

Univerzita Karlova v Praze

1.lékařská fakulta



Autoreferát disertační práce

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

Mgr. Petr Škopek

2013

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: **Farmakologie a toxikologie**

Předseda oborové rady: **Doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.**

Školící pracoviště: **Laboratoř neurofarmakologie ÚLBLD, 1. LF UK a VFN**
Albertov 4, 128 00 Praha 2

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

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

Oponenti:

RNDr. Ludmila Okruhlicová, CSc.

Vedoucí Oddelenie histochemie a elektrónovej mikroskopie
Ústav pre výskum srdca SAV
Bratislava, SR

Prof. MUDr. Jaroslava Dušková, CSc., FIAC

Ústav patologie 1. LF UK a VFN

Autoreferát byl odeslán dne: 15.8.2013

Obhajoba disertační práce se koná dne:

18. září 2013 ve 14.30 v seminární místnosti (Veranda)
Farmakologického ústavu 1. LF UK v Praze
1. patro Purkyňova ústavu, Albertov 4, 128 00 Praha 2

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

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 dizertace, za jeho podporu, pomoc a podněty při přípravě práce i po celou dobu mého studia.

Rád bych poděkoval přednostovi ÚLBD 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.

OBSAH

OBSAH	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
SHRNUTÍ/ABSTRACT	6
1. ÚVOD	8
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	12
3. MATERIÁL A METODIKA	12
4. VÝSLEDKY	14
4. 1. Behaviorální studie	14
4. 2. Neuropeptidy v srdci	15
4. 3. Neuropeptidy v hypofýze	26
4. 4. Neuropeptidy v adenohypofýze	28
4. 5. Neuropeptidy v neurohypofýze	34
4. 6. Hypothalamus	39
5. DISKUZE	40
6. ZÁVĚRY	45
7. POUŽITÁ LITERATURA	47
Seznam publikací autora	50

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A488	Alexa Fluor 488
A546	Alexa Fluor 546
A633	Alexa Fluor 633
AC	Adenylylcykláza
AH	Adenohypofýza
ANP	Atriální natriuretický peptid
ATP	Adenosintrifosfát
AVP	Arginin vasopresin
BSA	Albumin z hovězího séra
BNP	Mozkový natriuretický peptid
CMD	Distance ve vnitřním segmentu
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diaminidno-2-fenylindol
DTT	Dithitritol
EPM	Vyvýšené křížové bludiště
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein = Gliální marker
GPCR	Receptory spřažené s G-proteiny
i.c.v.	Intracerebroventrikulární aplikace
IMO	Imobilizační stres
IMO+C	Imobilizační stres kombinovaný s chladovým stresem
LE	Kmen potkana Lewis
OF	Test otevřeného pole
OT	Oxytocin
OTR	Oxytocinový receptor
PBS	Fosfátový pufr s NaCl
PFA	Paraformaldehyd
PP	Primární protilátka
S-D	Kmen potkana Sprague-Dawley
SON	Supraoptické jádro
TMD	Celková vzdálenost pohybu
TTM	Celkový čas pohybu

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 použili 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 adenohypofýze 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.

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.

1. ÚVOD

V posledních desetiletích stoupl zájem o **studium neuropeptidů**, u nichž byly prokázány jak periferní tak centrální účinky. Dlouhodobě se zabýváme studiem neuroendokrinních regulací včetně účasti neuropeptidů v normálu a za stresu, 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 dlouhodobé behaviorální účinky. Behaviorální studie umožňují určit, zda sledovaný neuropeptid působí v CNS, zda proniká mozkomíšní bariérou po systémové aplikaci, zda má protistresový a anxiolytický účinek. Tyto nové poznatky umožňují hledání cílových struktur pro terapeutické a preventivní zákroky. Ukazuje se, že nejvhodnější výzkum je ten, který kombinuje přístup behaviorální s buněčným a molekulárním, se zaměřením na vztah mezi strukturou a funkcí mozku. Naše pracoviště se dlouhodobě zabývá studiem mechanismu účinku neurohormonů oxytocinu a vasopresinu a dalších peptidů, a to jak v CNS, tak v některých periferních tkáních (Hynie a Klenerová, 2010; Klenerova et al., 2011).

Nejnověji byl OT označen také jako **kardiovaskulární hormon** (Gutkowska et al., 2000), ale nebyly charakterizovány jeho receptory a jejich možná účast na stresové odpovědi. Sledovali jsme expresi OR receptorů v myokardu metodou exprese mRNA a metodou exprese receptorového proteinu, za fyziologických podmínek a za stresu.

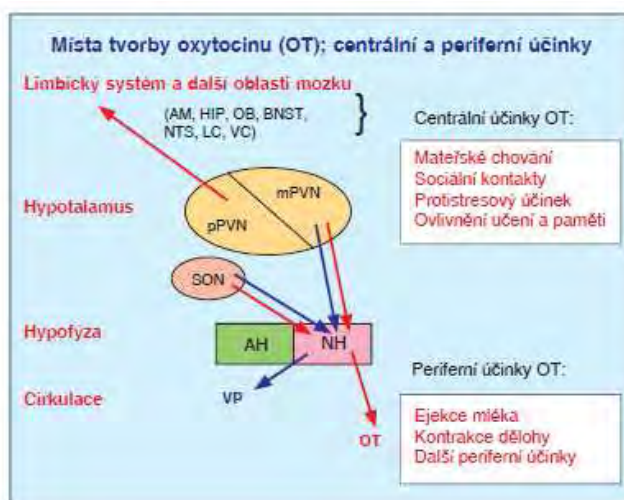
Behaviorální studie poskytují informaci o centrálním působení testovaných látek. Využití antagonistů poskytuje důležitou informaci o zapojení příslušných receptorů testovaného peptidu. V našem výzkumu jsme zjistili, že karbetocin a nízké dávky OT vykazují protistresové a anxiolytické účinky, a to i při parenterální aplikaci uskutečněné až po proběhlém stresu, které přetrvávají i bez další aplikace stresu a těchto peptidů. K ověření těchto behaviorálních účinků jsme využili antagonisty Ant99 a v naší laboratoři syntetizovaného antagonisty AntFL (Klenerová et al., 2009a; 2009b; 2010).

Stres se považuje za porušenou homeostázu organismu (Chrousos, 1992). Na stresu se podílí sympatoadrenální systém (Sabban a Květnanský, 2001) a hypotalamo-hypofýzo-adrenální systém (HPA osa). Porucha těchto regulačních systémů se uplatňuje při vzniku celé řady stresem navozených nemocí (McEven, 1998; Petterson a Abizaid, 2013). V naší laboratoři byl vypracován dobře definovaný animální model akutního stresu s převahou emocionální nebo fyzické složky účinku (Klenerová et al.,

2002; Klenerová et al., 2007). Náš výzkum je zaměřen na nalezení takových neuro-peptidů, které po podání po proběhlém stresu vrátí deteriorační účinky stresu k normálu.

Neuropeptidy mohou působit v CNS jako neurotransmitery nebo neuromodulátory, některé mohou být uvolněny do krve, kde pak působí jako hormony. Receptory neuropeptidů jsou spřažené s G proteiny (GPCR) a představují největší rodinu membránových receptorů, které jsou zodpovědné za přenos signálů. Tyto receptory hrají klíčovou fyziologickou úlohu; při jejich dysfunkci dochází k mnoha nemocem. Tyto receptory tvoří cílové místo pro přes 50 % v současné době terapeuticky používaných látek.

Studium neuropeptidů a jejich analogů bylo umožněno jejich syntézou v naší laboratoři, které by nebylo jinak možné pro finanční náročnost. Vycházíme z výsledků naší laboratoře o behaviorálních účincích OT a karbetocinu a dosavadní výzkum jsme rozšířili o studium galaninu, galanin like peptidu a jejich receptorů (Klenerová et al., 2011).



Obr. 1

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 různých doménách plazmatické membrány (viz Klenerová a Hynie, 2008; Strunecká et al., 2009), ale především i diverzitou signálních cest. Hlavní signální kaskádou je cesta využívající $G_{q/11}$ protein vedoucí ke stimulaci fosfolipázy C (PLC). OTR je schopen aktivovat další signální cesty prostřednictvím různých G-proteinů.

Neurohypofyzární nonapeptid **oxytocin** (OT) je znám především pro periferní účinek, kdy studium centrálních účinků neuropeptidů je zpomalováno skutečností, že

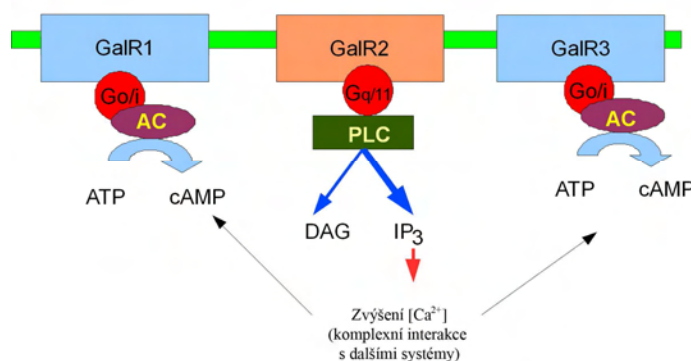
peptidy pronikají mozkomíšní bariérou do CNS jen omezeně. OT se uplatňuje jako neurotransmitter a neuromodulátor v procesu učení, paměti, sociálního chování, vytváření partnerských vztahů, mateřského chování, stresu aj. (viz Hynie a Klenerová, 2008). OT je vytvářen několika různými typy neuronů. Magnocelulární neurony v paraventriculárním jádře (mPVN) a neurony supraoptického jádra (SON) syntetizují OT se projikují do neurohypofýzy (NH), odkud je OT uvolňován do cirkulace. Kromě toho existuje rozsáhlá oxytocinergní nervová síť, která se projikuje z parvicelulárních neuronů PVN (pPVN) do různých oblastí mozku (viz Hynie a Klenerová, 2008) viz Obr 2.

Nejnověji byl OT 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. 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.

Z dalších sledovaných peptidů, které se uplatňují v udržení elektrolytové a volumové homeostázy, jsou natriuretické peptidy. 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. V naší práci jsme sledovali ANP, který je tvořen v srdečních síních a má velmi úzký vztah k OT při zajištění kardiovaskulární homeostázy. Cirkulující OT uvolněný z NF se váže na jeho receptory v pravé srdeční síni a stimuluje další uvolnění ANP z atriálních kardiomyocytů (Gutkowska et al., 1997). OT v odpovědi na stres má protistresové účinky a lze předpokládat společný mechanismus s ANP po působení stresu.

Neuropeptid **galanin** (Gal) má rozsáhlé funkce, díky tomu je často označován jako „multitalentový peptid“. Z dalších galaninergních peptidů sledujeme i nově nalezený galanin like peptid (GalLP). 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 i u řady patologických stavů (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. Působí prostřednictvím zatím známých třech subtypů galaninového receptoru GalR1, GalR2 a GalR3 (Obr. 2).



Obr. 2. Schéma galaninových receptorů a mechanismů transdukce signálu

Galaninové receptory (GalR) jsou spřažené s různými G-proteiny. GalR1 a GalR3 aktivací G_{i/o} inhibují aktivitu adenylylcyklázy a GalR2 spojený s G_{q/11} aktivuje fosfolipázu C (Tortorella et al., 2007). Rozdílnou distribucí a denzitou GalR v různých oblastech a aktivací rozdílných signálních soustav lze vysvětlit širokou škálu účinků Gal.

Řada prací popisuje interakci Gal s funkcí hypotalamo-neurohypofyzárního systému a možný modulační účinek na funkci OT. Dosud však nebyla prokázána jednoznačná přítomnost GalR v AH a NF za fyziologických podmínek. Nejsou ani jednoznačné údaje o Gal systému po aktivaci HPA osy stresem. Z dalších periferních tkání byl popsán kardiovaskulární účinek Gal v srdci (Diaz-Cabiale et al., 2005; Diaz-Cabiale et al., 2010). Nebyly však dosud publikovány žádné údaje o účasti Gal systému na regulaci/modulaci přímo v srdci a ani v jednotlivých srdečních oddílech.

Dalším intenzivně sledovaným neuropeptidem je v r. 1999 nově objevený peptid **galanin like peptid** (GalLP) (Ohtaki et al., 1999). Na rozdíl od distribuce Gal, který byl identifikován ve většině oblastí CNS a ve většině hypotalamických jádrech, GalLP byl popsán v neuronech nc. arcuatus a v pituicytech NH (Lawrence a Fraley, 2011; Saito et al., 2005;). Zatím nebyl nalezen jeho specifický receptor a ve vztahu ke GalR existuje řada kontroverzních nálezů. Předpokládá se jeho účast na stresové odpovědi.

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 neuropeptidů oxytocinu a galaninu.

Předpokládáme, že po systémové aplikaci neuropeptidu se jeho část dostává do mozku a cílem této dizertace je zjištění, zda aplikovaný neuropeptid galanin má centrální účinky.

Pokud předpokládáme, že centrální účinek galaninu je zprostředkován vazbou na galaninergní receptory v mozku, je cílem průkaz pomoci systémové aplikace antagonistů galaninu s následným antagonizováním jeho centrálních účinků.

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 potkani kmene Sprague-Dawley a Lewis s odlišnou aktivitou HPA osy ovlivní konečnou odpověď oxytocinového systému v srdci na stres.

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

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 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.

Dalším cílem pro splnění vytýčených úkolů je syntéza testovaných peptidů a jejich antagonistů a rovněž najít látky pronikající snadněji mozkomíšní bariérou. Řešením je syntéza chimérické molekuly oxytocinu s fluorescenčním markerem.

3. MATERIÁL A METODIKA

V této disertaci jsme sledovali expresi neuropeptidů a jejich receptorů metodou imunofluorescence a expresi mRNA sledovaných genů metodu kvantitativního real time qPCR. Dále byly prováděny behaviorální testy. Všechny experimenty proběhly v laboratořích neurofarmakologie ÚLBD 1. LF UK v Praze.

Materiál

Arginin-vasopresin, oxytocin (OT), carbetocin (CT, dlouhodobě působící analog OT), galanin (Gal), galanin antagonist M40, amide (desGly-NH₂-d(CH₂)₅[D-Tyr²,Thr⁴] OVT) (AntFL) neuropeptid S, chiméra OT s imunofluorescenčním markerem: syntetizoval M. Flegel z naší laboratoře. Diazepam byl z Biotica (SR), Lysin-vasopresin (LVP), desmopresin (DDAVP), atosiban (ATO) Polypeptide Labs (ČR), OT receptor antagonist: nonpeptide drug L-368899 (Ant99) (Tocris Bioscience, USA). Dále byly použity běžně komerčně dostupné chemikálie, protilátky a kity.

