

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**VLASTNOSTI A REGULACE MUSKARINOVÝCH A
ADRENERGNIČH RECEPTORŮ**

*Podtitul: Působení stresu na vlastnosti muskarinových a adrenergních receptorů
v plicích a srdci*

MUDr. Martina Nováková

2011

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Univerzita Karlova v Praze
Fyziologický ústav 1. LF UK
Albertov 5, Praha 2 128 00

Školitel: doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D

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 UK.

Obsah:

Souhrn v češtině.....	3
Souhrn v angličtině.....	4
Úvod.....	5
Cíle a hypotézy.....	7
Materiál a metodika	8
Výsledky	12
Diskuse.....	26
Závěry.....	36
Literatura.....	37

Zkratky

AAR	α -adrenergní receptory
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AC	adenylátcykláza
BAR	β -adrenergní receptory
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CHO	chinese hamster ovary cells
CRH	kortikotropin releasing hormon
CRH KO	vyřazení genu pro CRH, myši s vyřazeným genem pro CRH
CRH WT	wild type, kontrolní myši bez vyřazeného genu pro CRH
DAG	diacylglycerol
EPI	epibefrin - adrenalin
HPA	hypotalamus – hypofýza-adrenokortikální systém
IP ₃	inositoltrifosfát
KO	knock out: vyřazení specifického genu
MR	muskarinové receptory
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
NE	norepinefrin - noradrenalin
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
RT-PCR	reverse transcription- polymerázová řetězová reakce
PNMT	fenyletanolamin-N-metyl transferáza
WT	wild type: kontroly

Souhrn v češtině

Cílem předkládané práce bylo objasnění, zda a jakým způsobem se mění množství adrenergických a muskarinových receptorů v srdci a plicích pod vlivem stresu. K výzkumné práci jsme měli k dispozici plíce a srdce laboratorních potkanů a plíce CRH KO myši. Nejprve jsme ověřili expresi mRNA pro jednotlivé podtypy α - a β -adrenergických receptorů a pro receptory muskarinové (zde i zastoupení jednotlivých podtypů) v srdci a plicích. Následně jsme stanovili množství vazebných míst odpovídajících příslušným receptorům pomocí specifických radioligandů. V plicích potkanů jsme prokázali přítomnost všech tří podtypů α_1 -adrenergických receptorů. V plicích u WT myši se nám podařilo prokázat pohlavní rozdíly v množství α_1 -adrenergických a muskarinových receptorů, u samic byla zvýšená denzita α_1 -adrenergických receptorů oproti samcům, naopak množství vazebných míst pro muskarinové receptory bylo vyšší u samců. Pohlavní rozdíly v distribuci β -adrenergických receptorů jsme v plicích myši neprokázali. U CRH KO myši bylo množství vazebných míst pro sledované receptory sníženo oproti WT myším (vyjma β_1 -adrenergických receptorů u samic).

Hlavním záměrem práce bylo zjistit imobilizací, tj. stresem navozené změny v množství výše uvedených receptorů v plicích WT myši a současně sledovat vliv vyřazení genu pro CRH (CRH KO myši). Krátkodobá i dlouhodobá imobilizace způsobila u WT myši výrazné snížení všech podtypů α_1 -adrenergických receptorů u samic, zatímco u samců se snížilo pouze množství α_{1A} -adrenergických receptorů. Množství β_1 -adrenergických receptorů se snížilo u samců, u samic zůstalo nezměněno. Množství β_2 -adrenergických receptorů a muskarinových receptorů bylo sníženo u obou pohlaví proporcčně srovnatelně. Pokles v množství příslušných receptorů u CRH KO myši pod vlivem imobilizace byl ve srovnání s WT zvířaty méně výrazný a to především u samců. Aktivita AC byla u WT vlivem imobilizace snížena, aktivita PLC zůstala beze změn. U CRH KO myši nedošlo k žádné změně v aktivitě AC.

Dále jsme detekovali změny exprese a množství receptorů navozené působením imobilizace v srdcích u myši a potkanů.

