivitou HPA osy.

Zacházení se zvířaty bylo v souladu s „Declaration of Helsinki Guiding Principles on Care and Use of Animals, DHEW Publication, NHI 80-23“ a probíhalo dle pokynů Komise pro práci s pokusnými zvířaty platnými na 1. LF UK v Praze. Po dekapitaci potkanů byly podle potřeby dalšího metodického zpracování odebrány vzorky tkání. Experimentální studie a jejich protokoly byly schváleny „Komisí pro práci s pokusnými zvířaty“ 1. LF UK v Praze.

### 3. 3. STRES

Potkani byli vystaveni dvěma různým typům imobilizačního (restraint) stresu po dobu 60 minut. Imobilizační stres (IMO, IS) spočívá ve fixaci předních i zadních končetin pomocí náplastí. Následně je potkan obalen pevnou plastovou folií, která se zafixuje. Druhý typ stresu (IMO+C, ISC) je stejný jako předcházející, ale potkan je navíc ponořen do vody o teplotě 21 °C tak, aby přední ¼ těla zůstala nad vodou (Klenerova et al., 2006). Na konci působení stresu byla zvířata osušena a vrácena do svých klecí. Oba stesy byly aplikovány po dobu 60ti minut s následnou dekapitací 1 hod po skončení stresu. Pokud byla délka stresu odlišná, nebo pokud byl odlišný interval mezi koncem stresu a dekapitací, je tato skutečnost uvedena u příslušného pokusu; např. IMO60 je hodinový stres + 60 interval po stresu. Před vlastním pokusem se potkani po dobu jednoho týdne seznamovali s pracovníkem aplikujícím stres (tzv. handlování).

### 3. 4. ODBĚR TKÁNÍ

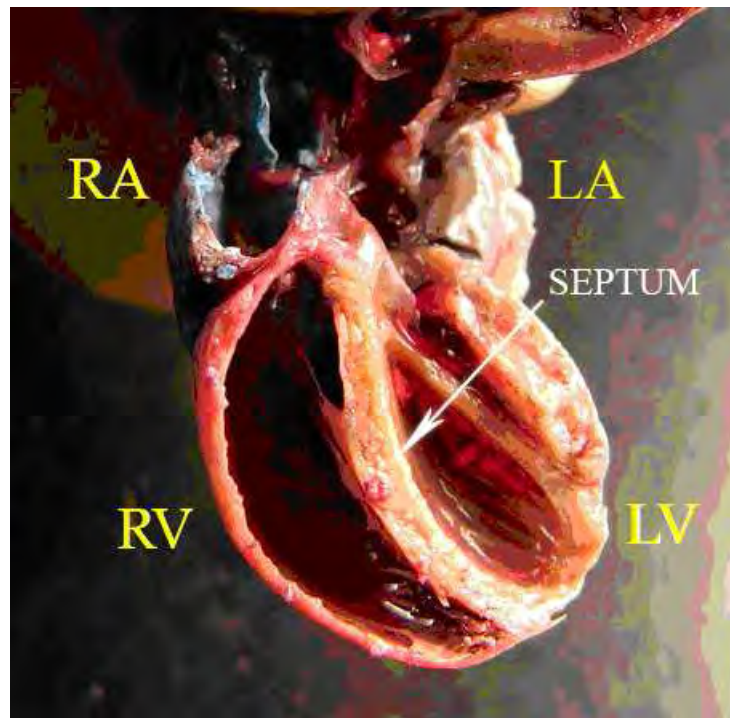
Z pokusného zvířete byl odebrán mozek, hypofýza a srdce. Hypofýza byla buď ponechána vcelku, nebo byla rozdělena na adenohypofýzu (AH) a neurohypofýzu (NH). Srdce bylo rozděleno na jednotlivé oddíly (LS, PS, LK, PK) po odstranění septa. Další zpracování se liší podle následujícího použití vzorku pro stanovení exprese mRNA nebo pro imunohistochemické zpracování.

#### 3.4.1. Mozek

Pro imunofluorescenční stanovení byly mozky fixovány ve 4% roztoku paraformaldehydu (PFA) (Merck, Germany) v kombinaci s působením mikrovln po dobu 7s, s následným uložením v 4% roztoku PFA (Merck, Germany) přes noc při 4 °C. Následovala kryoprotekce, zalití mozku kryolepidlem Cryomount (Histolab, Sweden) a zmražení vzorku v isopentanu (Aldrich, Germany) vychlazeném na -80 °C. Pro vzorky určené ke zpracování metodou real time qPCR a metodou Western blot, byly vzorky ihned po odebrání zmrazeny v tekutém dusíku na -80 °C a uloženy až do homogenizace vzorků v den pokusu.

### 3.4.2. Srdce

Srdce bylo rozděleno na jednotlivé oddíly, pravou síň (PS, RA), levou síň (LS, LA), pravou komoru (PK, RV) a levou komoru (LK, LV), po předchozím odstranění hrotu a septa (viz Obr. 10).



Obr. 10

Odebrané vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku pro metodu real time qPCR a Western blot. Pro imunohistochemické zpracování byly vzorky zality kryolepidlem Cryomount (Histolab, Sweden) a zmrazeny v tekutém dusíku nebo v isopentanu (Aldrich, Germany) vychlazeném na -80 °C.

### 3.4.3. Hypofýza

Část hypofýz byla ponechána vcelku a část byla rozdělena na AH a NH. Vzorky byly zmrazeny v tekutém dusíku nebo v isopentanu (Aldrich, Germany) vychlazeném na -80 °C (pro real time qPCR a Western Blot). Další vzorky pro imunohistochemické zpracování byly uloženy do 4% roztoku PFA (Merck, Germany) s následnou kryoprotekcí, zalití kryolepidlem Cryomount (Histolab, Sweden) a zmrazení v isopentanu (Aldrich, Germany) vychlazeném na -80 °C.

### **3. 5. IMUNOFLUORESCENCE**

#### **3.5.1. Krájení řezů**

Tkáňové řezy z bločků tkání zamražených v kryolepidle byly krájeny v síle 7 $\mu$ m, pro řezy z neurohypofýz v síle 5  $\mu$ m, při teplotě -24°C, na kryostatu Leica CM1850 (Leica Microsystems, Germany). Řezy jsou po nakrájení sbírány na podložní sklíčka upravená Poly-l-lysinem (Aldrich, Germany). Sklíčka s řezy jsou před vlastním značením vložena do roztoku fosfátového pufru s NaCl (PBS).

#### **3.5.2. Blokování nespecifických vazeb**

Před aplikací primární protilátky byly řezy inkubovány s blokovacím roztokem na bázi albuminu z hovězího séra (Bovine serum albumin, Sigma, USA) (BSA) a kozího séra (Normal Goat Serum, Gibco, USA). Dále jsme blokovací roztok doplnili o detergent, který zaručí proděravění plazmatické membrány tak, aby protilátka mohla proniknout i do vnitřního prostoru buňky. Pro blokování nespecifických vazeb je používána inkubace s blokovacím roztokem po dobu dvou hodin.

#### **3.5.3. Protilátky**

Byly použity komerčně vyráběné primární protilátky (PP) proti sledovaným neuropeptidům a jejich receptorům a rovněž komerčně vyráběné sekundární protilátky (SP). Pro značení některých proteinů jsou komerčně vyráběny primární protilátky, které jsou přímo konjugovány s fluorescenční značkou. Tyto primární protilátky pak není nutné značit sekundární protilátkou. Protože se značené primární protilátky vyrábí pouze pro omezený počet proteinů, v naší laboratoři je nepoužíváme.

##### **3.5.3.1. Primární protilátky:**

Mouse monoclonal to Atrial Natriurec Peptide (ANP) (Abcam, UK)

Mouse monoclonal to Neuron specific beta III Tubulin - Neuronal Marker  
(Abcam, UK)

Anti-Oxytocin receptor antibody (OTR) (Abcam, UK)

Anti-Galanin (Gal) (Lifespan, USA)

Galanin like peptide Rabbit anti-Rat Polyclonal antibody (GALP) (Lifespan, USA)



Oxytocin Receptor Rabbit anti Rat Polyclonal Antibody (Lifespan, USA)

Anti Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Millipore, USA)

Anti-Galanin Receptor type 1 (GalR1) (Alomone Labs, Israel)

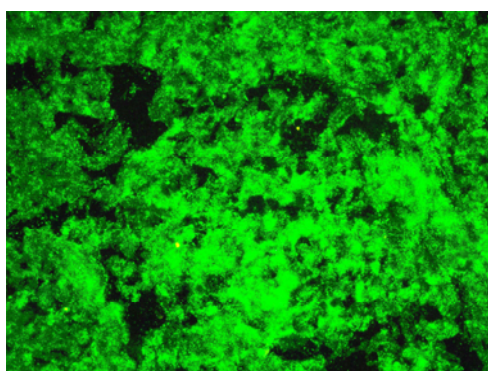
Anti-Galanin Receptor type 2 (GalR2) (Alomone Labs, Israel)

Anti-Galanin Receptor type 3 (GalR3) (Alomone Labs, Israel)

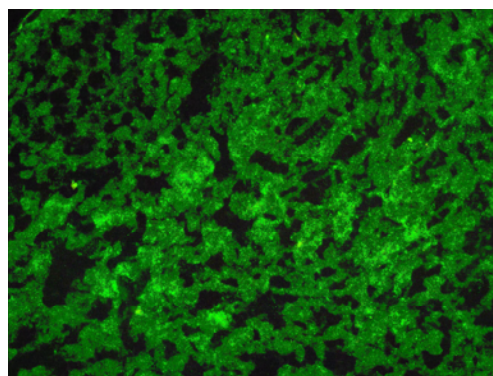
Guinea Pig anti-Oxytocin (OT) (Peninsula Laboratories, USA)

Guinea Pig anti-(Arg<sup>8</sup>)-Vasopressin (AVP) (Peninsula Laboratories, USA)

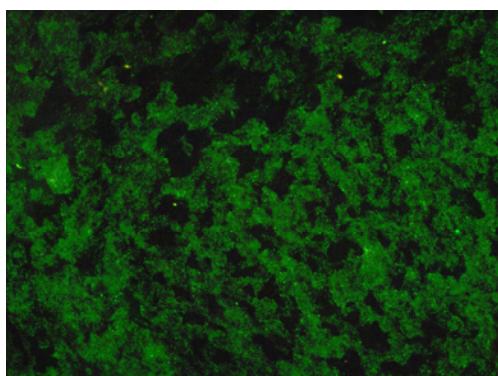
Primární protilátka se ředí do blokovacího roztoku a její optimální koncentrace se určuje experimentálně, kdy se vzorek inkubuje s různě koncentrovanými roztoky protilátky a následně se vybere taková koncentrace, která poskytuje nejlepší značení cílové struktury při minimální nespecifické vazbě.



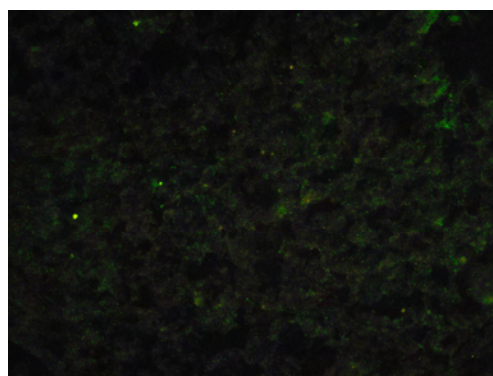
**OTR 1:200**



**OTR 1:400**



**OTR 1:800**



**OTR 1:1600**

**Obr. 11. Příklad testu ředění protilátek**

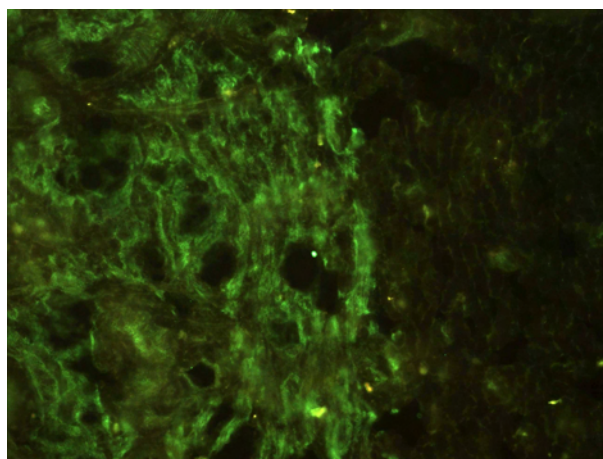
Řez z pravé síně srdce kontrolního potkana kmene Wistar; primární protilátka: Rabbit anti OTR (Alomone Labs, Jerusalem, Israel); sekundární protilátka: AlexaFluor 488 Goat anti Rabbit (Invitrogen, USA), (zvětšení 40x).

Na Obr. 11 je uveden příklad ředění PP pro oxytocinový receptor, kde je nevhodnější ředění protilátky proti oxytocinovému receptoru (OTR) 1:200, které jsme použili rovněž pro GalR3, beta III (neuronální marker). Pro ANP, Gal, GalLP, GalR1, GalR2 bylo ředění 1:500 a pro OT, AVP, GFAP (gliální marker) 1:800.

Inkubace řezu s primární protilátkou probíhá při 4 °C přes noc. Tímto způsobem inkubace je při nižší koncentraci protilátky dosaženo vyšší specifity vazby na cílovou strukturu. Po inkubaci následují před aplikací sekundární protilátky tři oplachy v PBS trvající 5, 10 a 15 minut. Specifitu vazby primární protilátky je možné otestovat různými metodami viz kapitola 3.5.3.2.

### 3.5.3.2. Testování specifity primární protilátky

Nejobvyklejší metodou je použití značení testovanou protilátkou na referenční tkáni. Dále uvádíme výsledky z našich pokusů sledujících specifitu PP. Např. referenční tkáni pro oxytocinový receptor je děloha, ve které je přítomnost tohoto receptoru známa a prokázána. Příklad testování specifity OTR je uveden na Obr. 12.

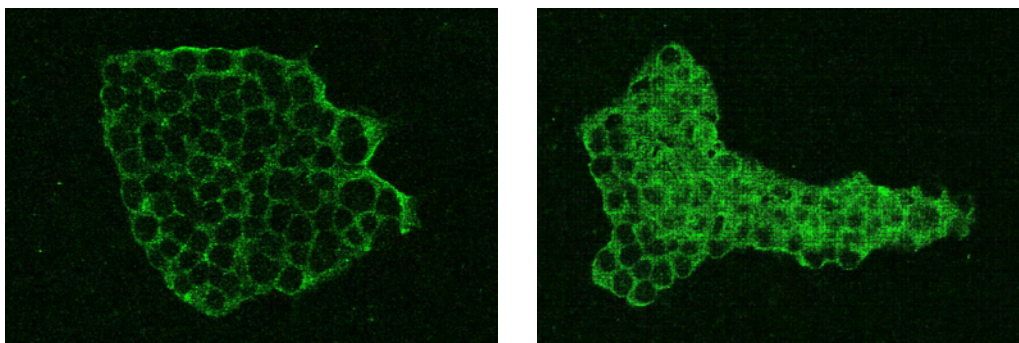


**Obr. 12. Průkaz oxytocinového receptoru v děloze primární protilátkou proti OTR**

Řez z dělohy kontrolního potkana. Primární protilátka Rabbit anti OTR (Alomone Labs, Jerusalem, Israel); sekundární protilátka AlexaFluor 488 Goat anti Rabbit (Invitrogen, USA), (zvětšení 40x)..

### 3.5.3.2a. Transfekce buněk genem

Sofistikovanější metodou testování specificity protilátky je transfekce buněk genem pro značenou strukturu, následné označení transfekovaných a netransfekovaných buněk, jako kontroly testovanou protilátkou (Obr.13).



Netransfekované buňky HEK 293      Buňky HEK 293 transfekované OTR

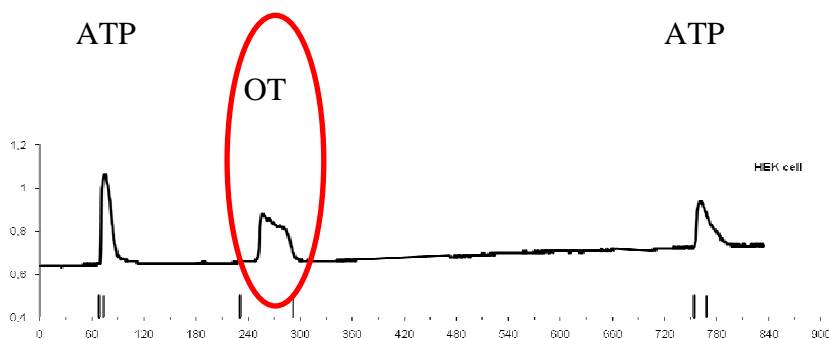
**Obr. 13. Human embryonic kidney 293 buňky transfekované genem pro OTR**

PP: Rabbit anti OTR (Alomone Labs, Jerusalem, Israel),

SP: AlexaFluor 488 Goat anti Rabbit (Invitrogen, Carlsbad, USA).

### 3.5.3.2b. Calcium imaging

Je výhodné ověřit úspěšnost transfekce metodou „calcium imaging“. Metoda calcium imaging spočívá ve sledování uvolnění vápníku po aktivaci transfekované buňky odpovídajícím podnětem, např. buňky transfekované genem oxytocinového receptoru po aplikaci oxytocinu (Obr.14). Tato metoda testování protilátky je velmi náročná na čas, potřebný materiál i přístrojové vybavení.



**Obr. 14. Odpověď buňky HEK 293 exprimující oxytocinový receptor**

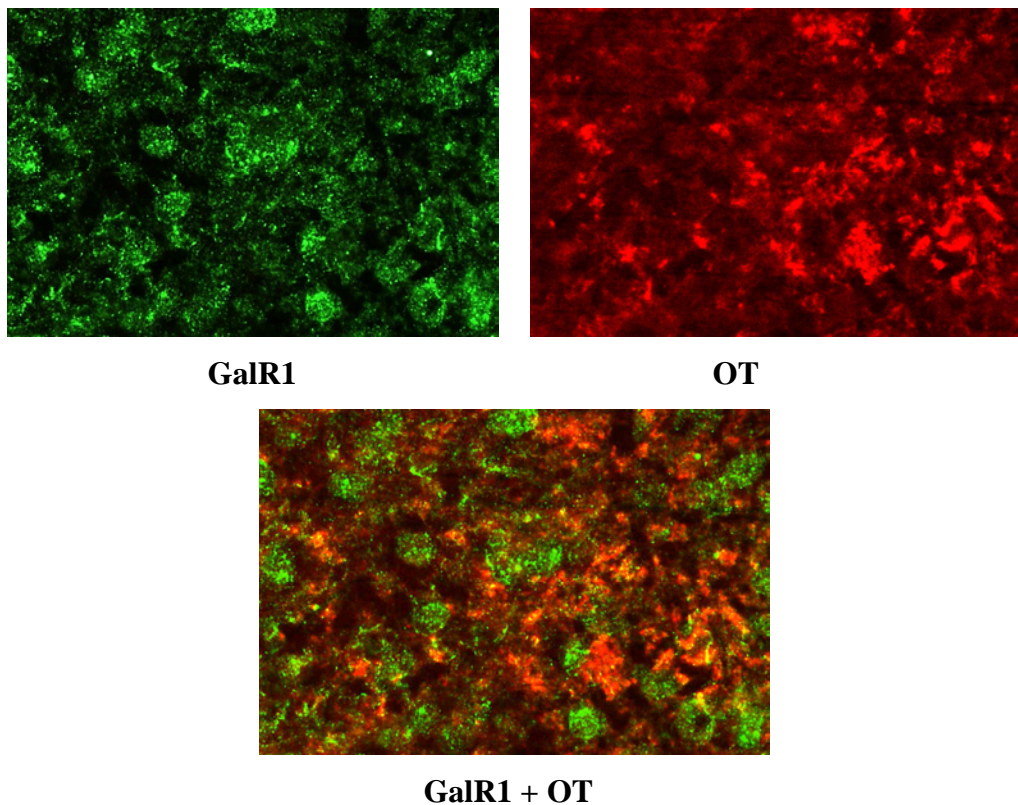
Metoda vápníkového zobrazování umožňuje ověření úspěšné transfekce. Aplikace adenosintrifosfátu (ATP) se používá jako kontrola funkce metody.

### 3.5.3.2c. Western Blot

Nejčastěji používanou metodou testování specificity primárních protilátek je Western blot (viz 45). Tato metoda nabízí dobrý poměr účinnosti a náročnosti metody.

### 3.5.3.3. Sekundární protilátky

Sekundární protilátky (SP) použité v reakci musí specificky reagovat s antigeny zvířat, ze kterých byly získány primární protilátky. Zároveň musí být SP používané současně označeny jinou fluorescenční barvou, aby bylo možné je na preparátu odlišit. SP se získávají z různých zvířecích druhů, což umožňuje kombinaci stanovení různých proteinů zároveň. Pro detekci se značí konjugací s různými značkami, nejčastěji používanými jsou fluorescenční značky pro sledování imunofluorescenčním mikroskopem, a značky koloidním zlatem pro elektronovou mikroskopii. Různé barvy fluorescenčních značek umožňují sledovat na jednom vzorku zároveň více cílových struktur. Např. současné sledování exprese GalR1 a oxytocinu (Obr.15).



Obr. 15. Příklad vícenásobného značení v neurohypofýze (zvětšeno 40x)

V našich experimentech jsme používali sekundární protilátky firmy Invitrogen, USA pro fluorescenční značení, ředěné 1:600.

AlexaFluor 488 Goat anti Rabbit

AlexaFluor 488 Goat anti Mouse

AlexaFluor 546 Goat anti Mouse

Alexa Fluor 546 Goat anti Guinea Pig

AlexaFluor 633 Goat anti Chicken

### **3.5.3.3a. Sekundární protilátky pro elektronovou mikroskopii**

Pro potřeby elektronové mikroskopie se tkáň po označení proteinu primární protilátkou označí sekundární protilátkou určenou pro elektronovou mikroskopii.

Sekundární protilátky pro elektronovou mikroskopii jsou stejně jako protilátky pro fluorescenční mikroskopii získávány z různých zvířat. Rozdíl spočívá v tom, že fluorescenční značka je nahrazena částicí koloidního zlata. Podobně jako fluorescenční značky mají různé barvy, částice koloidního zlata mají různé rozměry (např. 5, 10 a 15 nm), což následně umožní jejich rozlišení při vícenásobném značení jednoho preparátu.

Pro elektronovou mikroskopii jsme použili sekundární protilátky od firmy Abcam, UK s ředěním 1:500:

Goat to Mouse Gold 5 nm

Goat to Guinea Pig Gold 10 nm

Goat to Rabbit 15 nm

## **3. 6. WESTERN BLOT**

Metoda Western blot (WB) spočívá v přenosu proteinů rozdělených elektroforézou z homogenátu vzorku tkáně na pevnou membránu, a jejich následná detekce pomocí specifických protilátek. Takto detekované proteiny se na membráně objeví jako barevné proužky tzv. bandy. WB je možné použít nejen k ověření přítomnosti proteinu a zjištění jeho množství, ale také k ověření specifity protilátek.

### **3.6.1. Příprava homogenátu tkáně**

Vzorek tkáně se homogenizuje ihned po odběru, nebo je po odběru zmražen v tekutém dusíku a až do zpracování uložen v hlubokomrazícím boxu při -80 °C. Homogenát se smíchá s roztokem Laemmlli pufru a následně se vaří po dobu 5 minut na vodní lázni, čímž dojde k denaturaci proteinů.

### **3.6.2. Elektroforéza**

K elektroforetickému dělení vzorku proteinů používáme komerčně dodávané polyakrylamidové gradientní gely Mini-PROTEAN TGX 4-20% (Biorad, USA), které poskytují optimální separační rozsah pro proteiny o molekulové hmotnosti 10-200 kDa. Pro značení molekulární hmotnosti byl použit marker Precision Plus Dual Xtra Standards (Biorad, USA). Pro uvedený gel je obvyklá doba průchodu vzorku gelem 45 minut při napětí 200V.

Pro elektroforézu a Western blot byl použit postup doporučený výrobcem gelů a transferových sendvičů (Biorad). Postup je dostupný na [www.biorad.com](http://www.biorad.com).

### **3.6.3. Blotování**

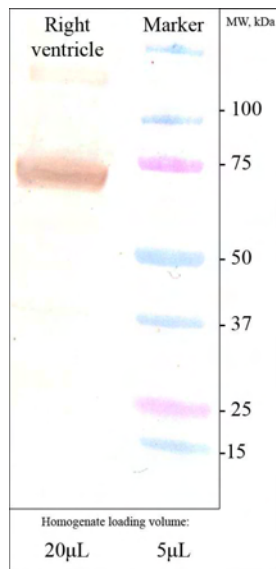
K následujícímu přenosu takto elektroforeticky rozděleného vzorku na nitrocelulóзовou membránu (tzv. blotování) používáme komerčně dodávaný sendvič Trans-Blot Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Packs (Biorad, USA).

Blotování probíhá na přístroji Trans-Blot Turbo (Biorad, USA), přenos trvá 3 minuty. Následně se gel přenesse do blokovacího roztoku na bázi albuminu z hovězího séra (BSA) (Ústav sér a očkovacích látek, ČR), ve kterém se membrána inkubuje dvě hodiny při pokojové teplotě.

### **3.6.4. Detekce cílového proteinu**

Ke zjištění, zda je ve vzorku přítomen hledaný protein, je nutné použít specifickou protilátku proti tomuto proteinu. V naší laboratoři využíváme k detekci kity Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, USA) a Immun-Blot Assay Kit (Biorad, USA). Oba kity jsou založeny na použití sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Rozdíl mezi oběma kity spočívá v substrátu pro křenovou peroxidázu.

Membrána s vyvolanými proužky je po oschnutí skenována a získaný obraz je následně softwarově zpracován a označen, jak je uvedeno na Obr. 16 s příkladem stanovení oxytocinového receptoru v pravé srdeční komoře potkana.



**Obr. 16. Western blot oxytocinového receptoru v pravé srdeční komoře srdce potkana**

### 3.6.5. Vyhodnocení Western Blotu

Membrána s proužky se vyhodnocuje obvykle pouze kvalitativně na základě přítomnosti proužku očekávané molekulové hmotnosti. V případě potřeby kvantifikace, např. pro srovnání množství exprimovaného proteinu u kontrol a po působení stresu, používáme nástroj Gels programu ImageJ (freeware dostupné <http://imagej.nih.gov/ij/>).

### **3. 7. STANOVENÍ EXPRESE mRNA**

Expresi mRNA transkriptů sledovaných neuropeptidů a jejich receptorů jsme určovali real time kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (real time qPCR) ze zmražených vzorků.

Princip kvantitativní real time qPCR spočívá ve sledování amplifikace určitého úseku nukleové kyseliny, která kóduje sledovaný protein. V našem případě se jedná o mRNA kódující jednotlivé neuropeptidy a jejich receptory. Protože polymerázová řetězová reakce pracuje s DNA, je nutné mRNA reverzně transkribovat na jednořetězovou cDNA. Následně se z cDNA vybere úsek, který se bude v reakci amplifikovat. Úsek cDNA je definován použitím tzv. primerů, které jsme navrhovali pomocí databází dostupných na internetu. Vybraný úsek se amplifikuje použitím teplu odolných enzymů a tepelných cyklů. V každém tepelném cyklu se počet molekul cDNA ideálně zdvojnásobí. Do reakční směsi je dále přidáno fluorescenční barvivo, které se vzrůstajícím množstvím cDNA zvyšuje emisi záření. Emitované záření je v průběhu celé reakce měřeno v reálném čase. Měřením emitovaného záření získáme amplifikační křivku, ze které je poté možné určit výchozí množství cDNA. Amplifikační křivka má esovitý tvar, který můžeme rozdělit na tři části. V počáteční fázi je v reakční směsi tak málo cDNA, že fluorescenční signál splývá se šumem pozadí. Dále následuje exponenciální fáze, kdy exponenciálně roste množství cDNA a s ním i fluorescence. Po exponenciální fázi se množství cDNA dále nemění.

Pro kvantifikaci cDNA ve vzorku je do exponenciální fáze vložena hodnota tzv. fluorescenčního prahu  $C_T$  (threshold cycle).  $C_T$  hodnota odpovídá cyklu, při kterém křivka fluorescence překročí tzv. fluorescenční práh. Do dosažení tohoto prahu je hodnota fluorescence neměřitelná. Čím dříve dosáhne amplifikační křivka hodnoty  $C_T$ , tím více molekul sledované cDNA bylo na počátku reakce přítomno ve vzorku.

#### **3.7.1. Izolace celkové RNA**

Celkovou RNA jsme v souladu s protokolem výrobce izolovali za pomoci TRI Reagentu (Sigma, USA) z jednotlivých vzorků zmražených tkání. DNA kontaminující vzorek byla odstraněna přidávkem 1 U DNAsy/ $\mu\text{g}$  celkové RNA (Invitrogen, USA). RNA byla reverzně transkribována při 42 °C po dobu 50 min s využitím Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Jednořetězová cDNA byla syntetizována ze



4 µg celkové RNA. Čistota RNA a její koncentrace byly určena na NanoPhotometeru (IMPLEN, USA).

### 3.7.2. Primery

Pro detekci vybraného úseku cDNA jsme použili námi navržené primery, které byly navrženy tak, aby došlo k amplifikaci sekvence odpovídající nukleotidu. Beta-aktin byl použit jako referenční, tzv. housekeeping gen. Pro referenční gen  $\beta$ -aktin jsme použili publikované sekvence cDNA (Genbank Accession No. NM\_031144), odpovídající nukleotidu 873-969 (forward: TTCCTTCCTGGGTATGGAATC, reverse: GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG). Pro další neuropeptidy a jejich receptory jsme navrhovali primery stejným způsobem, za pomoci Genbanky.

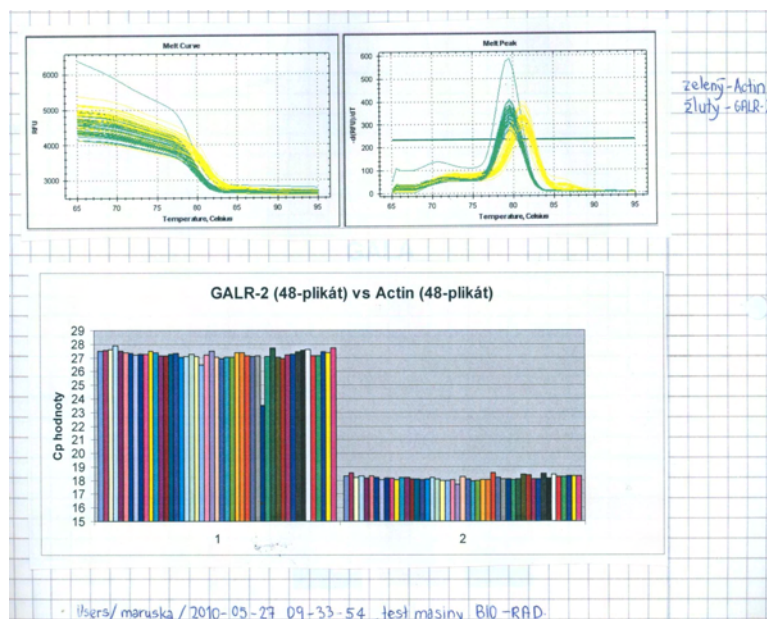
### 3.7.3. Test

Real time qPCR reakce byla provedena na přístroji iCycler (BioRad, USA) nebo na přístroji CFX96 Real-Time System (BioRad, USA). Reakční směs obsahovala 5 µl zředěné cDNA, 1 µl každého primeru (20 nmol/l), 5,5 µl ultračisté vody a 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix (Biorad, USA).

Kvantitativní PCR reakce sestávala z následujících kroků: denaturace při 95 °C po dobu 10 min a dále 45 cyklů amplifikace (95 °C/30 s, 60 °C/25 s a 72 °C/20 s). Po ukončení amplifikace byly vzorky zvolna ohřáty z 65 °C na 95 °C při kontinuálním měření fluorescence pro získání křivky tání.

### 3.7.4. Kvantifikace

Kvantifikaci dat jsme provedli softwarem Optical System Software (Biorad, USA). Stanovili jsme mRNA OTR vztažením její  $C_T$  hodnoty k  $C_T$  hodnotě referenčního genu pro  $\beta$ -aktin. Relativní exprese byla spočítána použitím metody  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak a Schmittgen, 2001).



**Obr. 17. Ukázka CT hodnot pro beta-aktin a galaninový receptor R1**

Uveden „melting“ bod jako indikátor specificity PCR.

Relativní exprese byla vypočtena pomocí Pfafflova vzorce:

$$RE = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Expresse genu pro  $\beta$ -aktin byla použita pro normalizaci rozdílů ve vstupních množstvích cDNA pro měřený transkript. Statistická významnost byla počítána jednocestnou ANOVA pro analýzu významnosti více vzorků, a v případě potřeby následoval Student's -Newman -Keuls *post hoc* test. Jako signifikantní je považována významnost pro  $p < 0,05$ .

### **3. 8. BEHAVIORÁNÍ STUDIE**

Předpokládaná úloha neuropeptidů a jejich analogů v regulaci emocionálního chování byla sledována u potkanů v testu otevřeného pole (OF) a ve vyvýšeném křížovém bludišti (EPM). Oba testy jsou všeobecně přijímaná paradigma pro měření úzkosti a anxiolytického účinku potenciálních léčiv.

V našich pokusech jsme testovali anxiolytické a protistresové účinky galaninu, antagonisty galaninu M40, fragment galaninu 1-13-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala amid (Bartfai et al., 1992; Crawley et al., 1993), syntetizované M. Flegelem z našeho pracoviště. Látky rozpuštěné ve fyziologickém roztoku byly aplikovány intraperitoneálně (i.p.) v dávce 0,3 mg/kg/2 ml.

#### **3.8.1. Test v otevřeném poli**

Test v otevřeném poli (OF, Open Field) byl prováděn v kruhové aréně s průměrem 150 cm a výškou stěny 50 cm. Aréna byla rozdělena na dva kruhové segmenty, zevní široký 20 cm a vnitřní o průměru 130 cm. Test trval 5 min a byly měřeny následující parametry: celková distance pohybu (TMD), celkový čas pohybu (TTM), distance ve vnitřním segmentu (CMD). Použitý softvér umožňuje výpočet dalších parametrů, např. byl vypočten parametr CMD/TMD jako procento TMD. V některých pokusech bylo ještě registrováno panáčkování (rearing) a péče o tělo (grooming). Chování testovaného potkana bylo snímáno kamerou a přenášeno do počítače, kde byly behaviorální parametry zaznamenávány a vyhodnocovány automatickým video-monitorovacím systémem (AnyMaze, Stoelting, USA).

#### **3.8.2. Test vyvýšeného bludiště**

V testu vyvýšeného křížového bludiště (EPM, Elevated Plus Maze) jsme sledovali pohyb v otevřených a zavřených ramenech, rovněž automaticky s použitím systému AnyMaze.

Statistické vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno použitím testu jednocestné ANOVA, s následujícími testy pro zjištění významnosti rozdílů. Jako signifikantní jsou považovány rozdíly s  $p < 0,05$ .

## 4. VÝSLEDKY

Nové nazírání na stres umožňuje využívat tento stav jako experimentální nástroj pro studium mozku a naopak nové poznatky umožňují hledání cílových struktur pro terapeutické a preventivní zákroky (Klenerová a Hynie, 2006a). Ukazuje se, že v současné době je nejvhodnější výzkum, který kombinuje přístup behaviorální s buněčným a molekulárním, se zaměřením na vztah mezi strukturou a funkcí mozku. Behaviorální studie potvrzují, zda sledovaný neuropeptid působí v CNS, zda proniká mozkomíšní bariérou po systémové aplikaci, zda má protistresový účinek a zda má anxiolytický účinek (Klenerova et al., 2011). Usilujeme o příspěvek k výzkumu centrálních účinků neuropeptidů a jejich analogů, se zaměřením na oxytocin a na další látky s modulačními účinky tohoto peptidu, v posledním období především na galaninergní systém (Klenerova et al., 2011a; Skopek et al., 2011).

Studium systému oxytocin/oxytocinový receptor (OT/OTR) je v posledním období zaměřeno na jiné tkáně, než na klasické dělohu a mléčnou žlázu. Zvýšená pozornost je věnována signálním cestám a biologickým účinkům OT/OTR systému, které jsou závislé na typu tkáně, lokalizaci receptorů na buněčné membráně a na možnosti transdukce extracelulárních signálů do nitra buňky prostřednictvím G-regulačních proteinů. Ve středu zájmu je kardiovaskulární systém, kde již byly identifikovány ligandy, zapojené v kardiovaskulárních poruchách. Dalším vhodným kandidátem pro studium nových mechanismů působení GPCR a jejich ligandů je galaninergní systém se třemi subtypy receptorů, které využívají pro transdukci různé G-proteiny.

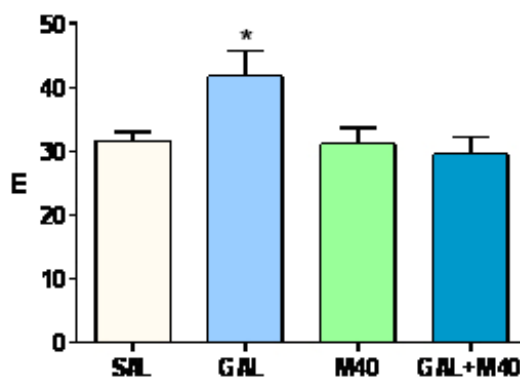
Výsledky této disertace jsou rozděleny na behaviorální studie, kde vycházíme z našeho nálezu protistresového účinku galaninu po systémové aplikaci. V další části jsou uvedeny výsledky ze studia OT/OTR systému a galaninergního systému v srdci a hypofýze, za fyziologického stavu a po aplikaci akutního stresu (Klenerova et al., 2011; Skopek et al., 2012), za využití molekulárně-biologických metod a metod imunofluorescenčních.