Pokusná zvířata, odběr vzorků, aplikace stresu, behaviorální testy

Použili jsme dospělé samce **potkanů** kmene Wistar (Velaz, ČR), Sprague Dawley a Lewis (Charles River Laboratories, Sulzfield, Německo) se změnou aktivitou HPA osy, n = 8-10. Zacházení se zvířaty bylo v souladu s právními předpisy práce se zvířaty.

Potkani byli vystaveni dvěma různým typům **imobilizačního (restraint) stresu** s převahou emoční (IMO) nebo fyzické složky (IMO+C) (Klenerova et al., 2006).

Z pokusného zvířete byl odebrán mozek, hypofýza a srdce, které byly rozděleny na jednotlivé oddíly. Další zpracování se liší podle dále použité metody, pro RT PCR zmražení na -80 °C a pro imunohistochemické zpracování fixace v paraformaldehydu. Pro **imunofluorescenční zpracování** byly nakrájeny tkáňové řezy na kryostatu Leica CM1850 (Leica Microsystems, Germany) a dále zpracovány standardním způsobem; pro určení jednotlivých proteinů byly použity komerční specifické primární a sekundární protilátky, za kontroly specificity protilátek pomocí metody Western Blot a dalšími testy (transfekce, calcium imaging).

K **elektroforetickému dělení** vzorku proteinů byly použity komerčně dodávané gely Mini-PROTEAN TGX 4-20% (Biorad, USA). K blotování používáme Trans-Blot Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Packs (Biorad, USA); blotování probíhá na přístroji Trans-Blot Turbo (Biorad, USA). Ke **kvantifikaci** používáme komponentu Gels programu ImageJ (freeware dostupné na <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Metoda kvantitativní real-time qPCR byla použita pro určení exprese mRNA jednotlivých neuropeptidů a jejich receptorů. Celková RNA byla izolována pomocí TRI Reagentu, k reverzní transkripci byl použit Superscript III Reverse Transcriptase. Jednořetězcová cDNA byla syntetizována ze 4 µg celkové RNA. Pro detekci vybraného úseku cDNA jsme použili námi navržené primery a SYBR Green Supermix PCR kit. Real time RT-qPCR reakce byla provedena na přístroji CFX96 Real-Time System firmy

Biorad (USA). Kvantifikaci dat jsme provedli softwarem Optical System Software (Biorad, USA). Stanovili jsme mRNA OTR vztahem její C_T hodnoty k C_T hodnotě referenčního genu pro β -aktin. Relativní exprese byla spočítána použitím metody $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak a Schmittgen 2001). Exprese genu pro β -aktin byla využita pro normalizaci rozdílů ve vstupních množstvích cDNA pro testovaný gen. **Statistická významnost** byla počítána jednocestnou ANOVA pro signifikanci $p < 0,05$.

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. Byly měřeny následující parametry: celková distance pohybu (TMD), celkový čas pohybu (TTM), distance ve vnitřním segmentu (CMD), a byl vypočten parametr CMD/TMD jako procento TMD. Behaviorální parametry byly zaznamenávány a vyhodnocovány automatickým video-monitorovacím systémem (AnyMaze, USA). **Statistické vyhodnocení** naměřených dat byla použita jednocestná ANOVA s následujícími testy pro zjištění významnosti rozdílů. Jako signifikantní jsou považovány rozdíly s $p < 0,05$.

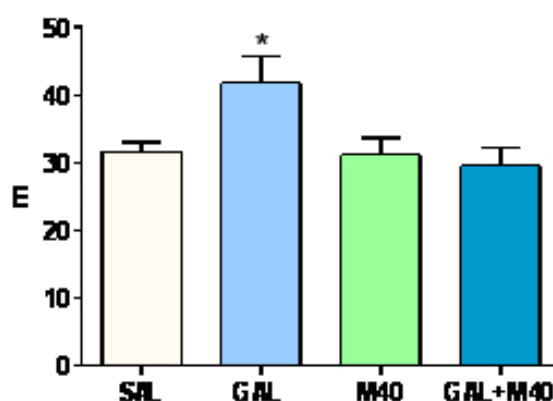
4. VÝSLEDKY

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. 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 hematoencefalickou bariérou (BBB) po systémové aplikaci, zda má protistresový účinek a zda má anxiolytický účinek.

4. 1. Behaviorální studie

Testovali jsme behaviorální účinek neuropeptidu, galaninu. Tento neuropeptid má rozsáhlé fyziologické účinky, ale jeho behaviorální účinky po systémové aplikaci nebyly dosud v literatuře prokázány. V experimentálním protokolu jsme vyšly z našich předchozích pokusů, které jsou uvedeny v úvodní a metodické kapitole.

V prvním experimentu galanin v dávce 0,3 mg zvýšil lokomoční chování, měřené jako celkovou délku pohybu (TMD) a rychlost pohybu, 1 hodinu po i.p. aplikaci. Jako průkaz specifity odpovědi jsme použili peptidového antagonistu M40, který snížil oba registrované lokomoční parametry na kontrolní hodnoty. Tento náález 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 bez další aplikace galaninu i antagonisty (Obr. 3).



Obr. 3. Účinek galaninu a jeho antagonisty M40 na TMD, měřeno v OF

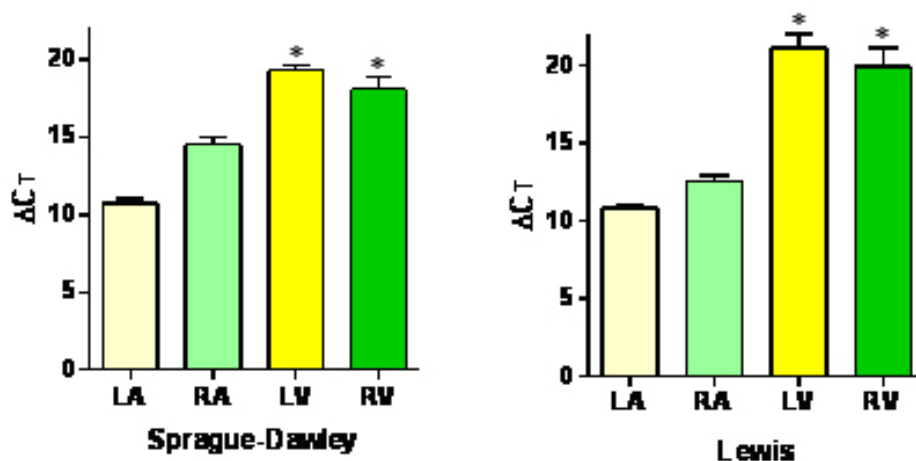
Data na Obr. 3 byla analyzována jednocestnou ANOVA s následným Student-Newman-Keuls testem pro více srovnání. Statistická analýza vykazala signifikantní účinek experimentálních podmínek na TMD ($F= 3.96$, $p<0.01$), rychlost pohybu ($F= 10.23$, $p<0.0001$). Galanin v dávce 0.3 mg zvyšuje TMD i rychlost pohybu ve srovnání s kontrolami, s antagonistou 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.

4. 2. Neuropeptidy v srdci

4.2.1. Oxytocinový systém

Expresa mRNA oxytocinového receptoru byla stanovena za fyziologických podmínek v srdečních oddílech, levé (LA, LS) a pravé síni (RA, PS), a levé (LV, LK) a

pravé komoře (RV, PK), u kmenů potkana Sprague Dawley (SD) a Lewis (LE). Tyto dva kmeny se vyznačují odlišnou aktivitou HPA osy - potkani kmene Lewis mají tuto aktivitu HPA sniženou. Experimenty byly provedeny u skupin potkanů $n = 6$.

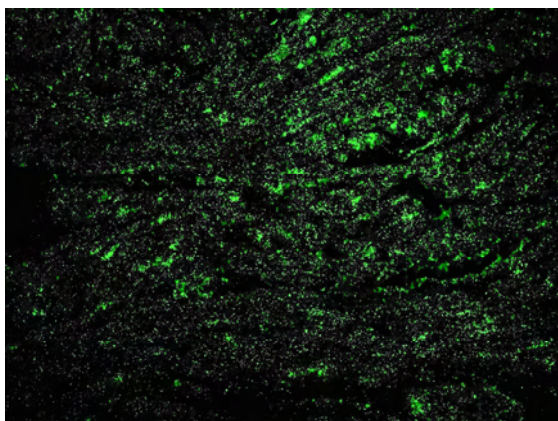


Obr. 4. Porovnání hodnot Δ CT mRNA OTR v srdečních oddílech u kmenů Sprague Dawley a Lewis za fyziologických podmínek. Signifikantní hodnoty u obou kmenů vs síně.

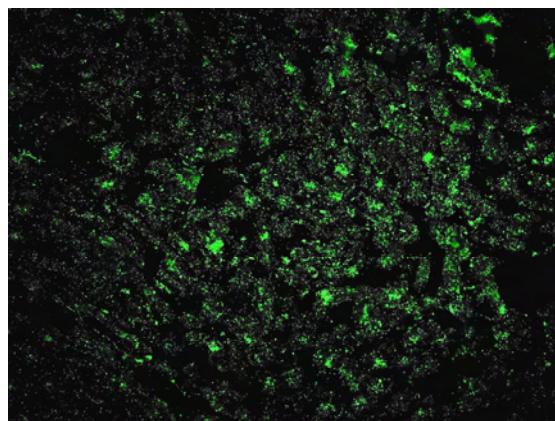
Poznámka: Nižší hodnoty Δ CT reprezentují vyšší expresi OTR.

V síních i komorách jsme zjistili rozdíly v prahovém cyklu (threshold cycle = Δ CT) mezi cílovým a referenčním genem. Na Obr. 4 jsou znázorněny hodnoty pro Δ CT mRNA OTR a β -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 Δ CT v grafu značí vyšší expresi mRNA).

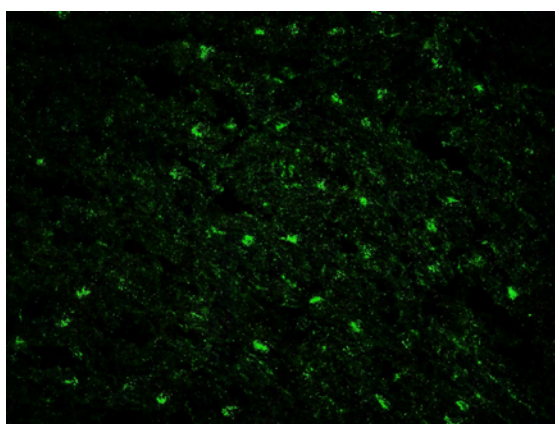
Imunohistochemická detekce OTR v srdci za fyziologických podmínek prokázala jeho expresi ve všech srdečních oddílech, jak je uvedeno na níže uvedené sérii obrázků (Obr. 5). Přítomnost OTR jsme zároveň potvrdili i metodou Western blot.



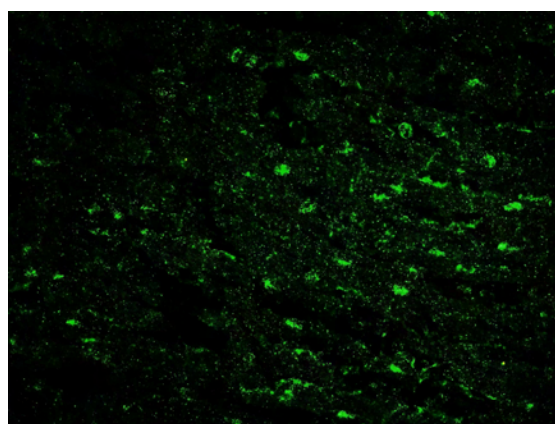
CO LS OTR



CO PS OTR



CO LK OTR

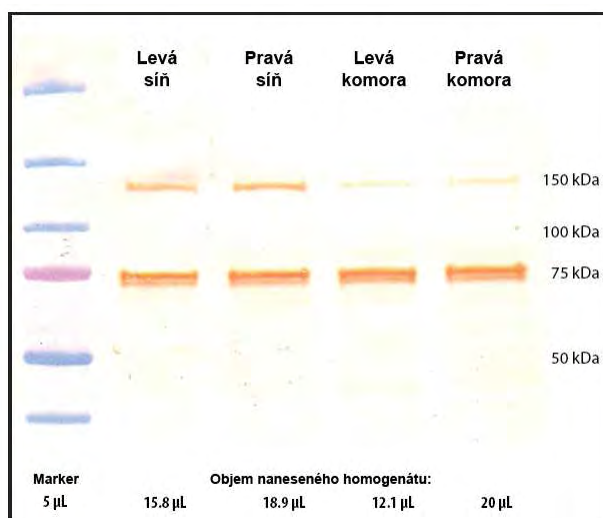


CO PK OTR

Obr. 5. Imunofluorescenční detekce OTR v srdečních oddílech kontrol potkana kmene Wistar

Pozn.: Zvětšení 40x, použité i u dalších řezů, pokud použité jiné zvětšení bude uvedeno

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 mezi síněmi a komorami není tak výrazný jako u exprese mRNA OTR.

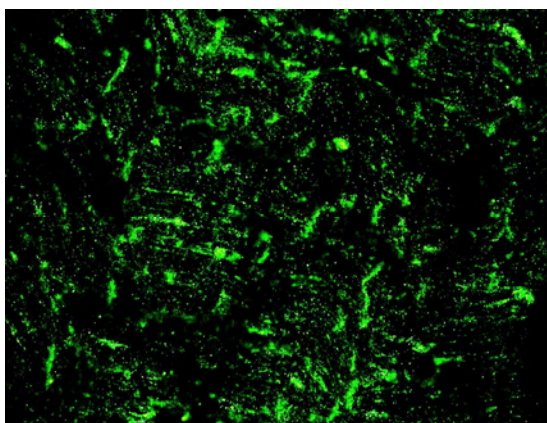


Obr. 6. Western blot OTR v srdečních oddílech kontrol

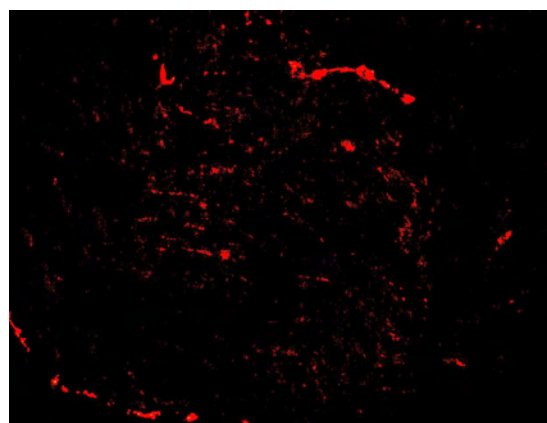
Metodou Western blot jsme prokázali přítomnost OTR ve všech srdečních oddílech.