Klíčová slova: *stres, adrenergní receptory, muskarinové receptory, CRH knockout, plíce, srdce, samice, samci*

Souhrn v angličtině

The aim of this thesis was to clarify the influence of the stress on the adrenergic and muscarinic receptors in the heart and in the lungs. Research was performed on rat hearts and lungs and on the hearts and lungs of the CRH KO mice. First, we assessed mRNA levels of all α - and β -adrenergic receptor and muscarinic receptor subtypes. Subsequently, we performed the radioligand-binding studies to determine densities of these receptors.

We identified all three α_1 -adrenergic receptor subtypes in the rat lungs. In the lungs of WT mice, we found that the amount of α_1 -adrenergic and muscarinic receptors was sex-dependent. Densities of the former were higher in females and those of the latter were higher in males. There was no difference between males and females in β -adrenergic receptor density. As for CRH KO mice, the basal densities of studied receptors were lower than in WT mice (except β_1 -adrenergic receptors in females).

The main purpose of the thesis was to detect the immobilization-induced changes in the studied receptors in the WT and CRH KO mice. Short-term and long-term immobilization caused decrease in all α_1 -adrenergic receptor subtypes in females, whereas only α_{1A} -adrenergic receptors decreased in males. The amount of β_1 -adrenergic receptors decreased in males and remained without change in females while β_2 -adrenergic receptors decreased in both sexes equally. Decrease of the receptors after the stress exposure was more striking in WT mice than in those with disrupted CRH gene. Moreover, the decrease of the receptors in CRH KO males was less prominent than in CRH KO females. Adenylyl cyclase activity was decreased in WT mice after the immobilization, the PLC activity in WT mice did not change. In CRH KO mice there was no change in AC and PLC activity.

Futhermore, we detected immobilization-induced changes in expression and amount of the receptors in the rat and murine hearts.

Keywords: *stress, adrenoceptors, muscarinic receptors, CRH knockout, lung, heart, females, males*

Úvod

Paralelní aktivace osy hypothalamus - hypofýza - adrenokortikální systém a sympatického nervového systému (včetně dřeně nadledvin) reprezentuje fyziologické základy stresové reakce [1]. Stres je fyziologickou situací (snaha po udržení homeostázy), při které dochází ke zvýšené stimulaci sympatiku a zvýšení hladiny katecholaminů v plasmě, jež mohou down-regulovat adrenoceptory. V dalším kroku dochází ke zvýšení sekrece glukokortikoidů. Vzhledem k působení stresu na signální transdukcí systém byla pozornost věnována především vlivům katecholaminů [1, 2], ale působení stresu na relevantní signální dráhy v srdci a především v plicích doposud podrobně zkoumány nebyly. Krátkodobé snížení koncentrace srdečních β -adrenoceptorů zaznamenali [1] a [3] po opakované stresové reakci. Tyto změny však nepřetrvávaly déle než 24 hodin. Působení stresu na srdeční muskarinové receptory, stejně tak jako jeho vliv na srdeční adenylcyklázu, byl poprvé popsán v naší laboratoři v roce 2004 [4].