#### 4. 1. BEHAVIORÁLNÍ STUDIE

V našich předchozích studiích týkajících se neurobiologie stresu jsme použili systémovou aplikaci oxytocinu a jeho dlouhodobě působícího analogu karbetocinu (Klenerová et al., 2009a; Klenerová et al., 2009b; Klenerová et al., 2010). Oba peptidy vykazaly anxiolytický účinek a rovněž protistresový efekt. Vzhledem k úzkému vztahu galaninu a oxytocinu, jsme zvolili podobný přístup ke studiu možných behaviorálních účinků galaninu, i v následujících pokusech. Vyslovili jsme hypotézu, že tyto peptidy částečně pronikají mozkomíšní bariérou a tak mohou působit na příslušné receptory v CNS. Cílem tohoto studia je možnost využití získaných poznatků k farmakologickému ovlivnění a terapeutickému využití u postresových i dalších poruch, jako je anxieta a deprese.

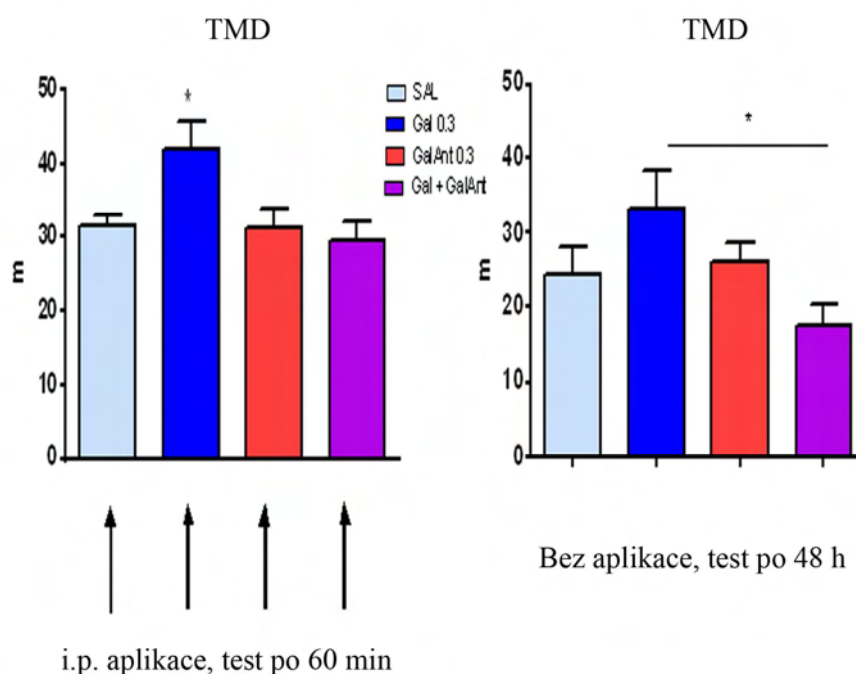
V následujících experimentech jsme přistoupili ke studiu behaviorálních účinků dalšího neuropeptidu, galaninu. Tento neuropeptid má rozsáhlé fyziologické účinky, ale jeho behaviorální účinky po systémové aplikaci nebyly dosud v literatuře prokázány. V experimentálním protokolu jsme vyšli z našich předchozích pokusů, které jsou zmíněny v úvodní a metodické kapitole.

V prvním experimentu galanin v dávce 0,3 mg zvýšil lokomoční chování, měřené jako TMD a rychlost pohybu, 1 hodinu po i.p. aplikaci. Peptidový antagonist M40 snížil oba registrované lokomoční parametry na kontrolní hodnoty. Tento nálezní ukazuje, že oba peptidy, agonista, stejně tak jako antagonist, pronikají mozkomíšní bariérou, a že účinky přetrvávají po více než 1 hod po aplikaci. Navíc data získaná po 48ti hodinách ukázala, že behaviorální účinky přetrvávají, a to již bez další aplikace galaninu i antagonisty GalAnt (Obr. 19).



Obr. 18. Účinek galaninu a jeho antagonisty M40 na TMD, měřeno v OF

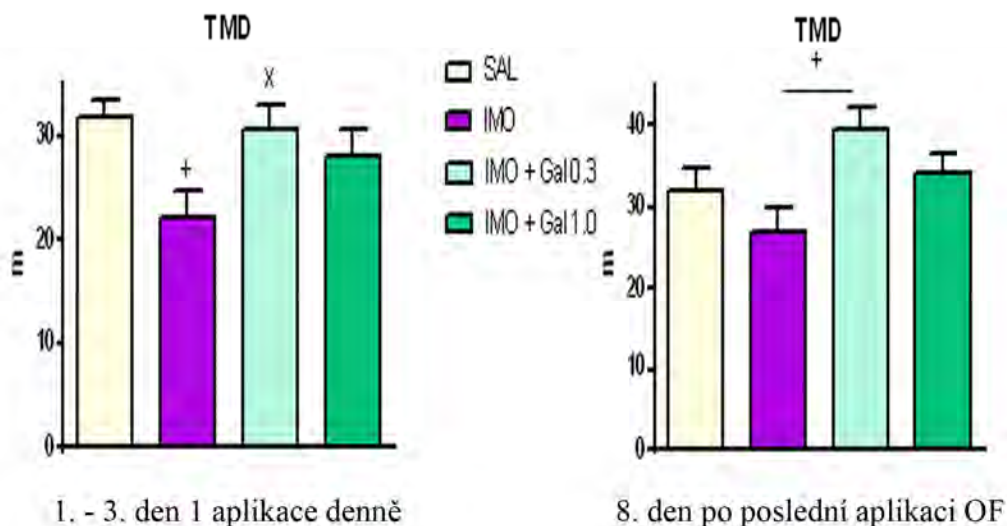
Data na Obr.19 byla analyzována jednocestnou ANOVA s následným Student-Newman-Keuls testem pro více srovnání, 1 :df 3,28. Statistická analýza vykazala signifikantní účinek experimentálních podmínek na TMD ( $F= 3.96$ ,  $p< 0.01$ ), rychlost pohybu ( $F= 10.23$ ,  $p< 0.0001$ , čas panáčkování (neuveďeno) ( $F= 12.42$ ,  $p< 0.0001$ ). Galanin v dávce 0.3 mg zvyšuje TMD i rychlost pohybu ve srovnání s kontrolami, s dalším antagonistou GalAnt a se skupinou potkanů s kombinovanou aplikací galaninu a antagonisty. Rovněž za 48 hod bez aplikace galaninu či jeho antagonisty přetrvává zvýšení TMD hodnot ( $F= 5.56$ ,  $p< 0.004$ ), rychlosti pohybu, která byla signifikantně odlišná mezi skupinami ( $F= 5.68$ ,  $p<0.004$ ), ale pouze u aplikace galanin vs jeho kombinace s antagonistou se signifikantně lišila.



**Obr. 19. Zvýšení explorační aktivity po aplikaci galaninu a její vrácení na kontrolní hodnotu po aplikaci antagonisty Galanin -Y Neuropeptid amidu (GalAnt)**

Jako dalšího antagonistu k ověření behaviorálních účinků galaninu jsme použili novou látku, syntetizovanou v naší laboratoři, chimérický peptid Galanin - (1-13) Neuropeptid Y - (25-36) amid. Obdrželi jsme obdobné výsledky jako v předchozím pokuse s antagonistou M40, jak je znázorněno na Obr. 19.

Imobilizační stres (IMO) snižuje explorační chování  
v testu otevřeného pole (OF)  
galanin tento efekt antagonizuje



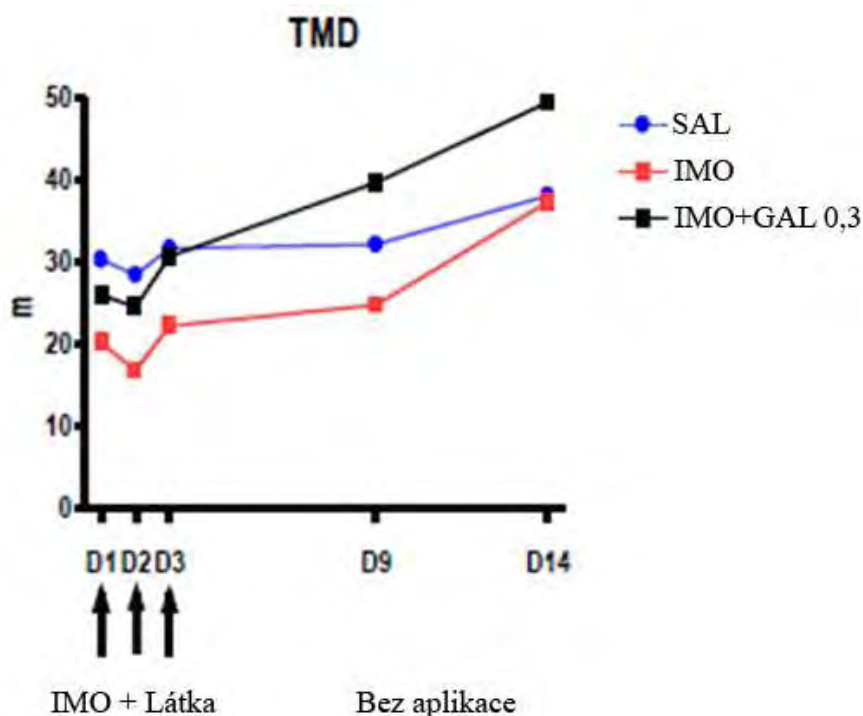
**Obr. 20. Vliv 3x aplikovaného akutního stresu na explorační chování, účinek galaninu s aplikací ve dvou dávkách 0.3 mg a 1 mg ip. po stresu**

Na základě hypotézy, že galanin by mohl mít obdobně jako oxytocin a karbetocin protistresové účinky, jsme v experimentu, jehož výsledky jsou uvedeny na obrázku 20, vystavili potkany po tři dny akutnímu stresu. Ihned po skončení stresu jsme aplikovali galanin ve dvou dávkách, 0.3 a 1 mg i.p., rovněž po tři dny. Zároveň jsme v OF testovali explorativní chování, které bylo po stresu signifikantně snižené. Aplikace galaninu v obou dávkách vrátila hodnoty TMD ke kontrolním hodnotám. Za týden po poslední aplikaci stresu a látek, tj. týden byla zvířata v klidu ve svých klecích pouze handlována, jsme opakovali behaviorální test. Protistresové účinky obou dávek galaninu přetrvávaly i bez aplikace galaninu

V dalším experimentu jsme předchozí pokus zopakovali. Potkani byli rozděleni na 4 skupiny po 8mi; kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok, stresované skupině byl rovněž aplikován fyziologický roztok, další skupině stres + galanin v dávce 0.3 mg a poslední skupině stres + galanin v dávce 1 mg. Látky byly aplikovány ihned po skončení stresu a behaviorální test byl proveden za 1. hodinu po ukončení stresu. Pro potvrzení přetrvání behaviorálních změn byl proveden behaviorální test 9. a 14. den bez další aplikace stresu a látek. Výsledky s hodnotami uvedených parametrů jsou v Tab. 2.

Tab. 2. Antistresový účinek galaninu po i.p. aplikaci přetrvávající dva týdny

| Měřené parametry            | Experimentální skupiny |                                 |                                     |                                 |
|-----------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
|                             | CO                     | IMO                             | IMO+GAL 0,3                         | IMO+GAL 1,0                     |
| <b>Den 1</b>                |                        |                                 |                                     |                                 |
| Celková uběhnutá vzdálenost | 30.29 ± 2.23           | 20.20 ± 2.53*                   | 25.93 ± 1.73                        | 24.93 ± 2.28                    |
| Rychlost pohybu (m/s)       | 0.256 ± 0.014          | 0.219 ± 0.009*                  | 0.232 ± 0.008 <sup>+</sup>          | 0.209 ± 0.006*                  |
| Doba panáčkování            | 26.29 ± 3.55           | 15.69 ± 3.10*                   | 19.46 ± 2.36*                       | 17.36 ± 2.66*                   |
| <b>Den 2</b>                |                        |                                 |                                     |                                 |
| Celková uběhnutá vzdálenost | 28.38 ± 2.41           | 16.77 ± 2.93*                   | 24.51 ± 3.11                        | 23.3 ± 1.70                     |
| Rychlost pohybu (m/s)       | 0.249 ± 0.012          | 0.212 ± 0.014                   | 0.237 ± 0.015                       | 0.223 ± 0.009                   |
| Doba panáčkování            | 23.60 ± 3.36           | 11.84 ± 2.78*                   | 20.82 ± 1.59                        | 13.87 ± 3.59                    |
| <b>Den 3</b>                |                        |                                 |                                     |                                 |
| Celková uběhnutá vzdálenost | <b>31.62 ± 1.76</b>    | <b>22.17 ± 2.64<sup>+</sup></b> | <b>30.64 ± 2.49<sup>+</sup></b>     | <b>28.09 ± 2.60</b>             |
| Rychlost pohybu (m/s)       | <b>0.257 ± 0.010</b>   | <b>0.230 ± 0.014</b>            | <b>0.277 ± 0.011<sup>+*</sup></b>   | <b>0.233 ± 0.009</b>            |
| Doba panáčkování            | <b>13.03 ± 2.20</b>    | <b>7.74 ± 0.88</b>              | <b>19.46 ± 2.50<sup>+</sup></b>     | <b>19.28 ± 3.91<sup>+</sup></b> |
| <b>Den 9</b>                |                        |                                 |                                     |                                 |
| Celková uběhnutá vzdálenost | 32.10 ± 2.63           | 24.73 ± 2.49*                   | 39.60 ± 2.85 <sup>+</sup>           | 34.19 ± 2.33                    |
| Rychlost pohybu (m/s)       | 0.266 ± 0.010          | 0.261 ± 0.012                   | 0.299 ± 0.010 <sup>***o</sup>       | 0.248 ± 0.009                   |
| Doba panáčkování            | 12.57 ± 1.35           | 9.35 ± 1.35                     | 15.26 ± 2.53                        | 17.49 ± 3.09                    |
| <b>Den 14</b>               |                        |                                 |                                     |                                 |
| Celková uběhnutá vzdálenost | <b>38.03 ± 2.43</b>    | <b>37.24 ± 2.43</b>             | <b>49.37 ± 3.29<sup>***o</sup></b>  | <b>38.77 ± 2.50</b>             |
| Rychlost pohybu (m/s)       | <b>0.299 ± 0.010</b>   | <b>0.294 ± 0.012</b>            | <b>0.351 ± 0.013<sup>***o</sup></b> | <b>0.277 ± 0.013</b>            |
| Doba panáčkování            | <b>18.61 ± 1.69</b>    | <b>18.11 ± 3.11</b>             | <b>24.28 ± 3.81</b>                 | <b>23.96 ± 2.98</b>             |





Výsledky z Tab. 2 jsou pro větší přehlednost zobrazeny jako graf. Statistické vyhodnocení experimentálních dat prvního dne vykazuje signifikantní rozdíly pro TMD ( $F= 3.48$ ,  $p= 0.027$ ), rychlost pohybu ( $F= 4.35$ ,  $p= 0.011$ ). Všechny měřené behaviorální parametry byly stresem sníženy. Tyto deteriorační účinky stresu byly oběma dávkami galaninu antagonizovány. Rovněž druhý a třetí den byly získány obdobné výsledky včetně výsledků statistické analýzy.

Zajímavé výsledky, získané 9. den bez aplikace stresu a látek od 3. dne, svědčí pro přetrvávání deterioračních účinků stresu, pro TMD ( $F= 6.18$ ,  $p= 0.002$ ) a rychlost pohybu ( $F=4.49$ ,  $p= 0.01$ ), které byly antagonizovány i.p. aplikovaným galaninem. Rovněž 14. den svědčily hodnoty statistické analýzy pro TMD ( $F= 4.51$ ,  $p= 0.009$ ) a rychlost pohybu ( $F = 6.72$ ,  $p= 0.001$ ) pro přetrvávání protistresových účinků galaninu i bez jeho aplikace .

Výše uvedené behaviorální studie prokázaly, že galanin je další neuropeptid, který po systémové aplikaci má protistresové a anxiolytické účinky. Získané výsledky také předpokládají, že agonista galanin a antagonist galaninu M40, i námi syntetizovaný antagonist galaninu peptid chiméra-Galanin Y Neuropeptid amid, působí na úrovni receptorů a výsledek této interakce po určitou dobu přetrvává. Na základě těchto výsledků, které potvrdily naši hypotézu o působení galaninu v CNS v odpovědi na stres, jsme přistoupili k dalšímu studiu galaninergního systému.

## 4. 2. NEUROPEPTIDY V SRDCI

### 4. 2. 1. Oxytocinový systém

#### 4. 2. 1. 1. Exprese mRNA OTR v srdci za fyziologických podmínek

Stanovili jsme za fyziologických podmínek expresi mRNA oxytocinového receptoru v srdečních oddílech potkana, levé (LA, LS) a pravé síni (RA, PS), a levé (LV, LK) a pravé (RV, PK) komoře, u kmenů Sprague-Dawley (SD) a Lewis (LE). Tyto dva kmeny se vyznačují odlišnou aktivitou HPA osy, potkani kmene Lewis mají sníženou aktivitu HPA osy ve srovnání s potkany Sprague-Dawley. Experimenty byly provedeny u skupin potkanů  $n = 6$ .

**Tab. 3. Relativní exprese OTR mRNA srdečních oddílech dvou kmenů potkanů**

Data jsou prezentována jako relativní exprese ( $\times 100$ )  $\pm$  SEM. Pro vyjádření relativní exprese byla jako kalibrátor použita  $\Delta\Delta C_T$  hodnota pro oba kmeny.

\*Dvoucestná ANOVA ukazuje, že kmen potkanů nemá na expresi signifikantní vliv:  $F(1,40)=0,53$ ;  $p=0,342$ . Rozdíly mezi srdečními oddíly jsou signifikantní:  $F(1,40)=75,58$ ;  $p<0,0001$ .

<sup>x</sup>Jednocestná ANOVA pro SD:  $F(3,20)=17,15$ ;  $p<0,0001$ , Bonferroniho *post hoc* test ukazuje, že LS je signifikantně odlišná od PS, LK a PK (pro  $p<0,001$ ).

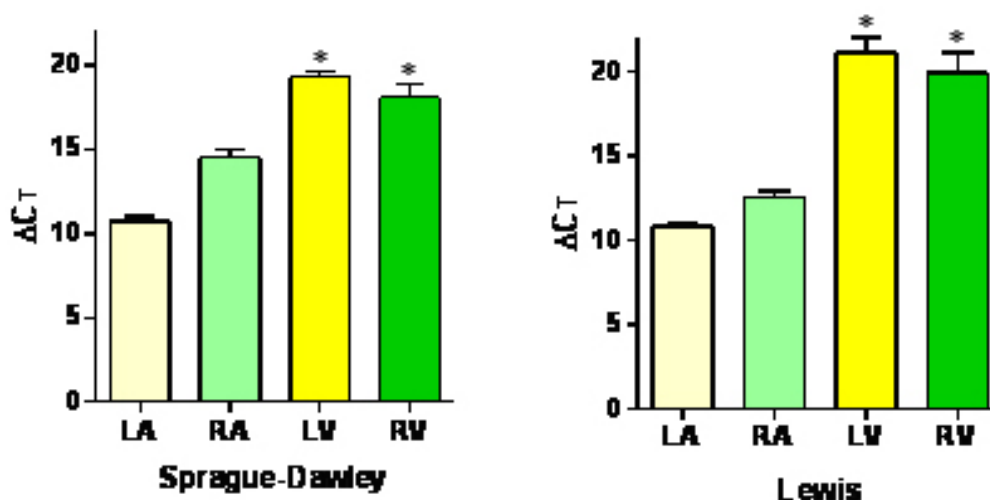
<sup>x</sup>Jednocestná ANOVA pro LE:  $F(3,20)=31,30$ ;  $p<0,0001$ , Bonferroniho *post hoc* test ukazuje, že LS je signifikantně odlišná od PS, LK a PK (pro  $p<0,001$ ). (Klenerova et al., 2011).

| Srdeční oddíly | Sprague-Dawley *<br>RE $\pm$ SEM (n)  | Lewis<br>RE $\pm$ SEM (n)             |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Levá síň       | 100.027 $\pm$ 23.437 (6) <sup>x</sup> | 105.021 $\pm$ 14.910 (6) <sup>x</sup> |
| Pravá síň      | 8.267 $\pm$ 2.069 (6)                 | 31.341 $\pm$ 9.488 (6)                |
| Levá komora    | 0.290 $\pm$ 0.053 (6)                 | 0.148 $\pm$ 0.012 (6)                 |
| Pravá komora   | 0.013 $\pm$ 0.527 (6)                 | 0.290 $\pm$ 0.204 (6)                 |

V tabulce 3 jsou porovnány relativní exprese mRNA OTR v srdečních oddílech potkanů SD a LE. Relativní exprese v levé síni SD byla použita jako kalibrátor. Dvoucestná ANOVA analýza nepotvrdila signifikantní rozdíl mezi oběma kmeny. Jednocestná ANOVA analýza, spočítaná pro jednotlivé kmeny, prokázala signifikantní rozdíl

v expresi mRNA OTR pro jednotlivé srdeční oddíly. V srdečních síních je exprese mRNA OTR oproti komorám výrazně vyšší.

V síních i komorách jsme zjistili rozdíly v prahovém cyklu (threshold cycle =  $\Delta$ CT) mezi cílovým a referenčním genem. Na Obr. 21 jsou znázorněny hodnoty pro  $\Delta$ CT mRNA OTR a  $\beta$ -aktinu, který byl použit jako referenční gen. Tato data potvrzují expresi mRNA OTR ve všech srdečních oddílech. Zaznamenali jsme rozdíl v expresi mRNA OTR, která je v síních vyšší než exprese v komorách (nižší hodnota  $\Delta$ CT v grafu značí vyšší expresi mRNA).



**Obr. 21. Porovnání hodnot  $\Delta$ CT mRNA OTR v srdečních oddílech u kmenů Sprague-Dawley a Lewis za fyziologických podmínek**  
Jedná se o průměrné hodnoty a SEM.

\*Signifikantní hodnoty vzhledem k síním u obou kmenů.

**Poznámka:** Nižší hodnoty  $\Delta$ CT reprezentují vyšší expresi OTR.

Dvoucestnou ANOVA analýzou bylo prokázáno, že kmen potkanů signifikantně neovlivní expresi mRNA OTR v srdečních oddílech:  $F(1,40)=1,42$ ,  $p=0,24$ . Rozdíl v expresi mRNA OTR mezi srdečními oddíly je extrémně signifikantní:  $F(3,40)=100,2$ ,  $p<0,0001$ . Jednocestnou ANOVA analýzou byla pro potkany Sprague-Dawley,  $F(3,20)=48,3$ ;  $p<0,0001$ , zjištěna následující data: Bonferroniho „Multiple Comparison Test“ potvrdil signifikantně vyšší expresi mRNA OTR pro levou síň oproti levé i pravé komoře. Pro potkany Lewis,  $F(3,20)=54,88$ ;  $p<0,0001$ , Bonferroniho „Multiple Comparison Test“ prokázal signifikantní zvýšení mRNA OTR jak v levé tak v pravé síni oproti levé i pravé komoře. (Klenerova et al., 2011).

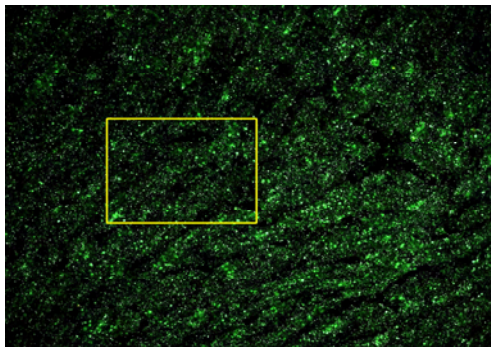
**Tab. 4. Hodnoty relativní exprese mRNA oxytocinového receptoru v oddílech srdce potkanů kmene SD a LE za fyziologických podmínek**

| <b>Relativní exprese mRNA OTR vztažená k levé síni kontroly u dvou kmenů potkanů</b> |                                   |           |                                   |
|--|-----------------------------------|-----------|-----------------------------------|
|  | <b>Sprague-Dawley*</b>            |           | <b>Lewis</b>                      |
|  | <b>RE ± SEM</b>                   |           | <b>RE ± SEM</b>                   |
| <b>LS</b>  | 1.1310 ± 0.2320 (6) <sup>x</sup>  | <b>LS</b> | 1.1880 ± 0.2690 (6) <sup>x</sup>  |
| <b>PS</b>  | 0.0920 ± 0.0230 (6) <sup>xx</sup> | <b>PS</b> | 0.3540 ± 0.1070 (6) <sup>xx</sup> |
| <b>LK</b>  | 0.0033 ± 0.0006 (6)               | <b>LK</b> | 0.0017 ± 0.0001 (6)               |
| <b>PK</b>  | 0.0131 ± 0.0050 (6)               | <b>PK</b> | 0.0039 ± 0.0025 (6)               |

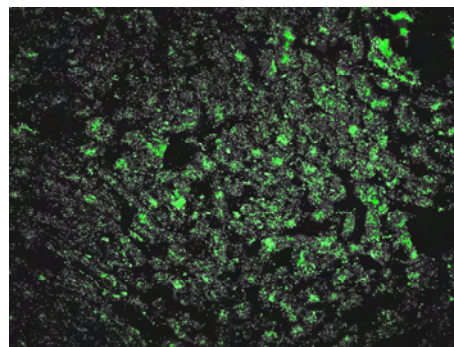
Tabulka 4 porovnává relativní expresi mRNA OTR v srdečních oddílech u kmenů Sprague-Dawley a Lewis. Ve všech srdečních oddílech jsme našli rozdíly v prahovém cyklu cílového a referenčního genu. Zjistili jsme, že vliv kmene potkanů nemá na expresi mRNA signifikantní vliv. Jako extrémně signifikantní se projevil rozdíl mezi srdečními oddíly, kdy exprese mRNA OTR v síních mnohonásobně převyšovala expresi v komorách.

#### 4. 2. 1. 2. Imunohistochemická detekce OTR v srdci za fyziologických podmínek

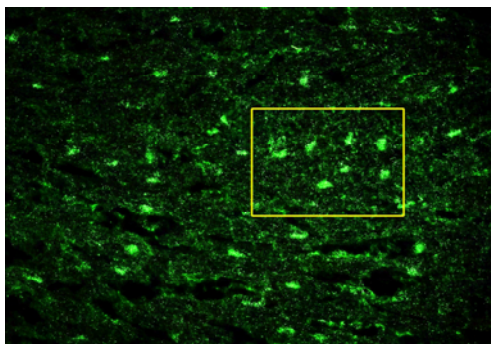
Imunohistochemická detekce OTR prokázala jeho expresi ve všech srdečních oddílech, jak je patrné na níže uvedené sérii obrázků (Obr. 22). Přítomnost OTR jsme zároveň potvrdili i metodou Western blot.



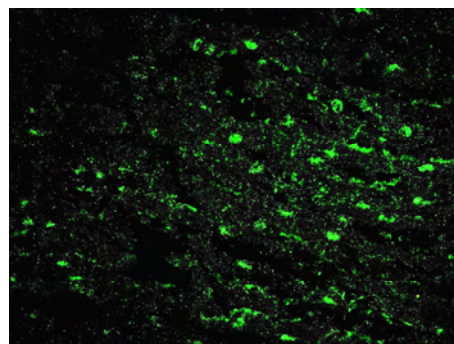
CO LS OTR



CO PS OTR



CO LK OTR



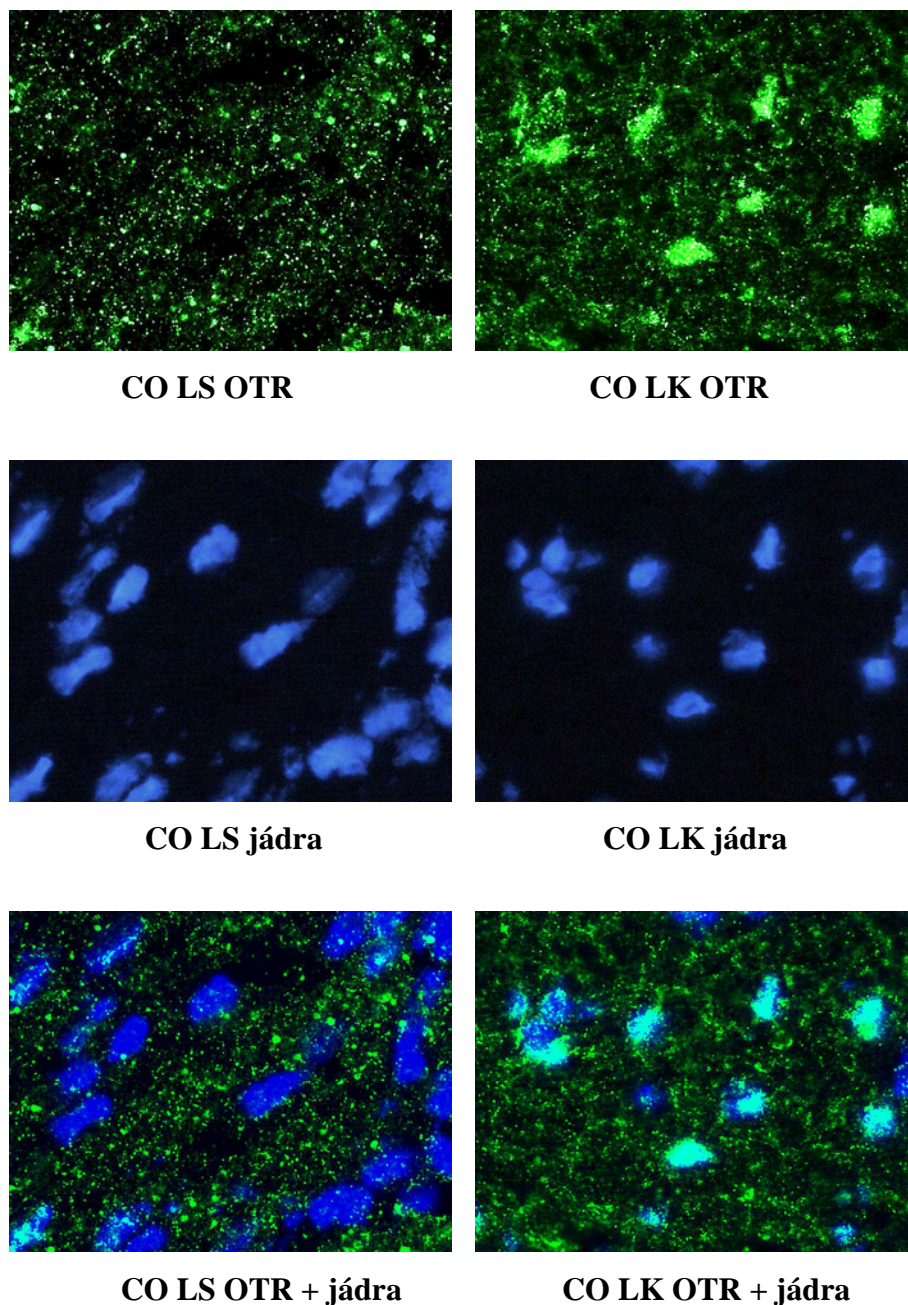
CO PK OTR

**Obr. 22. Imunofluorescenční detekce OTR v srdečních oddílech kontrol**  
(zvětšení 40x)

OTR jsme našli u kontrol v obou srdečních síních i v obou komorách.

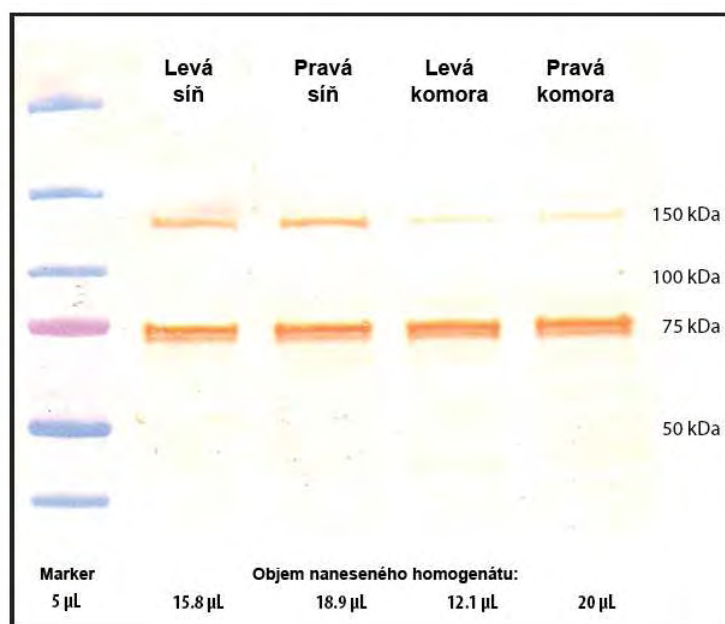
Oblasti ve žlutém rámečku jsou podrobně analyzovány na Obr. 23.

V levé a pravé síni je vyšší četnost buněk, které exprimují OTR. V komorách je oproti síním četnost buněk s expresí OTR nižší, ale je vyšší denzita jejich signálu. Tato zjištění jsou v souladu s expresí mRNA OTR, která je v síních značně vyšší než v komorách, ale rozdíl exprese OTR mezi síněmi a komorami není tak výrazný jako u exprese mRNA OTR.



**Obr. 23. Expresí OTR v jádrech v levé síni a levé komoře kontroly**  
(zvětšení 40x)

Obr. 23 detailně ukazuje výřezy z obrázku 23. OTR je označený zeleně a jádra modře pomocí jaderného markeru. Po prolnutí OTR s jádry je velmi dobře patrné, že exprese OTR v jádrech kardiomyocytu je v levé síni spíše ojedinělá a většina jeho signálu je lokalizována na membránách. Naopak v levé komoře je kolokalizace signálu OTR s jádry velmi častá.

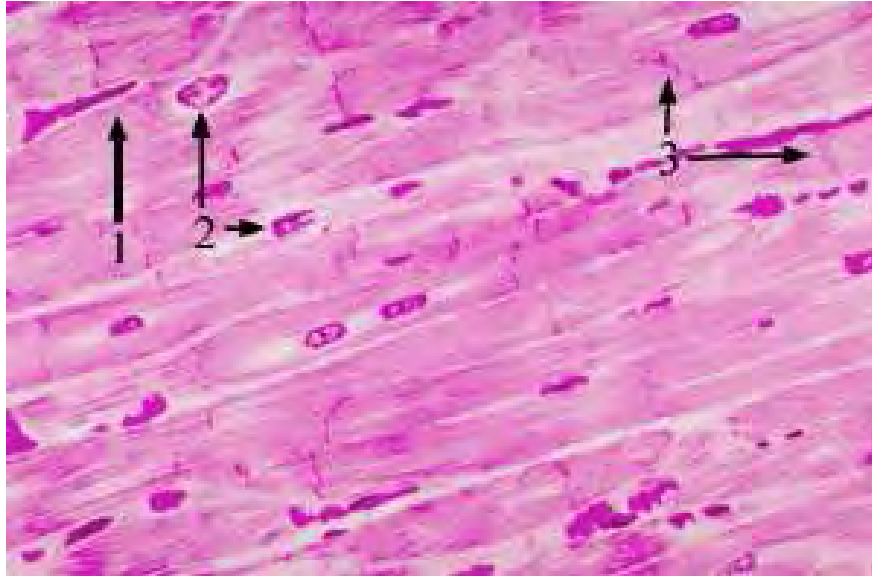


**Obr. 24. Western blot OTR v srdečních oddílech kontrol**

Metodou Western blot jsme prokázali přítomnost OTR ve všech srdečních oddílech.

U elektroforézy byly na gel naneseny vzorky homogenátu ze srdečních oddílů, které obsahovaly stejné množství proteinu. Na obrázku 24 je kromě proužku o odpovídající molekulové hmotnosti OTR přítomen další slabší proužek, který může být tvořen receptorovým homodimerem (Terrillon et al., 2003). Je zajímavé, že rozdíl mezi síněmi a komorami není tak výrazný jako rozdíl v expresi mRNA OTR. S expresí mRNA OTR je v souladu proužek odpovídající dimernímu receptoru o vyšší molekulové hmotnosti, jehož exprese v komorách je výrazně nižší než exprese v síních.

V dalších imunohistochemických pokusech jsme se zaměřili na lokalizaci OTR v jednotlivých srdečních oddílech. Srdeční sval je tvořen válcovitými jednojadernými buňkami – kardiomyocyty. Tyto buňky jsou trojrozměrně propojeny interkalárními disky. Na obrázku 25 je znázorněna struktura myokardu s kardiomyocyty, jádry a interkalárními disky.