U elektroforézy byly na gel nanášeny vzorky homogenátu ze srdečních oddílů, které obsahovaly stejné množství proteinu. Na Obr. 6 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.

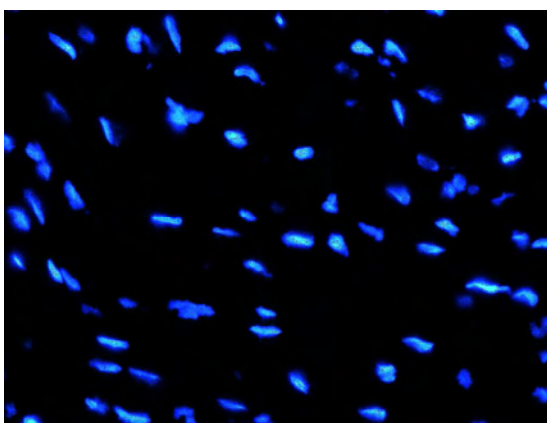
K určení, kde se nacházejí oxytocinové receptory, zda v kardiomyocytu, nervové tkáni, nebo v jádře, jsme použili nervový marker proti Beta III Tubulinu, který je součástí nervové tkáně. Na preparátu byla dále pomocí jaderného markeru DAPI označena jádra buněk. Protilátky proti OTR a Beta III Tubulinu 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. Je evidentní, že většina OTR jsou lokalizována mimo jádro a menším výskytem v jádru. Lokalizaci oxytocinového receptoru na nervové tkáni jsme nezaznamenali.



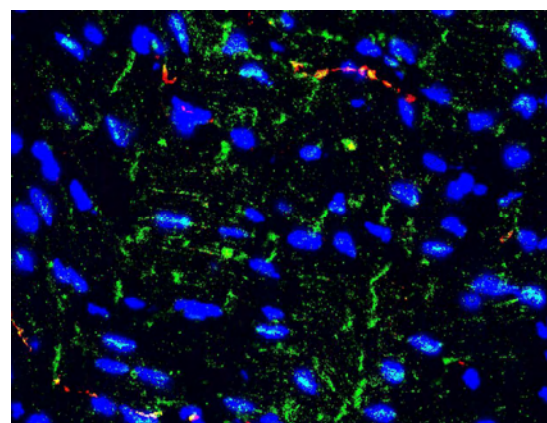
CO LS OTR



CO LS neuronální marker



CO LS jádra



CO LS OTR + neur.marker+jádra

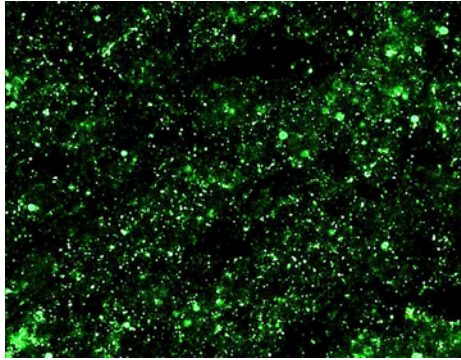
Obr. 7. Lokalizace OTR v levé srdeční síni kontroly potkana Wistar

V levé síni byl zeleně označen OTR, modře jádra a červeně neuronální tkáň.

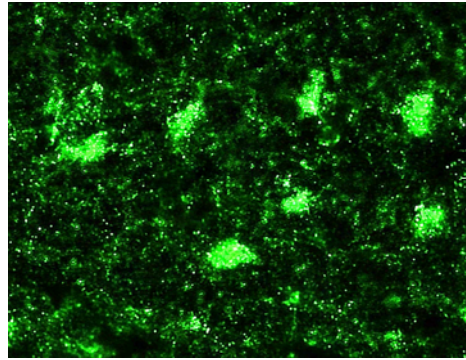
Po sloučení jednotlivých obrázků s označeným OTR, nervovou tkání a jader je z výsledného obrázku zřejmé, že OTR není v srdeční síni vázán na nervovou tkáň,

ale vyskytuje se převážně na membránách kardiomyocytů (Klenerova et al., 2011).

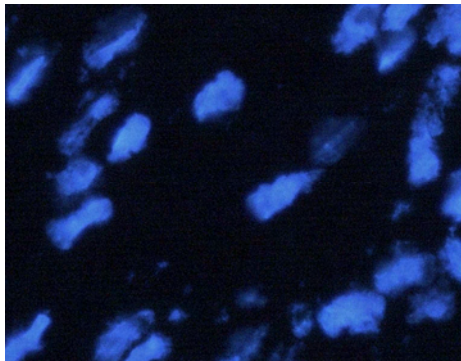
Na základě nálezů kolokalizace OTR s jádry viz obrázek 8, jsme se rozhodli pomocí konfokálního mikroskopu blíže identifikovat jeho lokalizaci OTR ve vztahu k jádru, výsledky uvedeny na obrázku. 9.



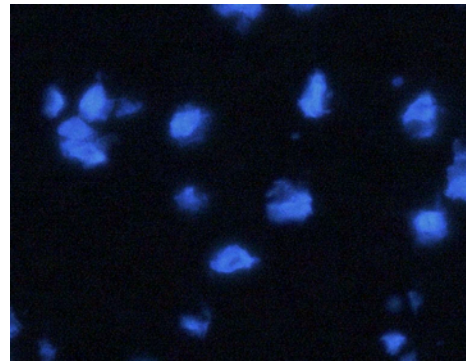
CO LS OTR



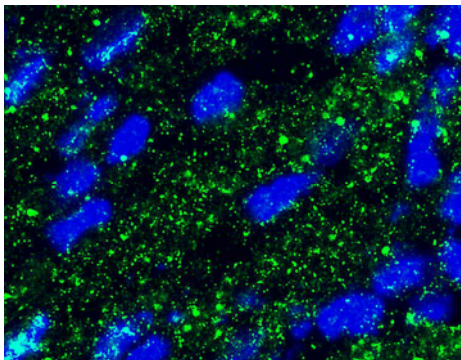
CO LK OTR



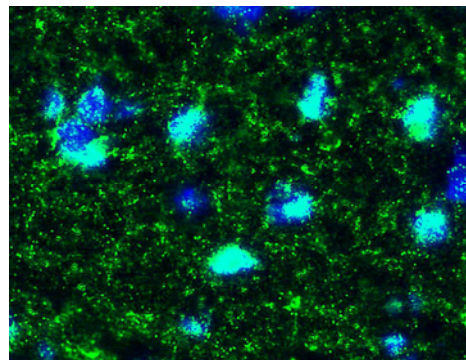
CO LS jádra



CO LK jádra



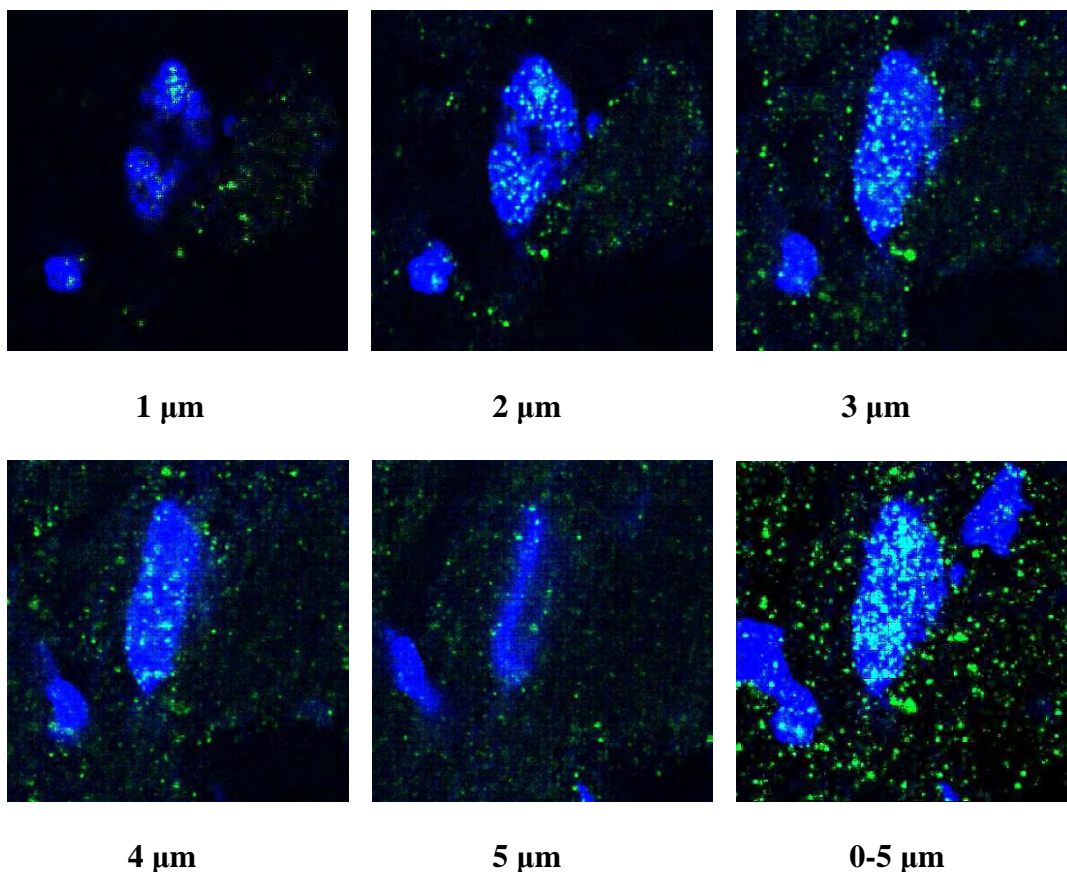
CO LS OTR + jádra



CO LK OTR + jádra

Obr. 8. Expresse OTR v jádrech v levé síni a levé komoře kontroly

Obrázky OTR označeného zeleně a jader označených modře pomocí jaderného markeru byly proluty. Z obrázků 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 (Skopek et al., 2012).

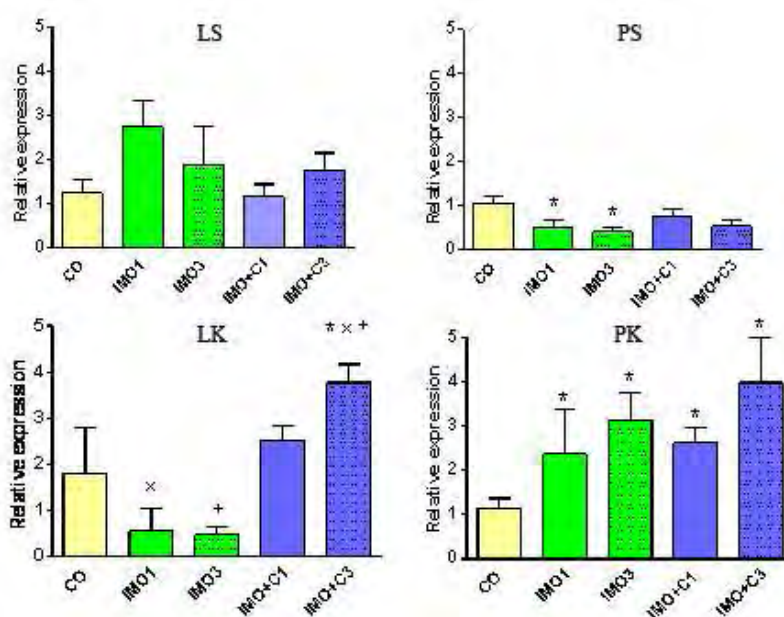


Obr. 9. Lokalizace OTR v jádře kardiomyocytu levé síně kontroly

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. 9) 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, β -adrenergními a opioidními receptory, ale ne pro oxytocin. V naší práci jsme prokázali jako první transport oxytocinového receptoru do jader kardiomyocytů, což lze považovat za unikátní nález.

Expres mRNA OTR v srdci po aplikaci imobilizačního stresu byla určena 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 10. Změny relativní exprese vyvolané stresem jsou vždy vztaženy k odpovídajícímu srdečnímu oddílu kontroly. Jednocestnou analýzou ANOVA jsme prokázali u kmene SD v levé síni prokázali signifikantní vliv stresu na expresi mRNA OTR.

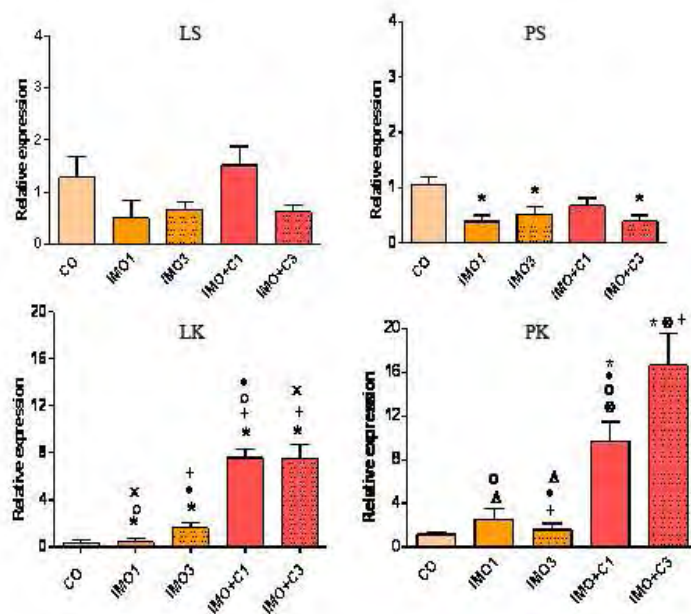


Obr. 10. Efekt akutního imobilizačního stresu na relativní expresi (RE) mRNA OTR v srdečních oddílech potkanů Sprague Dawley.

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

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, kde kombinovaný stres vykazoval silnější účinek. V levé komoře jsme prokázali signifikantní zvýšení exprese u skupiny IMO+C180 oproti

IMO60 i oproti IMO180. V pravé komoře obě skupiny vystavené kombinovanému stresu IMO+C vykazovaly vyšší expresi mRNA OTR oproti oběma skupinám IMO.



Obr. 11. Efekt akutního imobilizačního stresu na relativní expresi (RE) mRNA OTR v srdečních oddílech potkanů Lewis.