Správná funkce srdce a plic je pro zachování života zcela nezbytná, akutní změny funkčního výstupu těchto orgánů jsou kontrolovány prostřednictvím autonomního nervového systému. Tato část nervového systému zprostředkovává své účinky cestou dvou téměř antagonisticky působících neurotransmitterových systémů: sympatického a parasympatického oddílu. Oba tyto systémy působí na periferní orgány prostřednictvím receptorů spřažených s G proteiny, sympatikus cestou adrenergních receptorů, parasympatikus přes receptory muskarinové. Adrenergní receptory mohou být rozděleny na α - a β -adrenergní [5], které se vyskytují v mnoha podtypech: α -adrenergní receptory se dělí na α_1 - a α_2 - adrenergní receptory, které se dále dělí na následující podtypy [6]: α_{1A} , α_{1B} , a α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} a α_{2C} . β -adrenergní receptory mohou být rozděleny na β_1 -, β_2 - a β_3 -adrenoceptory [7]. Muskarinové receptory se vyskytují v následujících podtypech: M_1 , M_2 , M_3 , M_4 a M_5 [8]. V plicích na úrovni dýchacích cest i alveolů výrazně převažují β_2 -adrenergní receptory jejichž aktivace vede k bronchodilataci. V menší míře se v plicích vyskytují i β_1 -adrenergní receptory, především v alveolech a na epitelových buňkách. Kolem existence podtypů α_1 -adrenergních receptorů v plicích panují nadále pochybnosti, α_2 -adrenergní receptory bezpečně identifikovány nebyly. Muskarinové receptory jsou v dýchacím systému reprezentovány M_1 , M_2 a M_3 podtypy: podtypy M_1 a M_2 převažují v dýchacích cestách, v alveolech dominuje podtyp M_3 . Receptory M_1 a M_3 působí přímo bronchokonstrikci, podtyp M_2 inhibuje bronchodilataci vyvolanou přes β_2 -adrenergní receptory.

Srdeční buňky exprimují β_1 a β_2 podtyp adrenergních receptorů, ovšem relativní množství β_1 -adrenergních receptorů je výrazně vyšší. Hlavní funkcí β -adrenergních receptorů je působit pozitivně ionotropně a chronotropně [9], [10]. V malé míře se vyskytují i receptory β_3 -adrenergní, jejichž působení je kardioinhibiční. Srdeční buňky exprimují také α_1 -adrenergní receptory [9], zastoupení jednotlivých podtypů není v současné době jednoznačně objasněno. Z funkčního hlediska jsou α_1 -adrenergní receptory schopny zvyšovat srdeční kontraktilitu i dráždivost. Muskarinové receptory jsou v myokardu savců reprezentovány především podtypem M_2 [8, 9]. Funkce zprostředkované MR jsou antagonistické k funkcím vyvolaným aktivací β -adrenergních receptorů, tj. negativně ionotropní a chronotropní. Mezi non- M_2 receptory identifikovanými do současné doby v srdci farmakologicky a/nebo elektrofyziologicky jsou nejlépe zdokumentované M_1 a M_3 podtypy (kardiostimulační efekt, sprážen s Gq/PLC) [11, 12], ačkoliv nedávné poznatky tuto skutečnost zpochybňují [13]. Nám se podařilo v srdci u laboratorního potkana detekovat populaci odpovídající M_1 muskarinovým receptorům a současně jsme prokázali výskyt dalšího minoritního podtypu, který nejspíše patří k M_5 podtypu, ale nikoliv k M_3 [14].

Senzitivita receptorů k extracelulárním působkům může být modifikována nejen jednoduše jako důsledek masivní aktivace příslušného receptorového typu (homologní regulace, viz [15]), ale také aktivací nebo inhibicí dalších receptorů exprimovaných v buňce (heterologní regulace, viz [16-18]). Existence heterologní regulace mezi adrenergními a muskarinovými receptory již byla demonstrována mnohokrát (pro přehled [18-20]). Několikrát bylo prokázáno, že v srdci jsou tyto receptory ve vzájemné funkční vazbě [21-25].

Cílené vyřazení genové exprese je stále častěji metodou užívanou k ozřejmění funkce genových produktů ve fyziologických systémech. Mezi jinými byly pomocí genové manipulace připraveny i myši, jimž chybí gen pro CRH [26, 27]. Nepřítomnost CRH vede k významnému snížení hladiny plazmatických glukokortikoidů a narušení odpovědi organismu na stresové podněty. Takto modifikovaní jedinci jsou tudíž výhodným modelem pro zkoumání změn za stresových podmínek. Porovnáním reakcí kontrolních a geneticky upravených zvířat pak lze jasně demonstrovat důsledek poruchy osy hypothalamus-hypofýza-adrenokortikální systém na průběh stresové reakce. My jsme měli k našim pokusům k dispozici plíce z CRH KO myší, dále jsme pracovali s tkáněmi laboratorních potkanů kmene Wistar.