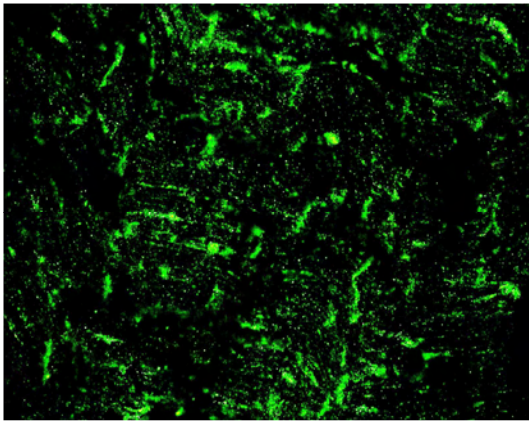


**Obr. 25. Kardiomyocyt - 1, jádro - 2, interkalární disk - 3**

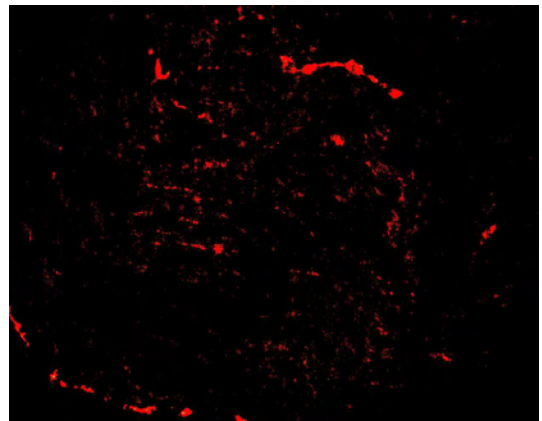
Barveno hematoxylin – eosin. Zvětšení 40x.

K určení, kde se nacházejí oxytocinové receptory, zda v kardiomyocytu, nervové tkáni, nebo v jádře, jsme použili nervový marker proti Beta III Tubulinu, který je součástí nervové tkáně. Na preparátu byla dále pomocí jaderného markeru DAPI označena jádra buněk. Protilátky proti OTR a Beta III Tubulinu byly následně označeny různými fluorescenčními barvivy. Prolnutím obrázku se zeleně označeným OTR a červeně označenou nervovou tkání jsme prokázali, že OTR je převážně lokalizován na kardiomyocytech, na plasmatických membránách. Lokalizaci oxytocinového receptoru na nervové tkáni jsme nezaznamenali.

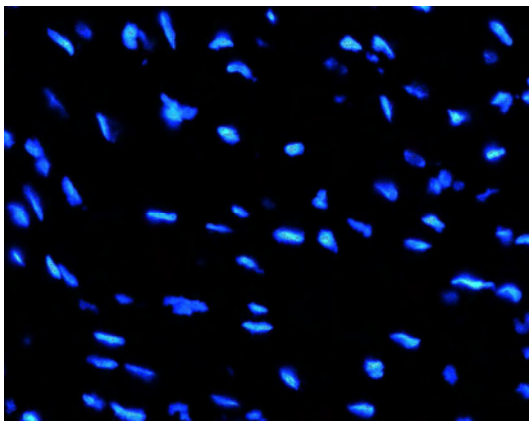




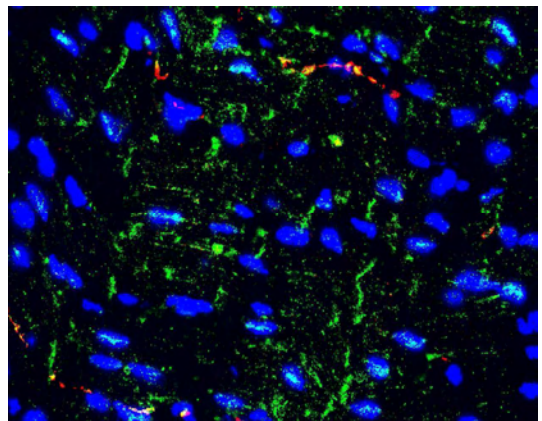
CO LS OTR



CO LS neuronální marker



CO LS jádra



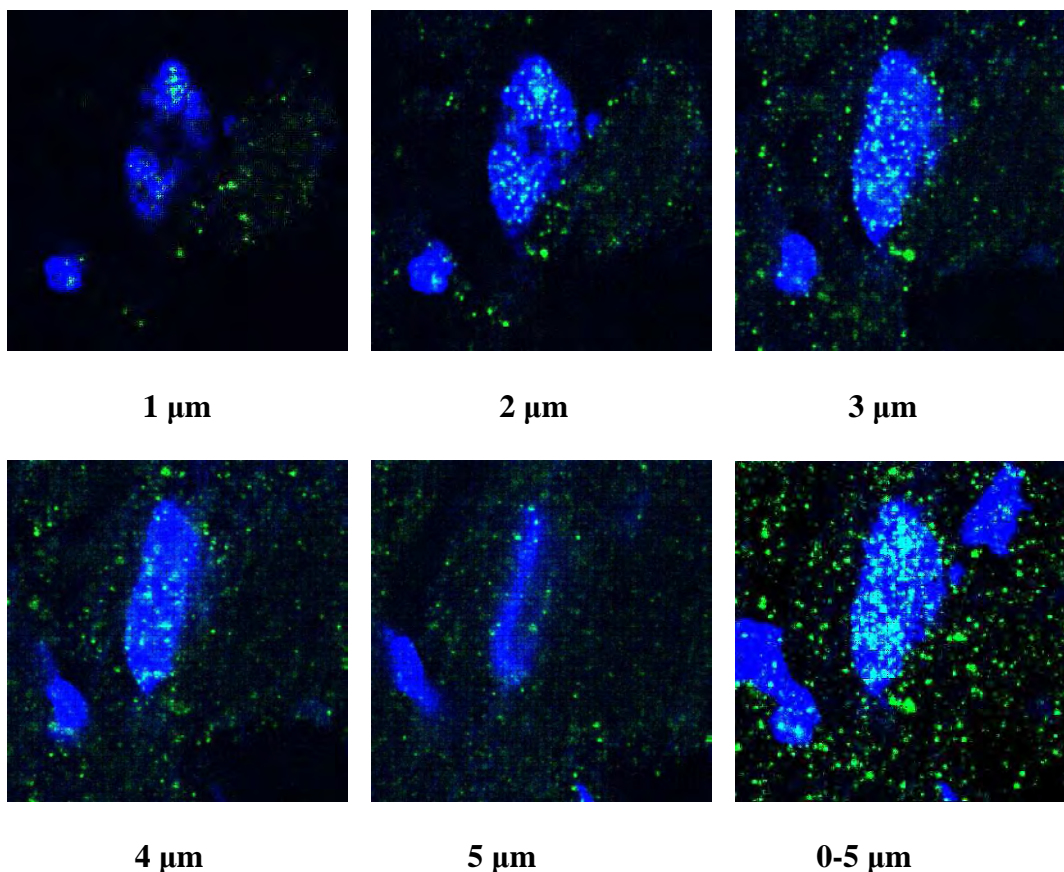
CO LS OTR + neur.marker+jádra

**Obr. 26. Lokalizace OTR v levé srdeční síni kontroly potkana Wistar**

**Pozn.:** zvětšení 40x i u všech dalších řezů, již neuváděno

V levé síni zeleně OTR, modře jádra a červeně neuronální tkáň. Po sloučení jednotlivých obrázků s označeným OTR, nervovou tkání a jádry je z výsledného obrázku zřejmé, že OTR není v srdeční síni vázán na nervovou tkáň, ale vyskytuje se převážně na membránách kardiomyocytů (Klenerova et al., 2011).

Protože jsme v předchozích experimentech kromě výskytu oxytocinového receptoru mimo nervovou tkáň zaznamenali také částečnou kolokalizaci oxytocinového receptoru s jádry (Obr. 26), rozhodli jsme se pomocí konfokálního mikroskopu identifikovat, zda se oxytocinový receptor nachází na povrchu nebo uvnitř jádra.



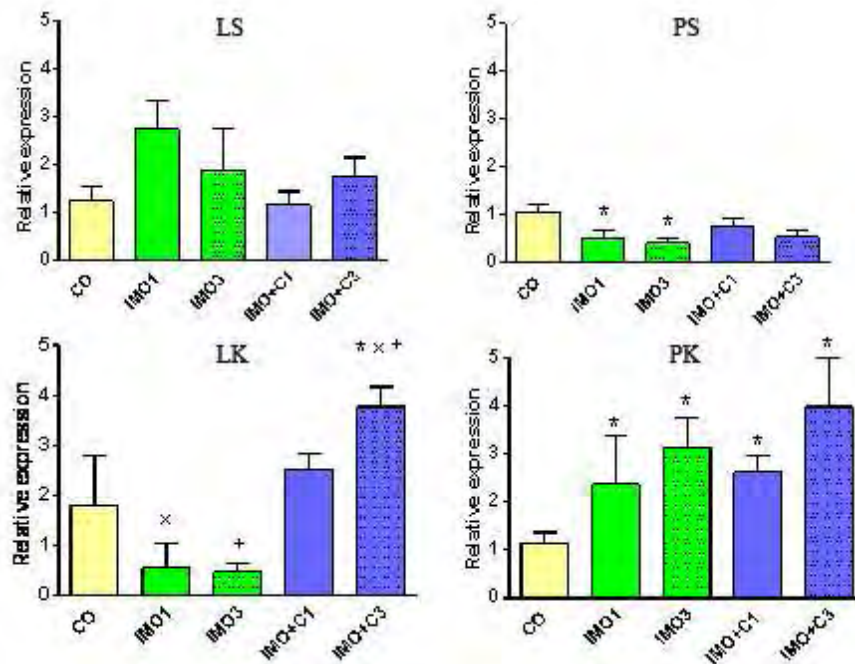
**Obr. 27. Lokalizace OTR v jádře kardiomyocytu (zvětšení 40x)**

Na obrázcích jsou optické řezy z různých hloubek jádra (1, 2, 3, 4, 5 μm) procházející zevně od povrchu přes vnitřní objem až k povrchu na opačné straně jádra. Obrázek 0-5 μm ukazuje sumární projekci z celého objemu jádra, na kterém lze pozorovat přítomnost oxytocinových receptorů uvnitř jádra.

V kardiomyocytu jsme sledovali OTR ve vztahu k jádru. OT receptor jsme s využitím specifických protilátek označili zeleně a jádra jsme označili jaderným markerem DAPI modře. Pomocí konfokálního mikroskopu jsme vytvořili v oblasti jádra detailní optické řezy v ose Z, což nám umožnilo získat trojrozměrnou představu o lokalizaci OTR. Kromě OTR přítomného na membráně (zelený signál OTR mimo oblast jádra na Obr. 27) jsme potvrdili, že OTR je přítomen ve vnitřním prostoru jádra. Tadevosyan et al. (2011) popisují v srdci přítomnost některých receptorů spřažených s G proteiny, které přecestovávají z membrán do nitra jádra. Takováto skutečnost byla prokázána v experimentech s receptory pro angiotensin II, endothelin,  $\beta$ -adrenergními a opioidními receptory. V naší práci jsme prokázali jako první transport oxytocinového receptoru do jader kardiomyocytů, což lze považovat za unikátní nález.

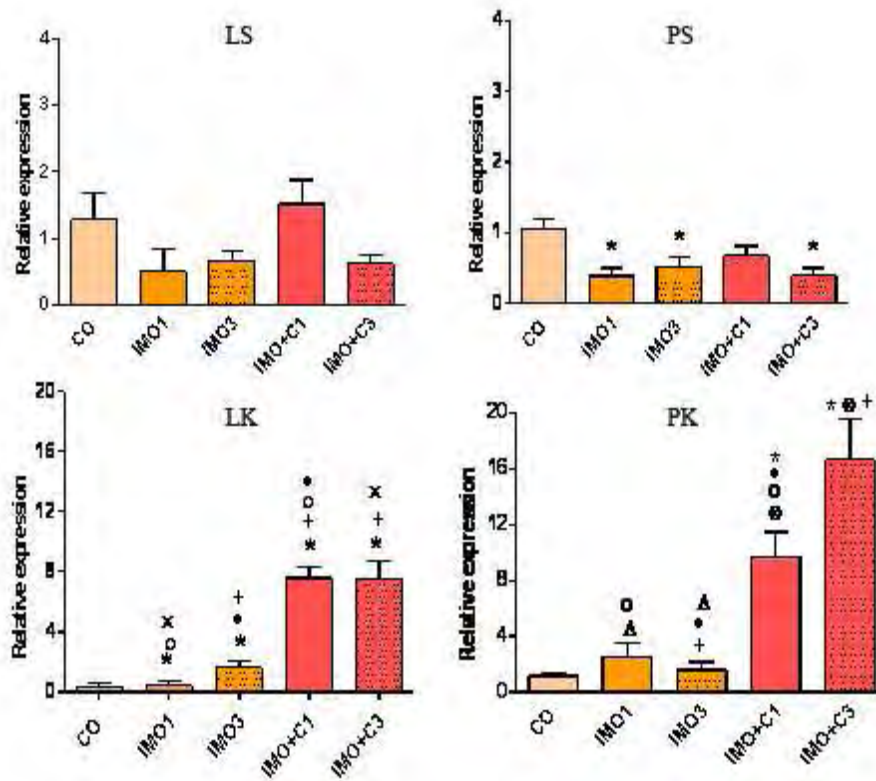
#### 4.2.1.3. Expresse mRNA OTR v srdci po aplikaci imobilizačního stresu

Sledovali jsme vliv stresu a doby uplynulé od jeho aplikace na expresi mRNA OTR v srdečních oddílech potkanů SD a LE. Potkani byli dekapitováni po 60 a 180 minutách po aplikaci stresu. Vliv imobilizačního stresu (IMO) a jeho kombinace s chladovým stresem (IMO+C) na relativní expresi mRNA OTR pro kmen SD je graficky znázorněn na obrázku 28. Změny relativní exprese vyvolané stresem jsou vždy vztaženy k odpovídajícímu srdečnímu oddílu kontroly. Jednocestnou analýzou ANOVA jsme u kmene SD v levé síni prokázali signifikantní vliv akutního stresu na expresi mRNA OTR. Všechny čtyři skupiny potkanů vystavených stresu vykazovali snížení exprese mRNA OTR. Toto snížení bylo signifikantní u skupiny IMO60, IMO180 a IMO+C180. V pravé síni jsme nenašli u žádné skupiny signifikantní rozdíl. V komorách, které ve srovnání se síněmi exprimují podstatně méně mRNA OTR, jsme našli základní rozdíl v účinku IMO a IMO+C. Kombinovaný stres vykazoval silnější účinek na expresi mRNA OTR. V levé komoře jsme prokázali signifikantní zvýšení exprese u skupiny IMO+C180 oproti IMO60 i oproti IMO180. V pravé komoře obě skupiny vystavené IMO+C vykazovaly vyšší expresi mRNA OTR oproti oběma skupinám IMO.



Obr. 28. Efekt akutního imobilizačního stresu na relativní expresi (RE) mRNA OTR v srdečních oddílech potkanů Sprague-Dawley.

RE byla spočítána tak, jak je popsáno v metodách; kontrolní hodnoty odpovídajících srdečních oddílů byly použity jako kalibrátor. \* = vs CO, + = IMO3 vs IMO+C3, x = IMO1 vs IMO+C3. \*Statisticky signifikantní výsledek vztažený k odpovídající kontrole; pro  $p < 0,05$ . (Skopek et al., 2011).



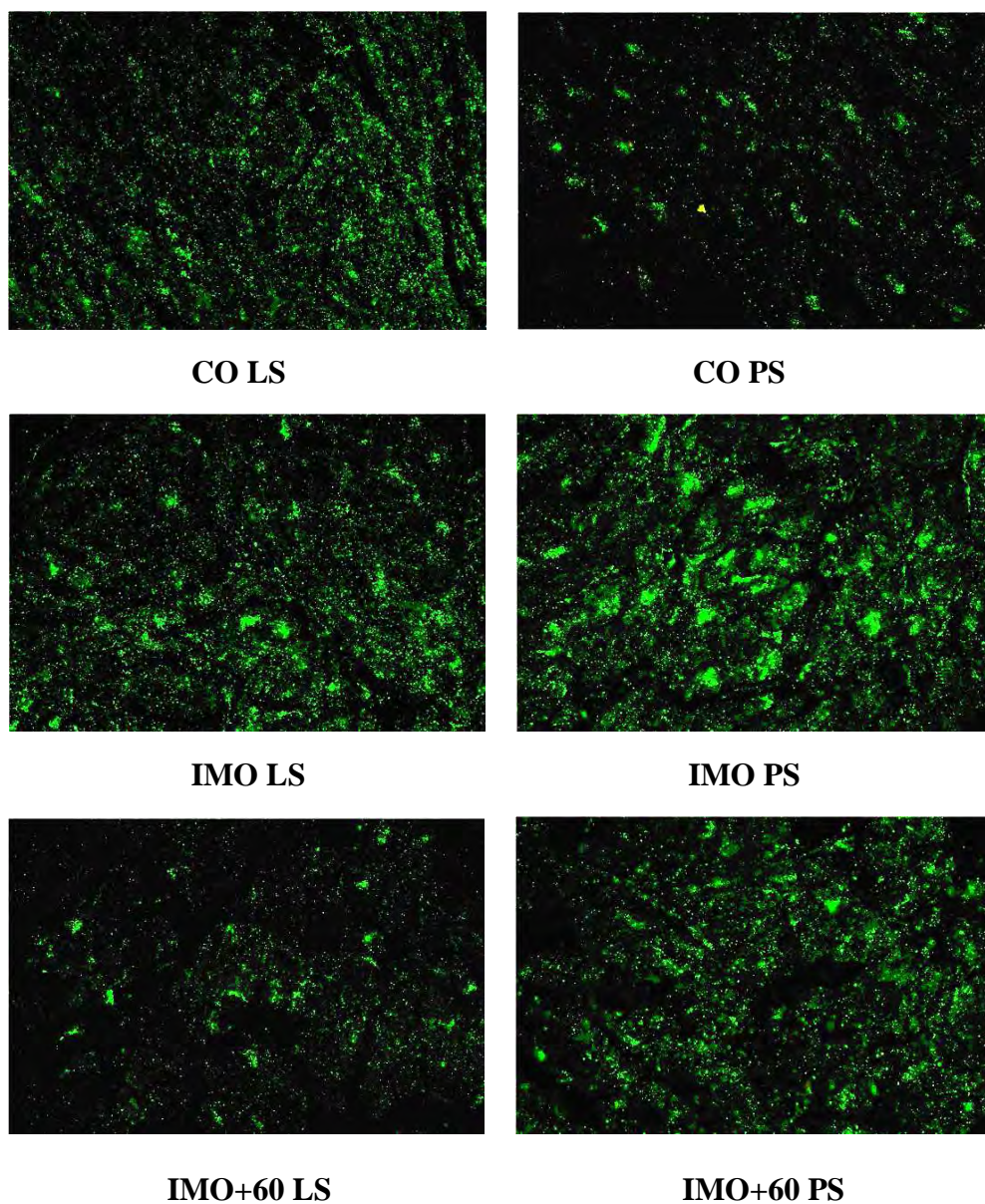
**Obr. 29. Efekt akutního imobilizačního stresu na relativní expresi (RE) mRNA OTR v srdečních oddílech potkanů Lewis**

Data z jednotlivých oddílů jsou označena v nadpisu grafů. Uvedeny průměrné hodnoty + SE. \* = vs CO, + = IMO3 vs IMO+C3, x = IMO1 vs IMO+C3, o = IMO1 vs IMO+C1, Δ = IMO3 vs IMO+C1, Δ = IMO1 vs IMO3, □ = IMO+C1 vs IMO+C3.

V levé srdeční síni potkanů LE jsme našli obdobné výsledky jako u kmene SD a to signifikantní snížení exprese mRNA OTR u skupin IMO60, IMO180 a IMO+C180. V pravé síni potkanů LE jsme ve srovnání s potkany SD našli největší rozdíly. Zatímco u SD došlo ke zvýšení exprese mRNA OTR u LE byla exprese signifikantně snížena ve skupinách IMO60, IMO180 a IMO+C180. Stejně jako u potkanů SD se i u LE projevil vliv specifického stresoru. V levé i pravé komoře potkanů LE jsme našli signifikantně zvýšenou expresi mRNA OTR u skupin IMO+C.

#### 4.2.1.4. Imunohistochemická detekce OTR v srdci po aplikaci imobilizačního stresu.

Potkanům jsme aplikovali stres trvající 60 minut (metody). Další skupině byla aplikována stejně dlouhá imobilizace, ale před dekapitací byla ponechána pauza v délce 60 minut. Sledovali jsme změny v expresi OTR. Zjistili jsme, že exprese OTR se mění v závislosti na čase uplynulém od aplikace imobilizačního stresu. U potkanů dekapitovaných ihned po aplikaci stresu dochází v pravé i levé síni ke zvýšení exprese OTR oproti kontrolám. Po hodině od aplikace imobilizačního stresu dochází k poklesu exprese OTR na úroveň kontrol.

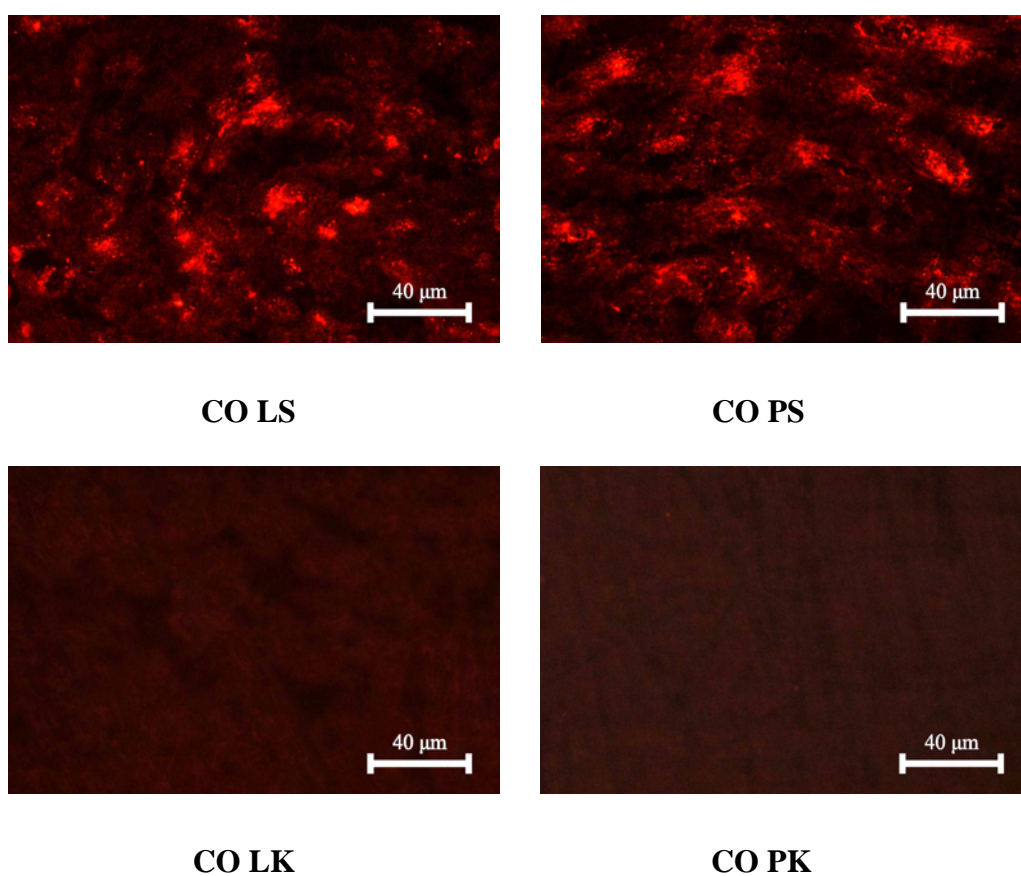


Obr. 30. Vliv stresu a času uplynulého od jeho působení na expresi OTR

## 4. 2. 2. ATRIÁLNÍ NATRIURETICKÝ PEPTID

### 4.2.2.1. Imunohistochemická detekce atriálního natriuretického peptidu v srdci za fyziologických podmínek

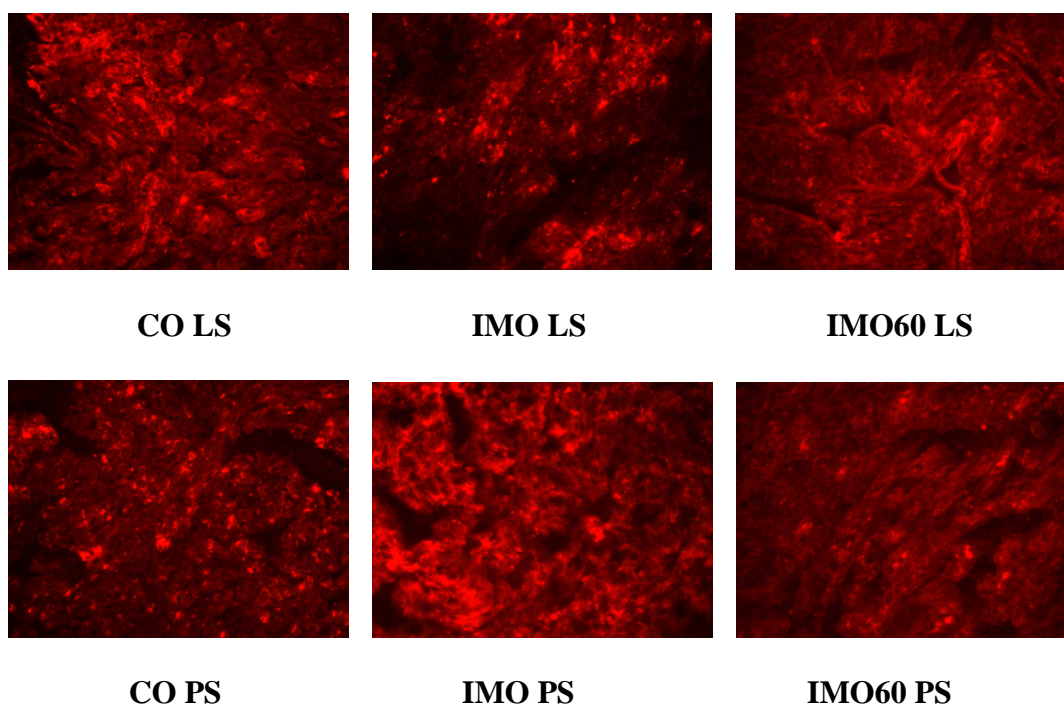
Protože OT působí v srdci prostřednictvím atriálního natriuretického peptidu (ANP), sledovali jsme v srdečních oddílech také expresi tohoto peptidu. Potvrdili jsme jeho přítomnost v srdečních síních. Exprese v komorách nebyla nalezena.



**Obr. 31. Exprese atriálního natriuretického peptidu (ANP) v srdečních oddílech potkana za fyziologických podmínek**

V levé i pravé srdeční síni jsme prokázali expresi ANP. Ani v jedné z komor jsme přítomnost ANP neprokázali.

#### 4.2.2.2. Imunohistochemická detekce atriálního natriuretického peptidu v srdci po aplikaci akutního imobilizačního stresu



**Obr. 32. Vliv imobilizačního stresu na expresi ANP v srdečních síních**

V levé srdeční síni jsme potvrdili vyšší expresi u IMO60 oproti IMO.  
V pravé síni byla hodnota exprese u IMO vyšší oproti kontrole i oproti IMO60.

Výsledky získané z imunohistochemického stanovení ANP v srdečních oddílech jsme podrobili obrazové analýze. Obrazová analýza imunohistochemických stanovení ANP v srdečních oddílech byla provedena programem ImageJ (freeware, dostupný ze stránek <http://imagej.nih.gov/ij>) a vyhodnocena programem InStat (GraphPad, La Jolla, USA). V levé srdeční síni jsme u skupiny IMO60 prokázali signifikantní zvýšení exprese ANP ve srovnání se skupinou IMO ( $p = 0,0062$ ). V pravé srdeční síni došlo vlivem imobilizačního stresu ke zvýšení exprese ANP u IMO oproti kontrole ( $p = 0,0033$ ). V pravé srdeční síni dále došlo k signifikantnímu snížení exprese ANP u skupiny IMO60 oproti IMO ( $p = 0,0098$ ). Prokázali jsme zapojení ANP v odpovědi na stres v závislosti na dynamice působení stresoru.

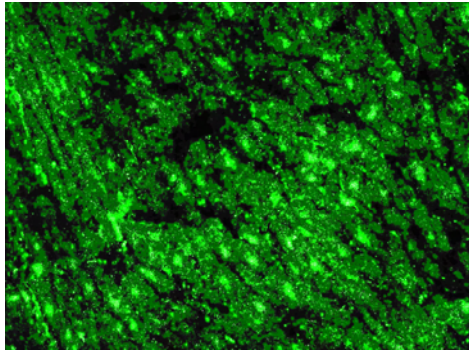
### 4. 2. 3. Galaninergní systém

V našich experimentech jsme studovali kardiovaskulární úlohu oxytocinu a atriálního natriuretického peptidu. Z dalších peptidů, které jsme našli kolokalizované s těmito peptidy v některých tkáních a předpokládáme možné modulační/regulační propojení, jsou galanin a galanin like peptid. V literatuře jsou údaje, že má galanin kardiovaskulární účinky, ale studie o přítomnosti jednotlivých komponent galaninergního systému jsou ojedinělé. V této disertační práci jsme studovali galaninergní systém v jednotlivých srdečních oddílech za fyziologických podmínek a za stresu, opět pomocí stanovení exprese mRNA a pomocí imunofluorescenční detekce nově syntetizovaných genů.

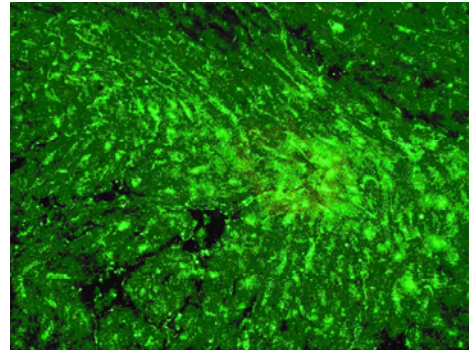
Přestože existuje velké množství prací zabývajících se galaninem, galanin like peptidem a galaninovými receptorovými subtypy, práce studující tyto součásti galaninergního systému v srdci jsou pouze ojedinělé a nekomplexní např. viz Waters a Krause, 2000; Fang et al., 2013; Fathi et al., 1997. Protože byl potvrzen vliv galaninu na srdeční činnost (Potter a Smith-White, 2005) rozhodli jsme se určit přítomnost galaninu, galanin like peptidu a galaninových receptorových subtypů v jednotlivých srdečních oddílech pomocí imunohistochemických metod za fyziologických podmínek.



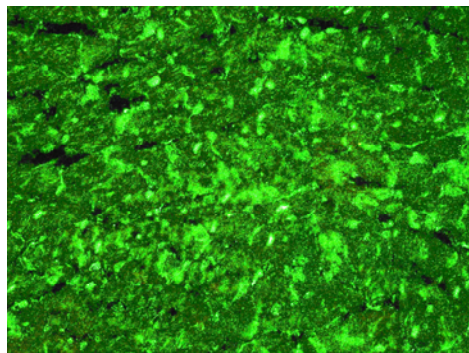
#### 4.2.3.1. Imunohistochemická detekce galaninu v srdci za fyziologických podmínek



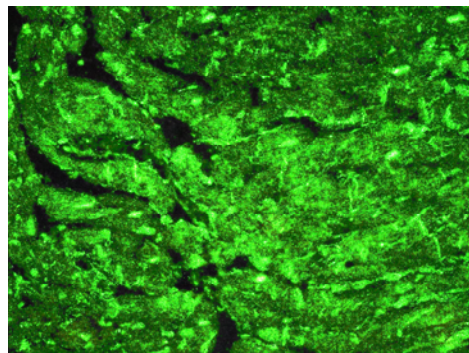
**Gal LS**



**Gal PS**



**Gal LK**



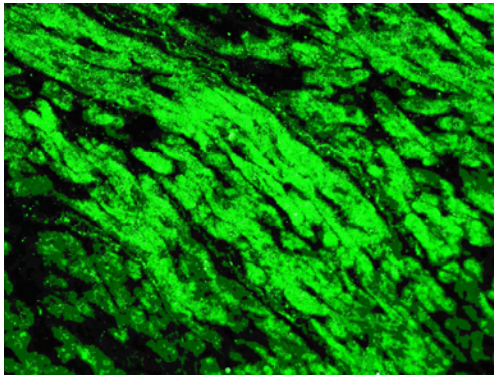
**Gal PK**

**Obr. 33. Expresi galaninu v srdečních oddílech**

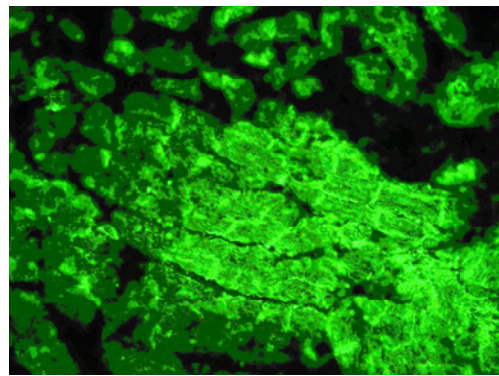
Zelená barva označující galanin na obrázcích prokazuje přítomnost galaninu v srdečních síních i v obou komorách.

V obou síních i komorách srdce potkana jsme za fyziologických podmínek prokázali expresi galaninu. Četnost buněk exprimujících galanin je srovnatelná v síních i komorách. V komorách je denzita signálu galaninu oproti síním poněkud vyšší.

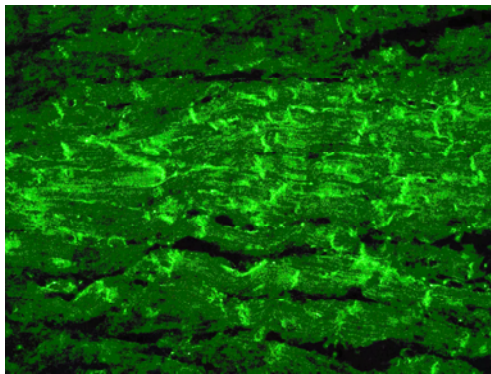
#### 4.4.3.2. Imunohistochemická detekce galanin like peptidu v srdci za fyziologických podmínek



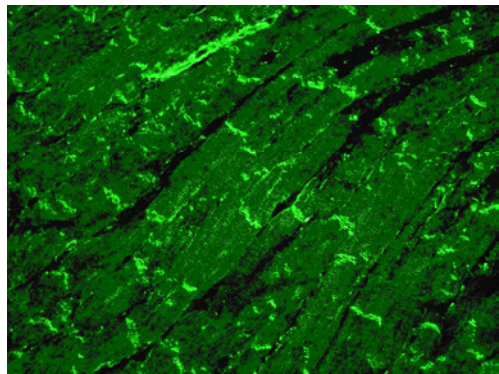
**GalLP LS**



**GalLP PS**



**GalLP LK**



**GalLP PK**

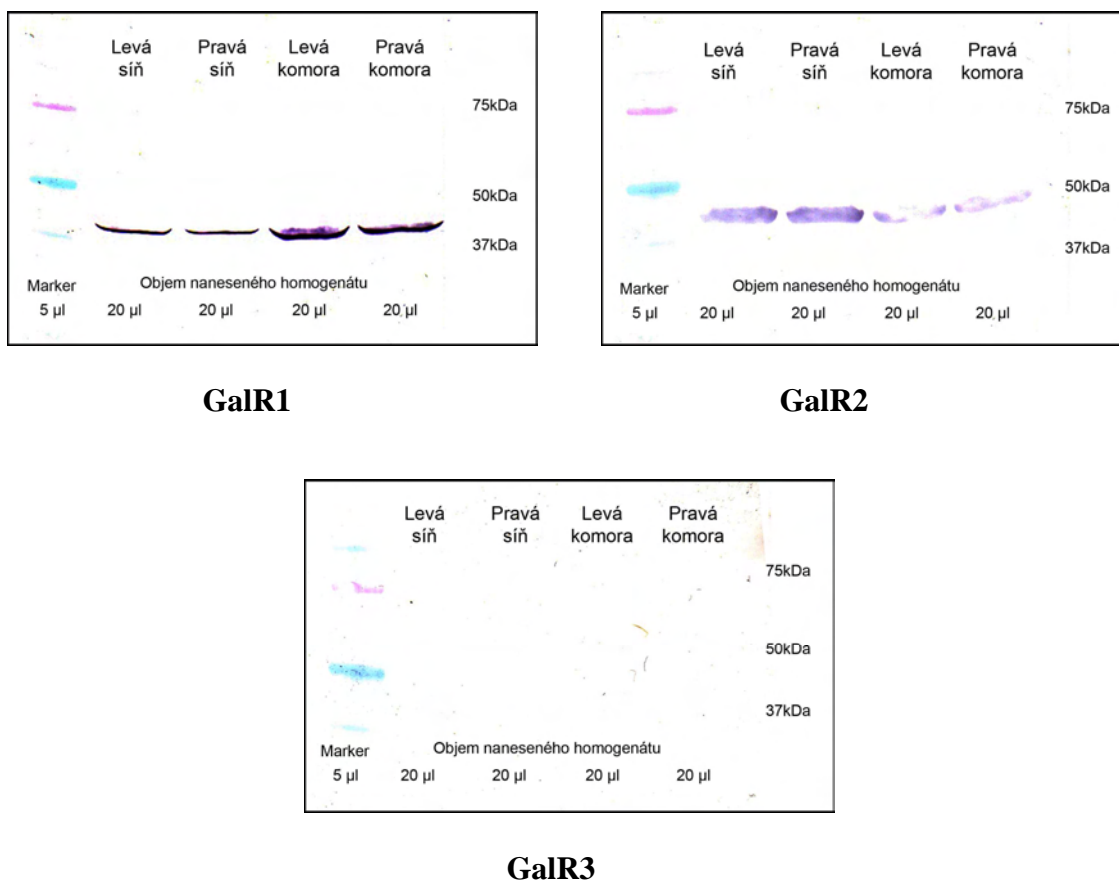
**Obr. 34. Galanin like peptid v srdečních oddílech u potkana za fyziologických podmínek**

Obrázky zachycují expresi zeleně označeného galanin like peptidu v síních a obou srdečních komorách, která je přítomná ve všech srdečních oddílech.