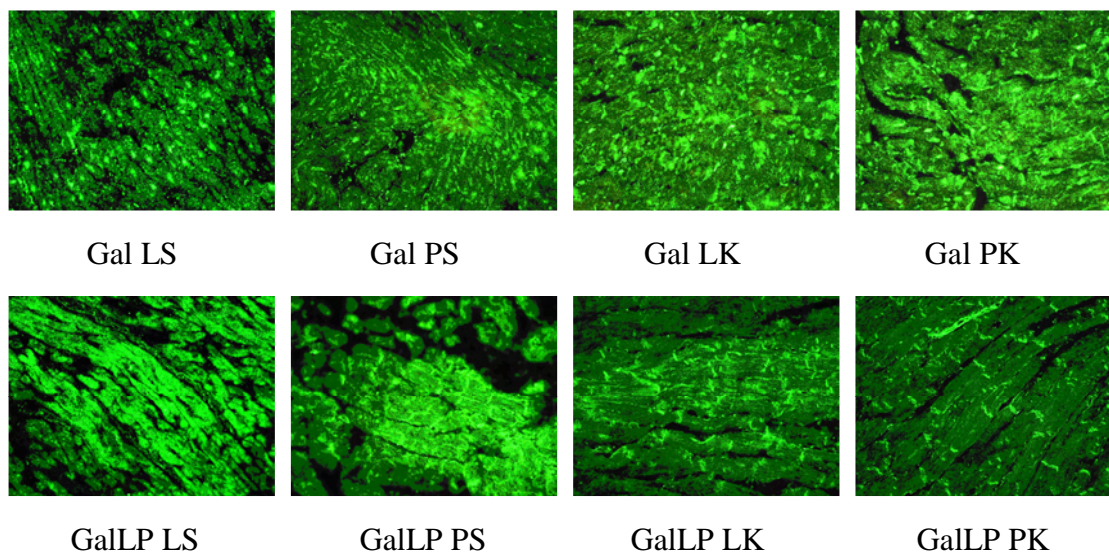
Data z jednotlivých oddílů jsou označena v nadpisu grafů. Uvedeny průměrné hodnoty + SE. * = vs CO, + = IMO3 vs IMO+C3, x = IMO1 vs IMO+C3, o = IMO1 vs IMO+C1, Δ = IMO3 vs IMO+C1, □ = IMO+C1 vs IMO+C3.

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 potkanů kmene LE byla exprese signifikantně snížena ve skupinách IMO60, IMO180 a IMO+C180. V levé i pravé komoře potkanů LE jsme našli signifikantně zvýšenou expresi mRNA OTR u skupin IMO+C (Obr. 11).

Stejně jako u potkanů SD se i u LE projevil vliv specifity stresoru, s převahou emocionální složky (IMO) nebo s převahou fyzické složky (IMO+C).

4.2.2. Galaninergní systém

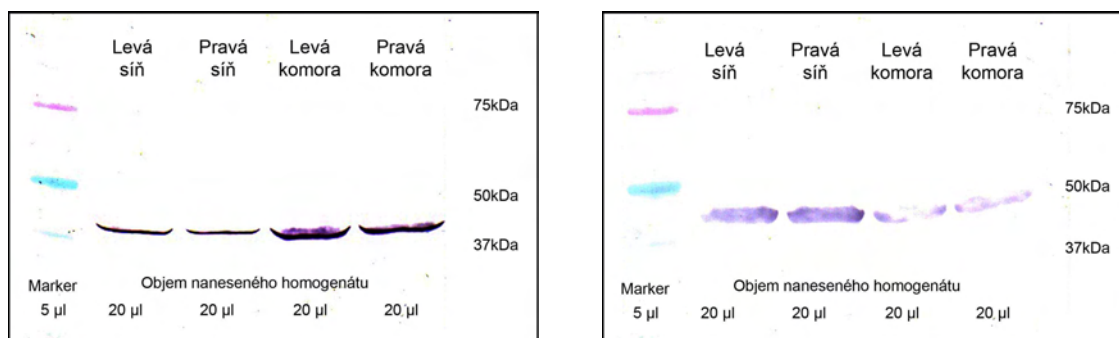
V této disertační práci jsme sledovali přítomnost galaninu, galanin like peptidu a galaninových receptorových subtypů v jednotlivých srdečních oddílech pomocí imunohistochemických metod za fyziologických podmínek. Jedná se o prioritní studii dosud v literatuře nepublikovanou.



Obr. 12. Expres galaninu a galaninu like peptidu v srdečních oddílech potkana za fyziologických podmínek

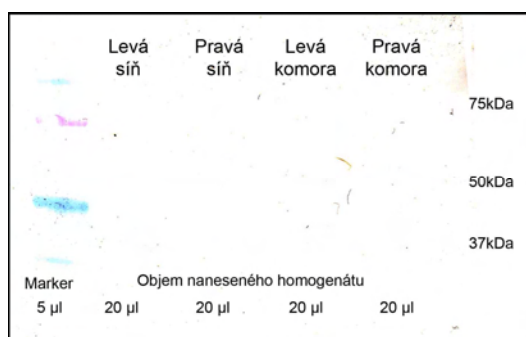
V obou síních i komorách srdce potkana jsme prokázali expresi galaninu a galanin like peptidu za fyziologických podmínek. Četnost buněk exprimujících galanin je srovnatelná v síních i komorách. V komorách je denzita signálu galaninu oproti komorám poněkud vyšší. Vedle galaninu jsme v síních i komorách dále imunohistochemicky sledovali expresi galanin like peptidu. Z výsledků na řezu obrázku 12 je zřetelné, že galanin like peptid je v srdeční tkáni lokalizován v oblasti interkalárních disků. Upřesnění této lokalizace bude vyžadovat další experimenty.

Galaninové receptorové subtypy v srdečních oddílech jsme sledovali imunofluorescenčním stanovením exprese jejich genů. Tyto receptory jsme nejprve stanovili metodou Western blot v homogenátu z jednotlivých srdečních oddílů.



GalR1

GalR2



GalR3

Obr. 13. Galaninové receptorové subtypy v srdečních oddílech kontroly Wistar

Ve všech srdečních oddílech jsme prokázali metodou Western blot přítomnost všech tří receptorových subtypů (Obr. 13). Vzhledem k tomu, že byl pro elektroforézu použit vždy stejný objem homogenátu, je možné porovnat množství jednotlivých receptorů.

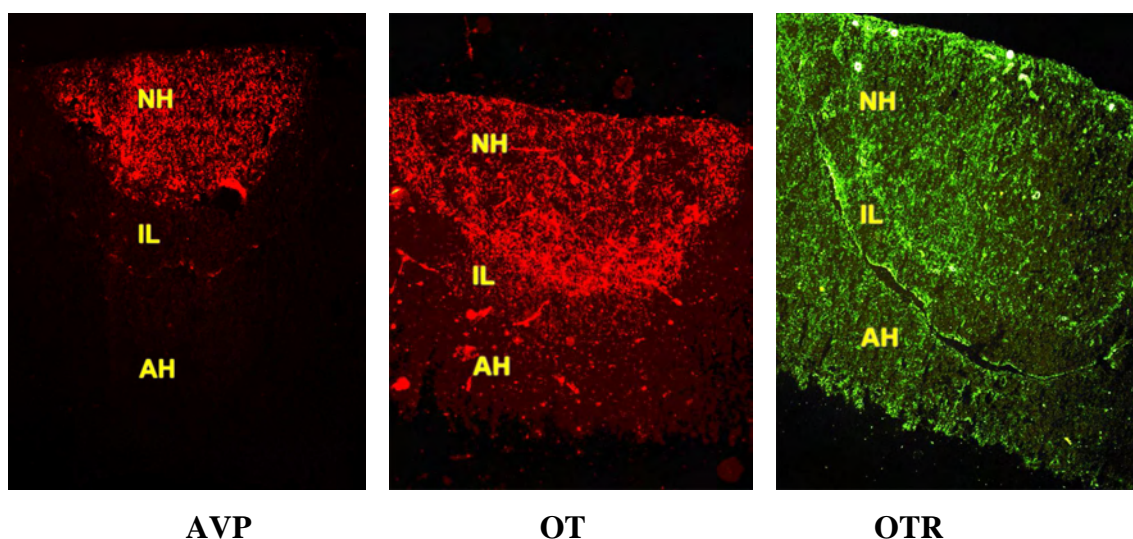
Z obrázků je patrné, že exprese GalR2 je daleko vyšší než exprese GalR1. Exprese GalR3 je ze všech receptorových subtypů nejnižší. Přestože bylo na nitrocelulózové membráně možné identifikovat bandy svědčící o přítomnosti GalR3, byla jejich intenzita tak nízká, že prakticky nebylo možné je při skenování zaznamenat.

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. Exprese GalR3 v síních se jeví jako vyšší oproti komorám.

4. 3. Neuropeptidy v hypofýze

4.3.1 Oxytocinový a galaninerní systém v hypofýze

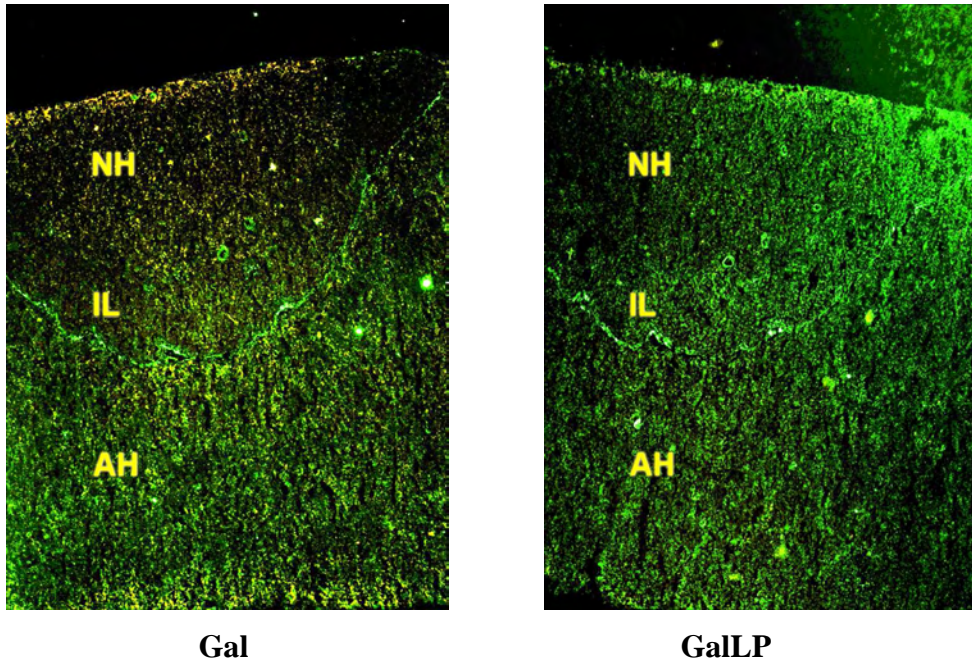
Imunohistochemickou detekcí jsme sledovali expresi vasopresinu, oxytocinu, oxytocinového receptoru, galaninu, galanin like peptidu, galaninového receptor 1, galaninového receptoru 2 a galaninového receptoru 3 na koronálních řezech celou hypofýzou, za fyziologického stavu. Koronální řez umožňuje znázornění 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. 14. Vasopresin a oxytocin v jednotlivých oddílech hypofýzy

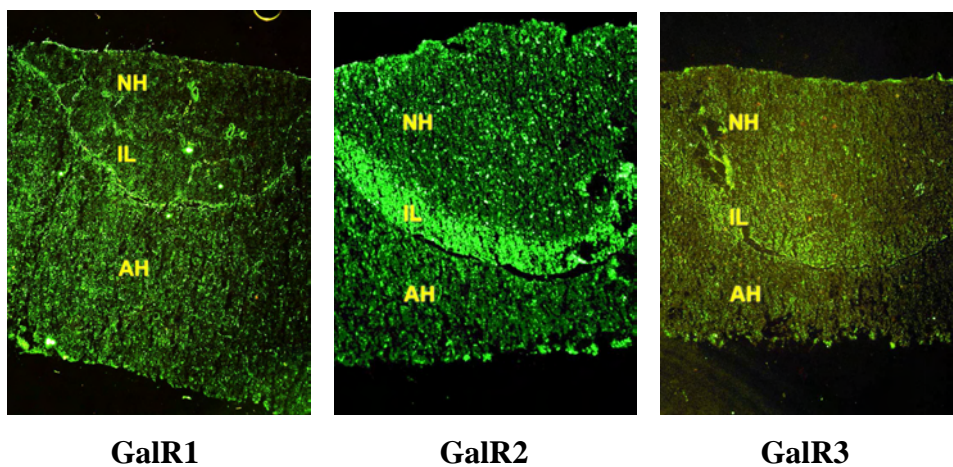
Pozn.: Zvětšení 20x, použité u všech dalších koronárních řezů z hypofýzy

Jak vyplývá z výsledku uvedeném na Obr.14 jsme v neurohypofýze prokázali 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 adenohypofysárních hormonů.



Obr. 15. Galanin a galanin like peptid v jednotlivých oblastech hypofýzy

Galanin i galanin like peptid byly exprimovány v NH, AH i v IL (Obr. 15). GalLP vykazuje silnější expresi v intermediálním laloku oproti NH a AH. V další části experimentů jsme se zaměřili na zjištění přítomnosti jednotlivých galaninových receptorových subtypů. Na obrázku 16 s koronálním řezem hypofýzy je znázorněna exprese všech tří galaninových receptorových subtypů. GalR1 je exprimován v neurohypofýze, adenohypofýze a intermediálním laloku.



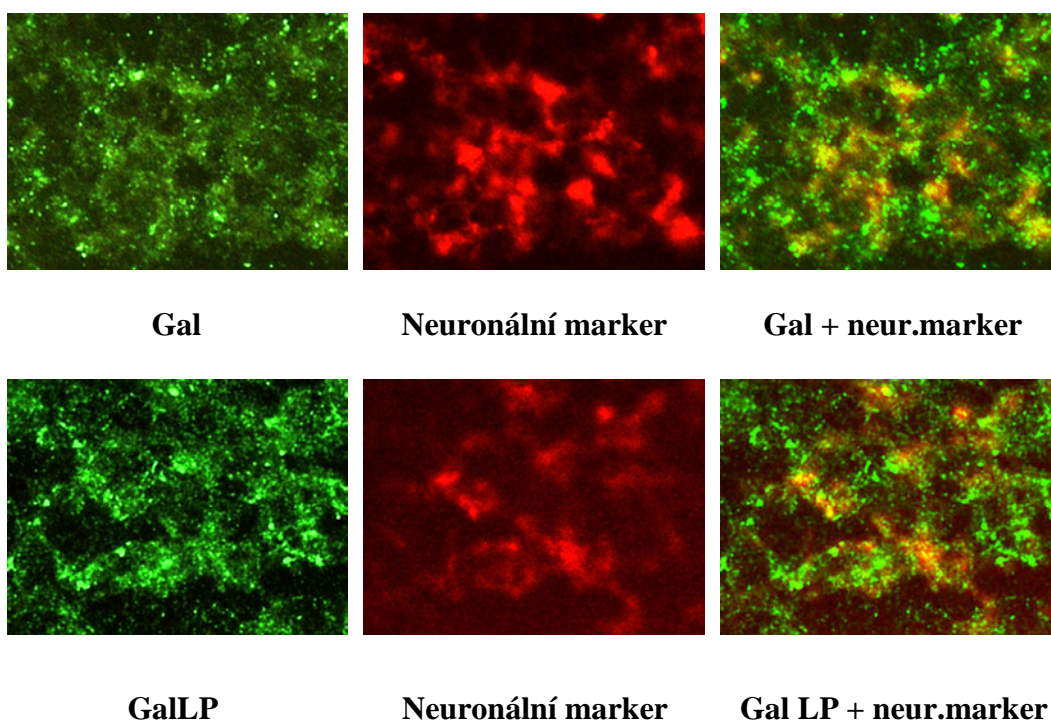
Obr. 16. Galaninové receptorové subtypy GalR1, GalR2, GalR3 v neurohypofýze, intermediálním laloku a v adenohypofýze

Zajímavý je výsledek exprese GalR2, který je exprimován v neurohypofýze a adenohypofýze a vykazuje velmi silnou expresi v intermediálním laloku. GalR3 je exprimován slabě v NH a AH a poněkud silněji v IL. V literatuře nejsou uvedeny údaje o takovéto komplexní Gal systému v hypofýze a v jednotlivých oddílech hypofýzy.