V předkládané práci jsme se především zaměřili na změny adrenergních a muskarinových receptorů v plicích a to jak za fyziologických podmínek tak především pod vlivem

imobilizačního stresu. Na úrovni plic jsme měli možnost zkoumat i vliv narušení regulace osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny vlivem vyřazení genu pro CRH a pozorovat tak odlišnou reakci na stres u kontrolních a KO zvířat. Měli jsme k dispozici samce i samice a tudíž jsme se mohli zaměřit i na sledování případných pohlavních rozdílů. Dále jsme se zaměřili na sledování vlivu imobilizačního stresu na receptory v srdci u potkanů a myši.

Cíle a hypotézy

Hlavním cílem disertační práce bylo přispět k detailnějšímu poznání mechanismů, které regulují množství muskarinových a adrenergních receptorů v tkáni plic a srdce za fyziologických podmínek a především pod vlivem imobilizačního stresu. Dále nás zajímalo, jakým způsobem tyto změny v plicích ovlivní vyřazení genu pro CRH a bude-li možno pozorovat pohlavně vázané rozdíly.

Jednotlivé dílčí cíle disertační práce:

- a) Zjistit, které podtypy α_1 -adrenergních receptorů se vyskytují v plicích, což dosud nebylo bezpečně uzavřeno. Současně ověřit, které podtypy muskarinových a adrenergních receptorů jsou exprimovány srdeční tkání a to jednak na úrovni genové exprese (mRNA), jednak na úrovni vazby.
- a) Zjistit jakým způsobem se bude měnit množství muskarinových a adrenergních receptorů pod vlivem stresu v plicích. Obdobně nás tyto změny zajímali i na úrovni srdce, kde jsme se zaměřili i na rozdíly mezi oblastí síní a komor..
- b) Jak tyto změny v množství receptorů v plicní tkáni ovlivní nepřítomnost CRH, důležitého hormonu stresové regulační kaskády. Budou se tyto případné změny lišit v závislosti na pohlaví?

V souvislosti s těmito cíli jsme si vytýčili následující hypotézy:

- b) V plicní tkáni budeme schopni na základě vazebných studií identifikovat všechny podtypy α_1 -adrenergních receptorů.
- c) V srdeční tkáni bude možné identifikovat minoritní podtyp muskarinových receptorů a na úrovni genové exprese i β_3 -adrenergní receptory. Jednotlivé receptorové podtypy

budou mít specifickou distribuci v srdečních oblastech, genová exprese bude odpovídat množství vazebných míst.

- d) Stres bude měnit nejenom množství adrenergních receptorů, ale bude paralelně ovlivňovat i muskarinové receptory. Nitrobuněčná signalizace nebude těmito změnami významně ovlivněna.
- e) CRH ovlivní průběh stresové odpovědi, toto bude možno dokumentovat na změnách množství sledovaných receptorů

Materiál a metodika

Experimentální protokol a příprava tkáně:

S experimentálními zvířaty bylo zacházeno v souladu s legislativou České Republiky a legislativou Evropské Unie.

Potkani kmene Wistar: K experimentům byly využity tkáně z dospělých samců potkana kmene Wistar (hmotnost 200-250 g, stáří 46-55 dní). Zvířata byla chována za standardních kontrolovaných podmínek (12/12 cyklus světlo/tma, krmení a voda dle potřeby). K usmrcení došlo cervikální dislokací. Zvířata byla dekapitována, plíce vypreparovány a očištěny od velkých dýchacích cest a cév, zváženy a zhomogenizovány ve vychlazeném fyziologickém roztoku. V průběhu homogenizace byly zkumavky uchovávány na ledu. Homogenát byl následně skladován při teplotě -20 °C až do provádění vazebných experimentů. Homogenát byl rehomogenizován až těsně před přidáním tkáně do směsi radioligandu a antagonisty.