Vedle galaninu jsme v síních i komorách dále imunohistochemicky sledovali expresi galanin like peptidu. Jeho expresi jsme prokázali v obou síních i obou komorách. Zdá se, že galanin like peptid je ve tkáni lokalizován v oblasti interkalárních disků. Upřesnění této lokalizace bude vyžadovat další experimenty.

#### 4.2.3.3. Galaninové receptorové subtypy

V srdečních oddílech jsme sledovali i expresi galaninových receptorových subtypů. Tyto receptory jsme nejprve stanovili metodou Western blot v homogenátu jednotlivých oddílů.



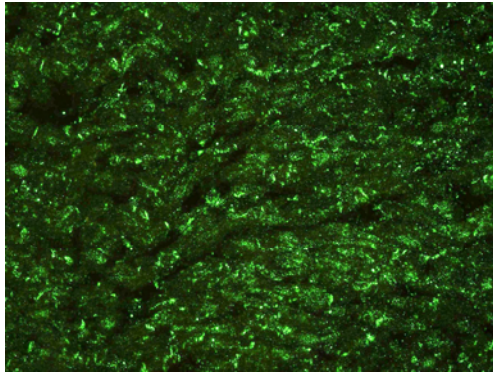
**Obr. 35. Galaninové receptorové subtypy v srdečních oddílech kontroly Wistar**

V srdečních oddílech jsme prokázali přítomnost GalR1, GalR2 i GalR3.

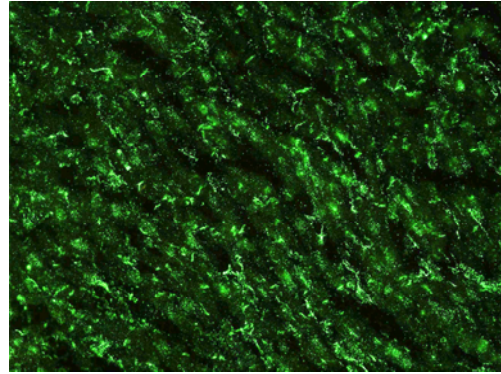
Ve všech srdečních oddílech jsme prokázali metodou Western blot přítomnost všech tří receptorových subtypů. Vzhledem k tomu, že byl pro elektroforézu použit vždy stejný objem homogenátu, je možné porovnat množství jednotlivých receptorů. Z obrázků je patrné, že exprese GalR2 je daleko vyšší než exprese GalR1. Exprese GalR3 je ze všech receptorových subtypů nejnižší. Přestože bylo na nitrocelulozové membráně možné identifikovat proužky svědčící o přítomnosti GalR3, byla jejich intenzita tak nízká, že je prakticky nebylo možné při skenování zaznamenat.

Poté, co jsme pomocí metody Western blot prokázali přítomnost GalR subtypů ve všech srdečních oddílech, sledovali jsme imunofluorescenčně tyto receptory na tkáňových řezech.

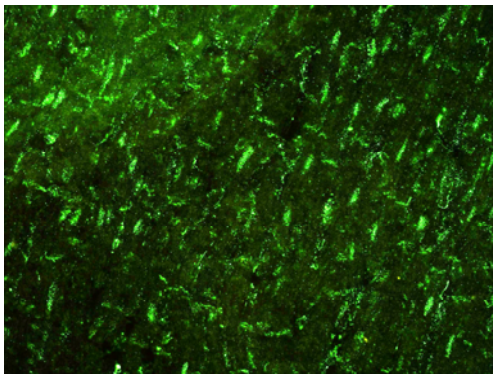
### **Galaninový receptor 1**



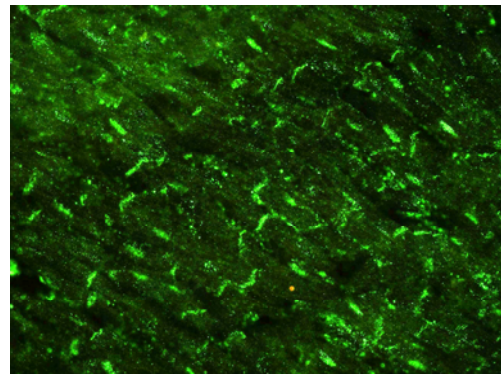
**GalR1 LS**



**GalR1 PS**



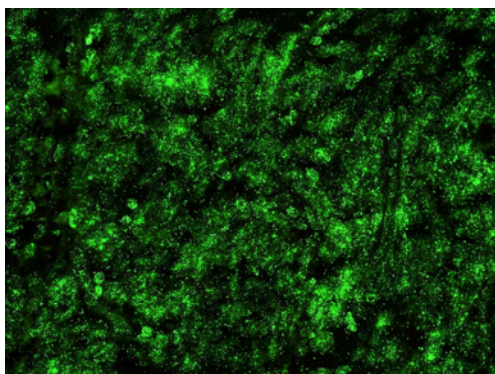
**GalR1 LK**



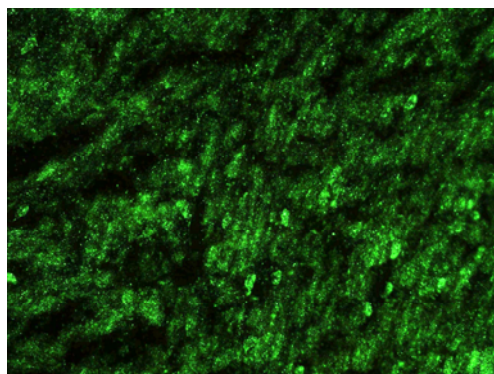
**GalR1 PK**

**Obr. 36. GalR1 v srdečních oddílech srdce potkana**

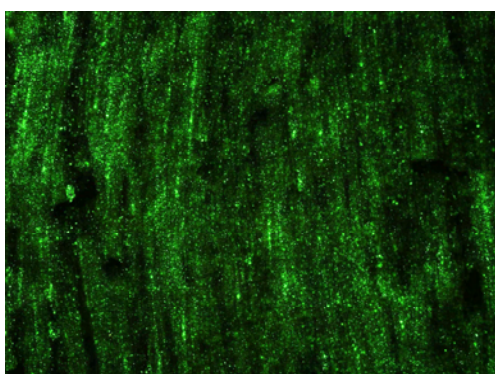
V srdečních síních a v komorách jsme prokázali pomocí specifické protilátky přítomnost GalR1. Exprese GalR1 kolokalizuje s jádry, zatímco na buněčných membránách je pouze ojedinělá. GalR1 je také exprimován v oblasti interkalárních disků, které mají propojovací funkci mezi jednotlivými kardiomyocyty. Densita signálu je ve všech srdečních oddílech na stejné úrovni.



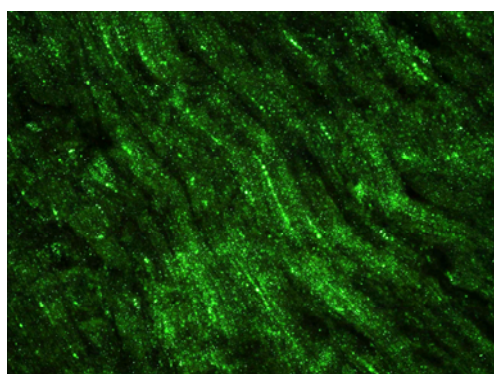
**GalR2 LS**



**GalR2 PS**



**GalR2 LK**

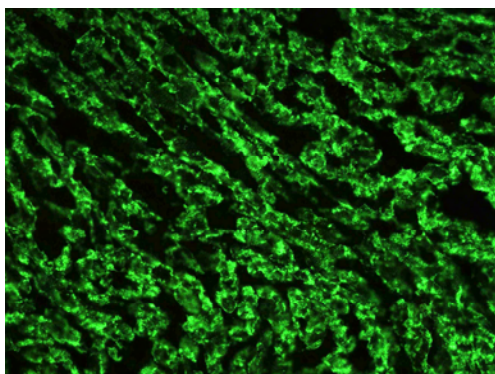


**GalR2 PK**

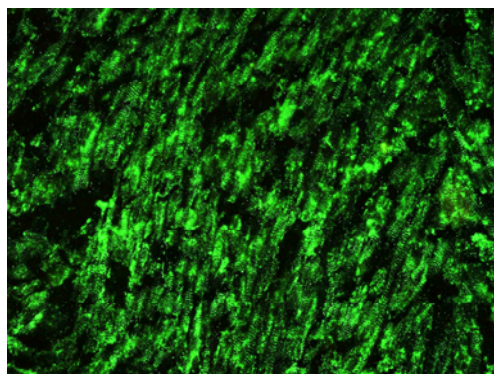
**Obr. 37. GalR2 v srdečních oddílech**

V obou síních i obou komorách jsme našli expresi GalR2.

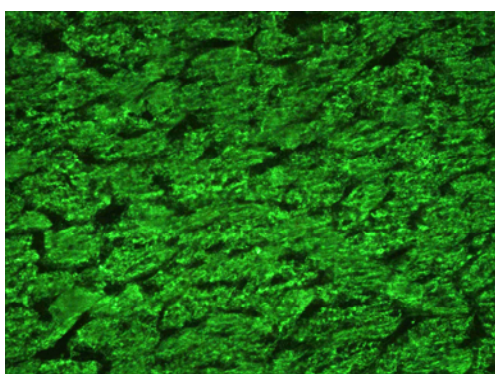
Expresi galaninového receptoru 2 jsme prokázali v obou síních i obou komorách srdce potkana za fyziologických podmínek. Nalezli jsme expresi na plazmatické membráně a také kolokalizaci GalR2 s jádry ve všech srdečních oddílech. Počet buněk exprimujících GalR2 a denzita jeho signálu jsou mezi jednotlivými oddíly na srovnatelné úrovni.



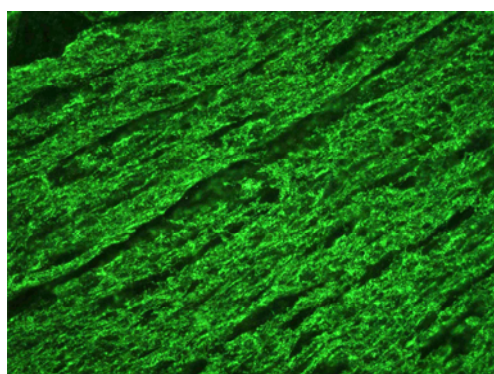
**GalR3 LS**



**GalR3 PS**



**GalR3 LK**



**GalR3 PK**

**Obr. 38. GalR3 v srdečních oddílech srdce potkana za fyziologických podmínek**

Na řezech obou síní i obou komor jsme prokázali expresi GalR3.

V rozporu se zjištěním autorů Smith et al. (1998), kteří v srdci nepotvrdili přítomnost mRNA pro GalR3, se nám podařilo prokázat přítomnost tohoto receptoru ve všech srdečních oddílech. GalR3 je exprimován na plazmatické membráně, kolokalizaci s jádry jsme nezaznamenali. Expres GalR3 v síních se jeví jako vyšší oproti komorám.

## 4. 3. NEUROPEPTIDY V HYPOFÝZE

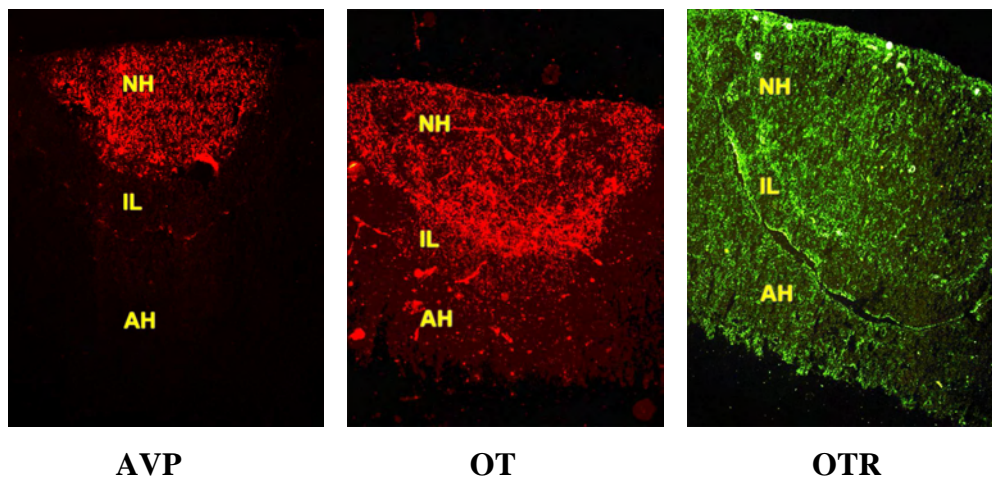
### 4. 3. 1. Imunohistochemická detekce za fyziologického stavu

Pozn.: Jsou prezentovány obrázky velice náročné na tisk a z tohoto důvodu byly umístěny obrázky v menších rozměrech, což ovlivnilo počet stránek.

Na koronálních řezech (zvětšeno 20x) celou hypofýzou jsme sledovali expresi těchto peptidů a jejich receptorů: galanin, galanin like peptid, oxytocin, vasopresin, adrenokortikotropní hormon, oxytocinový receptor, galaninový receptor 1, galaninový receptor 2 a galaninový receptor 3.

Dále jsme k určení lokalizace těchto proteinů použili gliální marker k označení gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP) k detekci pituicytů a neuronální marker k označení beta III tubulinu v neuronech a tím detekci nervové tkáně.

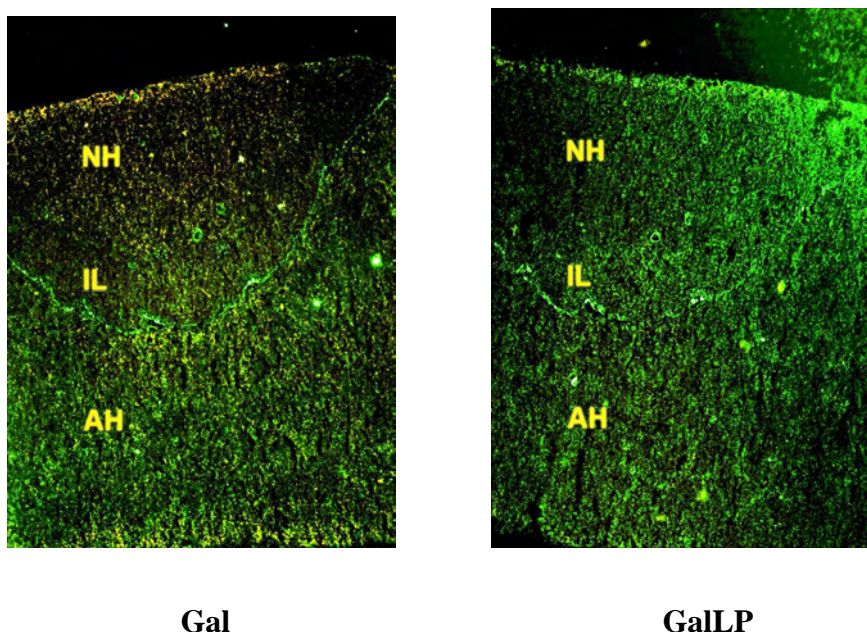
Koronární řez umožňuje znázornění kromě adenohypofýzy (AH) i znázornění neurohypofýzy (NH) a intermediálního laloku (IL), který bývá při mechanickém dělení na adenohypofýzu a neurohypofýzu silně poškozen. Na základě těchto souborných výsledků jsme pokračovali v dalších experimentech sledujících změny v jednotlivých komponentách hypofýzy.



**Obr. 39. Vasopresin a oxytocin v jednotlivých oddílech hypofýzy**

AVP = arginin vasopresin, OT = oxytocin, NH = neurohypofýza,  
IL = intermediální lalok, AH = adenohypofýza

Jak vyplývá z výsledku uvedeném na Obr. 39 prokázali jsme v neurohypofýze silnou expresi vasopresinu (AVP) a velmi slabou ojedinělou expresi v intermediálním laloku. V adenohypofýze jsme vasopresin neprokázali. Oxytocin je silně exprimován v neurohypofýze a v intermediálním laloku. Je zajímavé, že jsme ojedinělou expresi oxytocinu prokázali i v adenohypofýze. Tento ojedinělý nález vyžaduje další analýzu, která bude předmětem dalších pokusů naší laboratoře. V adenohypofýze jsme také prokázali expresi oxytocinového receptoru, což ukazuje na možnou funkci oxytocinu při sekreci adenohypofyzárních hormonů.

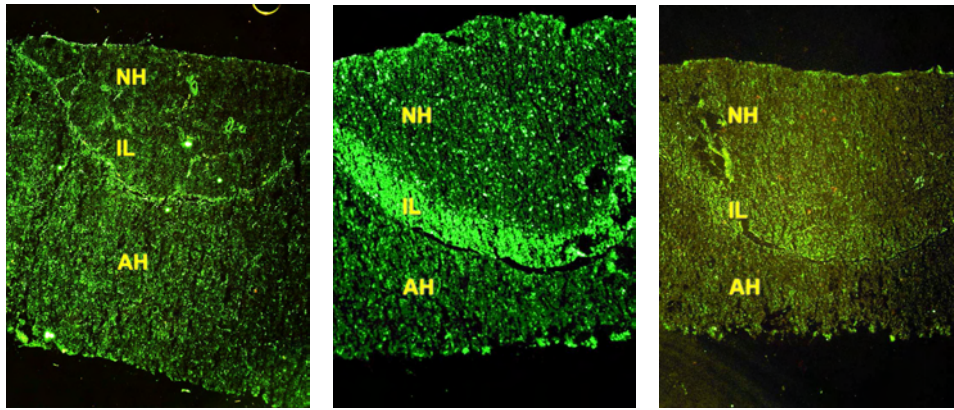


**Obr. 40. Galanin a galanin like peptid v jednotlivých oblastech hypofýzy**

Na obrázku 23 je znázorněna exprese galaninu (Gal) a galanin like peptidu (GalLP) na koronárním řezu celou hypofýzou.

Oba neuropeptidy byly exprimovány v neurohypofýze, intermediálním laloku i adenohypofýze. Galanin like peptid vykazuje silnější expresi v intermediálním laloku oproti neurohypofýze a adenohypofýze. V další části experimentů jsme se zaměřili na zjištění přítomnosti jednotlivých galaninových receptorových subtypů.





**GalR1**

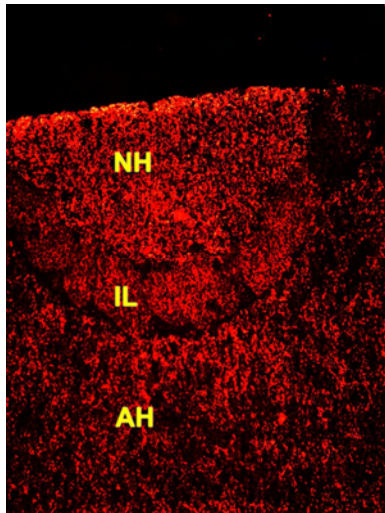
**GalR2**

**GalR3**

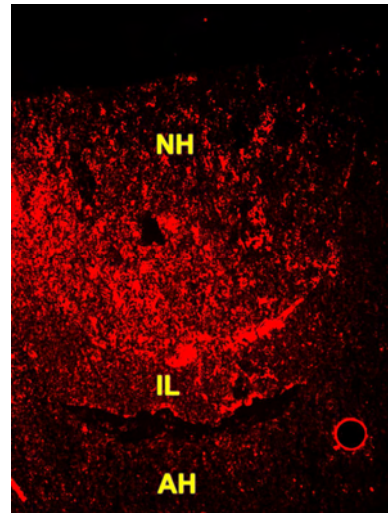
**Obr. 41. Galaninové receptorové subtypy GalR1, GalR2, GalR3 v neurohypofýze, intermediálním laloku a v adenohypofýze**

Na obrázku 41 s koronárním řezem hypofýzy je znázorněna exprese všech tří galaninových receptorových subtypů. GalR1 je exprimován v neurohypofýze, adenohypofýze a intermediálním laloku. Zajímavý je výsledek exprese GalR2, který je exprimován v neurohypofýze a adenohypofýze, jeho exprese je však velmi silná v intermediálním laloku. GalR3 je exprimován slabě v neurohypofýze a adenohypofýze a poněkud silněji v intermediálním laloku. V literatuře nejsou uvedeny údaje o takovéto komplexní studii galaninergního systému v hypofýze a v jednotlivých oddílech hypofýzy.

Důležitou informací je určení lokalizace galaninu a galanin like peptidu a jejich receptorů ve vztahu k neuronální tkáni a ve vztahu k pituicytům. V další části experimentů jsme proto určili přítomnost neuronální tkáně a pituicytů pomocí příslušných markerů. Pro detekci pituicytů jsme použili gliální fibrilární acidický protein (GFAP) a k detekci nervové tkáně beta III tubulin.



**neuronální marker**



**gliální marker**

**Obr. 42. Pituicyty a nervová tkáň v hypofýze**

Jak vyplývá z nálezu na obrázku 42, prokázali jsme v hypofýze přítomnost nervové tkáně v neurohypofýze, v adenohypofýze i intermediálním laloku. Pituicyty jsou exprimovány pouze v neurohypofýze, především v centrální části (obrázek neuveden) a v intermediálním laloku. V adenohypofýze jsme expresi pituicytů neprokázali.

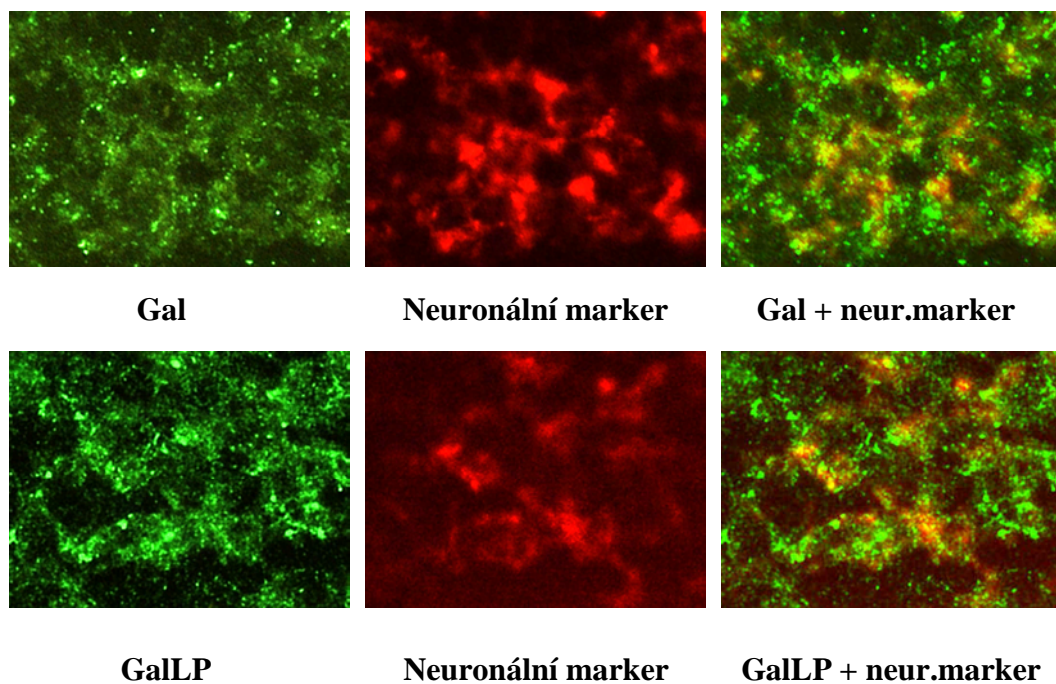
## 4. 4. NEUROPEPTIDY V ADENOHYPOFÝZE

### 4.4.1. Galaninerní systém v adenohipofýze

Cílem této experimentální části bylo potvrdit naši hypotézu, že galaninerní systém se může podílet na regulačních změnách v odpovědi na stres v adenohipofýze potkana, která je součástí HPA osy a která má rozhodující úlohu při zprostředkování stresových reakcí. V první části experimentů bylo nutné prokázat přítomnost exprese galaninu a galanin like peptidu a jednotlivých receptorových subtypů. V dalších experimentech jsme testovali, zda jsou galanin a galanin like peptid exprimovány v neuronech; v adenohipofýze jsme expresi pituicytů neprokázali (viz obrázek 42).

.V následné části této studie jsme určili kolokalizaci galaninerního systému s některými peptidy. V poslední části pokusů jsme na základě údajů získaných za fyziologických podmínek testovali možnou účast galaninerního systému po aplikaci stresu. V této části jsou uvedeny i výsledky s expresí mRNA.

#### 4.4.1.1. Imunohistochemická detekce galaninu a galanin like peptidu za fyziologického stavu, určení kolokalizace s nervovou tkání

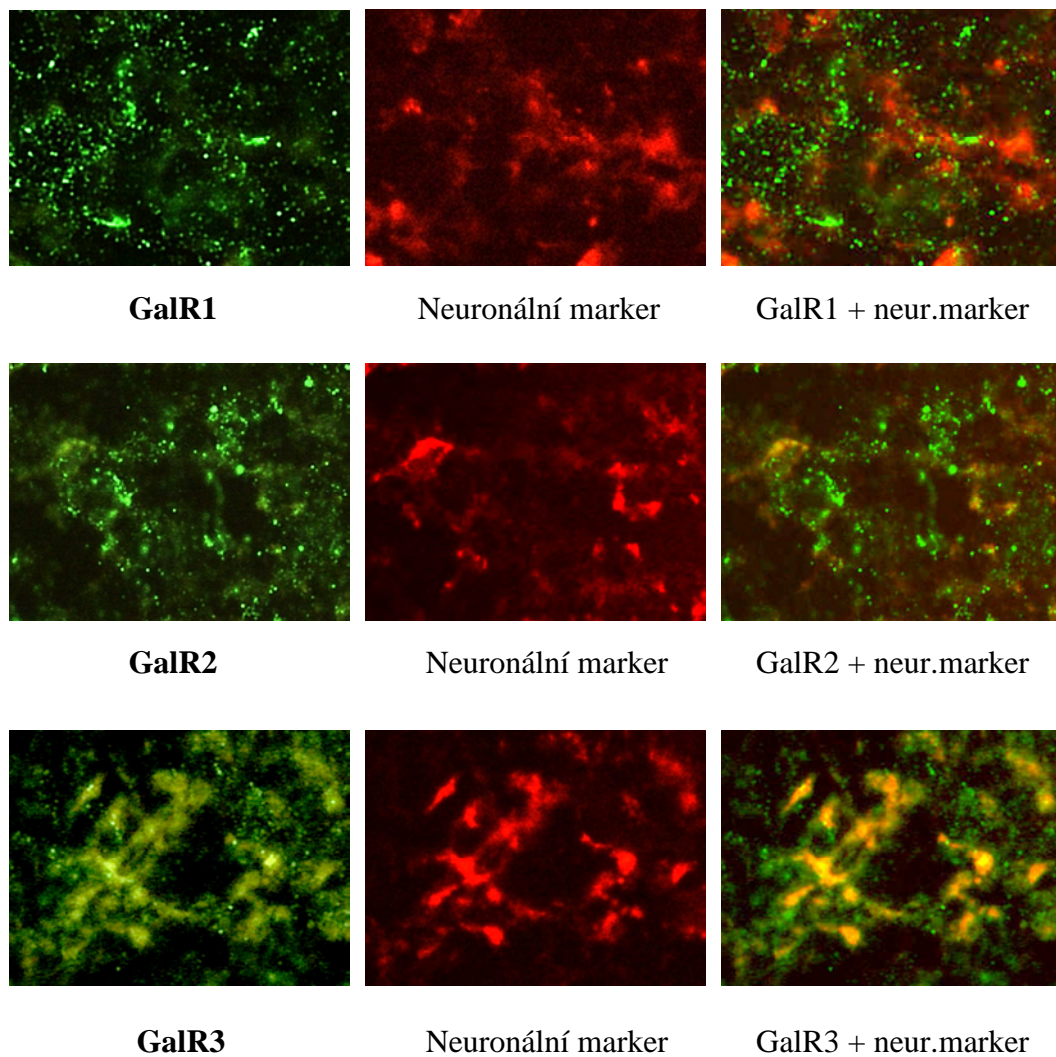


Obr. 43. Kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s nervovou tkání

Na obrázku 43 jsou výsledky určující přítomnost galaninu a galanin like peptidu v adenohypofýze a jejich kolokalizaci s nervovou tkání; zeleně je označený galanin a galanin like peptid a červeně je označena nervová tkáň; kolokalizaci peptidu s nervovou tkání určuje žlutá barva po prolnutí řezů. Z výsledků vyplývá, že galanin i galanin like peptid jsou kolokalizovány s nervovou tkání a zároveň se vyskytují i mimo neurony.

#### 4.4.1.2. Imunohistochemická detekce galaninergních receptorových subtypů za fyziologických podmínek

V další části analýzy galaninergního systému za fyziologického stavu jsme sledovali expresi všech tří GalR subtypů a jejich lokalizaci.

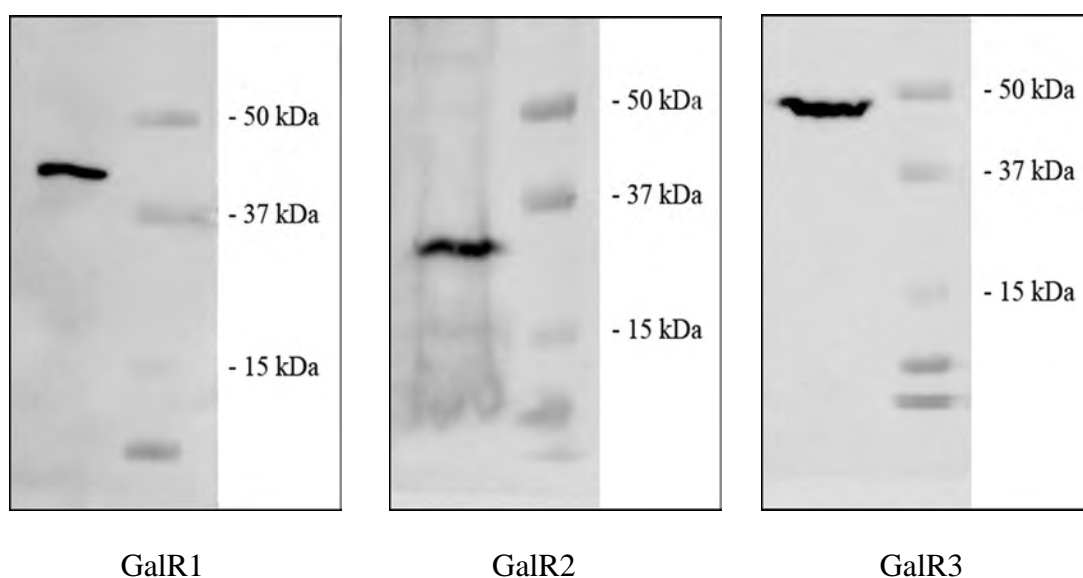


Obr. 44. Kolokalizace galaninových receptorových subtypů s nervovou tkání

Rovněž u galaninových receptorových subtypů jsme testovali kolokalizaci pouze s nervovou tkání, neboť v předchozích pokusech jsme neprokázali přítomnost pituicytů v adenohypofýze. Na Obr. 44 jsou výsledky svědčící pro nejvyšší kolokalizaci s nervovou tkání u GalR3.

Nepřítomnost žluté barvy na obrázku s GalR1 demonstruje, že GalR1 nekolokalizuje s nervovou tkání. Obrázek ukazuje u kolokalizace nervové tkáně s GalR2 ojedinělé výskyty oranžové až žluté barvy. Velký podíl žluté barvy na obrázku ukazuje, že GalR2 je kolokalizován s nervovou tkání velmi často. Z našich výsledků vyplývá, že galaninové receptorové subtypy v adenohypofýze jsou kolokalizovány s nervovou tkání rozdílně. GalR1 s nervovou tkání nekolokalizuje vůbec, kolokalizaci GalR2 s nervovou tkání jsme našli pouze v některých případech, větší podíl značení GalR2 jsme našli mimo nervovou tkáň. Nejvyšší míru kolokalizace jsme našli u GalR3, jehož značení se prakticky vždy překrývá se značením nervové tkáně.

K potvrzení našich nálezů jsme pomocí metody Western blot prokázali přítomnost všech galaninových receptorových subtypů v homogenátu adenohypofýzy. Na obrázku 45 jsou jednotlivé bloty pro každý z receptorů. Přítomné proužky prokazují přítomnost příslušného receptoru v homogenátu adenohypofýzy.

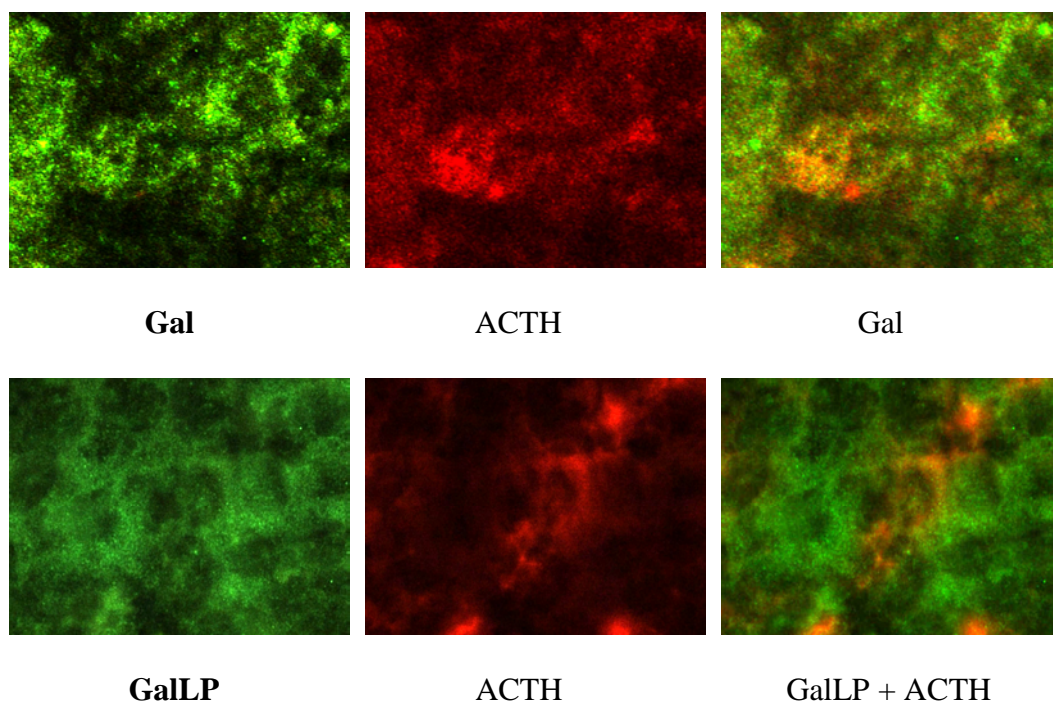


**Obr. 45. Western blot subtypů galaninového receptoru z adenohypofýzy**

Přítomnost jednoho proužku (bandu) na obrázcích prokazuje přítomnost jednotlivých subtypů GalR1, GalR2 a GalR3 v homogenátu adenohypofýzy.

#### 4.4.2. Kolokalizační studie

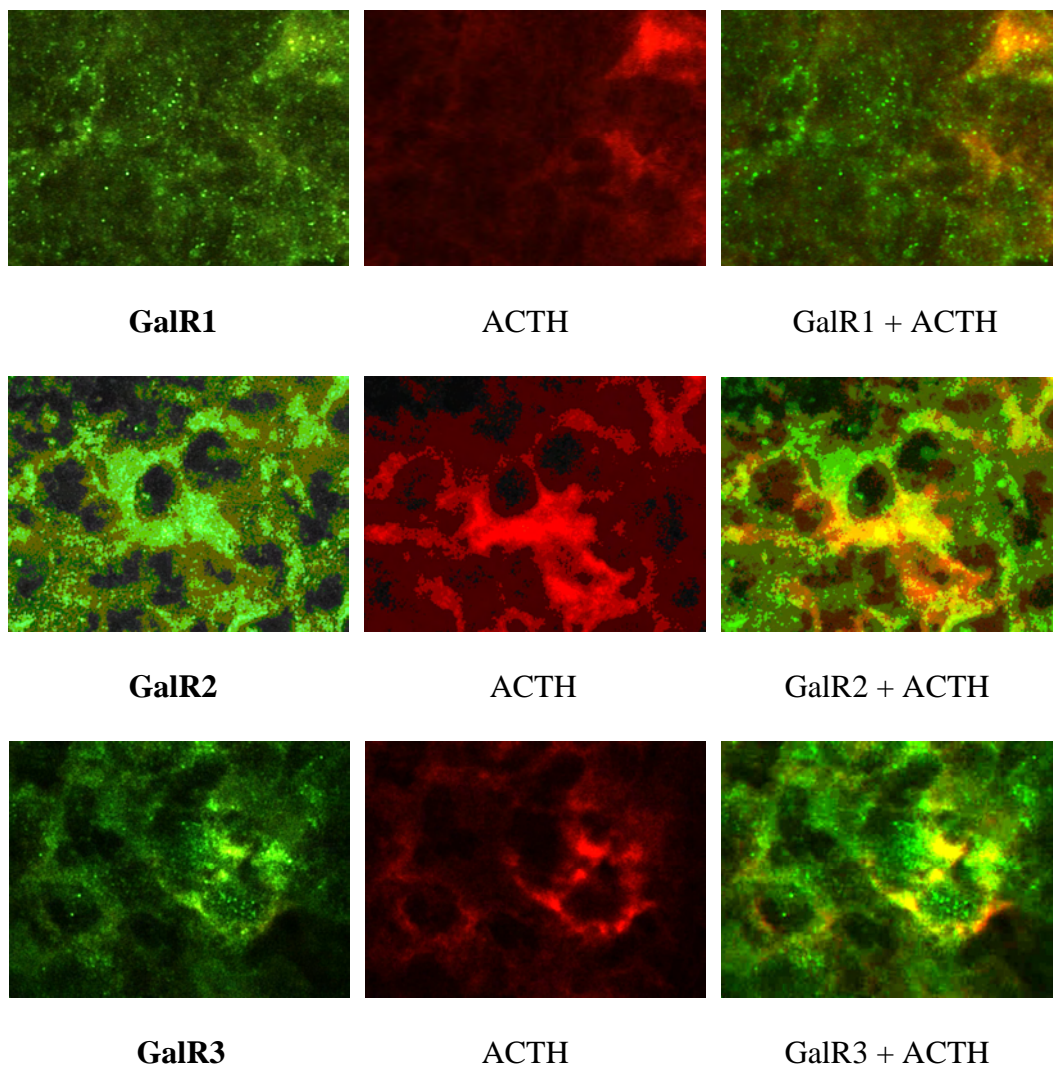
Pro potvrzení naší hypotézy, že může být galaninerní systém zapojen v modulaci uvolňování adenohipofyzárních hormonů, především ACTH, který je součástí hypotalamo-hipofýzo-adrenální osy, jsme v dalších experimentech určili v AH kolokalizaci Gal a GalLP s ACTH.