4. 4. Neuropeptidy v adenohypofýze

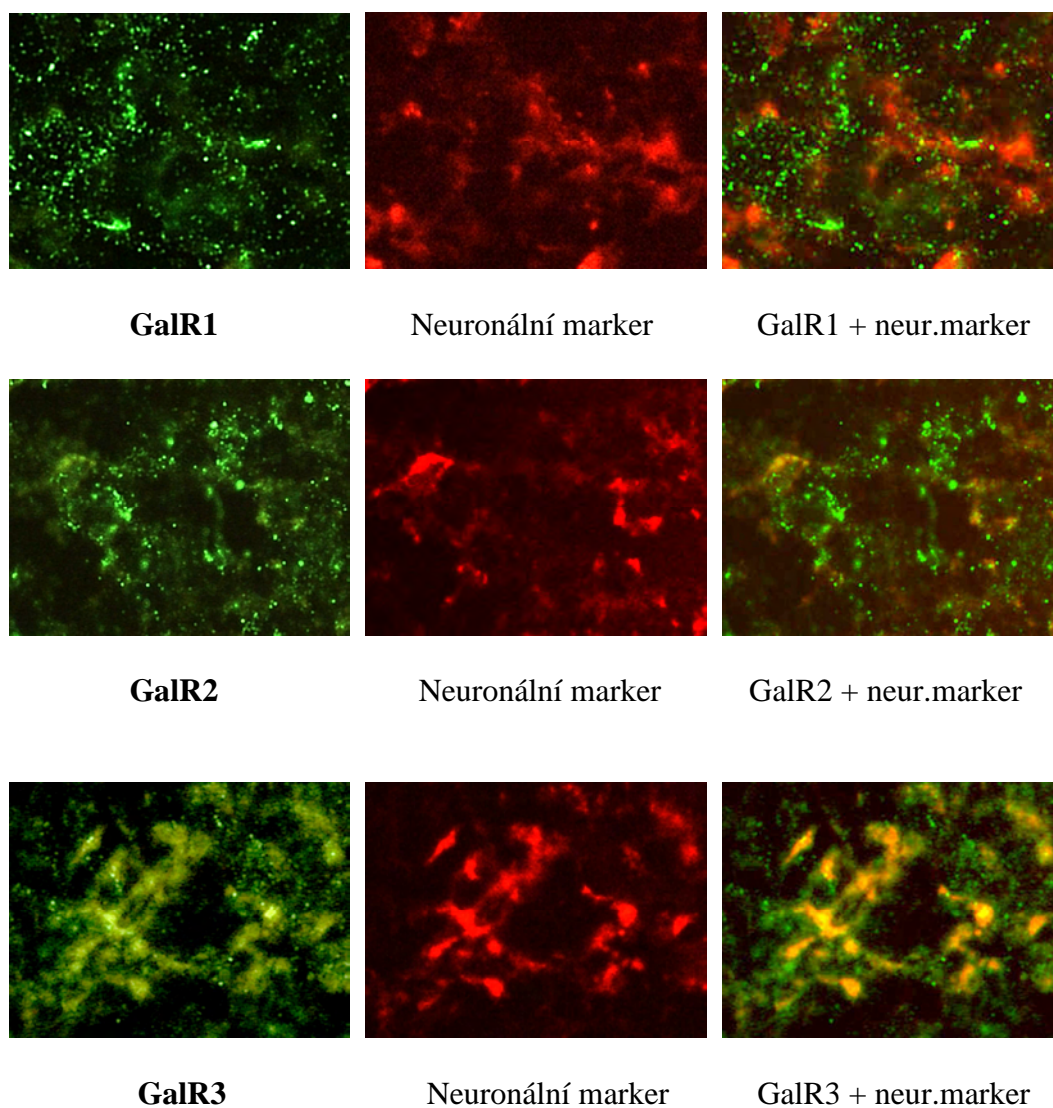
4.4.1. Galaninergní systém

Cílem této experimentální části bylo potvrdit naši hypotézu, že galaninergní systém se může podílet na regulačních změnách v odpovědi na stres v AH potkana, která je součástí HPA osy, jež má rozhodující úlohu při zprostředkování stresových reakcí (Skopek et al., 2011). V našich pokusech jsme pomocí **imunohistochemické detekce a exprese mRNA galaninových receptorových subtypů** stanovili přítomnost jednotlivých proteinů za fyziologického stavu. Na tkáňových řezech AH jsme prokázali přítomnost Gal I GalLP a všech tří subtypů GalR, které jsou lokalizovány na membránách buněk.



Obr. 17. Kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s nervovou tkání značenou neuronálním markerem

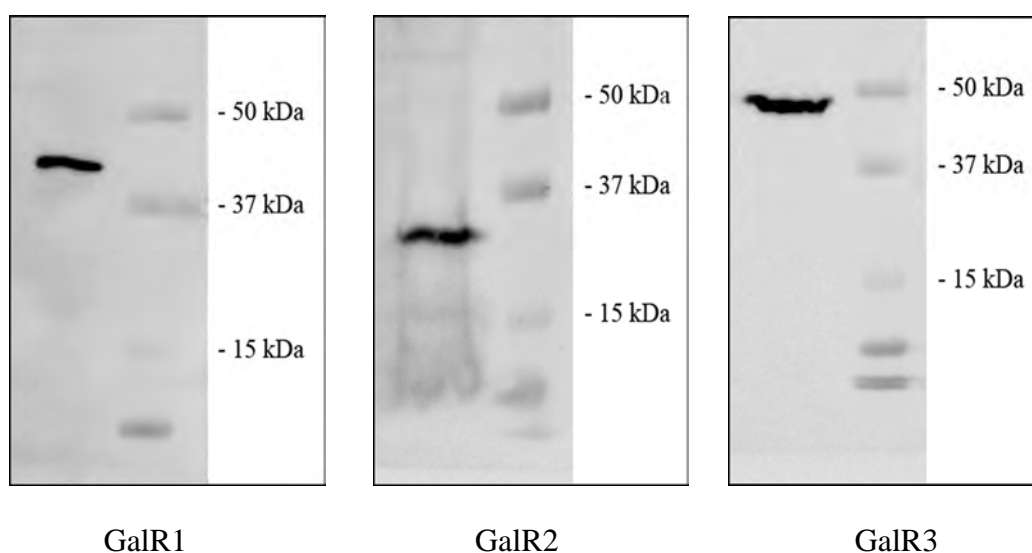
Výsledky na Obr. 17 prokazují částečnou kolokalizaci Gal a GalLP s nervovou tkání a přítomnost samostatně se vyskytující nervové tkáně, Gal a GalLP. V další části analýzy Gal systému AH za fyziologického stavu jsme sledovali expresi všech tří GalR subtypů a jejich lokalizaci. Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny na Obr. 18 prokazujících v AH expresi všech tří GalR subtypů. Četnost buněk exprimujících GalR1 je srovnatelná s četností buněk GalR2. Četnost GalR3 exprimujících buněk je oproti předchozím dvěma receptorům nižší. Densita signálu je nejvyšší u GalR2, pak následuje GalR3 a GalR1.



Obr. 18. Kolokalizace galaninových receptorových subtypů s nervovou tkání značenou neuronálním markerem v AH

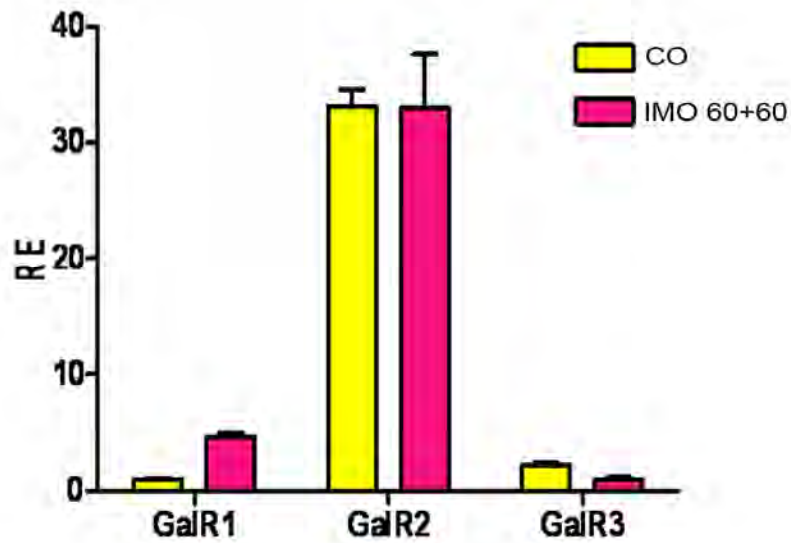
Rovněž u GalR jsme testovali kolokalizaci pouze s nervovou tkání, neboť v předchozích pokusech jsme neprokázali přítomnost pituicytů v AH. Z našich výsledků vyplývá, že GalR subtypy v AH jsou kolokalizovány s nervovou tkání rozdílně. GalR1 s nervovou tkání nekolokalizuje vůbec. Kolokalizaci GalR2 jsme 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; vyskytuje se i mimo nervovou tkáň.

K potvrzení našich nálezů jsme pomocí metody Western blot prokázali přítomnost všech GalR subtypů v homogenátu AH. Na Obr. 19 jsou jednotlivé bloty demonstrující proužky jednotlivých Gal receptorů.

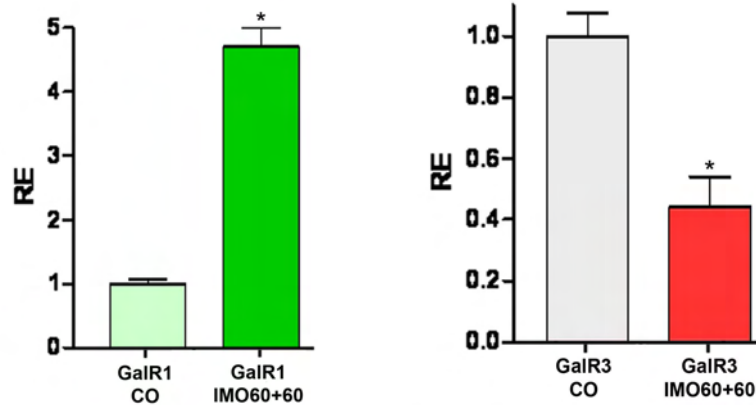


Obr. 19. Western blot subtypů galaninového receptoru z adenohipofýzy

V další části pokusů jsme určovali **expresi proteinu a expres mRNA galaninergního systému po stresu**. U exprese mRNA GalR2, která mnohonásobně převyšuje expresi mRNA GalR1 a mRNA GalR3 (Obr. 20), po aplikaci stresu nedochází k signifikantní změně na rozdíl od GalR1 a GalR3, kde byla relativní exprese stresem ovlivněna. Pro lepší názornost jsou detailní údaje z obrázku 20 uvedeny na grafu znázorněném na obrázku 21.; hodinový stresový podnět s hodinovým postresovým intervalem vedl ke zvýšení exprese GalR1 a naopak u GalR3 došlo ke snížení exprese mRNA.

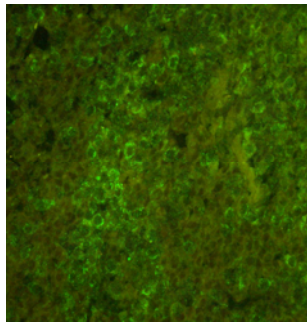


Obr. 20. Expres mRNA galaninových receptorových subtypů v AH u kontrol a po aplikaci po stresu

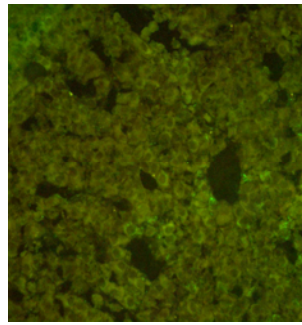


Obr. 21. Údaje z grafu Obr. 20 v detailu; vliv stresu na expresi mRNA GalR1 a GalR3

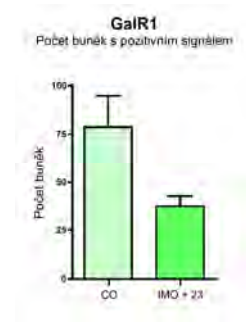
V AH jsme sledovali změny v expresi subtypů GalR v různých časových intervalech po ukončení stresu, za 1, 3, 7 a 23 hod. Pomocí programu ImageJ jsme určili dva parametry, počet buněk exprimujících receptor a denzitu jeho signálu, která vypovídá o množství exprimovaného receptoru. Na obrázku 22 uvádíme imunofluorescenční výsledky s příslušným grafem obrazové analýzy. Pro přehlednost výsledků uvádíme pouze případy, kdy nastala signifikantní změna v expresi GalR.



GalR1 CO

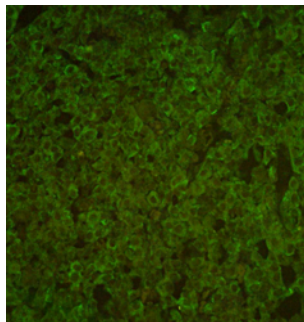


GalR1 IMO + 23h

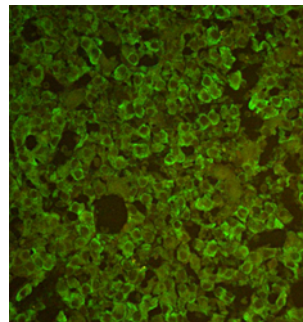


GalR1 CO vs IMO + 23h

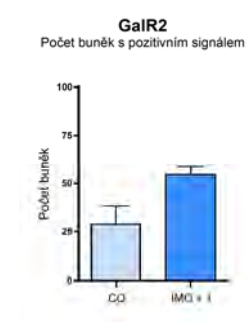
U galaninového receptoru 1 došlo po 23 hodinách ke snížení počtu buněk exprimujících tento receptor, ke změně denzity signálu nedošlo.



GalR2 CO

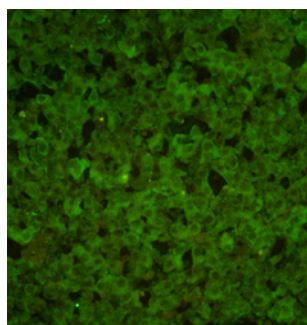


GalR2 IMO + 1h

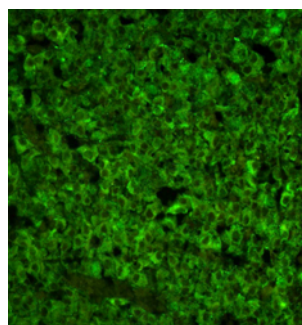


GalR2 CO vs IMO + 1h

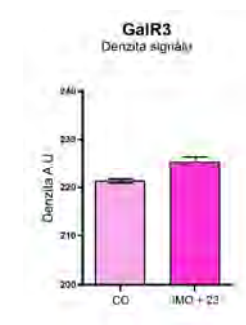
Po jedné hodině od ukončení stresu došlo k signifikantnímu zvýšení počtu buněk exprimujících GalR2, ke změně denzity signálu nedošlo.



GalR3 CO



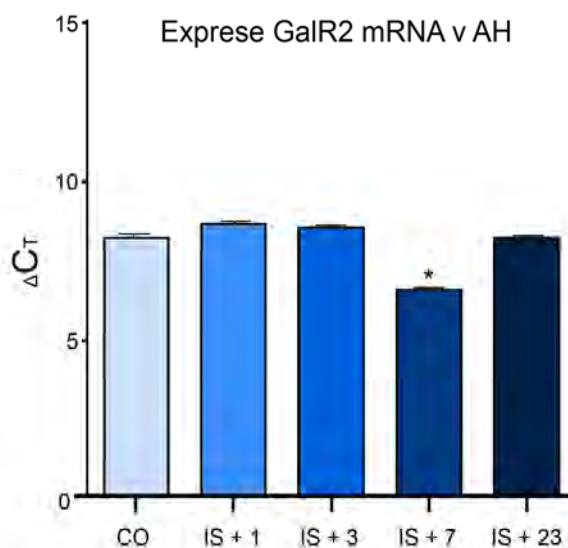
GalR3 IMO + 23h



GalR3 CO vs IMO + 23h

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

Obr. 22. Změny exprese GalR subtypů v různých časových intervalech po ukončení stresu



Obr. 23. Dynamika exprese změn mRNA různých intervalů po ukončení stresu.

Poznámka: Nižší hodnoty ΔCT reprezentují vyšší hodnoty exprese GalR2.

Vyhodnocení dynamiky změn exprese mRNA Gal receptorových subtypů v různých časových intervalech po ukončení stresu (1, 3, 7 a 23 hod) prokázalo, že kritický interval po ukončení stresu je 7 hodin. V tomto intervalu se exprese signifikantně zvýšila u všech GalR subtypů. Na obrázku 23 je příklad zvýšení exprese mRNA 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 (Obr. 19). Účinek aplikovaného stresu vedl ke změnám podle typu receptoru a délce intervalu po stresu.

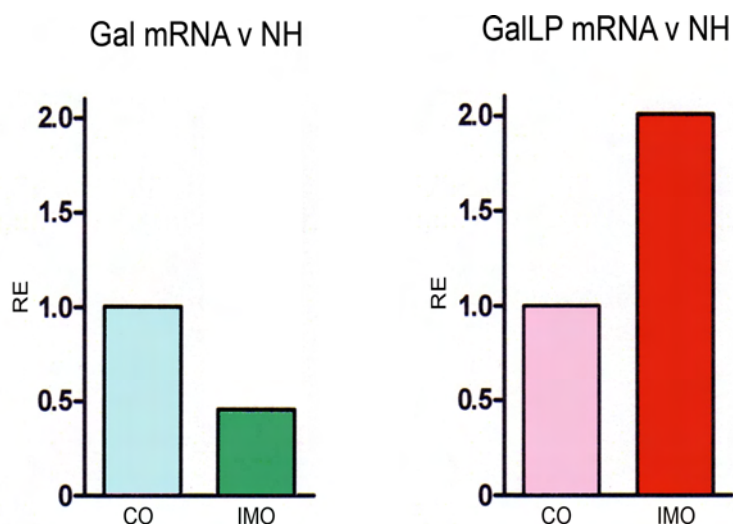
Podářilo se prokázat v adenohypofýze potkanů přítomnost všech subtypů galaninových receptorů, a to jak sledováním genové exprese pomocí RT qPCR, tak exprese vlastních receptorů pomocí imunohistochemických postupů. GalR2 se jeví jako receptor exprimovaný ve větším množství než ostatní galaninové receptorové 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

4.5.1. Galaninerní systém

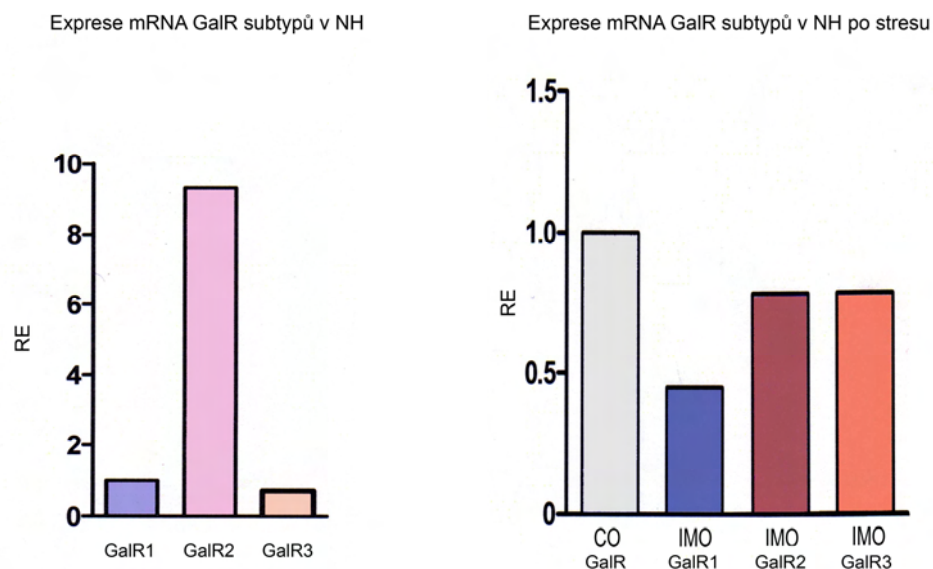
Stanovení exprese mRNA Gal, GalLP a GalR subtypů

Velmi malé rozměry a váha NH nedovolují experimenty se stejným protokolem jako u AH a je nutné pracovat se směsnými vzorky. Výsledky uvedené na grafech znázorňují data získaná za fyziologických podmínek a po stresu (Skopek et al., 2013). Na Obr. 24 jsou výsledky experimentu, prokazující expresi mRNA Gal a GalLP. Velmi zajímavý je výsledek po aplikaci akutního stresu, kde exprese mRNA Gal byla snížena o 50% a naopak exprese mRNA GalLP byla o 50% po stresu zvýšena. Tato data svědčí pro přítomnost Gal a GalLP v NH a také svědčí o rozdílném zapojení těchto dvou neuropeptidů v odpovědi na akutní stres.



Obr. 24. Expresse mRNA galaninu a expresse mRNA galanin like peptidu za fyziologických podmínek a po stresu

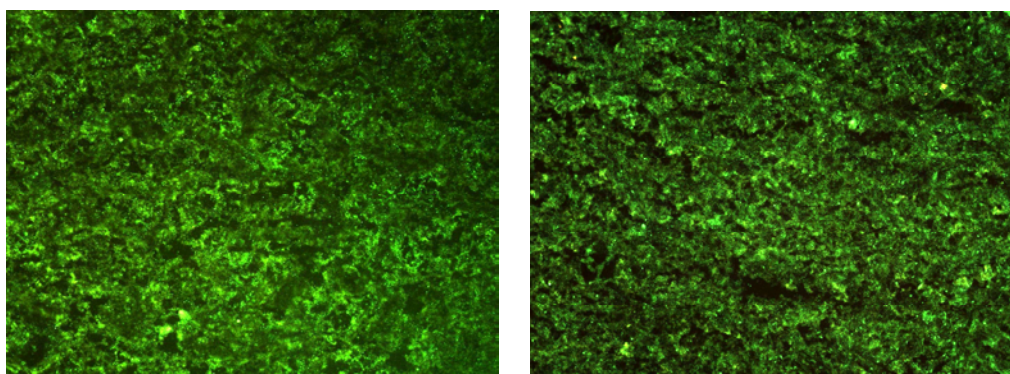
V další části pokusů jsme se zabývali testováním exprese mRNA jednotlivých subtypů GalR1, GalR2 a GalR3. Prokázali jsme přítomnost exprese mRNA všech tří receptorových subtypů, s nejvyšší expresí mRNA GalR2 za fyziologických podmínek a v následujících experimentech jsme určili vliv stresu. Všechny tři receptory GalR1, GalR2 a GalR3 reagovaly na stres snížením exprese mRNA, nejsilnější odpověď byla u subtypu GalR1 (Obr. 25).



Obr. 25. Expresse mRNA tří subtypů galaninových receptorů v NH za fyziologických podmínek a po stresu

Stanovení exprese Gal, GalLP a GalR subtypů imunofluorescencí

V NH jsme prokázali expresi obou neuropeptidů Gal a GalLP (Obr. 26). Četnost buněk exprimujících galanin odpovídá četnosti buněk exprimujících galanin like peptid. Denzita signálu galaninu se oproti galanin like peptidu jeví jako vyšší.

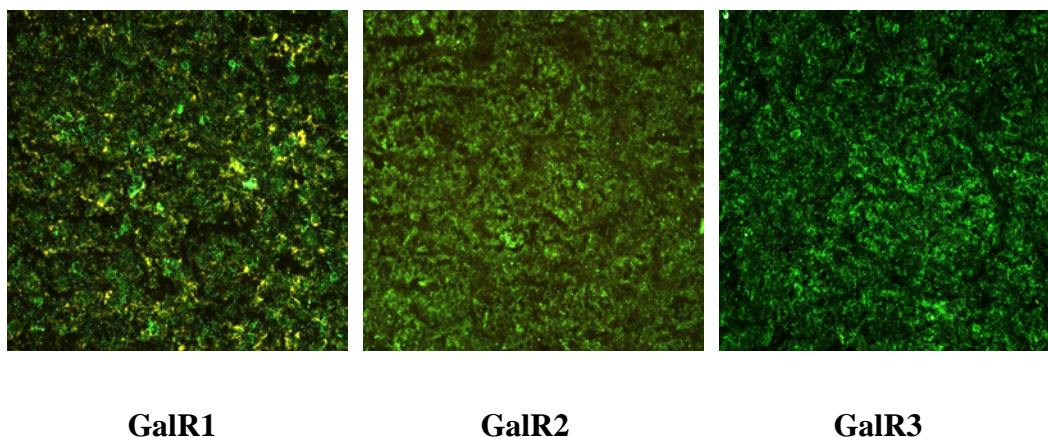


Gal

GalLP

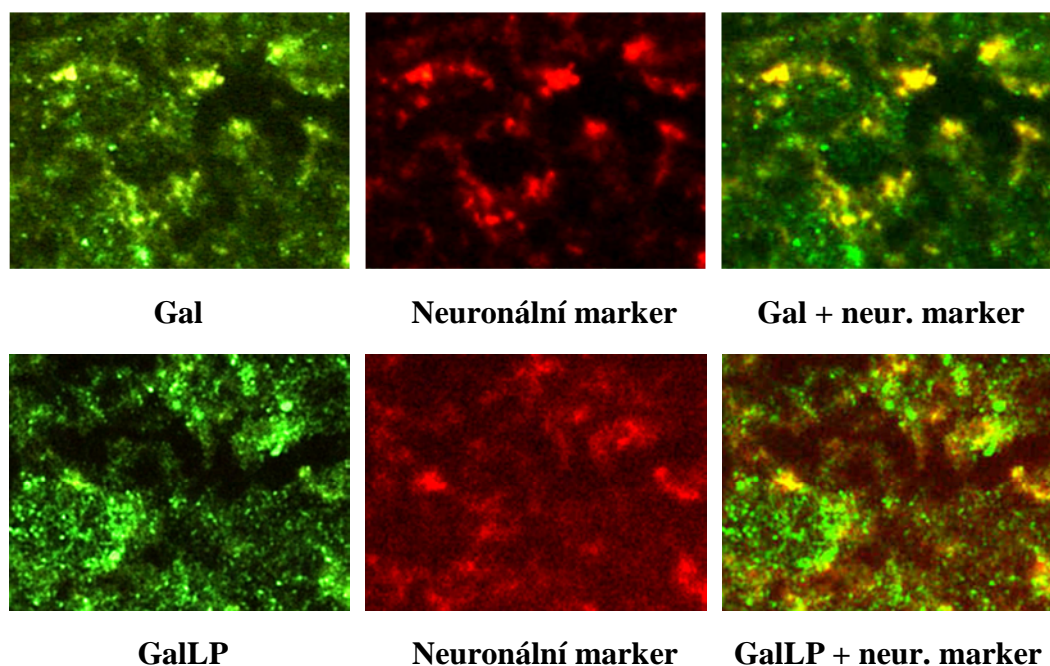
Obr. 26. Expresse galaninu a galanin like peptidu v neurohypofýze
 Škopek et al., 2013
 Zvětšeno 40x (i u dalších řezů, již neuváděno)

V NH jsme prokázali expresi všech tří GalR 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 (zelené až zelenožluté zbarvení na obrázku 27).