**Obr. 46. Kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s ACTH**

Na obrázku je zeleně označený galanin a galanin like peptid, červeně je označený ACTH. Po sloučení zelené a červené barvy vznikne oranžová až žlutá barva, která značí místa kde došlo k překryvu zeleného a červeného signálu, tzv kolokalizaci.

Výsledky uvedené na Obr. 46 prokázaly kolokalizaci galaninu a galanin like peptidu s adrenokortikotropním hormonem. Zatímco galanin je s ACTH kolokalizován ve velké míře, kolokalizace ACTH s galanin like peptidem je pouze ojedinělá. Tento výsledek svědčí pro možnou účast galaninu při regulaci sekrece ACTH. Dalším experimentem proto bylo určení exprese a kolokalizace ACTH s jednotlivými receptorovými subtypy galaninu.



**Obr. 47. Kolokalizace galaninových receptorových subtypů s ACTH**

Na obrázku je demonstrována kolokalizace galaninových receptorových subtypů s ACTH. Zeleně jsou označené jednotlivé galaninové receptorové subtypy a červeně ACTH a po překryvu oranžovožlutá barva vypovídá o kolokalizaci.

Výsledky uvedené na obrázku 47 prokázaly nejsilnější kolokalizaci ACTH s GalR2, byla přítomna u většiny GalR2 pozitivních buněk.

GalR1 je s ACTH kolokalizován pouze ojediněle a GalR3 kolokalizuje s ACTH pouze na některých buňkách.

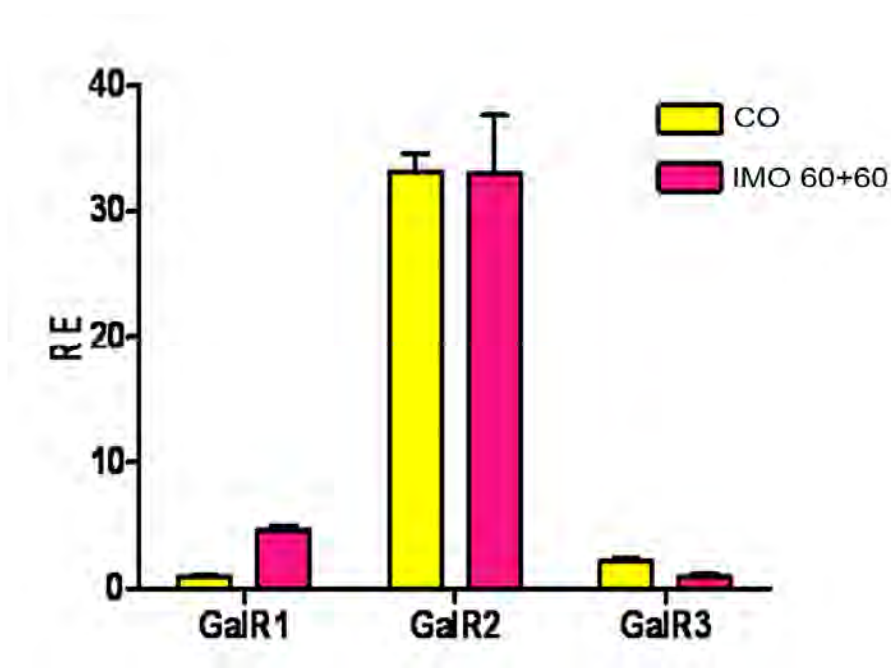
Tyto výsledky svědčí o účasti galaninových receptorů při sekreci ACTH v adenohypofýze potkana.

#### 4.4.3. Exprese proteinů a exprese mRNA galaninergního systému po aplikaci stresu

V další části pokusů jsme určovali expresi mRNA obou neuropeptidů galaninu a galanin like peptidu a všech tří receptorových galaninových subtypů za fyziologických podmínek po stresu (viz metody).

V adenohipofýze jsme prokázali expresi mRNA pro všechny tři receptorové subtypy také metodou real time qPCR. Exprese GalR2 mnohonásobně převyšuje expresi GalR1 a GalR3, viz obrázek 48, což je v souladu i s výsledky exprese peptidů de novo.

U exprese mRNA GalR2, která mnohonásobně převyšuje expresi mRNA GalR1 a mRNA GalR3 (Obr. 48), po aplikaci stresu nedochází k signifikantní změně na rozdíl od GalR1 a GalR3, kde byla relativní exprese stresem ovlivněna.

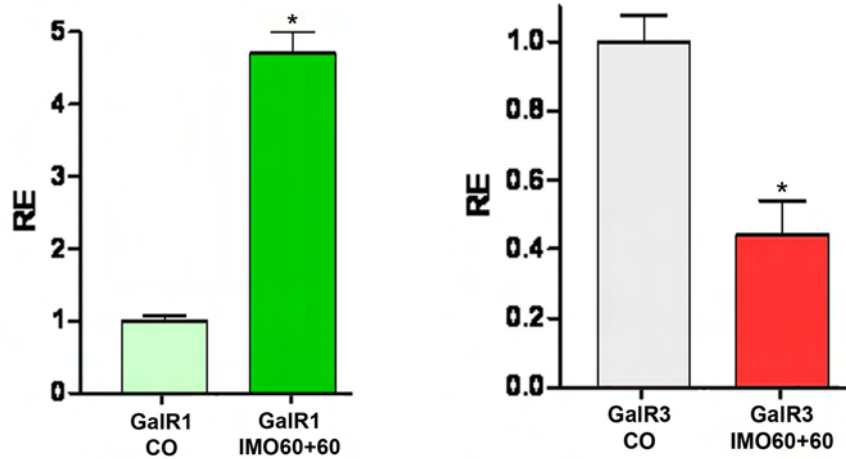


**Obr. 48. Exprese mRNA galaninových receptorových subtypů v AH u kontrol a po aplikaci po stresu**

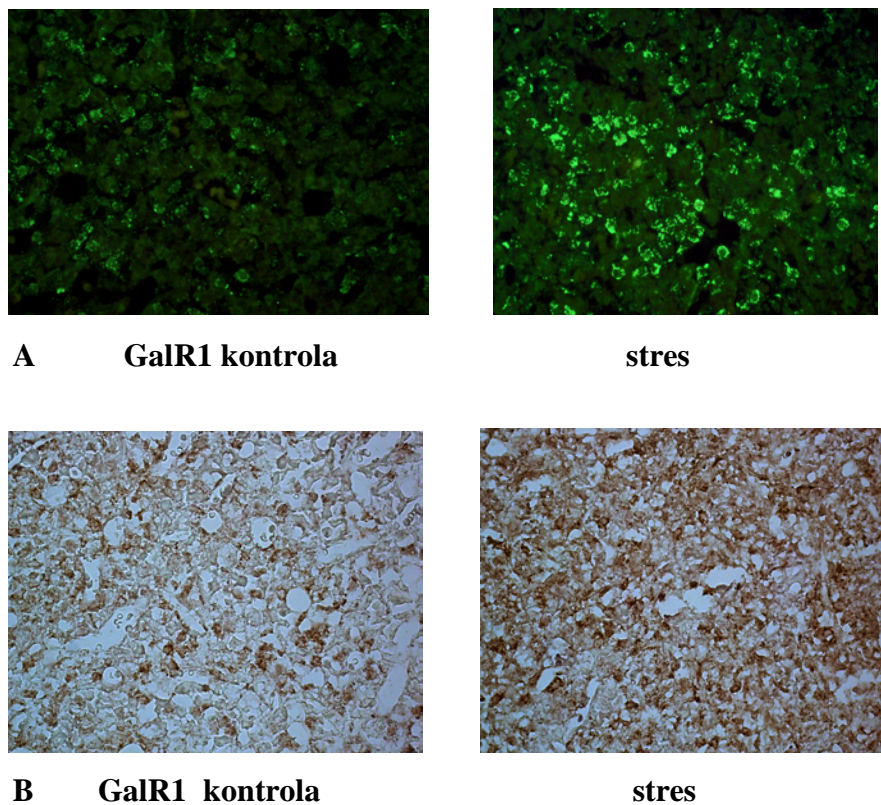
Pro lepší názornost jsou tyto údaje z obrázku 48 o expresi GalR1 a GalR3 uvedeny na dalším grafu (Obr. 49); hodinový stresový podnět s 60 min postresovým intervalem vedl ke zvýšení exprese GalR1 a naopak u GalR3 došlo ke snížení exprese mRNA.

Tento výsledek potvrzuje i stanovení postresových změn v expresi GalR1 imunofluorescencí a s použitím křenové peroxidázy, viz obrázek 51 ze strany 89.





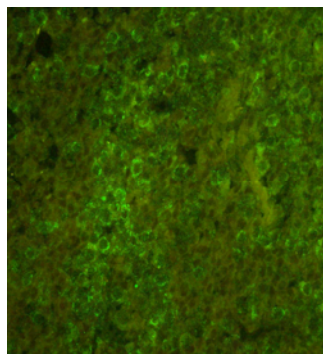
Obr. 49. Vliv imobilizačního stresu na expresi mRNA GalR1 a GalR3



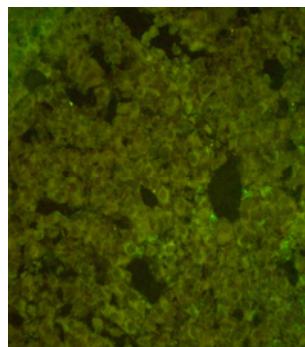
Obr. 50. Imunohistochemické stanovení galaninového receptorového podtypu GalR1 u kontrol a po stresu IMO60+60, značeného imunofluorescenčně (A) a pomocí křenové peroxidázy (B)

Tyto výsledky podporují naši hypotézu, že na regulaci/modulaci po stresovém podnětu se budou podílet jednotlivé receptorové subtypy v závislosti na jejich denzitě, lokalizaci a dalších podmínkách. Tuto hypotézu podporují i výsledky z dalšího experimentu, který sledoval rozvoj změn v různé časové periodě po ukončení stresu.

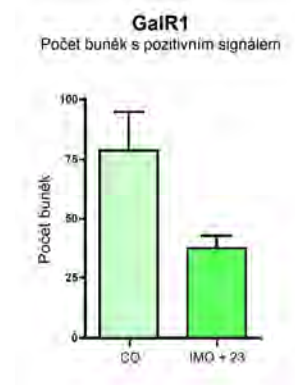
V AH jsme sledovali změny v expresi subtypů GalR za 1, 3, 7 a 23 hodin po ukončení stresového podnětu. Sledovali jsme dva parametry: počet buněk exprimujících receptor a denzitu jeho signálu. Denzita signálu vypovídá o množství exprimovaného receptoru. Na Obr. 51 uvádíme imunofluorescenční výsledky s jejich vyhodnocením obrazovou analýzou s příslušným grafem. Pro přehlednost výsledků uvádíme pouze případy, kdy nastala signifikantní změna testovaných parametrů.



**A. GalR1 CO**

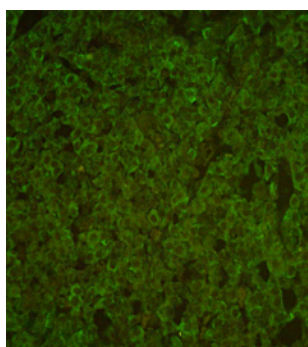


**GalR1 IMO + 23h**

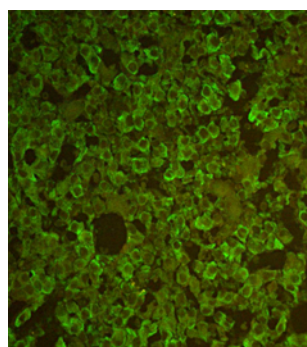


**GalR1 CO vs IMO + 23h**

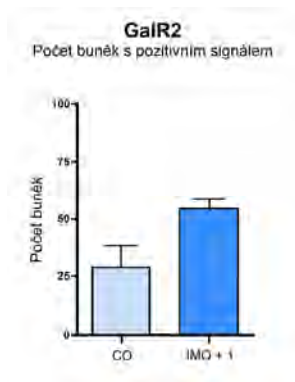
U galaninového receptoru 1 došlo po 23 hodinách ke snížení počtu buněk exprimujících tento receptor, ke změně denzity signálu nedošlo.



**B. GalR2 CO**

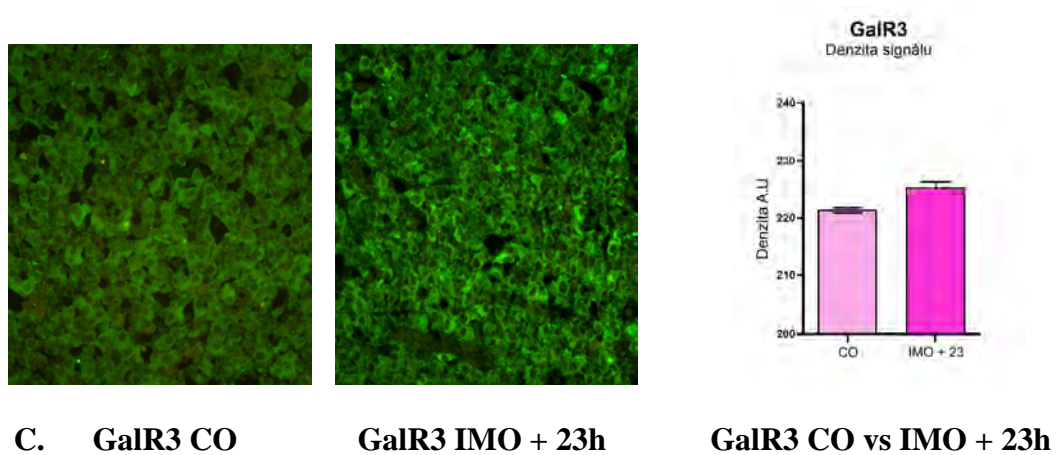


**GalR2 IMO + 1h**



**GalR2 CO vs IMO + 1h**

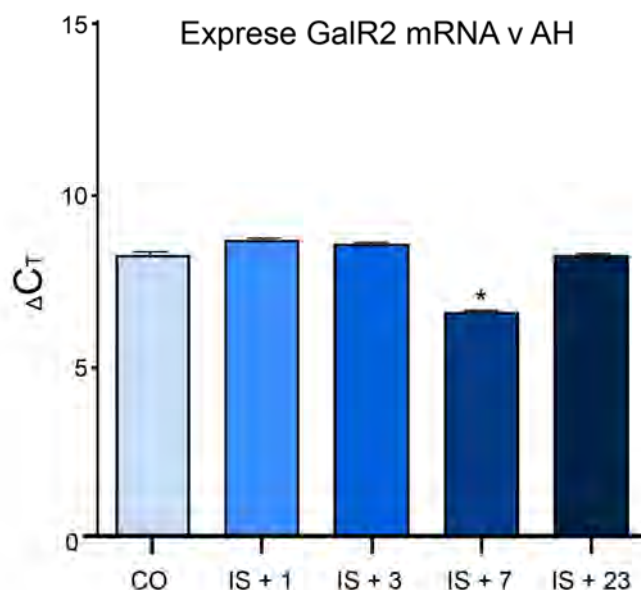
Po jedné hodině od ukončení stresu došlo k signifikantnímu zvýšení počtu buněk exprimujících GalR2, ke změně denzity signálu nedošlo.



Denzita signálu GalR3 se signifikantně zvýšila 23 hodin po ukončení stresu, ke změně počtu buněk exprimujících GalR3 nedošlo.

**Obr. 51. Změny denzity galaninových receptorových subtypů po aplikaci IMO s intervalem vyhodnocení 1, 3, 7 a 23 hodin po ukončení stresového podnětu.**

Jsou uvedeny změny exprese GalR subtypů (A, B, C) u příslušného postresového intervalu vyhodnocení, kde došlo k signifikantním změnám v denzitě a počtu buněk. Pro lepší přehlednost je tento údaj uveden u jednotlivých subtypů receptorů také v grafu.



**Obr. 52. Dynamika exprese změn mRNA různých intervalů po ukončení stresu**

Dynamika exprese mRNA GalR po působení stresu ukazuje, že kritický interval po ukončení stresu je 7 hod, kdy se exprese signifikantně zvýšila u všech GalR subtypů, na Obr. 52 je příklad zvýšení u GalR2 (hodnoty v delta CT, tj. nízká hodnota znamená nejvyšší expresi). Výše uvedené výsledky jasně dokumentují, že v AH jsou exprimovány všechny tři receptorové subtypy a specificita těchto výsledků byla potvrzena metodou Western blotu. Účinek aplikovaného stresu vedl ke změnám podle typu receptoru a délce intervalu po stresu.

Podářilo se nám prokázat v adenohipofýze potkanů přítomnost všech subtypů galaninových receptorů, a to jak sledováním genové exprese pomocí RT qPCR, tak exprese vlastních receptorů pomocí imunohistochemických postupů. GalR2 se jeví jako receptor exprimovaný ve větším množství než ostatní galaninové receptorové subtypy, ale vykazuje nižší odpověď na stresové podněty. Tyto nálezy jsou podkladem pro další studia sledující vliv stresu na galaninový systém, kde především antagonisté galaninu mají potenciál terapeutického využití.

#### 4. 5. NEUROPEPTIDY V NEUROHYPOFÝZE

Neurohypofýza potkana je velmi malá tkáň elipsoidního tvaru o průměru cca 1 mm a váze pod 1 mg. Je u potkana umístěná na spodině mozku uprostřed adenohypofýzy a je uzavřená ve fascii; lze ji vyloupnout pod mikroskopickou kontrolou. Na Obr. 53 šipka ukazuje uložení neurohypofýzy.



**Obr. 53**

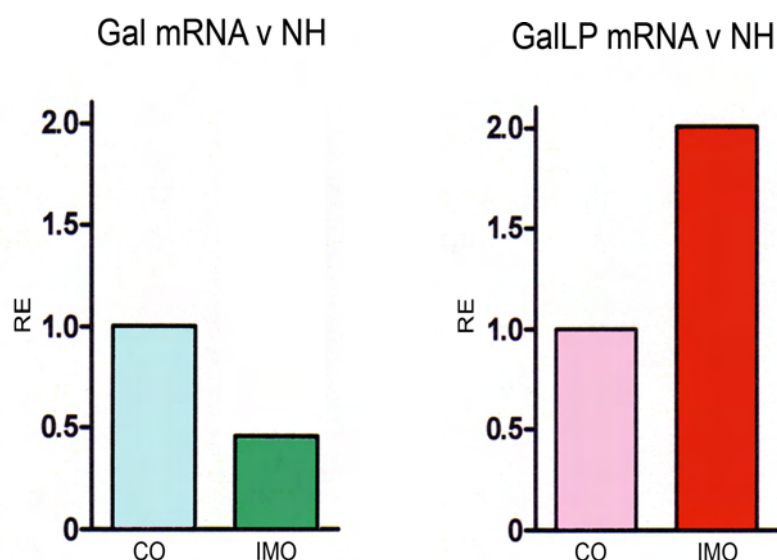
Velmi malé rozměry a velmi nízká váha neurohypofýzy nedovolují experimenty se stejným protokolem jako u adenohypofýzy a u dalších tkání o vyšší hmotnosti. Pro obdobné experimenty s testováním individuálních vzorků, např. exprese mRNA by bylo potřeba mnohonásobně větších skupin zvířat. Z tohoto důvodu jsme nejprve pomocí metody kvantitativní real time qPCR určovali, zda se v neurohypofýze exprimuje mRNA pro galanin, mRNA galanin like peptid a pro jednotlivé subtypy galaninových receptorů za fyziologických podmínek a po aplikaci stresu (Hynie et al., 2013). Pro jedno stanovení exprese mRNA v jednom vzorku byl potřeba směsný vzorek homogenátu z 10ti neurohypofýz; použili jsme dva směsné vzorky a stanovení byla prováděna v triplikátech. Teprve na základě takto získaných výsledků jsme určovali další údaje z tkáňových řezů neurohypofýz s kvalitativním vyhodnocením výsledků. Metodou real time qPCR jsme demonstrovali v neurohypofýze expresi mRNA galaninu a mRNA galanin like peptidu.

Existuje mnoho kontraverzních údajů (Fathi et al., 1997; Hökfelt a Tatemoto 2010; Kawasaki, 2007) o přítomnosti galaninu, galanin like peptidu a individuálních receptorových subtypech galaninu v neurohypofýze. Z tohoto důvodu jsme nejprve testovali expresi mRNA (Hynie et al., 2013).

#### 4.5.1. Detekce exprese mRNA galaninu, galanin like peptidu a jejich receptorů metodou real time qPCR v neurohypofýze za fyziologického stavu a po stresu

Dnes je již obecně přijímaným poznatkem, že neurohypofýza je zapojena v stresové odpovědi, studovali jsme proto úlohu galaninergního systému v neurohypofýze za stresu (Hynie et al., 2013; Skopek et al., 2013). V uváděných výsledcích jsou data hodnot mRNA získaných za fyziologických podmínek u kontrol a hodnoty mRNA z neurohypofýz potkanů po aplikaci stresu.

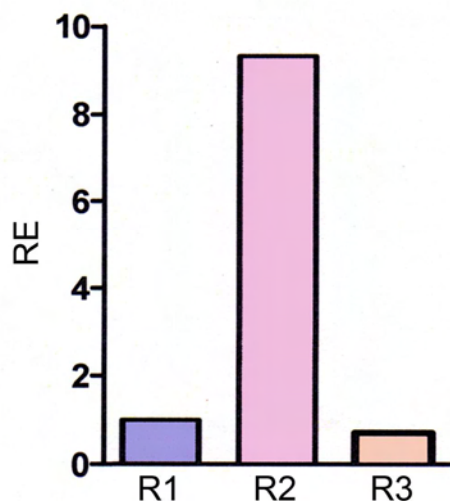
Na Obr. 54 jsou výsledky experimentu, prokazující expresi mRNA galaninu a galanin like peptidu v NH za fyziologických podmínek. Velmi zajímavý je výsledek po aplikaci akutního stresu, kde exprese mRNA galaninu byla snížena o 50% a naopak exprese mRNA byla o 50% po stresu zvýšena. Tato data svědčí pro přítomnost galaninu a galanin like peptidu v NH a také svědčí o rozdílném zapojení těchto dvou neuropeptidů v odpovědi na akutní stres.



Obr. 54. Exprese mRNA galaninu a exprese mRNA galanin like peptidu za fyziologických podmínek a po stresu

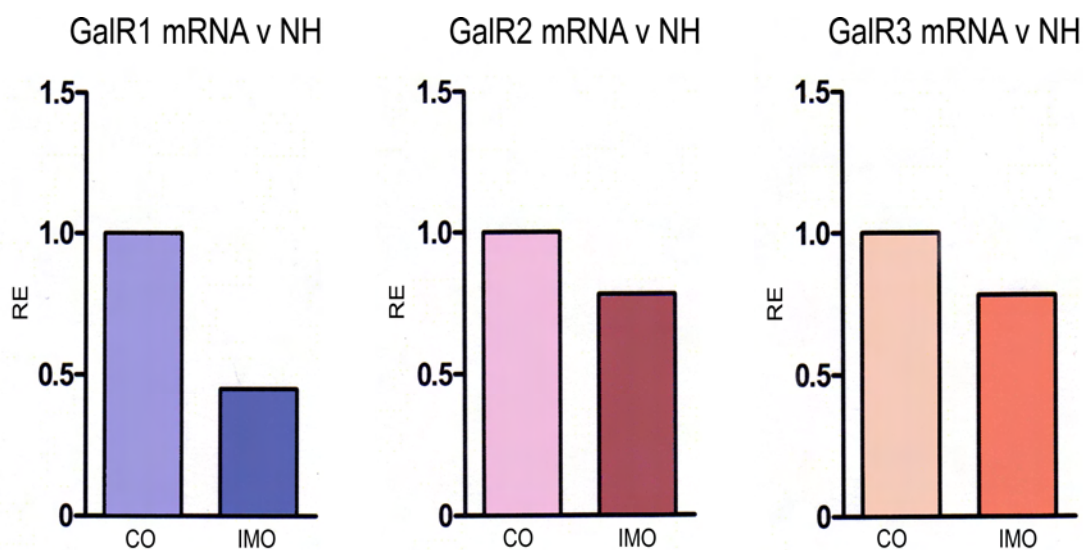
V další části pokusů jsme se zabývali testováním exprese mRNA jednotlivých subtypů GalR1, GalR2 a GalR3. Prokázali jsme přítomnost exprese mRNA všech tří receptorových subtypů, s nejvyšší expresí mRNA GalR2 (Obr. 55).

Expese mRNA GalR subtypů v NH



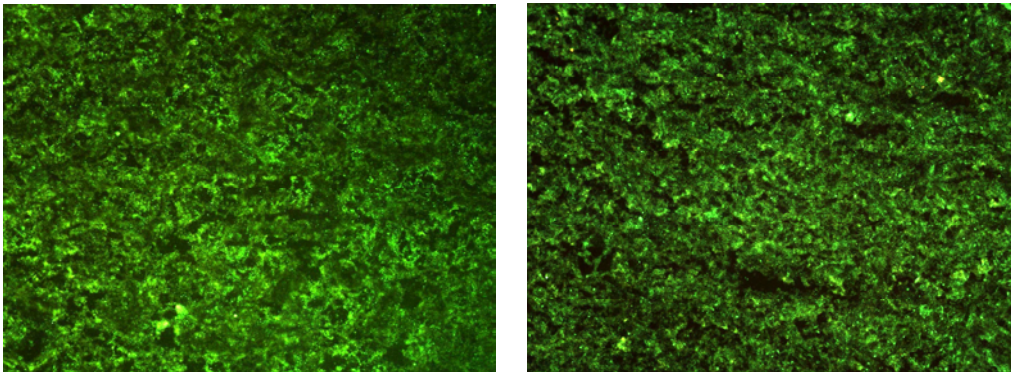
**Obr. 55. Expese mRNA tří subtypů galaninových receptorů v neurohypofýze**

V další části disertace jsme určili vliv stresu na expresi mRNA GalR subtypů. Všechny tři receptory GalR1, GalR2 a GalR3 reagovaly snížením exprese mRNA, nejsilnější odpověď byla u subtypu GalR1.



**Obr. 56. Expese mRNA GalR subtypů po působení akutního stresu**

#### 4.5.2. Imunohistochemická detekce vybraných součástí galaninergního systému sledovaná v neurohypofýze za fyziologického stavu

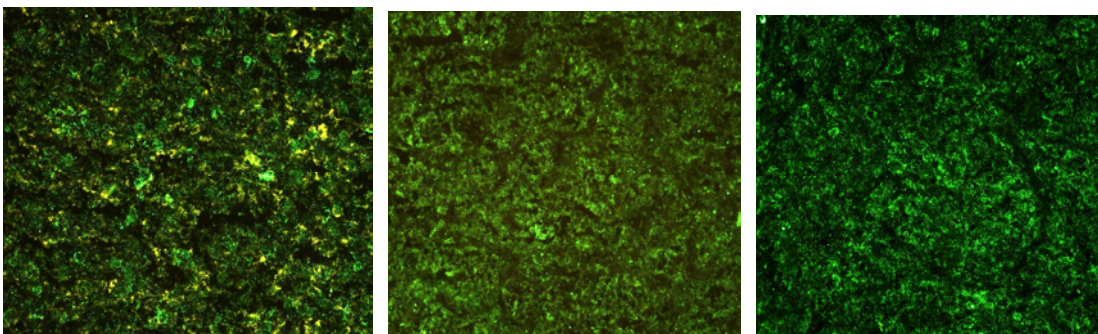


**Gal**

**GalLP**

**Obr. 57. Expres galaninu a galanin like peptidu v neurohypofýze**  
(Škopek et al., 2013). Zvětšeno 40x (i u dalších řezů, již neuváděno).

V neurohypofýze jsme prokázali expresi galaninu a galanin like peptidu. Četnost buněk exprimujících galanin odpovídá četnosti buněk exprimujících galanin like peptid. Densita signálu galaninu se oproti galanin like peptidu jeví jako vyšší.



**GalR1**

**GalR2**

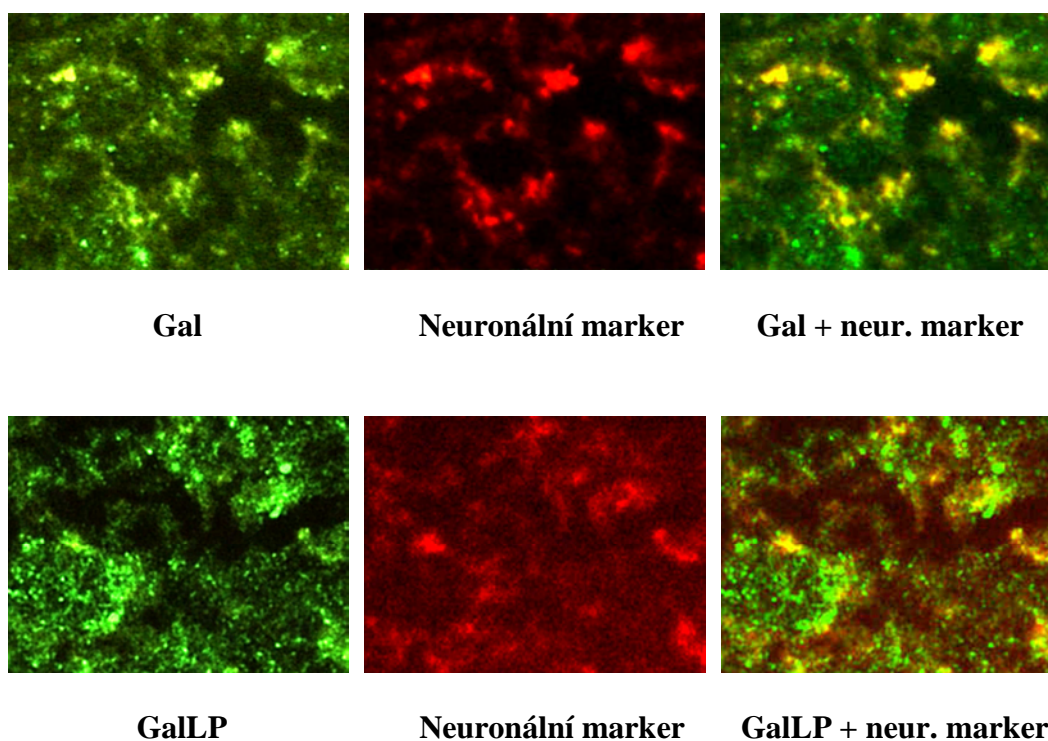
**GalR3**

**Obr. 58. Expres galaninových receptorových subtypů v neurohypofýze**  
V neurohypofýze jsme prokázali expresi všech třech galaninových receptorových subtypů (Škopek et al., 2013).



V neurohypofýze jsou exprimovány všechny tři galaninové receptorové subtypy. Počet buněk, které exprimují GalR2 a GalR3 je přibližně stejný. Počet buněk exprimujících GalR1 je nižší oproti subtypům GalR2 a GalR3, ale denzita jeho signálu je vyšší (zelené až zelenožluté zbarvení na obrázku 58).

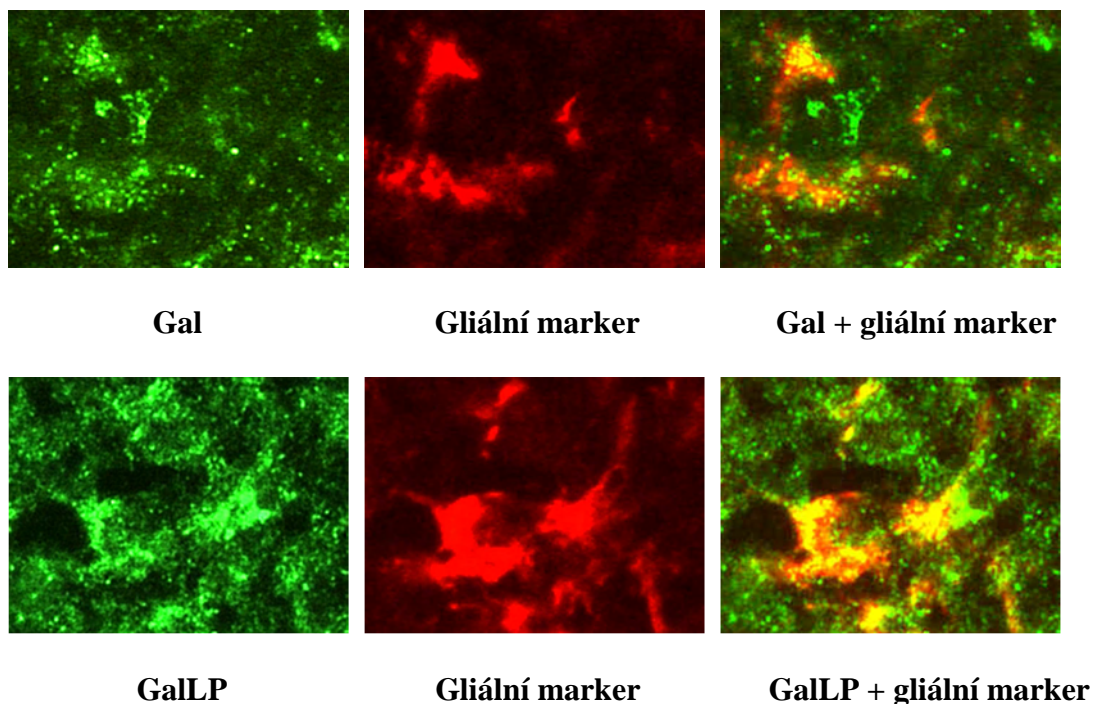
Stejně jako v adenohypofýze jsme se i v neurohypofýze zabývali možnými kolokalizacemi sledovaných neuropeptidů. Po detekci přítomnosti galaninu a galanin like peptidu a všech tří galaninových receptorových subtypů jsme určili jejich kolokalizace s neuronální tkání, pituicyty, oxytocinem a vasopresinem.



**Obr. 59. Kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s nervovou tkání**

V neurohypofýze jsme sledovali kolokalizaci galaninu a galanin like peptidu s nervovou tkání. Obrázky znázorňují zeleně značený galanin resp. galanin like peptid a červeně označenou nervovou tkáň. Kolokalizaci obou neuropeptidů s nervovou tkání po překryvu řezů, znázorňuje žlutá barva. Vedle kolokalizace peptidů s nervovou tkání se oba neuropeptidy vyskytují v NH i samostatně mimo nervovou tkáň.

Z našich imunohistochemických detekcí v neurohypofýze vyplývá, že je galanin i galanin like peptid kolokalizován s nervovou tkání. Tyto neuropeptidy jsou přítomny i mimo nervovou tkáň.

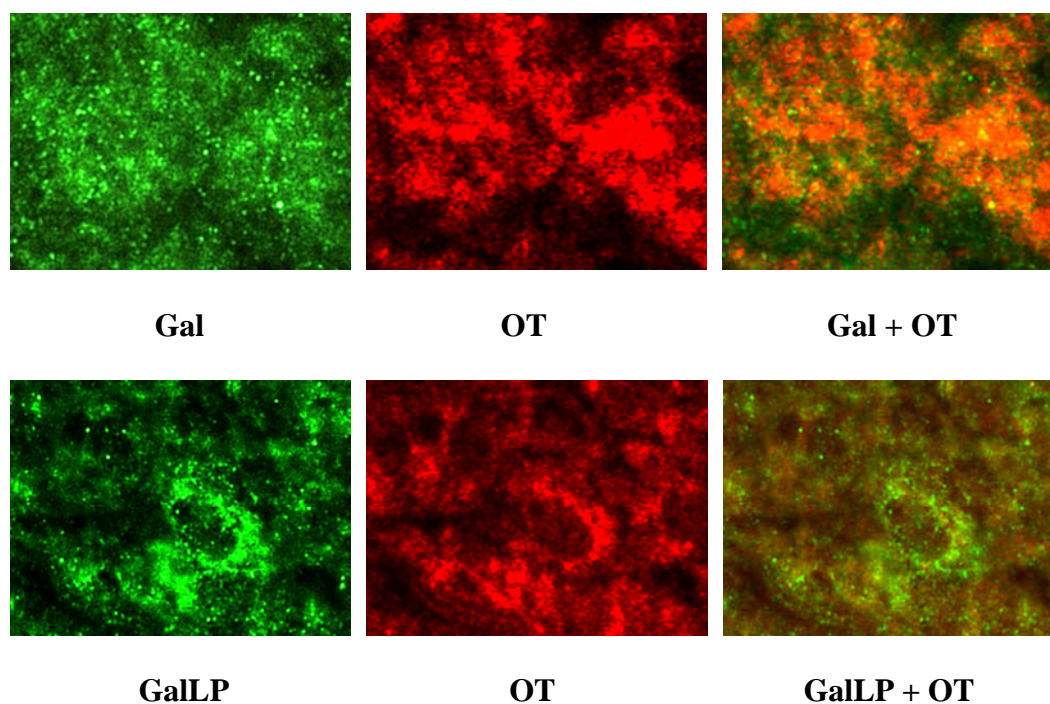


**Obr. 60. Kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s pituicyty značenými gliálním markerem**

V neurohypofýze jsme sledovali kolokalizace galaninu a galanin like peptidu, které jsou značeny zeleně. Na obrázcích jsou červeně znázorněny pituicyty označené gliálním markerem. Žlutá barva u překryvu řezů signalizuje, že galanin i galanin like peptid jsou kolokalizovány s pituicyty, částečně se vyskytují i mimo ně.

Prokázali jsme kolokalizaci galaninu a galanin like peptidu s pituicyty značenými gliálním markerem. Jedná se o částečnou kolokalizaci, to znamená, že se galanin, stejně jako galanin like peptid, se vyskytují i mimo pituicyty.

#### 4.5.3. Kolokalizační studie s oxytocinem a vasopresinem

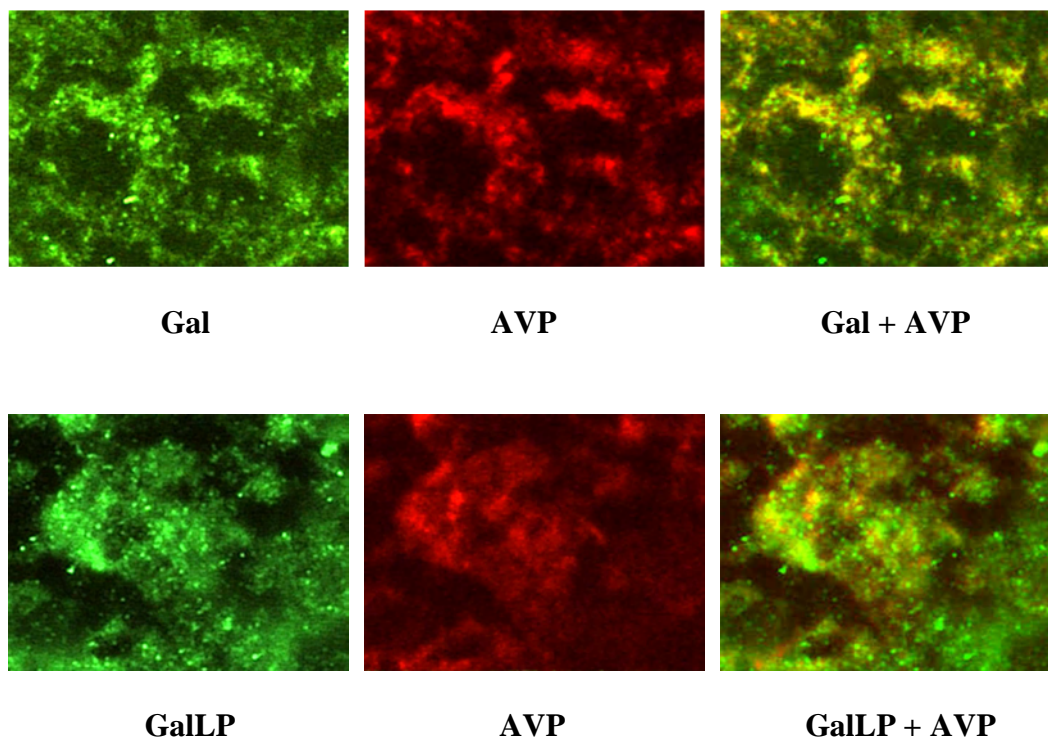


**Obr. 61. Kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s oxytocinem**

V neurohypofýze jsme určili kolokalizaci galaninu a galanin like peptidu s oxytocinem. Obrázky znázorňují zeleně značený galanin a galanin like peptid a červeně označený oxytocin. Obrázek s překryvem Gal s OT ukazuje, že galanin je kolokalizován s oxytocinem (oranžová barva značí překryv zeleně značeného galaninu s červeným oxytocinem), žlutá barva vzniká v místech nejsilnějšího zeleného signálu. Žlutá a oranžová barva na obrázku s překryvem Gal LP a OT označují místa překryvu signálů galanin like peptidu a oxytocinu, červená a zelená barva označuje místa, kde se tyto peptidy vyskytují samostatně.

Prokázali jsme kolokalizaci galaninu a galanin like peptidu s oxytocinem v neurohypofýze. Galanin, galanin like peptid i oxytocin se v neurohypofýze vyskytují také vzájemně nekolokalizovány.

V následující sérii experimentů jsme sledovali kolokalizaci s vasopresinem, výsledky jsou uvedeny na Obr. 62.

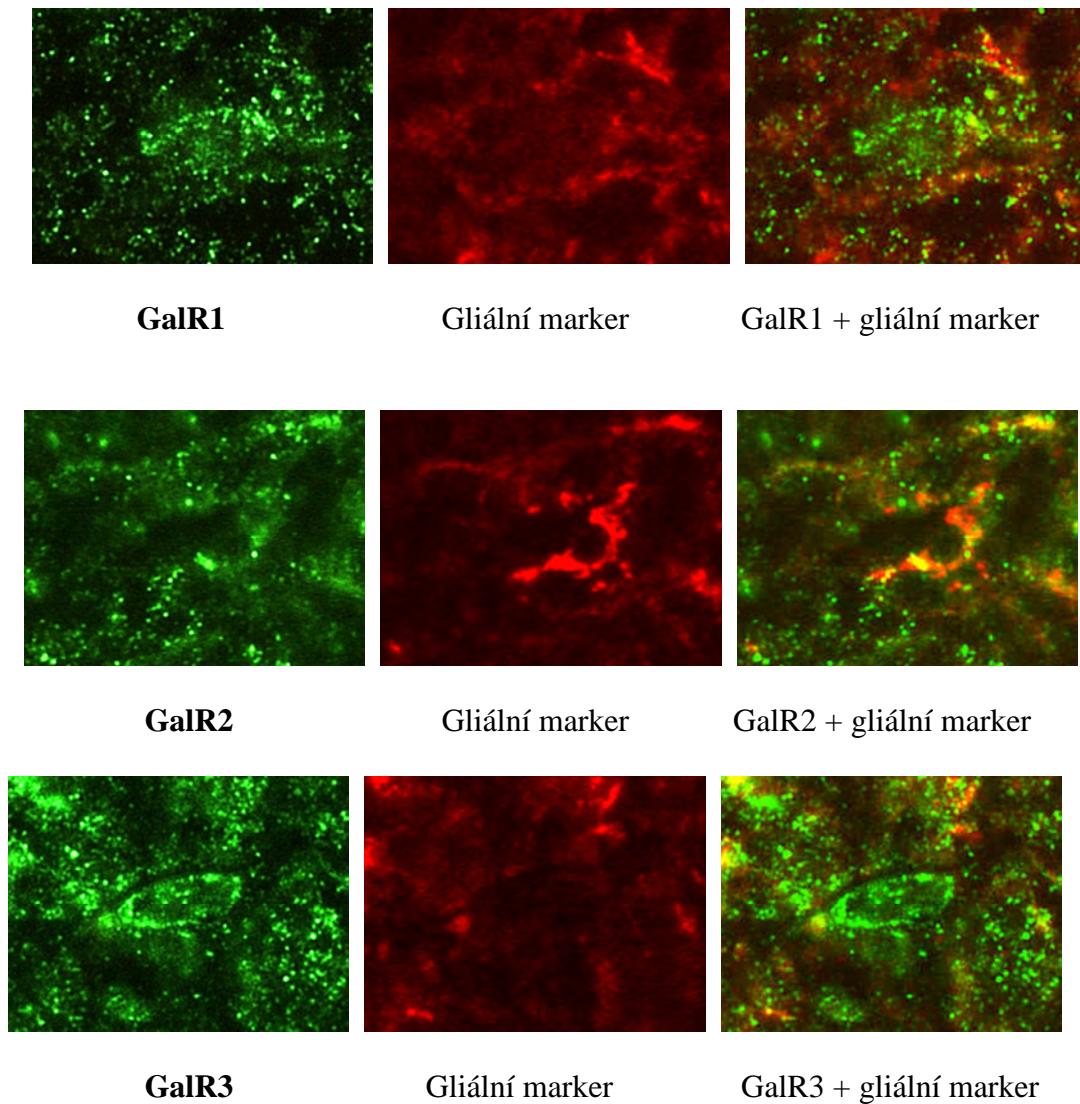


**Obr. 62. Kolokalizace galaninu a galanin-like peptidu s vasopresinem**

Sledovali jsme kolokalizaci galaninu a galanin like peptidu s vasopresinem v neurohypofýze. Na obrázcích jsou zeleně označeny galanin a galanin like peptid a červeně označený vasopresin. Mimo samostatný výskyt peptidů, je galanin kolokalizován s vasopresinem, o čemž svědčí žlutá barva na obrázku s překryvem, stejně tak jako galanin like peptid.

V neurohypofýze jsme našli kolokalizaci vasopresinu jak s galaninem, tak s galanin like peptidem.

V další sérii experimentů jsme zjišťovali expresi genů receptorových subtypů a jejich lokalizaci ve vztahu k pituicytům a neuronální tkáni. Na následujících obrázcích jsou prezentovány výsledky z těchto studií, v pořadí značení gliálním markerem s následným značením neuronálním markerem.

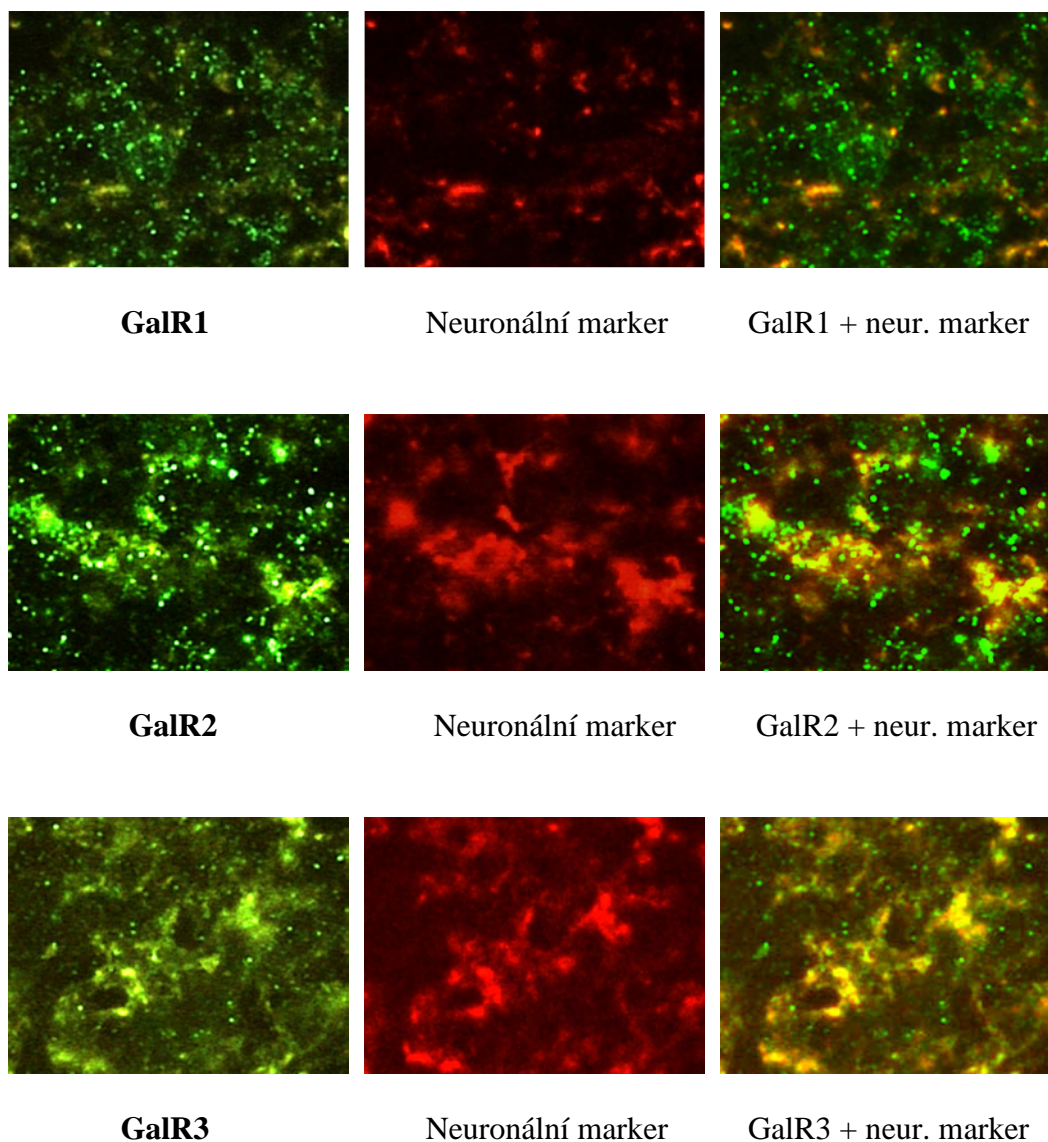


**Obr. 63. Kolokalizace galaninových receptorových subtypů s pituicyty**

Na obrázku jsou zeleně označené galaninové receptorové subtypy a červeně označené gliálním markerem pituicyty. Z obrázku s překryvem je zřejmé, že GalR1 je s pituicyty kolokalizován ojediněle, většina tohoto subtypu je lokalizována mimo pituicyty a žlutá barva značící kolokalizaci se vyskytuje pouze lokálně.

Obrázek zachycuje částečnou kolokalizaci GalR2 s gliálním markerem, GalR2 je přítomen i mimo pituicyty, o čemž svědčí zelená barva, stejně tak se vyskytuje i GalR3.

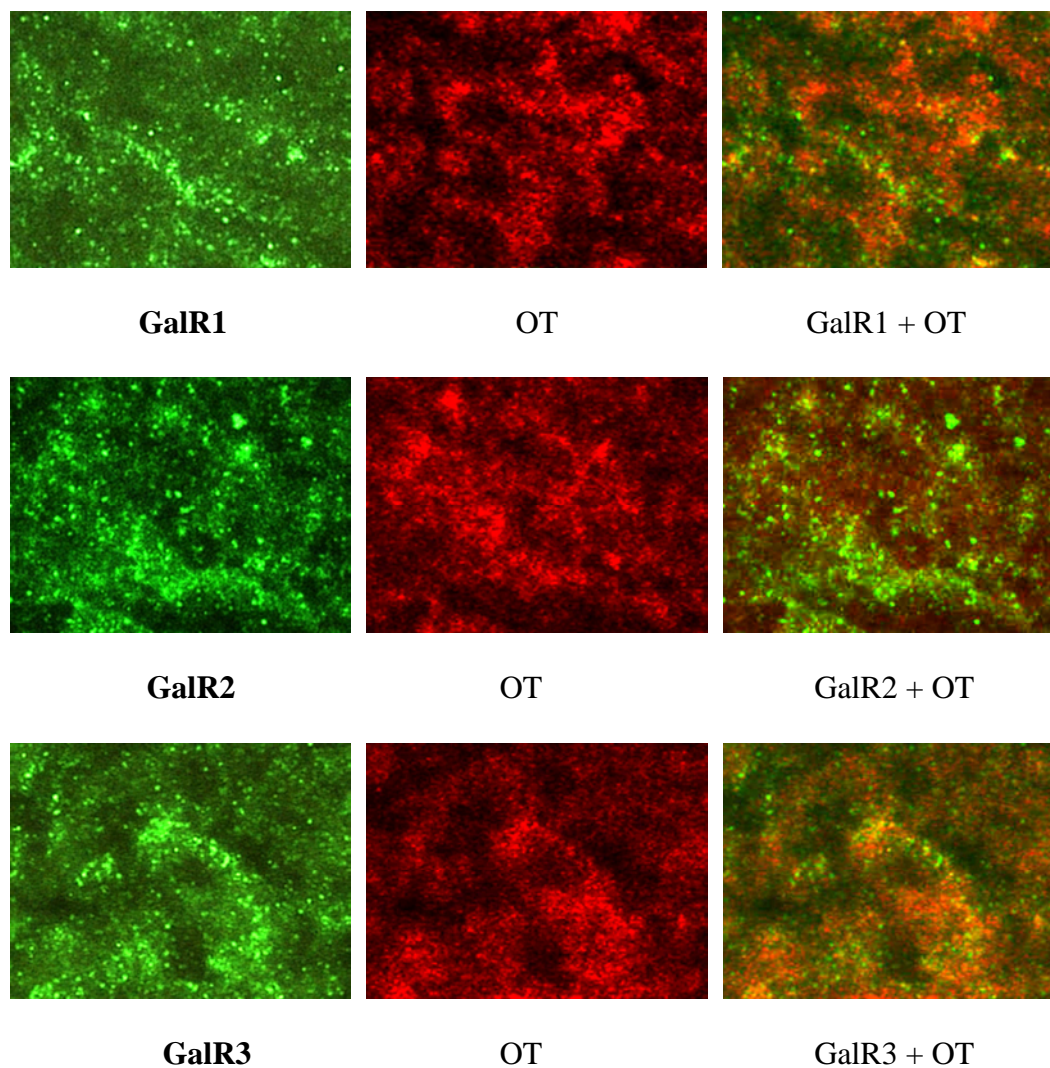
V neurohypofýze jsme prokázali kolokalizaci galaninových receptorových subtypů s pituicyty. Všechny tři receptorové subtypy jsou s pituicyty kolokalizovány pouze částečně. Většina signálu GalR1, GalR2 a GalR3 se nachází mimo pituicyty a k překryvu s pituicyty dochází pouze lokálně.



**Obr. 64. Kolokalizace galaninových receptorových subtypů s neuronální tkání**

Na obrázku jsou zeleně označené galaninové receptorové subtypy a červeně neuronálním markerem označená nervová tkáň. Žlutá barva označuje místa, kde dochází ke kolokalizaci, nejméně kolokalizuje s nervovou tkání GalR1 na rozdíl od časté lokalizace GalR2 a GalR3.

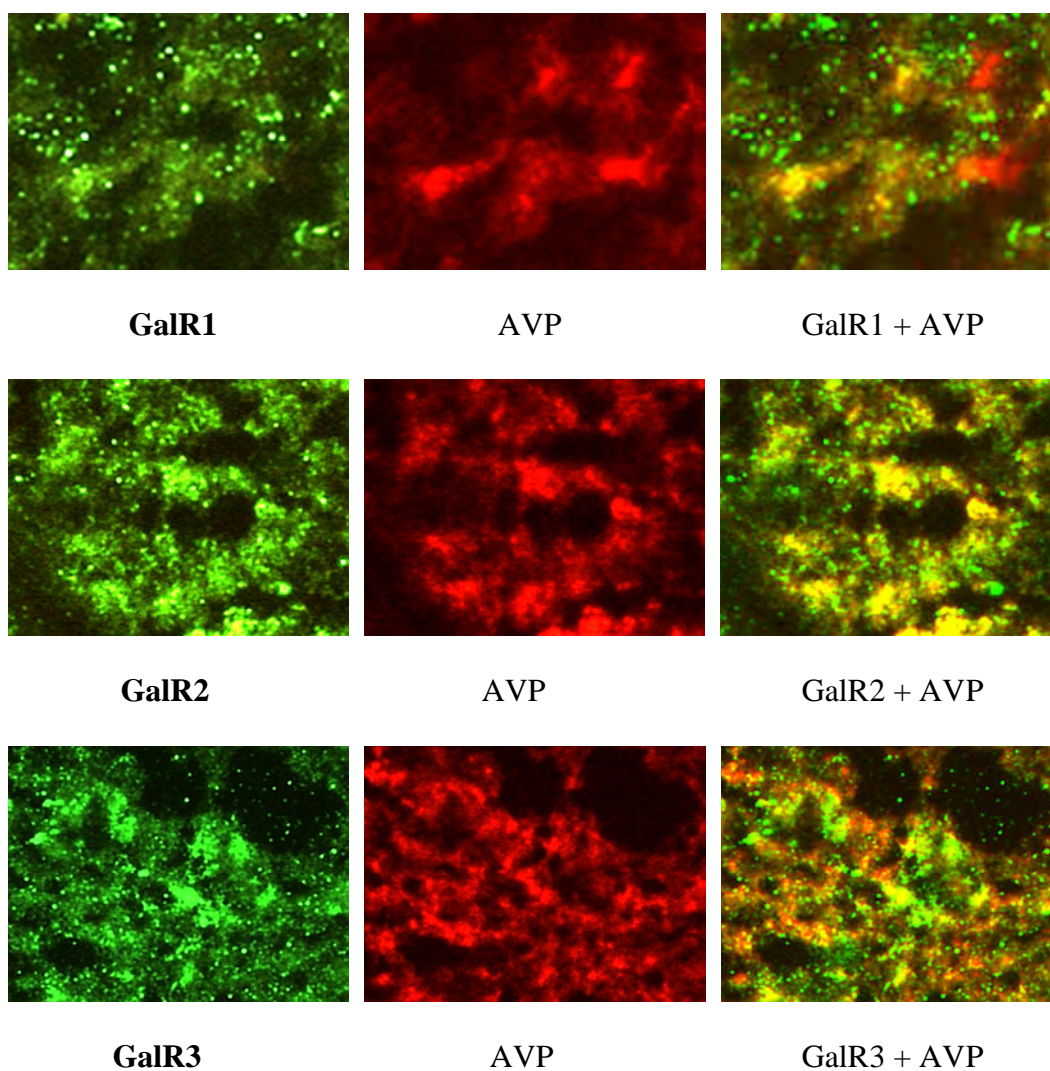
V neurohypofýze jsme prokázali kolokalizaci galaninových receptorových subtypů s nervovou tkání. Kolokalizace GalR2 a GalR3 s nervovou tkání je velmi častá. GalR1 je naopak exprimován mimo nervovou tkáň častěji než zbylé dva receptorové podtypy, s nervovou tkání je GalR1 kolokalizován spíše ojediněle.



**Obr. 65. Kolokalizace galaninových receptorových subtypů s oxytocinem**

Zeleně jsou označené galaninové receptorové subtypy a červeně oxytocin. U GalR1 se žlutá barva, která značí kolokalizaci s oxytocinem, vyskytuje pouze bodově, většina zeleného signálu GalR1 leží mimo signál oxytocinu. GalR2 i GalR3 s oxytocinem kolokalizují.

Prokázali jsme kolokalizaci galaninových receptorových subtypů s oxytocinem. GalR2 a GalR3 kolokalizují s oxytocinem častěji než GalR1. Častější je lokalizace GalR1 mimo výskyt oxytocinu.

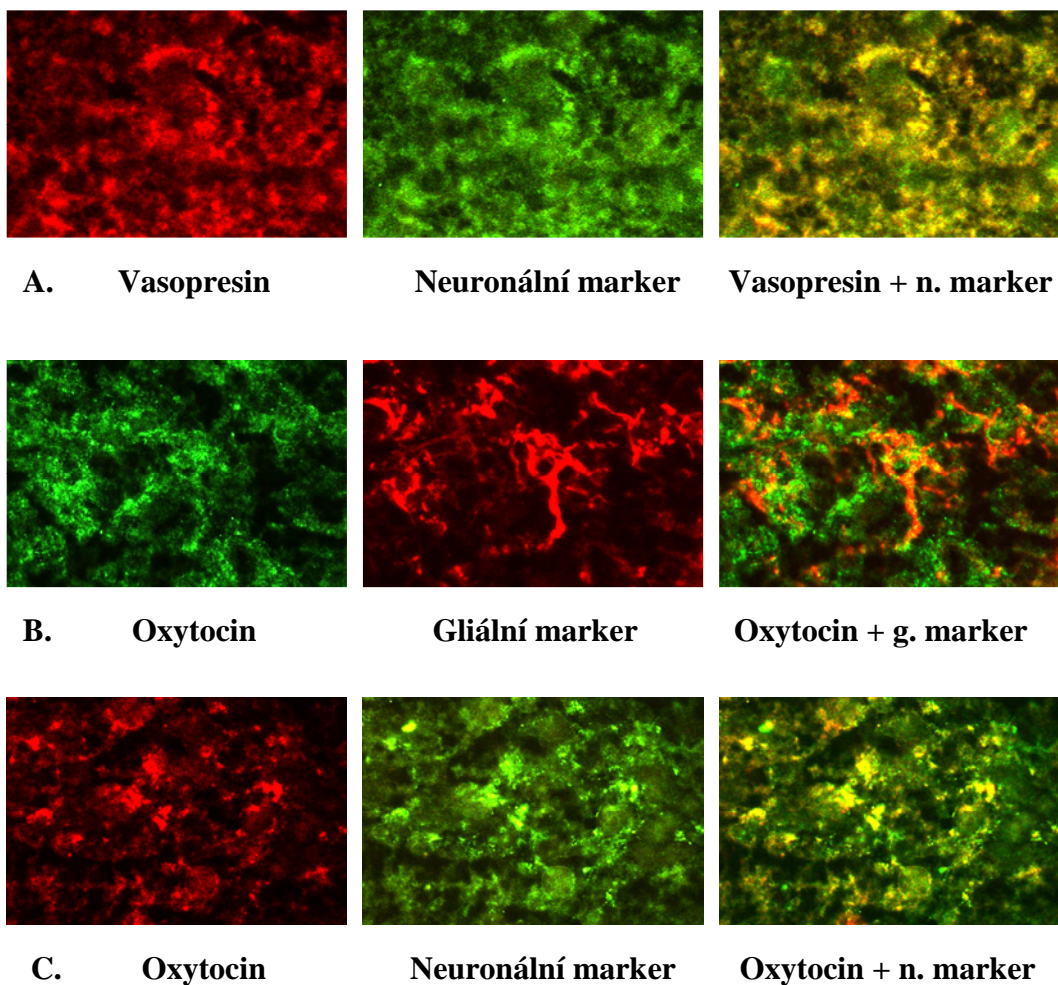


**Obr. 66. Kolokalizace galaninových receptorových subtypů s vasopresinem**

Na obrázku jsou zeleně označené galaninové receptorové subtypy a červeně vasopresin. Kolokalizaci s AVP značí žlutý signál je nejslabší u GalR1. Velmi silný signál je u GalR2 svědčící o silné kolokalizaci GalR2 a AVP. Rovněž signál GalR3 se z velké části překrývá se signálem AVP.

V neurohypofýze jsme prokázali kolokalizaci galaninových receptorových subtypů s vasopresinem. Nejsilnější kolokalizaci jsme našli u GalR2. GalR1 je s vasopresinem také kolokalizován, ale častěji než u GalR2 se vyskytují lokalizace vasopresinu mimo oblasti s exprimovaným GalR1. GalR3 je s vasopresinem lokálně kolokalizován, ale vyskytuje se i mimo oblasti s expresí vasopresinu.

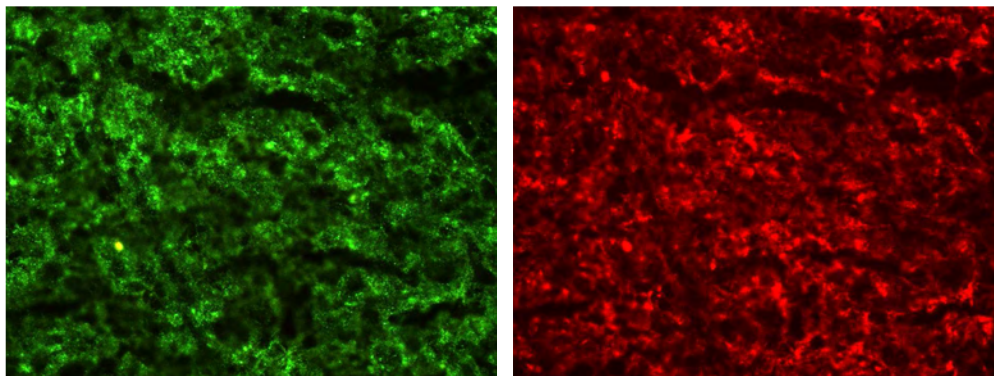




**Obr. 67. Kolokalizace oxytocinu a vasopresinu s gliálním a neur. markerem**

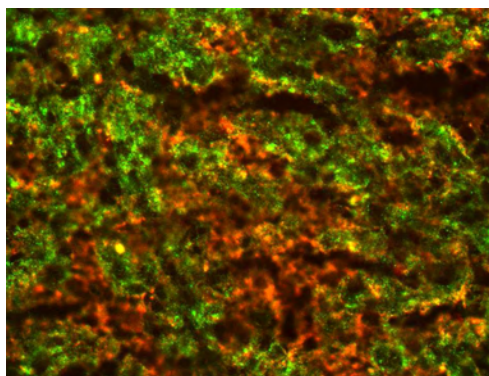
Na obrázku část A. je červeně označen vasopresin a zeleně nervová tkáň. Žlutá barva označuje místa, kde došlo ke kolokalizaci vasopresinu s neuronálním markerem. Na obrázku B. je zeleně značený oxytocin a červeně pituicyty, po překryvu dochází k částečné kolokalizaci oxytocinu s pituicyty s výskytem samostatné lokalizace oxytocinu i pituicytů. Na obrázku C. je červeně značený oxytocin a zeleně značená nervová tkáň, dochází k částečné kolokalizaci.

Při analýze vztahu neuronální tkáň a pituicytů k oxytocinu a vasopresinu jsme v neurohypofýze jsme prokázali kolokalizaci neuronální tkáň i pituicytů s oxytocinem a kolokalizaci neuronální tkáň s vasopresinem. Bohužel jsme nemohli testovat kolokalizaci vasopresinu s pituicyty, nebyla k dispozici komerčně dostupná protilátka.



**Oxytocin**

**Vasopresin**



**Oxytocin + vasopresin**

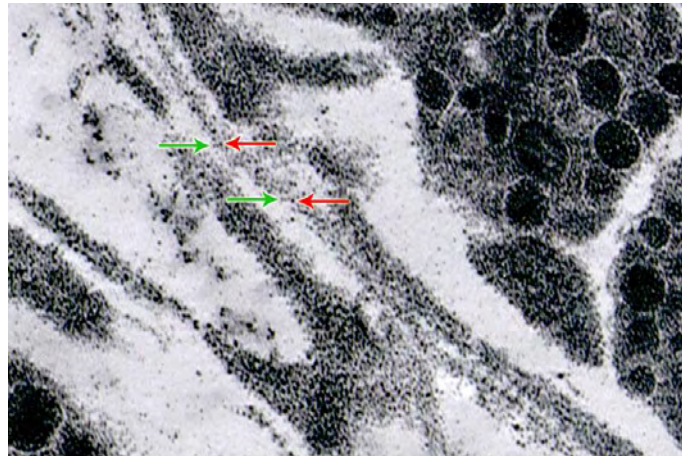
**Obr. 68. Kolokalizace oxytocinu s vasopresinem**

Sledovali jsme kolokalizaci zeleně značeného oxytocinu s červeně značeným vasopresinem. Nepřítomnost žluté barvy na obrázku s překryvem obou neuropeptidů dokazuje, že oxytocin s vasopresinem nejsou kolokalizovány. Ze vzorce značení je zřejmé, že buňky se signálem oxytocinu vytváří ostrůvky mezi nimiž jsou lokalizovány ostrůvky buněk se signálem vasopresinu.

Prokázali jsme, že oxytocin a vasopresin v neurohypofýze nejsou kolokalizovány. Buňky exprimující vasopresin jsou rozmístěny v ostrůvcích střídajících se s ostrůvky buněk, které exprimují oxytocin.

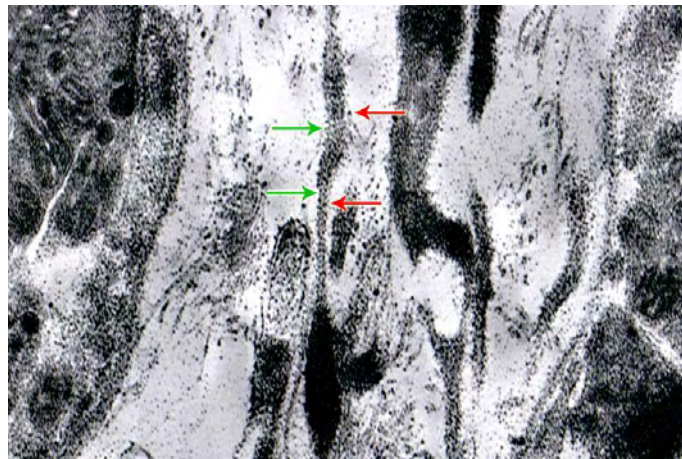
#### 4.5.3.1. Určení kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s oxytocinem za použití elektronové mikroskopie

V neurohypofýze jsme označili galanin, galanin like peptid a oxytocin protilátkami s koloidním zlatem. Elektronovou mikroskopií jsme potvrdili kolokalizaci galaninu i galanin like peptidu s oxytocinem, jak je znázorněno na obrázku 69.



A.

Gal + OT



B.

GalLP + OT

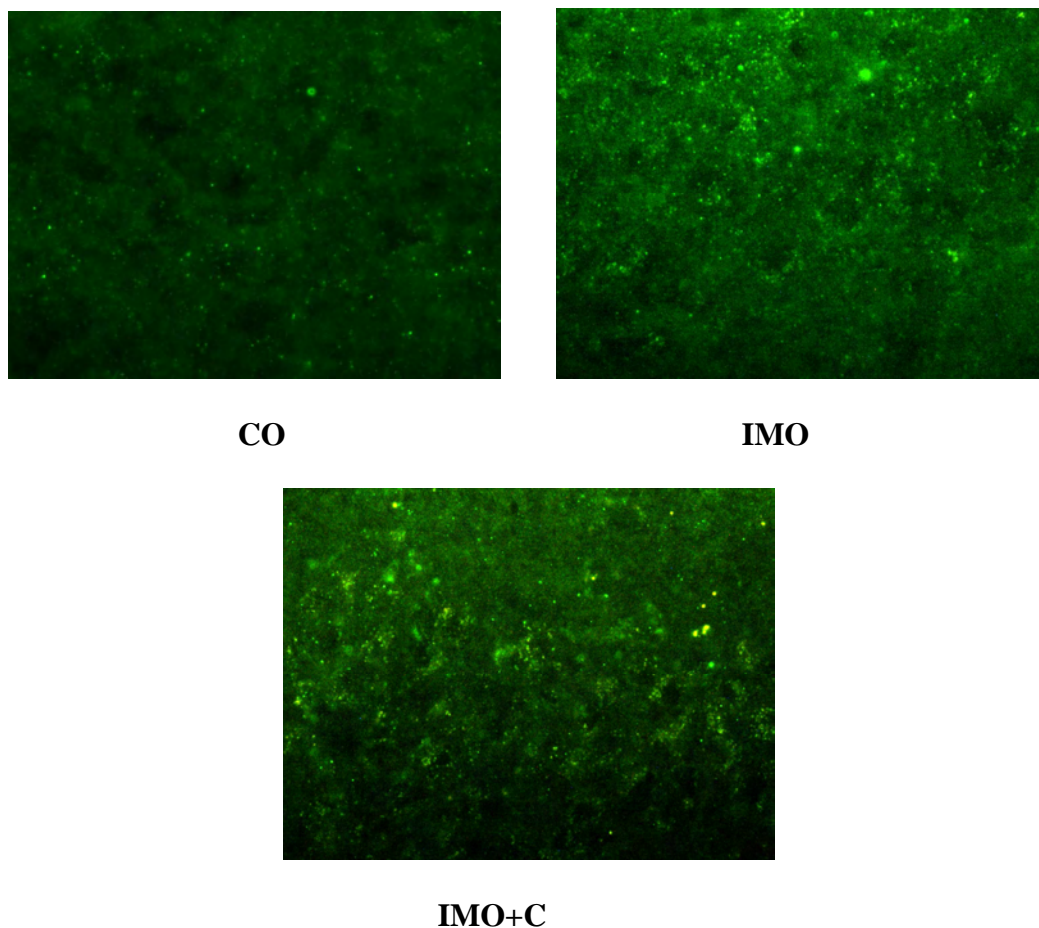
**Obr. 68. Imunohistochemické sledování kolokalizace Gal a GalLP s OT v NH**  
Galanin (A.) a galanin like peptid (B.) jsou označeny 15nm částicemi koloidního zlata (červená šipka), oxytocin je označen 5nm částicemi koloidního zlata (zelená šipka).

Přítomnost částic 15nm zlata v těsné blízkosti 5nm částic zlata svědčí o kolokalizaci galaninu s oxytocinem (Obr. 69 A.) a rovněž galanin like peptidu s oxytocinem (Obr. 69 B.).

V neurohypofýze jsme označili galanin, galanin like peptid a oxytocin protilátkami s koloidním zlatem. Elektronovou transmisní mikroskopií jsme prokázali na membránách pituicytů kolokalizaci galaninu s oxytocinem i kolokalizaci galanin like peptidu s oxytocinem.