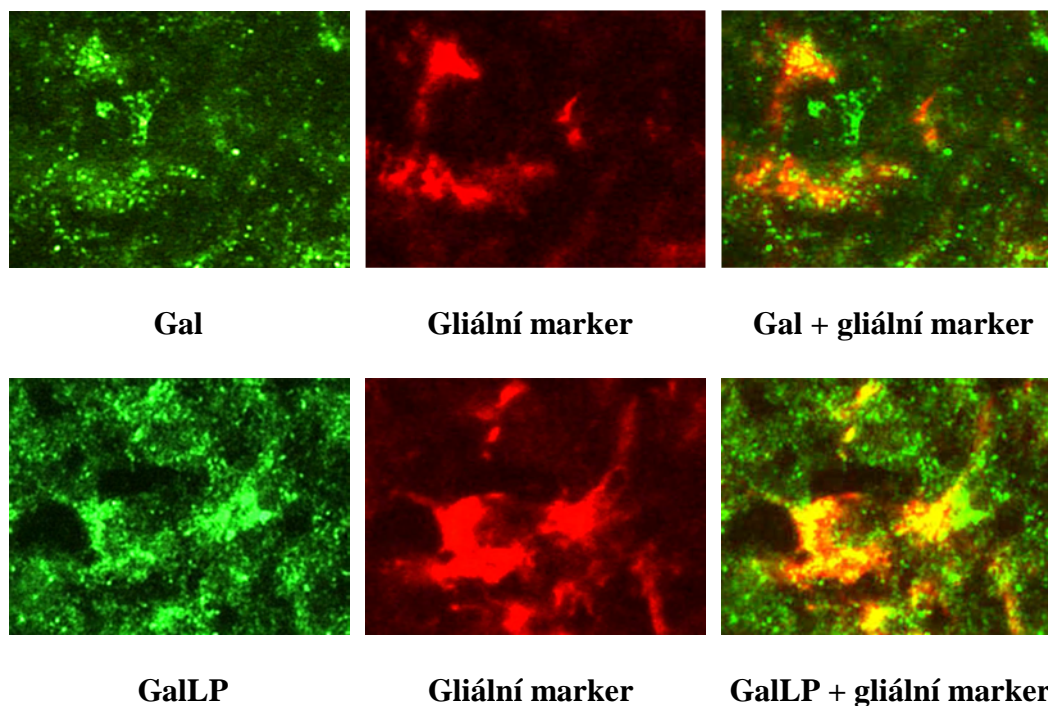
Obr. 27. Expres galaninových receptorových subtypů v neurohypofýze

Stejně jako v AH jsme se i v NH zabývali možnými kolokalizacemi sledovaných neuropeptidů. Po detekci přítomnosti Gal a GalLP a všech tří GalR subtypů jsme testovali jejich kolokalizace s neuronální tkání a pituicyty.



Obr. 28. Kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s nervovou tkání

Z našich imunohistochemických detekcí vyplývá, že Gal i GalLP jsou kolokalizovány s nervovou tkání. Tyto neuropeptidy jsou přítomny i mimo nervovou tkáň (Obr. 28). V další serii pokusů jsme sledovali kolokalizaci s glií.

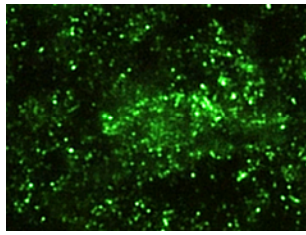


Obr. 29. Kolokalizace galaninu a galanin like peptidu s pituicyty značenými gliálním markerem

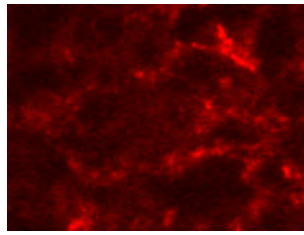
Prokázali jsme kolokalizaci Gal a GalLP s pituicyty značenými gliálním markerem. Jedná se o částečnou kolokalizaci, to znamená, že se galanin, stejně jako galanin like peptid, se vyskytují i mimo pituicyty. Stejným způsobem jsme postupovali i při detekci Gal R subtypů a jejich kolokalizaci s pituicyty a s nervovou tkání (Obr. 30).

V NH jsme prokázali kolokalizaci GalR 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. 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.

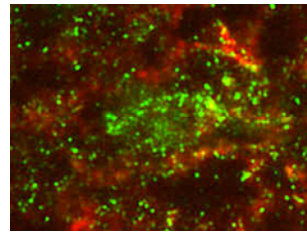
Obrázek 30 „Kolokalizace galaninových receptorových subtypů s glií a neuronální tkání“ je uveden na další straně.



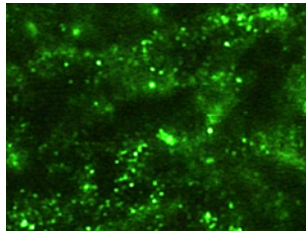
GalR1



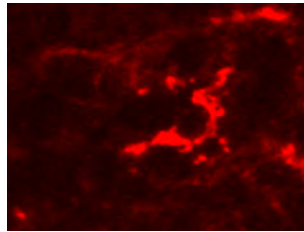
Gliální marker



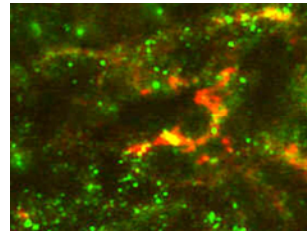
GalR1 + gliální marker



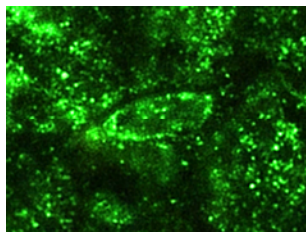
GalR2



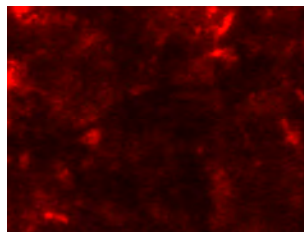
Gliální marker



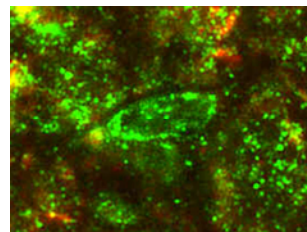
GalR2 + gliální marker



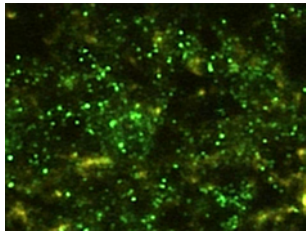
GalR3



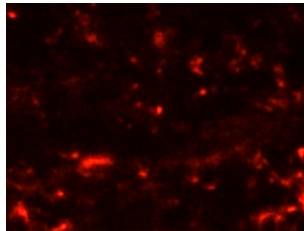
Gliální marker



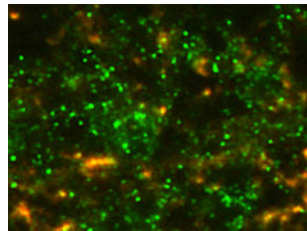
GalR3 + gliální marker



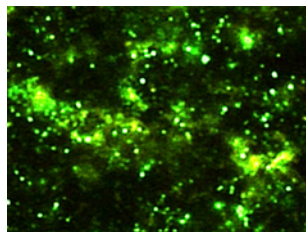
GalR1



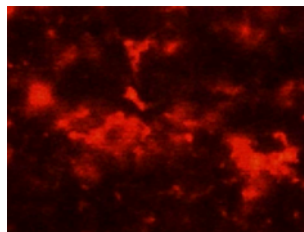
Neuronální marker



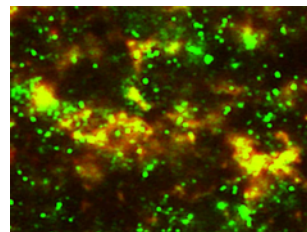
GalR1 + neur. marker



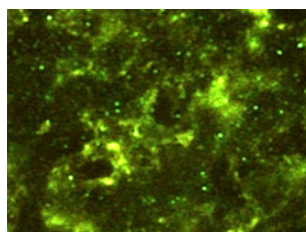
GalR2



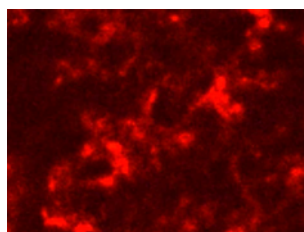
Neuronální marker



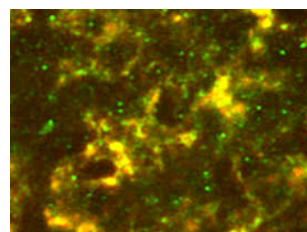
GalR2 + neur. marker



GalR3



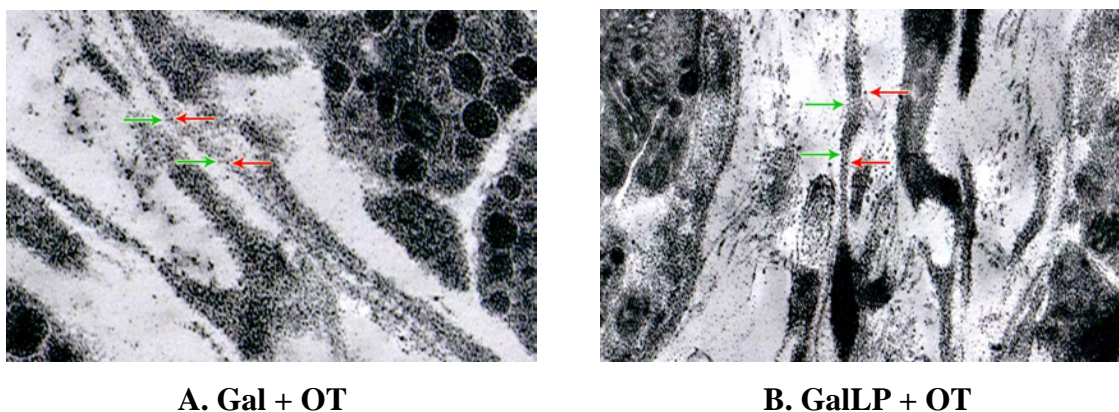
Neuronální marker



GalR3 + neur. marker

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

V neurohypofýze jsme označili Gal, GalLP a oxytocin protilátkami s koloidním zlatem (ředění 1:500). Elektronovou mikroskopií jsme potvrdili kolokalizaci Gal a GalLP s oxytocinem, jak je znázorněno na obrázku 31.



Obr. 31. 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 (A.) a rovněž galanin like peptidu s oxytocinem (B.).

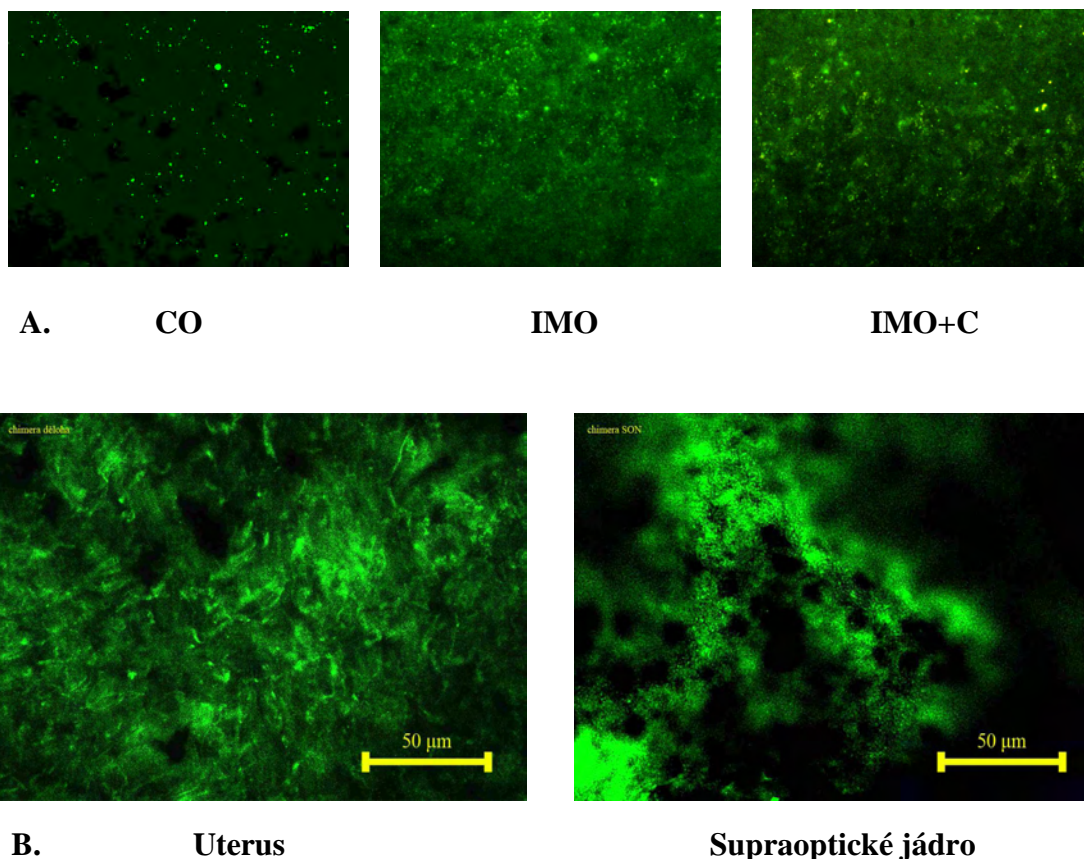
V neurohypofýze jsme označili galanin, galanin like peptid a oxytocin protilátkami s koloidním zlatem. Elektronovou transmisní mikroskopií jsme prokázali na membránách pituicytů kolokalizaci galaninu s oxytocinem (A) i kolokalizaci galanin like peptidu s oxytocinem (B.).

4. 6. Hypotalamus

V supraoptickém jádru (SON) hypotalamu jsme identifikovali expresi oxytocinového receptoru ve stejném experimentu se stanovením oxytocinového receptoru v NH.

Výsledná imunofluorescence OTR prokázala, že v obou tkáních se jedná o stejný typ receptoru. V dalším experimentu jsme testovali expresi OTR v SON po aplikaci dvou typů stresu (Obr. 32 A). Vlivem imobilizačního stresu dochází v SON ke zvýšení intenzity signálu OTR, tento efekt je výraznější u kombinace imobilizačního stresu s chladovým stresem.

K označení oxytocinových receptorů v SON jsme také použili chiméru oxytocinu s kumarinem jako fluorescenčním markerem (Obr. 32B), která byla syntetizována v naší laboratoři. Vazbu chiméry jsme otestovali na řezech dělohy.



Obr. 32

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 v supraoptickém jádru hypotalamu (SON) potkana. Tento postup lze využít pro detekci oxytocinového receptoru bez použití primárních a sekundárních protilátek (Obr. 32B).

5. DISKUSE

Laboratoř neurofarmakologie se dlouhodobě zabývá studiem periferních i centrálních účinků některých neuropeptidů, především neurohormonů oxytocinu, vasopresinu a jejich analogů za fyziologických podmínek a po působení stresu. Neuropeptidy AVP a OT vykazují nejen typické periferní účinky, ale mají i důležitou centrální regulační úlohu jako neurotransmitery a neuromodulátory. Stále jsou

objevovány nové neuropeptidy a velmi perspektivními se jeví galanin a galanin like peptid, které mají velmi úzký vztah k oxytocinu. Bylo prokázáno, že modulují řadu neurofyziologických fenomenů, jako chování, sociální cítění, učení, paměť, a ovlivňují stresové odpovědi. Behaviorální studie poskytují informaci o těchto centrálních účincích.

Tato disertační práce pojednává o studiu oxytonergního a galaninergního systému v srdci, hypofýze a CNS za fyziologických podmínek a po působení stresu; přináší zcela nové a ojedinělé výsledky, které přispívají k objasnění mechanismu jejich působení. Při studiu Gal jsme vyšli z výsledků behaviorálních studií s OT a karbetocinem po jejich systémové aplikaci, které prokázaly protistresový a anxiolytický účinek (viz Klenerová et al., 2007; 2009b; 2010). Většina publikací uvádí, že pro peptidy je hematoencefalická bariéra (BBB) nepropustná a z tohoto důvodu jsou většinou aplikovány i.c.v. Tato aplikace může být zdrojem řady kontroverzních výsledků, neboť působí stresogenně. Naše laboratoř prokázala, že peptidy NH mají při systémové aplikaci významné behaviorální účinky. Je předmětem diskuse, jakým způsobem se tyto peptidy do mozku dostávají. Vycházíme z hypotézy, že peptidy mohou být transportovány v cirkumventrikulárním orgánu, kde BBB chybí a kapiláry jsou fenestrovány. Naše behaviorální studie prokázaly (Klenerová et al., 2011a), že galanin je další neuropeptid, který po systémové aplikaci vykazuje protistresové a anxiolytické účinky. Tento nález byl potvrzen podáním antagonistů Gal, které uvedené účinky zablokovaly. Získané výsledky také předpokládají, že agonista Gal a antagonist Gal M40, i námi syntetizovaný antagonist Gal 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 farmakologickém působení galaninu v CNS v odpovědi na stres (Klenerová et al., 2011a).

Studium OT/OTR systému je v současnosti zaměřeno i na jiné periferní tkáně, než jsou pro oxytocin typické klasické orgány děloha a mléčná žláza, především na srdce a neoplastické tkáně (Strunecká et al., 2009).

Oxytocin byl nově zařazen mezi kardiovaskulární hormony (Gutkowska et al., 2000). OT působí regulaci krevního objemu svými natriuretickými účinky a moduluje krevní tlak stimulací uvolnění ANP. Z experimentálních studií vyplývá, že OT může ovlivňovat nebo regulovat funkce srdce několika různými mechanismy, ale zbývá mnoho nevyřešených otázek týkajících se signálních procesů iniciovaných stimulací OTR v srdci. V naší dizertaci jsme sledovali v jednotlivých srdečních oddílech expresi OTR a její možné ovlivnění aktivitou HPA osy za fyziologických podmínek a za stresu.

Sledovali jsme expresi mRNA metodou RT 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). Použili jsme potkany Sprague-Dawley a Lewis s rozdílnou aktivitou HPA osy, získané výsledky však neprokázaly signifikantní rozdíly v expresi mRNA za bazálních podmínek, ale po aplikaci dvou typů stresu jsme zjistili signifikantní rozdíly v expresi mRNA v závislosti na HPA ose a typu stresu. Rovněž v pokusech s určením exprese OTR pomocí imunofluorescence jsme demonstrovali výrazné rozdíly v lokalizaci OTR u kontrol a po působení stresu. Tyto výsledky svědčí pro účast OT/OTR na stresové odpovědi (Klenerova et al., 2011). Dále jsme zjistili velké rozdíly v hodnotách relativní exprese mRNA OTR mezi síněmi a komorami, avšak u exprese OTR určené imunofluorescencí jsme tento rozdíl v expresi mezi síněmi a komorami neprokázali. V kardiomyocytu jsme identifikovali OTR v plazmatické membráně, což je typické pro GPCR, a nenalezli jsme kolokalizaci s nervovou tkání.

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 ve shodě s novými objevy popisujícími, že mnohé GPCR jsou kolokalizovány s jádry, avšak u OTR tyto studie chybí (Tadevosyan et al., 2012). OTR lokalizované na jaderné membráně mohou regulovat odlišné signální dráhy a mohou se podílet na vzniku kardiovaskulárních poruch. Kolokalizace OTR s jádry buněk by pravděpodobně mohla vysvětlit diskrepanci v síních a komorách mezi expresí mRNA OTR a expresí genu OTR. Prokázali jsme přestup OTR z plazmatické membrány do jádra kardiomyocytů a tento nález je v literatuře prioritní (Klenerová et al., 2011; Škopek et al., 2012). Nové znalosti o signalizaci OTR mají význam pro hledání terapeutických látek s vyšší specificitou účinku a sníženými nežádoucími účinky.

Dále jsme v srdci sledovali galaninergní systém a jeho možné zapojení v centrální regulaci kardiovaskulárního systému, včetně zapojení ve stresové odpovědi (Xu et al., 1994; Sweerts et al., 1999). V přehledovém článku uvádí Fang se spolupracovníky (2013) rozsáhlý přehled studií sledujících kardiovaskulární účinky centrálně

aplikovaného Gal. V kardiovaskulárním systému nebyla dosud provedena studie zabývající se komplexním studiem galaninerního systému za fyziologických podmínek. V našich pokusech se nám podařilo identifikovat Gal, GalLP a všechny tři receptorové subtypy ve všech oddílech srdce, pomocí stanovení exprese mRNA a exprese jednotlivých proteinů.

V další části se disertace zabývá studiem OT a Gal systému v hypofýze. Jde o složitý komplex otázek týkajících se dosud nevyřešeného propojení hypotalamu, NH a AH a zřejmě i některých periferních tkání. Není především jasné, jak se neurohormony vzájemně podílejí na regulaci/modulaci sekrece OT a AVP, a adenohipofyzárních hormonů. Řada laboratoří se zabývá lokalizací a vztahem Gal a GalLP s dalšími neurohormony, GalLP však popisují pouze v NH.

V našich studiích jsme dokumentovali expresi mRNA a expresi genů Gal a GalLP a všech tří GalR subtypů v AH, intermediálním laloku (IL) i NH. Zajímavý je výsledek exprese GalR2, který je exprimován v NH a AH a také je velmi silně exprimován v IL. GalR3 je exprimován slabě v NH a AH a poněkud silněji v IL. V literatuře nejsou uvedeny údaje o takovéto komplexní studii galaninerního systému v hypofýze a v jednotlivých oddílech hypofýzy. Důležitou informací našich výsledků je určení lokalizace Gal a GalLP a jejich receptorů ve vztahu k neuronální tkáni a ve vztahu k pituicytům, což jsme určili pomocí příslušných markerů. Identifikovali jsme přítomnost nervové tkáně v NH, AH a IL. Pituicyty jsou exprimovány pouze v NH a IL, v AH jsme expresi pituicytů neprokázali. Tyto údaje, především o identifikaci GalR subtypů, se v literatuře velmi liší a opět jsou často kontroverzní (Lang et al., 2007; Merchenthaler, 2010; Tortorella; Waters a Krause, 2000; Hökfelt a Tatemoto, 2010).

Galaninerní systém je také zapojen v regulaci uvolňování hypofyzárních hormonů; Gal se podílí na sekreci ACTH, GH, PRL a TSH (viz Bennet et al., 1991). Nás zajímala především sekrece ACTH, který je součástí HPA osy a má důležitou úlohu při stresu (Waters a Krause, 2000). Sledovali jsme kolokalizaci Gal a GalLP s ACTH a našli jsme kolokalizaci Gal s ACTH, zatímco kolokalizace ACTH s GalLP je pouze ojedinělá. Určili jsme také kolokalizaci ACTH s Gal receptory, která je nejsilnější s GalR2, GalR1 je kolokalizován pouze ojediněle a GalR3 kolokalizuje pouze na některých buňkách. Tyto výsledky svědčí o účasti galaninerního systému při sekreci ACTH. V souladu s našimi výsledky další publikace uvádějí, že aplikace Gal působí zvýšení aktivity HPA osy s následným zvýšením uvolnění CRH a ACTH, zatímco u stresu působí galanin snížení stresové odpovědi (viz Picciotto et al., 2010).

Tradiční nazírání na neurohypofyzární peptidy jako na 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). V našich pokusech jsme v hypotalamických jádrech identifikovali OTR pomocí různých metod. Velmi zajímavá byla identifikace OTR v supraoptickém jádru (SON) 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 OTR bez použití primárních a sekundárních protilátek. V SON jsme dále sledovali změny exprese OTR po stresu, kde jsme našli zvýšení intenzity signálu OTR. Nález stejné odpovědi receptoru v SON a v NH indikuje, že se jedná o stejný typ receptoru.

Velmi nízká váha NH nedovoluje experimenty se stejným protokolem jako u AH. Z tohoto důvodu je nutné při studiu exprese mRNA pracovat se směsnými vzorky. Pomocí metody RT qPCR jsme v NH určili expresi mRNA pro Gal a GalLP a pro jednotlivé subtypy GalR za fyziologických podmínek a po aplikaci stresu. Dále jsme určili lokalizaci komponent Gal systému ve vztahu k neuronům, k pituicytům a rovněž jejich vzájemnou kolokalizaci a kolokalizaci s OT a AVP. Ani za fyziologických podmínek, ani za stresu, nejsou podobné komplexní studie v literatuře dostupné. Identifikovali jsme v NH expresi mRNA Gal i mRNA GalLP. Po aplikaci stresu byla exprese mRNA Gal snížena o 50% a naopak exprese mRNA GalLP byla o 50% po stresu zvýšena. Tato data svědčí o rozdílném zapojení těchto neuropeptidů v odpovědi na stres.

Naše výsledky o identifikaci Gal 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 OT z NH, zatímco v hypotalamu má účinek opačný; 2) U prodlouženého osmotického stimulu, který je v některých publikacích považovaný za stresový podnět, má Gal stimulační modulační účinek na uvolňování OT. Akutní osmotický stimulus tak blokuje oxytocinergní neurony, které jsou citlivé na působení galaninu“. V NH 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 hypotalamu a neurohypofýzy.

Naše výsledky se zvýšenou expresí mRNA GalLP po aplikaci stresu jsou v souladu s prací Shena, který našel v pituicytech NH zvýšené hodnoty exprese mRNA GalLP po dehydrataci (Shen et al., 2001; viz Suzuki et al., 2010) a Uety, který popsal

zvýšené hodnoty exprese mRNA GalLP po aplikaci endotoxinu LPS a chronického stresu. LPS stimuluje sekreci AVP a OT a aktivuje HPA osu (Ueta et al., 2004). Tyto nálezy indikují, že GalLP se podílí na sekreci neuropeptidů AVP a OT po stresu.

V dalších pokusech jsme identifikovali v NH expresi mRNA všech GalR subtypů, s nejvyšší expresí mRNA GalR2. Po stresu všechny tři subtypy GalR1, GalR2 a GalR3 reagovaly snížením exprese mRNA, nejsilnější odpověď byla u GalR1. V NH jsme také prokázali expresi obou Gal a GalLP a expresi všech tří GalR subtypů. Z našich imunohistochemických detekcí v NH vyplývá, že je Gal i GalLP kolokalizován s nervovou tkání a pituicyty a oba peptidy se vyskytují i mimo pituicyty a nervovou tkáň. Provedli jsme řadu experimentů ve snaze zjistit vzájemné kolokalizace, jak neurohypofyzárních hormonů, tak jednotlivých komponent Gal systému. Z našich výsledků vyplývá, že s oxytocinem a vasopresinem je kolokalizován Gal i GalLP. OT 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 stresu na úrovni .

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**, použité 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 určité době 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 imunofluorescenčního určení exprese sledovaných proteinů s kvantitativním vyhodnocením.

Vypracovali jsme metodu Western blot s nejmolekulárnějším turbo blotovacím zařízením.

5) Po zařazení OT mezi kardiovaskulární hormony jsme sledovali **expresi OTR a expresi mRNA 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 adenohipofýze, neurohipofýze a intermediálním laloku s identifikací exprese mRNA a exprese genů Gal, GalLP a tří subtypů GalR** za normálu a po stresu. Prokázali jsme účast tohoto systému ve stresové odpovědi..

V **adenohipofýze** jsme dále sledovali kolokalizaci Gal a GalLP s ACTH. Nalezli jsme **kolokalizaci Gal s ACTH**, zatímco kolokalizace ACTH s GalLP je pouze ojedinělá.

Určili jsme také kolokalizaci ACTH s Gal receptory.

Byly provedeny kolokalizační studie metodou dvojího imunofluorescenčního značení u neuronální tkáň, pituicytů a jednotlivých komponent Gal systému s OT a AVP.

V **neurohipofýze** potkana jsme prokázali expresi Gal a GalP mRNA a také expresi všech tří receptorových subtypů. Tento systém spolu s OT/OTR byl velmi specificky zapojen ve stresové odpovědi.

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

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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: 628-32, 2013.
- 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.
- Hökfelt T., Tatemoto K. Galanin: a multitasking neuropeptide. *EXS.* 102: 1-5, 2010. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- 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. *Journal of Physiology and Pharmacology* 58: 83-94, 2007.

- Klenerová V., Hynie S. Některé novější poznatky o signalizaci oxytocinovým receptorem. *Čs. fyziol.* 57: 76–82, 2008.
- 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.
- 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.
- McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840: 33–44, 1998. Review.
- Merchenthaler I. Galanin and the neuroendocrine axes. *EXS*, 102: 71–85, 2010. Review.
- 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.
- Peterson Z.R. and Abizaid A. Stress induced obesity: lesson from rodent models 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.
- Potter E.K., Smith-White M.A. Galanin modulates cholinergic neurotransmission in the heart. *Neuropeptides* 39: 345–348, 2005.
- 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.

- 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 neuronal interactions and/or neurosecretion. *Neuroendocrinology*. 73: 2–11, 2001.
- 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⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 273: 23321–6, 1998.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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: 677–91, 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.
- Ueta Y, Ozaki Y, Saito J. Novel G-protein coupled receptor ligands and neurohypophysial hormones. *J. Neuroendocrinol.* 16: 378-382, 2004. Review.
- Waters S.M., Krause J.E. Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 95: 265–71, 2000.
- Xu Y., Johansson O., Rökaeus A. Distribution and chromatographic analysis of galanin immunoreactivity in the heart. *Peptides* 16: 73-79, 1995.

Seznam publikací autora se vztahem k práci

a) s impakt faktorem

Skopek 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., **Skopek 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 (Suppl. 1): S123, 2012.

IF: 1,799

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. *Neuroscience Letters* 502: 147-151, 2011.

IF: 2,055

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. *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

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.

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.

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

Škopek P., Dzúr-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.

Škopek P., Dzúr-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

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