#### 4.5.4. Detekce exprese galaninu, galanin like peptidu a jejich receptorů v SON a neurohypofýze po stresu

##### 4.5.4.1. Výsledky stres SON

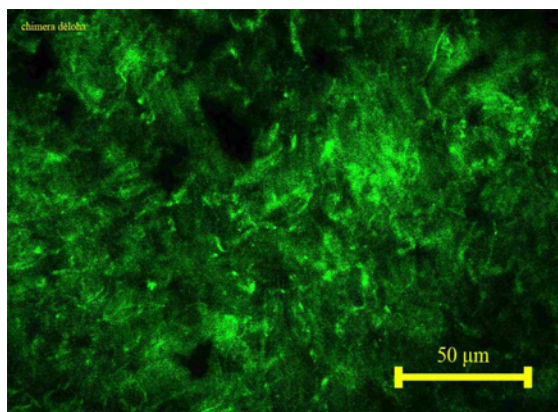


**Obr. 69. Oxytocinové receptory v supraoptickém jádře (SON) po aplikaci stresu**

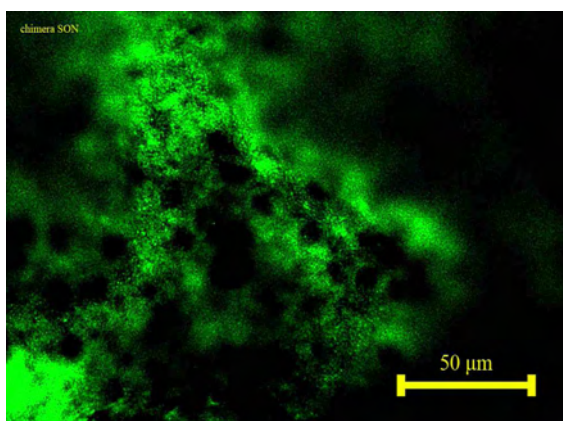
V supraoptickém jádru (SON) hypotalamu jsme metodou imunofluorescence označili oxytocinové receptory. Po aplikaci dvou typů akutního stresu IMO a IMO+C došlo v SON ke zvýšení intenzity signálu oxytocinového receptoru. U aplikovaného IMO+C byl tento efekt výraznější.

K označení oxytocinových receptorů v supraoptickém jádru hypotalamu jsme také použili chiméru, syntetizovanou v naší laboratoři.

**Obr. 70.**



**Uterus**

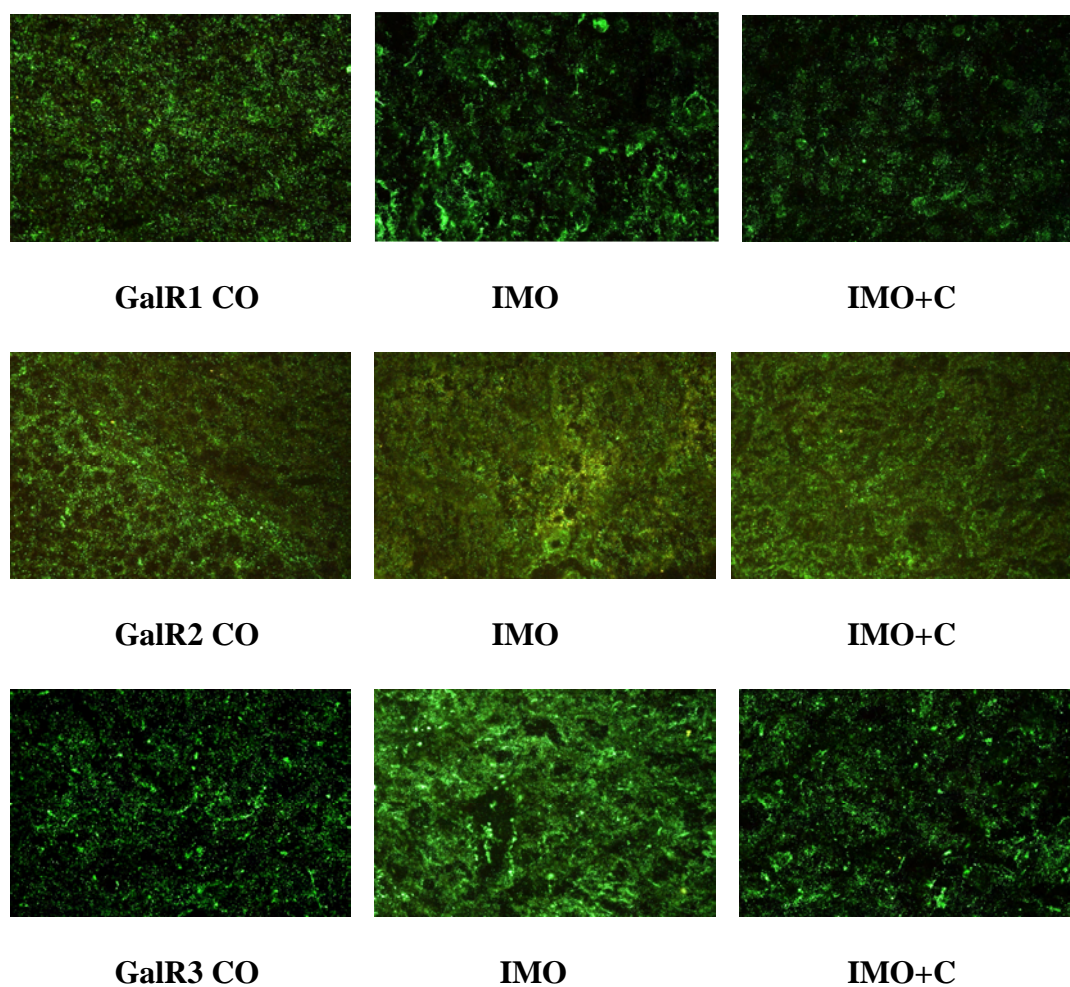


**Supraoptické jádro**

Chiméra OT s kumarinovým markerem, která se prokázala jako funkční, se navázala na oxytocinový receptor receptor v děloze, která byla použita jako referenční tkáň (A) a v supraoptickém jádru hypotalamu (SON) potkana. Tento postup lze využít pro detekci oxytocinového receptoru bez použití primárních a sekundárních protilátek.

#### 4.5.4.2. Působení stresu na galaninové receptorové subtypy v neurohypofýze

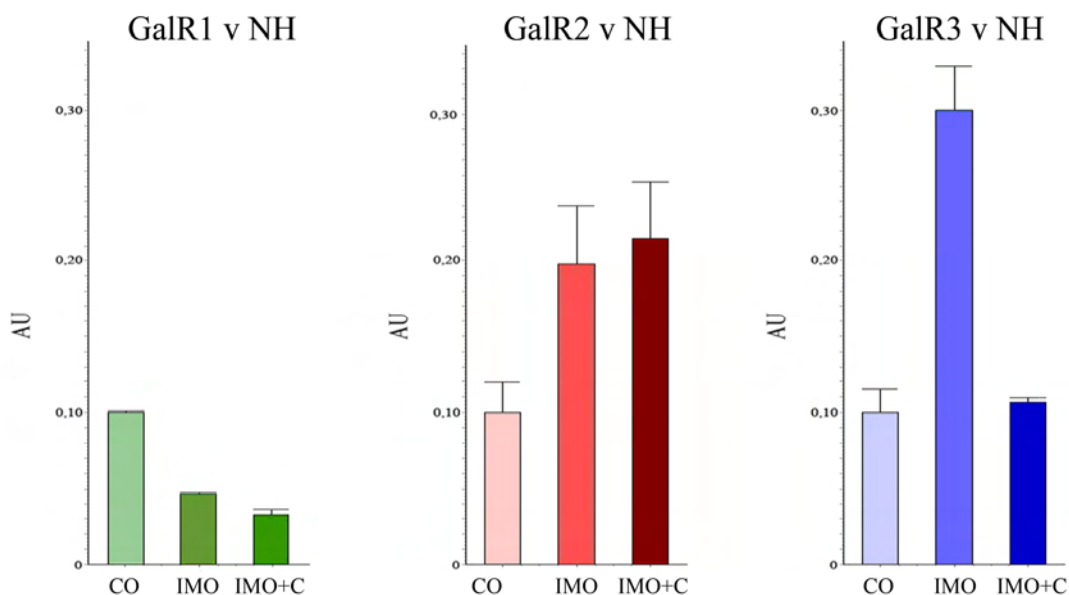
V další sérii pokusů nás především zajímalo potvrzení naší hypotézy, že jsou to receptory, které určují odpověď tkáně na stres. Provedli jsme sérii pokusů s aplikací dvou typů stresu a s analýzou případných změn receptorových subtypů vyvolaných stresem.



**Obr. 71. Galaninové receptrové subtypy v neurohypofýze u kontrol a po působení dvou typů stresu IMO a IMO+C**

Působením stresu došlo v neurohypofýze u GalR1 k signifikantnímu snížení exprese a to jak u IMO tak u IMO+C. Stres naopak neovlivnil expresi GalR2.

Expres GalR3 se ve skupině IMO signifikantně zvýšila oproti kontrolám i oproti IMO+C.



**Obr. 72. Vliv dvou typů stresu IMO60 a IMO+C60 na denzitu subtypů receptorů GalR1, GalR2, GalR3 v NH vyhodnocené pomocí obrazové analýzy**

Testovali jsme efekt dvou typů stresu (viz metody), s hodinovým odstupem po ukončení stresu, na denzitu jednotlivých subtypů receptorů galaninu. Uvádíme přehledné výsledky se signifikancí, které jsou zobrazeny také v grafu na Obr. vyhodnocené obrazovou analýzou (viz metody).

**GalR1:** CO x IMO60, signifikantní snížení denzity u IMO60;  $p < 0,001$

CO x IMO+C60, signifikantní snížení denzity u IMO60;  $p < 0,001$

IMO60 x IMO+C60, není signifikantní rozdíl

**GalR2:** žádný signifikantní rozdíl

**GalR3:** CO x IMO60 signifikantní zvýšení denzity u IMO60;  $p < 0,001$

CO x IMO+C60, není signifikantní rozdíl

IMO60 x IMO+C60, signifikantní snížení GalR3 u IMO+C60;  $p < 0,001$

Z této rozsáhlé studie lze vyvodit závěr, že galaninové receptory jsou do stresové odpovědi zapojeny rozdílně a rovněž rozdílně podle typu stresoru. Potvrdili jsme tak hypotézu, ze které jsme vycházeli při designu těchto experimentů.



## 5. DISKUZE

Předložená disertační práce se věnuje výsledkům získaným v průběhu mého 4-letého postgraduálního studia a navazuje na výsledky výzkumné práce školícího pracoviště. Tato laboratoř se dlouhodobě zabývá studii některých neuropeptidů, studiem periferních i centrálních účinků, především neurohormonů oxytocinu, vasopresinu a jejich analogů za fyziologických podmínek a po působení stresu. Neuropeptidy vasopresin a oxytocin vykazují nejen typické fyziologické periferní účinky, ale mají také důležitou centrální regulační úlohu jako neurotransmitery a neuromodulátory. Bylo u nich prokázáno, že modulují řadu neurofyziologických fenomenů, jako chování, sociální citění, učení, paměť, a ovlivňují stresové odpovědi. Behaviorální studie poskytují informaci o centrálním působení testovaných látek. Neuropeptidům je pro jejich centrální účinky věnována v posledním období zvýšená pozornost, neboť se předpokládá jejich terapeutické využití.

### Behaviorální studie

Stále jsou objevovány nové neuropeptidy a velmi perspektivními se jeví galanin a galanin like peptid, které mají velmi úzký vztah k oxytocinu. Při studiu galaninu jsme vyšli z výsledků behaviorálních studií s oxytocinem a karbetocinem po jejich systémové aplikaci (viz Klenerová et al., 2007; Klenerová et al., 2009b; Klenerová et al., 2010). Většina publikací uvádí, že pro peptidy je hematoencefalická bariéra nepropustná a z tohoto důvodu při studiu centrálních účinků neuropeptidů jsou většinou aplikovány i.c.v. Naše laboratoř prokázala, že peptidy neurohypofýzy mají při systémové aplikaci významné behaviorální účinky. Je předmětem diskuse, jakým způsobem se některé peptidy do mozku dostávají.

Výzkum funkce a mechanismu účinku neuropeptidů v mozku po systémové aplikaci je ztížen existencí hematoencefalické bariéry (BBB), která zajišťuje ochranu a funkčnost CNS a je nepropustná právě pro peptidy. Tato bariéra je tvořena z krevní strany vrstvou endoteliálních buněk spojených těsnými kontakty tzv. „tight junctions“, bazální membránou a z mozkové strany vrstvou astrocytů s pericyty. Pericyty hrají klíčovou roli ve formování a správné funkci přechodu mezi cévním systémem a mozkiem. Přes hematoencefalickou bariéru mohou volně přecházet látky rozpustné v tucích, plyny jako je kyslík a oxid uhličitý. Všechny ionty a látky rozpustné ve vodě, jako je glukóza, aminokyseliny aj., se však musí aktivně transportovat přes buněčné membrány za spotřeby energie. Průniku látek do mozku brání i enzymatická bariéra prostřednictvím enzymatické inaktivace některých látek, např. monoaminoxidáza, acetylcholinesteráza inaktivují setonin, acetylcholin, enkefaliny aj. (Begley, 1994). Díky

tomu může být výměna látek mezi krví a mozkovým tkáňovým mokem regulována (viz přehledový článek Abbot et al., 2006).

Hematoencefalická bariéra usnadňuje vstup požadovaných živin do mozku, a umožňuje vyloučit potenciálně škodlivé sloučeniny. Pomáhá tak udržet oddělené puly neurotransmiterů a neuroaktivních léčiv, která působí centrálně a periferně, a reguluje iontové mikroprostředí neuronů. Existuje stále více důkazů (Abbot et al., 2006), že funkce BBB se mění u některých patologických stavů, včetně otoku mozku, roztroušené sklerozy, epilepsie, Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy choroby. Poškození endotelu může změnit endoteliální vlastnosti, a tím otevřít nové komunikační smyčky mezi endotelem, pericyty, astrocyty a mikroglíí, které jsou důležité pro udržení nepropustnosti BBB.

Je otázka, zda některé stresové podněty mohou ovlivnit funkci BBB. Přestože je v poslední době věnována zvýšená pozornost studiu BBB, nejsou jednoznačné závěry o její funkci za stresu. Některé práce uvádějí, že neuropeptidy uvolňované působením stresu, jako je kortikotropin uvolňující hormon (CRH) a neurotenzin, aktivují prozánětlivé procesy, což vede k zvýšené propustnosti BBB (viz přehledový článek Karagkouni et al., 2013). S tímto závěrem jsou v souladu práce, které prokazují, že zvýšená hladina CRH navozená i.c.v. aplikací, vede ke zvýšení propustnosti BBB. Rovněž působení akutního stresu, spojené s uvolněním CRH, způsobilo zvýšení propustnosti BBB (Esposito et al., 2002).

Tyto výsledky z jiných laboratoří podporují náš cíl, zabývat se studiem přestupu peptidů přes BBB za stresu. V další části behaviorální studie byl galanin testován po vystavení potkanů akutnímu stresu.

Hematoencefalická bariéra v některých oblastech mozku zcela chybí; v těchto oblastech jsou kapiláry fenestrovány. Patří k nim epifýza, adenohipofýza a neurohypofýza, které vylučují hormony přímo do krve. Dále jsou v mozku speciální struktury přiléhající k mozkovým komorám, tzv. cirkumventrikulární orgány.

Cirkumventrikulární orgány jsou specializované nepárové struktury ležící ve stěně mozkových komor, s významnou účastí na neuroendokrinních interakcích. Patří sem area postrema, eminentia mediana, subkomisurální a subfornikální orgán, lamina terminalis (resp. její organum vasculosum). Jsou charakterizovány fenestrací endotelu na kapilární straně a specializovanými ependymálními buňkami, tzv. tancyty, z nichž jsou některé vybaveny chemoreceptory předávajícími podněty z krve do CNS.

Předpokládáme, že naši hypotézu o centrálních behaviorálních účincích námi systémově podaných peptidů oxytocinu, karbetocinu i galaninu lze vysvětlit výše popsaným mechanismem, se zapojením cirkumventrikulárního orgánu.

Zde je nutné zmínit způsob aplikace látek, který při i.c.v. podání působí stres, stejně tak jako chirurgické zákroky s tím spojené, a rovněž i některé způsoby anestézie. Tyto v podstatě stresové zásahy mohou být zdrojem kontroverzních výsledků. Další nevýhodou je náročnost i.c.v. aplikace a nutnost dalšího vybavení pro provedení operace.

Výše uvedené behaviorální studie naší laboratoře prokázaly (Klenerová et al., 2011a), že galanin je další neuropeptid, který po systémové aplikaci má protistresové a anxiolytické účinky. Získané výsledky také předpokládají, že agonista galanin a antagonist galaninu M40, i námi syntetizovaný antagonist galaninu peptid chiméra-galanin Y neuropeptid amid, působí na úrovni receptorů a že výsledek této interakce po určitou dobu přetrvává. Tyto výsledky, které jsou podkladem této disertace, potvrdily naši hypotézu o působení galaninu v CNS v odpovědi na stres (Klenerová et al., 2011a).

Studium oxytocin/oxytocin receptorového (OT/OTR) systému je v současnosti zaměřeno na jiné periferní tkáně, než jsou pro oxytocin klasické orgány děloha a mléčná žláza, např. na srdce, sval, kost, neoplastické tkáně (Strunecká et al., 2009). Velké množství dat o oxytocin/oxytocin receptorovém systému pochází ze studia nádorů, lidského osteosarkomu, rakoviny prsu a primárních lidských fibroblastických buněk (viz Kinsey et al., 2007).

Funkce oxytocinu je velmi komplexní, působí na mnoha místech v CNS a jeho účinky jsou složitě regulovány zpětnovazebnými mechanismy; některé tyto mechanismy jsou u oxytocinu známé, např. jeho regulační úloha je významně modulována ženskými pohlavními hormony (Brunton a Russell, 2008. Review).

## **Srdce**

Kardiovaskulární systém je regulován řadou hormonů a neurotransmiterů za fyziologických i patologických podmínek. V poslední době byl zařazen mezi tyto hormony i oxytocin, jako nový kardiovaskulární hormon. Oxytocin působí prostřednictvím neuroendokrinních-endokrinních-parakrinních cest regulaci krevního objemu svými natriuretickými účinky a moduluje krevní tlak stimulací uvolnění atriálního natriuretického peptidu. Z experimentálních studií vyplývá, že OT může ovlivňovat nebo regulovat funkce srdce několika různými mechanismy. Hlavní zásluhu na charakterizaci oxytocinu jako kardiovaskulárního hormonu mají Gutkowská a Jankowski (2000; 2008), ale zbývá mnoho

nevyřešených otázek týkajících se signálních procesů iniciovaných stimulační OTR v srdci. Pokud přijmeme tvrzení, že OT funguje jako kardiovaskulární hormon, měly by se další studie zaměřit na zjištění, do jaké míry je tato úloha zprostředkována OT systémem přímo v srdci a OT uvolněným do oběhu (Wsol et al. 2009).

V této části dizertace jsme sledovali v jednotlivých srdečních oddílech expresi oxytocinového receptoru a možnost ovlivnění jeho funkce rozdílnou aktivitou HPA osy za fyziologických podmínek a za stresu. Sledovali jsme expresi mRNA metodou real time qPCR a expresi genu imunofluorescencí. Zatímco sledování mRNA OTR poskytuje pouze informaci, že k tvorbě OTR proteinu má dojít, imunohistochemické studie určují přímo exprimovaný OTR protein. Mezi těmito dvěma parametry nemusí být ovšem přímý vztah. Je zajímavé, že výsledky Western blotu ze srdečních oddílů neukazují tak velké rozdíly v expresi OTR, jako poskytlo sledování relativní exprese mRNA OTR (Škopek et al., 2012).

V našich pokusech testujících vliv HPA osy na expresi mRNA OTR jsme použili potkany Sprague-Dawley a Lewis s rozdílnou aktivitou HPA osy za předpokladu, že tento rozdíl se projeví v expresi OTR (Klenerova et al., 2011). Stanovení exprese mRNA OTR ve všech srdečních oddílech u potkanů s geneticky rozdílnou aktivitou HPA osy však neprokázalo signifikantní rozdíly za bazálních podmínek. Naproti tomu jsme zjistili velké rozdíly v hodnotách relativní exprese mezi síněmi a komorami. Uvedená zjištění jsou v souladu s nálezy Gutkowské a Jankowského. V dalších pokusech jsme testovali vliv dvou typů stresu na expresi mRNA OTR. Hlavním nálezem u mRNA OTR je zjištění signifikantního vlivu stresu u obou kmenů s rozdílnou aktivitou HPA osy, značící účast oxytocinového systému na stresové odpovědi v závislosti na typu stresu, s rozdílnou odpovědí síní a komor.

V druhé části studie, jsme pomocí imunofluorescenčně značených protilátek sledovali v srdečních oddílech expresi OTR. V naší publikaci (Klenerova et al., 2011) jsme demonstrovali, že OTR není v srdečních oddílech kolokalizován s nervovou tkání a je lokalizován v plazmatické membráně, což je typické pro GPCR. V imunofluorescenčních studiích jsou patrné výrazné rozdíly v lokalizaci OTR u kontrol a po působení imobilizačního stresu, avšak nezjistili jsme rozdíl v expresi mezi síněmi a komorami, jaký byl nalezen při studiích u exprese mRNA. V některých srdečních oddílech kontrol a také po působení stresu můžeme pozorovat agregace signálu OTR. Zajímavé jsou rozdíly mezi levou síní a levou komorou, kde v levé síní je signál OTR lokalizován převážně mimo jádra a naproti tomu v levé komoře signál OTR kolokalizuje s jádry (Škopek et al., 2012). Tato pozorování jsou v shodě s novými objevy popisujícími, že mnohé GPCR jsou kolokalizovány s jádry

(Tadevosyan et al., 2012). Tyto receptory lokalizované na jaderné membráně, mohou regulovat odlišné signální dráhy a mohou se podílet na vzniku kardiovaskulárních poruch. Ke zjištění role receptorů kolokalizovaných s jádry je potřeba dalších studií, které jsme nemohli realizovat, neboť nebyly k dispozici komerční specifické protilátky, zakoupené nefungovaly. Kolokalizace OTR s jádry buněk by pravděpodobně mohla vysvětlit diskrepanci v sících a komorách mezi expresí mRNA OTR a OTR značeného pomocí specifických protilátek. Další studie budou nezbytné k objasnění vztahů mezi expresí mRNA a expresí genu OTR určené imunofluorescenčně.

Znalosti o signalizaci OTR mají význam pro hledání nových látek s vyšší specificitou účinku a sníženými nežádoucími účinky. Nové poznatky o regulaci oxytocinového receptoru G-regulačními proteiny slouží jako atraktivní model pro studium funkcí i ostatních receptorů spřažených s těmito regulačními proteiny („G protein coupled receptors“, GPCR) (Zingg a Laporte, 2003). Oblast výzkumu týkající se oxytocinu a jeho receptorů byla v poslední době zpracována v mnoha zajímavých přehledech a ty byly shrnuty ve velmi obsáhlém přehledovém článku V. Klenerové a S. Hynie (2008), z nichž uvádím některé údaje, které se staly podkladem pro naše studium OT/OTR systému v srdci.

V naší laboratoři má studium messengerových systémů a úlohy G-proteinu dlouholetou tradici, zejména díky objevu Sixta Hynie „perzistentní stimulace aktivity adenylylcyklázy cholera toxinem, související s G proteiny“, který přispěl k celosvětovému rozvoji studia problematiky spojené s G proteiny (Sharp a Hynie, 1971). Prokázali jsme přestup oxytocinových receptorů z plazmatické membrány do jádra kardiomyocytů. Tento náš nález je v literatuře prioritní (Klenerová et al., 2011; Škopek et al., 2012).

Na rozdíl od jiných neuropeptidů je znám u oxytocinu pouze jeden typ receptoru, který však využívá různé systémy druhých messengerů (viz přehledové práce Hynie et al., 2005; Strunecká et al., 2009). GPCR se mohou vázat s různými G-proteiny, ale molekulární mechanismy pro tuto promiskuitu interakcí nejsou přesně známy. Neví se doposud s dostatečnou přesností, co určuje kdy se receptor nachází v klidovém, aktivním nebo inaktivním stavu. Někteří agonisté mohou být schopni zvolit si vazbu na receptor v určitém stavu aktivity a ovlivnit jen jednu jeho signální cestu. Jde o fenomén nazývaný „agonistou-nasměřovaný receptorový signál“.

Rovněž úloha vazby ligandů na receptory hraje důležitou úlohu výsledné odpovědi tkáně na příslušný ligand. Ligand se váže klasicky v oblasti 7mi transmembránových klíčků receptoru nebo na jeho N-konci, to jsou tzv. ortosterické ligandy. Řada laboratoří v poslední době prokázala, že vedle této klasické vazby ligandu existují i další vazebná místa,

označovaná jako alosterická, která jsou lokalizací na receptoru odlišná od ortosterických vazebných míst. Navázání ligandů na alosterické vazebné místo může mít samostatný účinek nebo může modulovat aktivitu receptoru bez přítomnosti ortosterického ligandu. Alosterické modulátory mění aktivitu receptoru jen v přítomnosti ortosterického ligandu; látka tohoto typu nemá sama o sobě žádný účinek, ale zvyšuje nebo snižuje afinitu nebo účinnost ortosterického ligandu. Objev alosterické modulace GPCR má velký význam jak pro základní výzkum, tak pro objevy nových terapeuticky použitelných látek. Ta samá látka může fungovat jako antagonist pro jednu signální cestu, zatímco pro druhou cestu jako agonista. Takto působící ligand se označuje jako „biased“ (zaujatý, upřednostňující) (viz přehledová práce Klenerová a Hynie, 2008). Tyto nové poznatky podporují cíle našeho výzkumu, kdy se zabýváme syntézou nových analogů studovaných neuropeptidů.

Klíčovou fyziologickou úlohu v řadě tkání, včetně srdce, hrají receptory spřažené s G-proteiny a jejich dysfunkce ovlivňuje širokou škálu kardiovaskulárních nemocí. Na základě všech těchto nových poznatků se naše pozornost obrátila ke studiu receptorů spřažených s G proteiny: ke studiu internalizace receptorů spřažených s G proteiny z plazmatické membrány do jádra a možnosti lokalizace GPCR na nukleární membráně i další lokalizace. V poslední době byl akceptován názor, že GPCR jsou také lokalizovány v jádře. Takto v jádru lokalizované receptory mohou regulovat rozdílné (odlišné) signální cesty a lze tak předpokládat, že biologické odpovědi zprostředkované GPCR nejsou spouštěny pouze na buněčném povrchu, ale mohou být důsledkem integrace extracelulárních a intracelulárních signálních cest.

Z literárních dat vyplývá, že jaderná lokalizace oxytocinového receptoru ve všech testovaných tkáních byla závislá na navázání ligandu, s výjimkou osteosarkomu kde je internalizace konstitutivní. Tyto nové poznatky neodpovídají původním představám o účinku ligandů na receptory plazmatické membrány a je zřejmé, že bude nutné dosavadní paradigma doplnit o nové údaje, o působení neuropeptidů přímo v jádře. Vedle půlu GPCR v plazmatické membráně je nutné počítat s dalším intracelulárním púlem GPC receptorů, které mohou být konstitutivně aktivní, mohou být aktivovány internalizovanými ligandy z extracelulárního prostoru nebo syntetizovanými v buňce. Signální cesty tak mohou být aktivovány odlišným způsobem při stejném receptoru jako je lokalizovaný na buněčném povrchu.

Kardiovaskulární systém je regulován širokým spektrem hormonů, neurotransmiterů a růstových faktorů, které vyvolávají své biologické účinky stimulací receptorů spřažených s G proteiny. V srdci již byly prokázány receptory lokalizované na jaderné membráně kardiomyocytu: angiotenzin II - typ I a II receptory, alfa1 adrenergní receptor, endotelin B

receptor, beta1 a beta3 adrenergní receptory, opioidní receptory a dnes zřejmě již i další receptory, žádná publikace však neuvádí podobnou studii s oxytocinem. Existuje řada publikací, které se zabývají mechanismem účinku těchto jaderných receptorů a rovněž možnostmi jejich podílu na vzniku kardiovaskulárních poruch (viz Tadevosyan et al., 2012).

Význam lokalizace oxytocinového receptoru v jádře v této době není jasný, je pouze formulovaná hypotéza týkající se funkce jaderných nebo intrakrinních oxytocinových receptorů. Předpokládá se, že rozsáhlé spektrum účinků oxytocinu, které jsou často i zcela protichůdné, může být způsobeno nejen typem tkáně a rozdílem lokalizace oxytocinu v plazmatické membráně, ale také lokalizací oxytocinového receptoru navázaného na G protein přímo v jádře. Tím se může podílet na transkripční aktivitě. Vedle klasické aktivace nitrobuněčné signální kaskády, by oxytocin mohl být transportován do jádra, a přímo aktivovat transkripční faktory vedoucí k expresi specifických genů (Kinsey et al., 2007).

Výsledky našich experimentů, které prokázaly přítomnost oxytocinových receptorů v srdečních síních a komorách za fyziologických podmínek a po aplikaci stresu s dynamikou jejich změn, prokázaly transport oxytocinového receptoru do jader kardiomyocytů a přispěly tak k potvrzení zařazení oxytocinu mezi kardiovaskulární hormony.

Dalšími neuropeptidy, které jsou v současném výzkumu ve středu pozornosti, je galaninergní systém, kam patří několik peptidů a receptorů; nejvíce se zatím sleduje galanin a galanin like peptid. Tyto neuropeptidy jsou velmi perspektivní pro případné terapeutické využití, zejména díky dosavadnímu nálezů tří galaninových receptorových subtypů, které využívají různé messengerové systémy. Mají velmi rozsáhlé funkce a předpokládá se také účast galaninu v regulaci kardiovaskulárního systému. V průběhu let byly publikovány práce s rozdílnými výsledky o úloze galaninu v srdci a o možném zapojení v centrální regulaci kardiovaskulárního systému, včetně zapojení ve stresové odpovědi (Xu et al., 1994; Shih et al., 1996; Sweerts et al., 1999). V současné době je pozornost zaměřena na účast galaninu v srdci při diabetu (Fang et al., 2013) a účast galanin like peptidu v kontrole příjmu potravy a obezitě (Fang et al., 2012). V přehledovém článku uvádí Fang se spolupracovníky (2013) rozsáhlý přehled studií sledujících kardiovaskulární účinky centrálně aplikovaného galaninu. Pro různorodost a často protichůdnost popsanych nálezů, nebylo možné učinit jednoznačné závěry o funkci a mechanismu účinků galaninu a je nutné pokračovat v dalším výzkumu.

Galanin působí prostřednictvím tří galaninových receptorových subtypů GalR1, GalR2 a GalR3 patřící do rodiny GPCR a pro galanin like peptid zatím specifický receptor nalezen nebyl, má však nejvyšší afinitu ke GalR2. Všechny tři subtypy se nalézají v CNS a je řada

prací, snažících se charakterizovat význam jednotlivých subtypů a vymezení jejich účinků. Bohužel zatím neexistují selektivní ligandy, což brzdí tento výzkum. V kardiovaskulárním systému nebyla dosud provedena studie zabývající se komplexním studiem galaninu, galanin like peptidu a jednotlivých subtypů galaninových receptorů v srdci za fyziologických podmínek. V této disertační práci se nám podařilo identifikovat galanin, galanin like peptid a všechny tři receptorové subtypy ve všech oddílech srdce, pomocí stanovení exprese mRNA a exprese jednotlivých proteinů. Tyto výsledky mají význam pro další studium mechanismu účinku galaninergního systému v srdci.

## **Hypofýza**

V další části se disertace zabývá studiem oxytocinového a galaninergního systému v hypofýze. Jde o složitý komplex otázek týkajících se dosud nevyřešeného propojení hypotalamu, neurohypofýzy a adenohypofýzy a zřejmě i některých periferních tkání. Není především jasné, jak se neurohormony vzájemně podílejí na regulaci/modulaci sekrece oxytocinu a vasopresinu, a adenohypofyzárních hormonů. Řada laboratoří se zabývá lokalizací a vztahem galaninu a galanin like peptidu s dalšími neurohormony, galanin like peptid byl však podle dosavadních publikací zjištěn pouze v neurohypofýze.

Souhrně lze konstatovat, že v našich studiích jsme dokumentovali expresi mRNA a expresi genů galaninu a galanin like peptidu a všech tří receptorových galaninových subtypů v adenohypofýze, intermediálním laloku i neurohypofýze. Zajímavý je výsledek exprese GalR2, který je exprimován v neurohypofýze a adenohypofýze, a jeho exprese je velmi silná v intermediálním laloku. GalR3 je exprimován slabě v neurohypofýze a adenohypofýze a poněkud silněji v intermediálním laloku. V literatuře nejsou uvedeny údaje o takovéto komplexní studii galaninergního systému v hypofýze a v jednotlivých oddílech hypofýzy. Důležitou informací našich výsledků je určení lokalizace galaninu a GalLP a jejich receptorů ve vztahu k neuronální tkáni a ve vztahu k pituicytům. Určili jsme přítomnost neuronální tkáně a pituicytů pomocí příslušných markerů, v současnosti dostupného gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP) pro detekci pituicytů a pro detekci nervové tkáně beta III tubulin. V hypofýze jsme našli přítomnost nervové tkáně v neurohypofýze, v adenohypofýze i intermediálním laloku. Pituicyty jsou exprimovány pouze v neurohypofýze, především v centrální části a v intermediálním laloku, v adenohypofýze jsme expresi pituicytů neprokázali.



## Adenohypofýza

V našich experimentech v této části disertace byl použit stejný experimentální protokol jako v srdci a řadu poznatků diskutovaných při studiu této tkáně lze uplatnit i při studiu hypofýzy. V pokusech na tkáňových řezech adenohypofýzy jsme imunohistochemicky prokázali přítomnost galaninu i galanin like peptidu a všech tří subtypů receptorů galaninu, které jsou lokalizovány na membránách buněk. Denzita signálu je u obou peptidů srovnatelná, galanin like peptid se však jeví oproti galaninu exprimován větším počtem buněk oproti opět kontroverzním údajům z literatury (Lang et al., 2007; Merchenthaler, 2010; Tortorella; Waters a Krause, 2000; Hökfelt a Tatemoto, 2010).

Řada laboratoří se rovněž zabývala určením mRNA galaninových subtypů v periferních i centrálních tkáních, ve kterých byl prokázán účinek galaninu. Waters a Krause (2000) v adenohypofýze zjistili pomocí RT-PCR analýzy silný signál GalR2, slabý GalR3 a žádný pro GalR1. To je v kontrastu s výsledky dalších laboratoří o GalR3, úloha tohoto subtypu galaninového receptoru není stále jasná. Je zřejmé, že rozdílnost hodnot mRNA GalR určených metodou Northern blot bude záviset na metodických odchylkách a zpracování vzorků. V naší laboratoři jsme zjistili v AH expresi mRNA GalR2, která mnohonásobně převyšuje expresi GalR1 a GalR3. U exprese mRNA GalR2 po aplikaci stresu však nedochází k signifikantní změně, na rozdíl od GalR1 a GalR3, kde byla relativní exprese stresem ovlivněna; stresový podnět vedl ke zvýšení exprese GalR1 a naopak u GalR3 došlo k jejímu snížení. Lze spekulovat, že tento nález je v souvislosti s odlišným transdukčním mechanismem u GalR2, kterým je systém spřažený s fosfolipázou C a ovlivněním  $IP_3$ .

Vzhledem ke kontroverzním výsledkům o lokalizaci a účincích galaninových receptorů v AH se někteří autoři domnívají, že v adenohypofýze může být přítomen zatím neidentifikovaný nový subtyp galaninového receptoru.

V posledním desetiletí byly popsány zajímavé nálezy o významné regulační úloze galaninu v adenohypofýze (AH) savců při sekreci adenohypofyzárních hormonů, ale tyto nálezy jsou dosti rozporuplné a dokonce často i protichůdné. Vysoké koncentrace galaninu byly prokázány v lidské AH i hypotalamu, a v obou tkáních byly prokázány galaninové receptory. Tyto nálezy svědčí o důležité úloze galaninového systému v regulaci uvolňování hypofyzárních hormonů (viz Bennet et al., 1991). Zatím však není znám mechanismus působení peptidů, které jsou kolokalizovány s buňkami produkujícími některý z hypofyzárních hormonů. Existuje i řada nálezů, které svědčí o účasti galaninu jako růstového faktoru, který se uplatňuje při proliferaci buněk AH a vzniku adenomů (Berger, 2005;

Tortorella et al., 2007). Touto problematikou se zabývá řada prací, které však používají rozdílné metody, i díky tomu se jejich závěry mohou lišit, jak rozebírá ve svém přehledu Liu (2002). Galanin byl nalezen kolokalizován se somatotropními, tyrotropními a laktotropními buňkami; byl popsán v kortikotropních buňkách u člověka a rovněž v kortikotropním adenomu. Nás zajímala především sekrece ACTH, který je součástí HPA osy a má důležitou úlohu při stresu.

Studium koexprese galaninu a ACTH byla jedna z prvních studií u člověka s cílem využití nových údajů v terapii adenomů, akromegalie a dalších poruch (Hsu et al., 1991). Kolokalizační studie rovněž napomáhají designování chimérních molekul pro terapeutické účely.

Dnes je již zcela evidentní, že se galanin podílí na sekreci adenohipofyzárních hormonů ACTH, GH, PRL a TSH. Není však zcela jasné, zda galanin je sekretován z galaninergních buněk v AH nebo z hypotalamických galaninergních neuronů nebo z vezikul nervových terminálů v AH. Waters a Krause (2000) našli imunoreaktivitu na všech těchto místech a předpokládají, že galaninergní působení v AH je komplexní pochod, kde galanin může mít původ v portálním systému, v galaninergních buňkách, nebo v neuronálních terminálech AH (Liu, 2002).

Pro potvrzení naší hypotézy, zda může být galaninergní systém zapojen v modulaci uvolňování adenohipofyzárních hormonů za stresu, především v sekreci ACTH, který je součástí hypotalamo-hypofýzo-adrenální osy, jsme v dalších experimentech určili v AH kolokalizaci Gal a GalLP s ACTH. Z našich výsledků vyplývá, že zatímco galanin je s ACTH kolokalizován ve velké míře, kolokalizace ACTH s galanin like peptidem je pouze ojedinělá. Tento výsledek svědčí pro možnou účast galaninu při regulaci sekrece ACTH. V souladu s našimi výsledky jsou publikace, které uvádějí, že aplikace galaninu působí zvýšení aktivace HPA osy s následným zvýšeným uvolněním CRH a ACTH, zatímco u stresu působí galanin snížení stresové odpovědi (viz Picciotto et al., 2010).

Dalším experimentem proto bylo určení exprese a kolokalizace ACTH s jednotlivými receptorovými subtypy galaninu. Výsledky získané metodou imunofluorescence ukazují na nejsilnější kolokalizaci ACTH s GalR2, byla přítomna u většiny GalR2 pozitivních buněk. GalR1 je s ACTH kolokalizován pouze ojediněle a GalR3 kolokalizuje s ACTH pouze na některých buňkách. Tyto výsledky svědčí o účasti galaninových receptorů při sekreci ACTH v adenohipofýze potkana.

Vzhledem k tomu, že byla vyslovena hypotéza, že komponenty galaninergního systému mohou sloužit jako cílové struktury pro léčebný zákrok, představuje galaninový

systém v adenohypofýze velmi aktuální téma, které se začíná intenzivně zkoumat (přehledy Rauch a Kofler, 2010; Merchenthaler, 2010).

Tradiční nazírání na neurohypofyzární peptidy jako na endokrinní hormony s periferními účinky bylo nedávno revidováno, a dnes jsou rovněž považovány za látky s funkcemi neurotransmiterů a neuromodulátorů, které mají centrální účinky (Insel et al., 1999; Russell et al., 2003). Oxytocin je syntetizován nejen v magnocelulárních buňkách hypotalamických jader a neurony dopravován do neurohypofýzy, ale je také syntetizován v parvicelulárních buňkách PVN a odtud distribuován do různých extrahypotalamických oblastí mozku, především do limbického systému a do autonomních center. Tomu také odpovídají nové nálezy ukazující na syntézu OT a VP v některých částech mozku, kde jsou také exprimovány jejich receptory (Yoshimura et al., 1993). Navíc se ukazuje, že neuropeptid OT je secernován nejen axony, ale i dendrity, a ovlivňuje okolní struktury po difuzi do blízkého okolí. Existuje tak řada struktur, především v limbické oblasti, odkud vycházejí podněty pro četné centrální účinky.

### **Hypotalamus**

V našich pokusech jsme v hypotalamických jádrech identifikovali oxytocinový receptor pomocí různých metod. Velmi zajímavá byla identifikace OTR v supraoptickém jádru pomocí chiméry oxytocinu s navázaným imunofluorescenčním kumarinovým markerem, která byla syntetizovaná v naší laboratoři. Prokázala se jako funkční, což potvrdila vazba chiméry na OTR v děloze, která byla použita jako referenční tkáň. Tento postup lze využít pro detekci oxytocinového receptoru bez použití primárních a sekundárních protilátek.

V supraoptickém jádru hypotalamu jsme dále metodou imunofluorescence označili oxytocinové receptory a sledovali změny po stresu. Po aplikaci dvou typů akutního stresu IMO a IMO+C došlo v supraoptickém jádru ke zvýšení intenzity signálu oxytocinového receptoru. U aplikovaného IMO+C byl tento efekt výraznější. Nález stejné odpovědi receptoru v supraoptickém jádru a v neurohypofýze indikuje, že se jedná o stejný typ receptoru.

### **Neurohypofýza**

Velmi nízká váha neurohypofýzy nedovoluje experimenty se stejným protokolem jako u adenohypofýzy. Z tohoto důvodu studium exprese mRNA vyžaduje odlišný postup a bylo nutné pracovat se směsnými vzorky. Pomocí metody kvantitativní real time qPCR jsme sledovali, zda se v neurohypofýze exprimuje mRNA pro galanin, mRNA galanin like peptid

a pro jednotlivé subtypy galaninových receptorů za fyziologických podmínek a po aplikaci stresu. V dalších experimentech jsme se pokusili určit lokalizaci těchto galaninergních peptidů a jejich receptorů ve vztahu k neuronům a ve vztahu k pituocytům a rovněž jejich vzájemnou kolokalizaci a kolokalizaci s oxytocinem a vasopresinem. Ani za fyziologických podmínek, ani za stresu nejsou podobné komplexní studie v literatuře dostupné.

V naší práci jsme identifikovali v NH přítomnost exprese mRNA galaninu a mRNA galanin like peptidu. Po aplikaci akutního stresu byla exprese mRNA galaninu snížena o 50% a naopak exprese mRNA GalLP byla o 50% po stresu zvýšena. Tato data svědčí o rozdílném zapojení těchto dvou neuropeptidů v odpovědi na akutní stres.

Naše výsledky o identifikaci galaninu za fyziologického stavu a za stresu jsou v souladu s některými publikovanými daty. V publikaci Ciosek a Drobnik (2013) autoři uvádí: 1) galanin má inhibiční modulační účinek na uvolňování oxytocinu z NH, zatímco v hypothalamu má účinek opačný. 2) U prodlouženého osmotického stimulu, který je v některých publikacích považovaný za stresový podnět, má galanin stimulační modulační účinek na uvolňování oxytocinu. Akutní osmotický stimulus tak blokuje oxytocinergní neurony, které jsou citlivé na působení galaninu. V neurohypofýze se tak setkávají dva regulační principy, jeden zajišťující vodní a elektrolytovou homeostázu a druhý zajišťující propojení funkcí a jejich regulací oxytocinu a vasopresinu na úrovni hypothalamu a neurohypofýzy.

Naše výsledky se zvýšenou expresí mRNA GalLP po aplikaci stresu jsou v souladu s prací Shena, který našel v pituocytech neurohypofýzy zvýšené hodnoty exprese mRNA GalLP po dehydrataci a solné náloži (Shen et al., 2001; viz Suzuki et al., 2010) a skupiny Uety, kteří našli zvýšené hodnoty exprese mRNA GalLP po aplikaci dalšího stresového podnětu endotoxinu LPS a u chronického zánětlivého stresu. Endotoxin LPS stimuluje sekreci vasopresinu a oxytocinu a aktivuje HPA osu (Ueta et al., 2004). Tyto nálezy indikují, že GalLP se podílí na sekreci neuropeptidů vasopresinu a oxytocinu.

V následujících pokusech jsme identifikovali přítomnost exprese mRNA všech tří galaninových receptorových subtypů, s nejvyšší expresí mRNA GalR2. Po aplikaci akutního stresu všechny tři subtypy galaninových receptorů GalR1, GalR2 a GalR3 reagovaly snížením exprese mRNA, nejsilnější odpověď byla u subtypu GalR1.

V dalších experimentech jsme sledovali expresi galaninu, galanin like peptidu a všech tří GalR subtypů pomocí imunofluorescence. V neurohypofýze jsme prokázali expresi obou neuropeptidů, galaninu i galanin like peptidu. Četnost buněk exprimujících galanin odpovídá četnosti buněk exprimujících galanin like peptid. Densita signálu galaninu se oproti galanin

like peptidu jeví jako vyšší. Rovněž jsme identifikovali expresi všech tří galaninových receptorových subtypů. Počet buněk, které exprimují GalR2 a GalR3 je přibližně stejný. Počet buněk exprimujících GalR1 je nižší oproti subtypům GalR2 a GalR3, ale denzita jeho signálu je vyšší.

Z našich imunohistochemických detekcí v neurohypofýze vyplývá, že je galanin i galanin like peptid kolokalizován s nervovou tkání. Dále jsme prokázali kolokalizaci galaninu a galanin like peptidu s pituicyty. Jedná se o částečnou kolokalizaci, to znamená, že se galanin, stejně jako galanin like peptid vyskytují i mimo pituicyty a nervovou tkáň. Provedli jsme řadu experimentů ve snaze zjistit vzájemné kolokalizace, jak neurohypofyzárních hormonů, tak jednotlivých komponent galaninergního systému. Z našich výsledků vyplývá, že s oxytocinem a vasopresinem je kolokalizován galanin i galanin like peptid. Oxytocin byl prokázán v kolokalizaci se subtypy galaninergního receptoru GalR2 a GalR3, na rozdíl od ojedinělé kolokalizace s GalR1. Vasopresin je nejsilněji kolokalizován s GalR2 a méně GalR3 a GalR1, kde se častěji signál nekryje.

Ukazuje se však, že naše výsledky a výsledky studií ostatních laboratoří dosud nedovolují jednoznačný závěr vysvětlující úlohu galaninergního systému v neurohypofýze a jeho účast při stresové odpovědi

## 6. ZÁVĚRY

Nové poznatky o neuropeptidech jsou důležité nejen z hlediska fyziologie, farmakologie a neurověd pro základní výzkum, ale především svým potenciálem nových perspektivních léčiv. Předkládaná disertace je koncipována jako rozšíření dosavadního výzkumu pracoviště o centrálních i periferních regulačních mechanismech neuropeptidů, především neurohormonů oxytocinu, vasopresinu a jejich analogů, nově také galaninu a nedávno objeveného galanin like peptidu, za fyziologických podmínek a po působení stresu. Detailní mechanismus anxiolytického a protistresového účinku oxytocinu a galaninu nebyl dosud objasněn, avšak jejich účast na poststresových dějích je prokázána. Nové nazírání na stres umožňuje využívat tento stav jako experimentální nástroj pro studium mozku a naopak nové poznatky umožňují hledání cílových struktur pro terapeutické využití u emočních poruch a stresu. Ukazuje se, že v současné době je nejvhodnější výzkum, který kombinuje přístup behaviorální s buněčným a molekulárním, se zaměřením na vztah mezi strukturou a funkcí mozku. Podle této hypotézy byly i koncipovány studie a experimenty této disertace.

### **Závěry plynoucí z výsledků studií prezentovaných v této disertační práci:**

1) Prokázali jsme protistresový a anxiolytický účinek galaninu po systémovém podání, který měl protrahovaný účinek i v následujícím období bez aplikace galaninu.

Pro tuto studii byly vypracovány behaviorální testy a animální model akutního stresu s převahou emoční nebo fyzické složky. Behaviorální testy i animální model stresu byly použity i v následujících studiích.

Behaviorální studie prokázaly centrální účinky tohoto peptidu.

Centrální, protistresové a anxiolytické účinky byly potvrzeny podáním antagonistů galaninu, které uvedené účinky zablokovaly.

Získané výsledky také dokázaly, že systémově aplikovaný agonista galanin a antagonist galanin M40, i námi syntetizovaný antagonist galanin peptid chiméra-galanin Y neuropeptid amid, působí na úrovni receptorů a že výsledek této interakce po určitou dobu přetrvává.

2) V této disertaci použité peptidy byly syntetizované v naší laboratoři, tj. galanin, antagonist peptid chiméra-galanin Y neuropeptid amid, oxytocin a jeho analog karbetocin a další.

Také byla syntetizována chimérická molekula oxytocinu s fluorescenčním markerem pro účely detekce oxytocinového receptoru (OTR) bez použití specifických protilátek a s cílem syntézy chimérické molekuly se schopností projít hematoencefalickou bariérou.

3) Identifikace OTR v supraoptickém jádru (SON) pomocí chiméry oxytocinu s navázaným imunofluorescenčním kumarinovým markerem, která byla syntetizovaná v naší laboratoři, se prokázala se jako funkční, což potvrdila vazba chiméry na OTR v děloze, která byla použita jako referenční tkáň.

**4)** Pro identifikaci exprese mRNA a exprese genů sledovaných peptidů jsme implementovali metodu real time qPCR a metodu imunoflorescenčního určení exprese sledovaných proteinů s kvantitativním vyhodnocením.

Vypracovali jsme metodu Western blot s nejmodernějším turbo blotovacím zařízením.

**5)** Po zařazení OT mezi kardiovaskulární hormony jsme sledovali expresi OTR a expresi mRNA OTR v srdci, účast HPA osy za použití geneticky odlišných potkanů, za normálu a za stresu. Jako první jsme provedli analýzu Gal, GalLP a GalR subtypů ve všech srdečních oddílech a popsali změny po akutním stresu.

Za unikátní výsledek považujeme průkaz transportu OTR z plazmatické membrány do jádra kardiomyocytu.

**6)** Jednou ze tkání, kde není objasněna úloha galaninu a jeho působení je hypofýza. Jako první jsme provedli komplexní studii v adenohypofýze, neurohypofýze a intermediálním laloku s identifikací exprese mRNA a exprese genů Gal, GalLP a tří subtypů GalR za fyziologických podmínek a po akutním stresu. Nalezli jsme rozdílné chování neuropeptidů v jednotlivých oblastech hypofýzy a prokázali jsme účast galaninergního systému ve stresové odpovědi.

**7)** V adenohypofýze jsme dále sledovali kolokalizaci Gal a GalLP s ACTH. Nalezli jsme kolokalizaci galaninu s ACTH, zatímco kolokalizace ACTH s galanin like peptidem je pouze ojedinelá. Určili jsme také kolokalizaci ACTH s Gal receptory. Tyto výsledky dokazují zapojení galaninergního systému v adenohypofýze při sekreci ACTH.

V neurohypofýze byly provedeny kolokalizační studie metodou dvojího imunofluorescenčního značení u neuronální tkáně, pituicytů a jednotlivých komponent Gal systému s OT a AVP.

V neurohypofýze jsme prokázali expresi Gal a GalP mRNA a také expresi všech tří receptorových subtypů a zapojení tohoto systému spolu s OT/OTR ve stresové odpovědi.

Výsledky svědčí pro komplexnost zapojení galaninergního systému ve všech oddílech hypofýzy s možnou modulací oxytocinového systému za fyziologických podmínek i za stresu.

## 7. Seznam použité literatury

Abbott N. J., L. Rönnbäck, E. Hansson. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 41–53, 2006. Review

Aguilera G., Nikodemova M., Wynn P.C., Catt K.J. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* 25: 319–29. 2004. Review.

Bartfai T., Fisone G., Langel U. Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives. *Trends. Pharmacol. Sci.* 13: 312–317, 1992.

Begley D.J. Peptides and the blood–brain barrier: the status of our understanding. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 739: 89–100, 1994.

Bennet WM, Hill SF, Ghatei MA, Bloom SR. Galanin in the normal human pituitary and brain and in pituitary adenomas. *J. Endocrinol.* 130: 463–467, 1991.

Berger A, Santic R, Hauser-Kronberger C, Schilling FH, Kogner P, Ratschek M, Gamper A, Jones N, Sperl W, Kofler B. Galanin and galanin receptors in human cancers. *Neuropeptides* 39: 353–359, 2005. Review.

Brunton P.J., Russell J.A. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nature Reviews, Neuroscience* 9: 11–25, 2008.

Cannella N., Kallupi M., Ruggeri B., Ciccocioppo R., Ubaldi M. The role of the neuropeptide S system in addiction: focus on its interaction with the CRF and hypocretin/orexin neurotransmission. *Prog. Neurobiol.* 100: 48–59, 2013. Review.

Ciosek J., Drobnik J. Galanin modulates oxytocin release from rat hypothalamo-neurohypophysial explant in vitro - the role of acute or prolonged osmotic stimulus. *Endokrynol. Pol.* 64:139–148, 2013.

Cottet M., Albizu L., Perkovska S., Jean-Alphonse F, Rahmeh R, Orcel H, Méjean C, Granier S, Mendre C, Mouillac B, Durroux T. Past, present and future of vasopressin and oxytocin receptor oligomers, prototypical GPCR models to study dimerization processes. *Current Opinion in Pharmacol.* 10: 59–66, 2010.

Crawley J.N., Robinson J.K., Langel U., Bartfai T. Galanin receptor antagonists M40 and C7 block galanin-induced feeding. *Brain Res.* 600: 268–272, 1993.

Davis M.C., Lee J., Horan W.P., Clarke A.D., McGee M.R., Green M.F., Marder S.R. Effects of single dose intranasal oxytocin on social cognition in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 147: 393–7, 2013.

Devost D., Wrzal P., Zingg H.H. Oxytocin receptor signalling. In: *Progress in Brain Research*, (Neumann ID a Landgraf, Eds), Elsevier 170: 167–176, 2008.



- Díaz-Cabiale Z., Parrado C., Vela C., Razani H., Coveñas R., Fuxe K., Narváez J.A. Role of galanin(1–15) on central cardiovascular control. *Neuropeptides* 39: 185–190, 2005.
- Díaz-Cabiale Z., Parrado C., Narváez M., Millón C., Puigcerver A., Fuxe K., Narváez J.A. Neurochemical modulation of central cardiovascular control: the integrative role of galanin. *EXS.* 102: 113–31, 2010. Review.
- Esposito P., Chandler N., Kandere K., Basu S., Jacobson S., Connolly R., Tutor D., Theoharides T.C. Corticotropin-releasing hormone and brain mast cells regulate blood-brain-barrier permeability induced by acute stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 1061–1066, 2002.
- Fang P., Yu M., Guo L., Bo P., Zhang Z., Shi M. Galanin and its receptors: a novel strategy for appetite control and obesity therapy. *Peptides* 36: 331–339, 2012. Review.
- Fang P., Yu M., Shi M., Zhang Z., Sui Y., Guo L., Bo P. Galanin peptide family as a modulating target for contribution to metabolic syndrome. *Gen. Comp. Endocrinol.* 179: 115–20, 2012. Review.
- Fang P., Sun J., Wang X., Zhang Z., Bo P., Shi M. Galanin participates in the functional regulation of the diabetic heart. *Life Sci.* 92: 628–632, 2013. Minireview.
- Fathi Z., Cunningham A.M., Iben L.G., Battaglino P.B., Ward S.A., Nichol K.A., Pine K.A., Wang J., Goldstein M.E., Iismaa T.P., Zimanyi I.A. Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 51: 49–59, 1997.
- Favaretto A.L., Ballejo G.O., Albuquerque-Araújo W.I., Gutkowska J., Antunes-Rodrigues J., McCann S.M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides* 18: 1377–1381, 1997.
- Flegel M., Flegelova Z., Malon P., Hynie S., Klenerova V. Fmoc deprotection by tert-butylamine in solution and in the synthesis of cyclic part of oxytocin-like peptides. *Proceedings of the 31st European Peptide Symposium*: 54–55, 2010.
- Ghazal P., Ciccocioppo R., Ubaldi M. Morphine dependence is associated with changes in neuropeptide S receptor expression and function in rat brain. *Peptides* 46: 6–12, 2013.
- Gomez F., de Kloet E.R., Armario A. Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. *Am. J. Physiol.* 274: R420–427, 1998.
- Gimpl G., Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81: 621–683, 2001.
- Gutkowska J., Jankowski M., Lambert Ch., Mukaddan-Daher S., Zingg H.H., McCann S.M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11704–11709, 1997.

Gutkowska J., Jankowski M., Mukaddam-Daher S., McCann S.M. Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 625–633, 2000.

Gutkowska J., Jankowski M., Mukaddam-Daher S., McCann S.M. Corticotropin-releasing hormone causes antidiuresis and antinatriuresis by stimulating vasopressin and inhibiting atrial natriuretic peptide release in male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 483–488, 2000a.

Gutkowska J., Jankowski M. Oxytocin revisited: It is also a cardiovascular hormone. *J. Amer. Soc. Hypertension* 2: 318–325, 2008.

Hökfelt T., Tatemoto K. Galanin: a multitalented neuropeptide. *EXS*, 102: 1–5, 2010. Review.

Hsu D.W., Hooi S.C., Hedley-Whyte E.T., Strauss R.M., Kaplan L.M. Coexpression of galanin and adrenocorticotrophic hormone in human pituitary and pituitary adenomas. *Am. J. Pathol.* 138: 897–909, 1991.

Hynie S., Klenerova V., Caicedo M., Samanek M. Differences in response to activation of adenylyl cyclase by various stimulants in human myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 163–164: 329–33, 1996.

Hynie S., Klenerová V. Neurobiologie posttraumatické stresové poruchy. *Psychiatrie* 8 (Suppl. 2): 32–35, 2004. Review.

Hynie S., Klenerová V., Štípek S.: Laureáti Nobelovy ceny za fyziologii nebo lékařství, a chemii za rok 2004; příležitost k ohlédnutí se za některými objevy v přenosu signálů. *Čs. Fyziol.* 53: 11–16, 2005. Review.

Hynie S., Klenerová V. Centrální regulační úloha oxytocinu. *Psychiatrie* 12: 4–10, 2008. Review.

Hynie S., Klenerová V. Neurobiologie paměti. *Čs. fyziol.* 59: 44–50, 2010.

Hynie S., Džúr-Gejdošová M., Šída P., Klenerová V. Studium neuropeptidu galaninu v neurohypofýze pomocí exprese mRNA galaninu a galaninových receptorových subtypů. *Psychiatrie* 17 (Suppl. 1): 52–53, 2013.

Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 259–84, 2005. Review.

Chrousos G.P. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 21: 833–58, 1992. Review.

Chrousos G.P., Gold P.W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA.* 267: 1244–52, 1992a. Review.

- Chrousos G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* 332: 1351–62, 1995. Review.
- Insel T.R., O'Brien D.J., Leckman J.F. Oxytocin, vasopressin, and autism: is there a connection? *Biol. Psychiatry.* 45: 145–57, 1999. Review.
- Jankowski M., Hajjar F., Al-Kawas S., Mukaddam-Daher S., Hoffman G., McCann S., Gutkowska J. Rat heart: A site of oxytocin production and action. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 14558–14563, 1998.
- Jankowski M., Danalache B., Wang D., Bhat P., Hajjar F., Marcinkiewicz M., Paquin J., McCann S.M., Gutkowska J. Oxytocin in cardiac ontogeny. *PNAS* 35: 13074–13079, 2004.
- Jurasek, M.; Flegel, M.; Skopek, P.; Flegeova, Z;; Drasar, P.; Hynie, S.; Klenerova, V. Peptide-steroids chimeras synthesis and visualization of their binding to the rat brain slices. *J. Peptide Sci.* 18 (S1): S123–S123, 2012a.
- Jurasek M., P. Skopek, M. Flegel, Z. Flegelova, P. Drasar, M. Lebl, T. Kraus, S. Hynie and V. Klenerova. Synthesis of oxytocin-steroid chimeric molecule and its visualization on the rat uterus slices. *Proceedings of 32<sup>nd</sup> European Peptide Symposium*, G. Kokotos, V. Constantinou-Kohotou, J. Matsoukas Editors, European Peptide Society, 374–375, 2012b.
- Kaczmarek L., Robertson H.A. Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 19: 1–370, 2002.
- Kaminsky O., Klenerova V., Stöhr J., Sida P., Hynie S. Differences in the behaviour of Sprague-Dawley and Lewis rats during repeated passive avoidance procedure: effect of amphetamine. *Pharmacol. Res.* 44: 117–22, 2001.
- Karagkouni A., Alevizos M., Theoharides T.C. Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 12: 947–953, 2013. Review.
- Kawasaki M., Saito J., Hashimoto H., Suzuki H., Otsubo H., Fujihara H., Ohnishi H., Nakamura T., Ueta Y. Induction of the galanin-like peptide gene expression in the posterior pituitary gland after acute osmotic stimulus in rats. *Neurosci. Lett.* 419: 125–30, 2007.
- Kiernan J. A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* 00: 8–12, 2000.
- Kinsey C.G., Bussolati G., Bosco M., Kimura T., Pizzorno M.C., Chernin M.I., Cassoni P., Novak J.F. Constitutive and ligand-induced nuclear localization of oxytocin receptor. *J. Cell. Mol. Med.* 11: 96–110, 2007.
- Klenerova V., Sida P. Changes in beta-adrenergic receptors in the neurohypophysis and intermediate lobe of rat hypophysis exposed to stress. *Physiol. Res.* 43: 289–292, 1994.

Klenerova V., Kaminsky O., Sida P., Krejci I., Hlinak Z., Hynie S. Impaired passive avoidance acquisition in Sprague-Dawley and Lewis rats after restraint and cold stress. *Behav. Brain. Res.* 36: 21–29, 2002.

Klenerova V., Jurcovicova J., Kaminsky O., Sida P., Krejci I., Hlinak Z., Hynie S. Combined restraint and cold stress in rats: effects on memory processing in passive avoidance task and on plasma levels of ACTH and corticosterone. *Behav. Brain. Res.* 142: 143–149, 2003.

Klenerová V., Kaminský O., Sída P., Hlinák Z., Krejčí I., Hynie S. Impaired passive avoidance acquisition in Wistar rats after restraint/cold stress and/or stresscopin administration. *Gen. Physiol. Biophys.* 22: 115–20, 2003a.

Klenerová V., Trnečková L., Hynie S. Expres ranných genů c-fos a Arc v závislosti na délce trvání akutního stresu. *Psychiatrie* 9, (Suppl. 2): 52–53, 2005.

Klenerova V., Krejci I., Sida P., Hlinak Z., Hynie S. Timing of stress and testing influence the long-lasting behavioral performance in rats. *Neurosci. Lett.* 410: 100–104, 2006.

Klenerová V., Hynie S. Strukturálně funkční změny u stresu a poruch chování. *Psychiatrie* 10: 17–22, 2006a. Review.

Klenerova V., Sida P., Krejci I., Hlinak Z., Hynie S. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 58: 83–94, 2007.

Klenerová V., Hynie S. Některé novější poznatky o signalizaci oxytocinovým receptorem. *Čs. fyziol.* 57: 76–82, 2008. Review.

Klenerova V., Krejci I., Sida P., Hlinak Z., Hynie S. Modulatory effects of oxytocin and carbetocin on stress-induced changes in rat behavior in the open-field. *J. Physiol. Pharmacol.* 60: 57–62, 2009a.

Klenerova V., Krejci I., Sida P., Hlinak Z., Hynie S. Oxytocin and carbetocin effects on spontaneous behavior of male rats: modulation by oxytocin receptor antagonists. *Neuroendocrinol. Lett.* 30: 335–342, 2009b.

Klenerova V., Krejci I., Sida P., Hlinak Z., Hynie S. Oxytocin and carbetocin ameliorating effects on restraint stress-induced short- and long-term behavioral changes in rats. *Neuroendocrinol. Lett.* 31: 622–630, 2010.

Klenerova V., Chottova-Dvorakova M., Skopek P., Sida P., Mistrova E., Slavikova J., Hynie S. Expression of heart oxytocin receptor and its mRNA in two rat strains with different activity of HPA axis. *Neuroendocrinol. Lett.* 32: 805–810, 2011.

Klenerova V., Flegel M., Skopek P., Sida P., Hynie S. Galanin modulating effect on restraint stress-induced short- and long-term behavioral changes in Wistar rats. *Neurosci. Letters* 502: 147–151, 2011a.

- de Kloet E.R., Joëls M., Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 463–475, 2005. Review.
- Kumsta R., Chen F.S., Pape H.C., Heinrichs M. Neuropeptide S receptor gene is associated with cortisol responses to social stress in humans. *Biol. Psychol.* 93: 304–307, 2013.
- Lang R., Gundlach A.L., Kofler B. The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol. Ther.* 115: 177–207, 2007.
- Lang R., Kofler B. The galanin peptide family in inflammation. *Neuropeptides* 45: 1–8, 2011.
- Lawrence C. a G. S. Fraley. Galanin-like peptide (GALP) is a hypothalamic regulator of energy homeostasis and reproduction. *Front. Neuroendocrinol.* 32: 1–9, 2011. Review.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25: 402–408, 2001.
- Liu S. Galanin immunoreactive innervations of the anterior pituitary in the monkey and the dog. *Brain Res.* 924: 46–55, 2002.
- MacDonald K, Feifel D. Dramatic improvement in sexual function induced by intranasal oxytocin. *J. Sex. Med.* 9: 1407–10, 2012.
- McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840: 33–44, 1998. Review.
- McEwen BS. Mood disorders and allostatic load. *Biol. Psychiatry* 54: 200–7, 2003.
- Merchenthaler I. Galanin and the neuroendocrine axes. *EXS*, 102: 71–85, 2010. Review.
- Moncek F., Aguilera G., Jezova D. Insufficient activation of adrenocortical but not adrenomedullary hormones during stress in rats subjected to repeated immune challenge. *J. Neuroimmunol.* 142: 86–92, 2003.
- Mukaddam-Daher S., Yin Y.L., Roy J., Gutkowska J., Cardinal R. Negative Inotropic and Chronotropic Effects of Oxytocin. *Hypertension* 38: 292–296, 2001.
- Neumann ID, Torner L, Wigger A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience* 95: 567–75, 2000.
- Ohtaki T, Kumano S, Ishibashi Y, Ogi K, Matsui H, Harada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M: Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 274: 37041–37045, 1999.

- Olf M., Frijling J.L., Kubzansky L.D., Bradley B., Ellenbogen M.A., Cardoso C., Bartz J.A., Yee J.R., van Zuiden M. The role of oxytocin in social bonding, stress regulation and mental health: An update on the moderating effects of context and interindividual differences. *Psychoneuroendocrinology*. In press. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.06.019, 2013.
- Patterson Z.R., Abizaid A. Stress induced obesity: lessons from rodent models of stress. *Front. Neurosci.* 7: 130, 2013.
- Petersson M. Cardiovascular effects of oxytocin. *Prog Brain Res* 139: 281–288, 2002.
- Petersson M., Uvnäs-Moberg K. Effects of acute stressor on blood pressure and heart rate in rats pretreated with intracerebroventricular oxytocin injections. *Psychoneuroendocrinology* 32: 959–965, 2007.
- Petterson Z.R. and Abizaid A. Stress induced obesity: lesson from rodent model of stress. *Front Neurosci* 7: 1 – 20, 2013.
- Picciotto M.R., Brabant C., Einstein E.B., Kamens H.M., Neugebauer N.M. Effects of galanin on monoaminergic systems and HPA axis: Potential mechanisms underlying the effects of galanin on addiction- and stress-related behaviors. *Brain Res.* 1314: 206–218, 2010.
- van den Pol A. N. Neuropeptide Transmission in Brain Circuits. *Neuron* 76: 198–115, 2012. Review.
- Potter E.K., Smith-White M.A. Galanin modulates cholinergic neurotransmission in the heart. *Neuropeptides* 39: 345–348, 2005.
- Pyner S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: Implications for cardiovascular regulation. *J Chemical Neuroanatomy* 38: 197–208, 2009.
- Re R. N., J. L. Cook The Basis of an Intracrine Pharmacology. *J. Clin. Pharmacol.* 48: 344–350, 2008.
- Rauch I. a Kofler B. *EXS.* 102: 223–241, 2010
- Reversi A., Rimoldi V., Marrocco T., Cassoni P., Bussolati G., Parenti M., Chini B. The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a "biased agonist" mechanism. *J. Biol. Chem.* 280: 16311–8, 2005.
- Russell J.A., Leng G., Douglas A.J. The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy. *Front. Neuroendocrinol.* 24: 27–61, 2003. Review.
- Sabban E.L, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends. Neurosci.* 24: 91–8, 2001. Review.

- Saito M., Ozaki Y., Kawasaki M., Ohnishi H., Okimoto N., Nakamura T., Ueta Y. Induction of galanin-like peptide gene expression in the arcuate nucleus of the rat after acute but not chronic inflammatory stress. *Molecular Brain Research* 133: 233–241, 2005.
- Samson W.K., Schell D.A. Oxytocin and the anterior pituitary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 395: 355–364, 1995.
- Sharp G.W., Hynie S. Stimulation of intestinal adenyl cyclase by cholera toxin. *Nature*. 229: 266–269, 1971.
- Shen J., Larm J.A., Gundlach A.L. Galanin-like peptide mRNA in neural lobe of rat pituitary. Increased expression after osmotic stimulation suggests a role for galanin-like peptide in neuron-glia interactions and/or neurosecretion. *Neuroendocrinology*. 73: 2–11, 2001.
- Shih C.D., Chan S.H., Chan J.Y. Participation of endogenous galanin in the suppression of baroreceptor reflex response by locus coeruleus in the rat. *Brain Res.* 721: 76–82, 1996.
- Skopek P., Hynie S., Klenerova V. Immunohistochemical detection of galanin receptor subtypes in adenohypophysis of Wistar rats; effects of acute restraint stress. Program No. 394.08. 2011 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2011. Online.
- Skopek P., Hynie S., Chottova-Dvorakova M., Sida P., Slavikova J., Mistrova E., Klenerova V. Effects of acute stressors on the expression of oxytocin receptor mRNA in hearts of rats with different activity of HPA axis. *Neuroendocrinology Letters* 33: 124–132, 2012.
- Škopek P., Hynie S., Šída P., Klenerová V. Galanin a jeho receptorové subtypy v neurohypofýze za fyziologických podmínek a za stresu pomocí fluorescenčního zobrazení. *Psychiatrie* 17 (Suppl. 1): 53, 2013.
- Smith K.E., Walker M.W., Artymyshyn R., Bard J., Borowsky B., Tamm J.A., Yao W.J., Vaysse P.J., Branchek T.A., Gerald C., Jones K.A. Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 273: 23321–6, 1998.
- Soares T.J., Coimbra T.M., Martins A.R., Pereira A.G., Carnio E.C., Branco L.G., Albuquerque-Araujo W.I., de Nucci G., Favaretto A.L., Gutkowska J., McCann S.M., Antunes-Rodrigues J. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 278–83, 1999.
- Steckler T. The molecular neurobiology of stress-evidence from genetic and epigenetic models. *Behav. Pharmacol.* 12: 381–427, 2001. Review.

- Sternberg E.M., Glowa J.R., Smith M.A., Calogero A.E., Listwak S.J., Aksentijevich S., Chrousos G.P., Wilder R.L., Gold P.W. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Res* 570: 54–60, 1992.
- Strunecka A., Hynie S., Klenerova V. Role of oxytocin/oxytocin receptor system in regulation of cell growth and neoplastic processes. *Folia Biologica* 55: 159–165, 2009.
- Sweerts B.W., Jarrott B., Lawrence A.J. Expression of preprogalanin mRNA following acute and chronic restraint stress in brains of normotensive and hypertensive rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 69: 113–123, 1999.
- Suzuki H., Onaka T., Dayanithi G., Ueta Y. Pathophysiological roles of galanin-like peptide in the hypothalamus and posterior pituitary gland. *Pathophysiology* 17: 135–140, 2010. Review.
- Tadevosyan A., Vaniotis G., Allen B.G., Hébert T.E., Nattel S. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *J Physiol* 590: 1313–1330, 2012.
- Tatemoto K., Rökaeus A., Jörnvall H., McDonald TJ., Mutt V. Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett.* 164: 124–128, 1983.
- Tendis S., Klingberg F., Schaecker W. Arginine-vasopressin and lysine-vasopressin have different effects on spontaneous behaviour of rats. *Biomed. Biochim. Acta* 46: 719–725, 1987.
- Terrillon S., Durroux T., Mouillac B., Breit A., Ayoub M.A., Taulan M., Jockers R., Barberis C., Bouvier M. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* 17: 677–691, 2003.
- Tortorella C., Neri G., Nussdorfer G.G. Galanin in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int J Mol Med* 19: 639–647, 2007.
- Trneckova L., Hynie S., Sída P., Hlinak Z., Krejci I., Klenerova V. Effects of stress and of amphetamine on passive avoidance conditioning in rats. *Gen. Physiol. Biophys.* 24: 129–142, 2005.
- Trneckova L., Hynie S., Klenerova V., Armario A. The effect of acute stressors and rat strain on the genetic expression in the brain. *Acta Neurobiol. Exp.* 65: 95–96, 2005a.
- Trneckova L., Armario A., Hynie S., Sida P., Klenerova V. Differences in the brain expression of c-fos mRNA after restraint stress in Lewis compared to Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 1077: 7–15, 2006.
- Ueta Y., Ozaki Y., Saito J. Novel G-protein coupled receptor ligands and neurohypophysial hormones. *J. Neuroendocrinol.* 16: 378–82. 2004. Review.



- Uvnas-Moberg K., Ahlenius A.S., Hillegaard V., Alster P. High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49: 101–106, 1994.
- Uvnas M.K. Physiological and endocrine effects of social contact. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 807: 146–163, 1997.
- Uvnas M.K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology* 23: 819–835, 1998.
- Waters S.M., Krause J.E. Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 95: 265–271, 2000.
- Webling K.E., Runesson J., Bartfai T., Langel U. Galanin receptors and ligands. *Front. Endocrinol.* 3: 1–14, 2012. Review.
- Windle R.J., Shanks S.L., Lightman S.L., Ingram C.D. Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 138: 2829–2834, 1997.
- Windle R.J., Wood S.A., Lightman S.L., Ingram C.D. The pulsatile characteristic of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 139: 4044–4052, 1998.
- Wsol A., Cudnoch-Jedrzejewska A., Szczepanska-Sadowska E., Kowalewski S., Dobruch J. Central oxytocin modulation of acute stress-induced cardiovascular response after myocardial response after myocardial infarction in the rat. *Stress* 12: 517–525, 2009.
- Wudarczyk O.A., Earp B.D., Guastella A., Savulescu J. Could intranasal oxytocin be used to enhance relationships? Research imperatives, clinical policy, and ethical considerations. *Curr. Opin. Psychiatry* 26: 474–84, 2013.
- Xu Y., Johansson O., Rökaeus A. Distribution and chromatographic analysis of galanin immunoreactivity in the heart. *Peptides* 16: 73–79, 1995.
- Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O, Tohyama M. Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology* 133: 1239–46, 1993.
- Zingg H.H., Laporte S.A. The oxytocin receptor. *Trends in Endocrinol Metab* 14: 222–227, 2003. Review.