CRH KO myši: Myši s vyřazeným genem pro CRH, CRH KO myši, byly původně získány z Harvard Medical School, Ústav Endokrinologie v Bostonu a následně chovány ve vlastním zvěřinci v Bratislavě u Dr. Kvetňanského. Zvířata byla chována za kontrolovaných podmínek (12/12 cyklus světlo/tma, krmení a voda dle potřeby, teplota 22±1°C). Pro studii bylo využito 81 samců, z nich 41 WT a 40 CRH KO, a 42 samic, 21WT and 21CRH KO. Zvířata byla imobilizována ve věku 11-13 týdnů, hmotnost 20-25g. Jednalo se o jednorázovou imobilizaci trvající 120minut (model akutního stresu) nebo o 120minut trvající imobilizaci v sedmi po sobě následujících dnech (model chronického stresu). Zvířata byla dekapitována za 3h od ukončení poslední imobilizace. Plíce byly vyjmuty, očištěny, okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80°C až do provádění experimentů. Tkáně byly po rozmrazení rehomogenizovány v ledovém Tris-EDTA pufru (Tris-HCl 50 mmol/l, EDTA 2 mmol/l, pH 7.4). Během homogenizace byly tkáně uchovávány na ledu.

Vazebné studie s radioligandy:

Vazebné studie se specifickým radioligandem byly prováděny dle dříve popisovaného a publikovaného schématu [4] a [28].

Nejprve jsme stanovili K_D (disociační konstantu). Dále jsme stanovili, s ohledem na limitované množství tkáně, počet vazebných míst pomocí jedné vysoké (saturující) koncentrace radioligandu (dále viz jednobodová stanovení). Jako saturující koncentraci jsme používali přibližně desetinásobek K_D .

Saturační vazebné studie:

V preliminárních studiích jsme porovnávali vazbu v homogenátech s vazbou na membránách. Ačkoliv byla vazba na membrány srovnatelná s vazbou v homogenátech, výtěžnost (dpm/ mg původní tkáně) byla vyšší v homogenátech. Zvolili jsme tedy homogenáty, neboť množství dostupné tkáně bylo limitováno.

Zjednodušeně: množství vazebných míst odpovídajících muskarinovým receptorům (B_{max}) bylo vypočteno nelineární regresí z dat získaných saturačními experimenty s použitím 65-2000 pmol/l [3H]QNB v homogenátech plicní tkáně. Nespecifická vazba byla stanovena přidáním 5 μ mol/l atropinu. Množství vazebných míst odpovídajících α -adrenergním receptorům (B_{max}) bylo vypočteno na základě saturačních experimentů s použitím 93.75-3000 pmol/l [3H]prazosinu v homogenátech plicní tkáně. Nespecifická vazba byla stanovena přidáním 100 μ mol/l fentolaminu. Množství vazebných míst odpovídajících β -adrenergním receptorům (B_{max}) bylo vypočteno na základě saturačních experimentů s použitím 65-2000 pmol/l [3H]CGP 12177 v homogenátech plicní tkáně. Nespecifická vazba byla stanovena přidáním 5 μ mol/l propranololu. Všechny experimenty byly prováděny v duplikátech. Podrobněji viz [28, 29] a [30].

Délka inkubace: 90minut při 25°C pro [3H]prazosin, 120minut při 38°C pro [3H]QNB a 60minut při 38°C pro [3H]CGP 12177. Následovala filtrace. Použity byly filtry Whatman GF/B, které byly před použitím namočené v destilované vodě k minimalizaci nespecifické vazby. Filtrace byla provedena na přístroji Brandel cell harvester metodou trojího promytí filtrů vychlazenou destilovanou vodou. Promývání filtrů na přístroji Brandel cell harvester je extrémně rychlé a z toho důvodu nemá charakter promývacího roztoku vliv na úroveň vazby[29]. Filtry byly vysušeny přes noc a úroveň radioaktivity zachycené na filtrech byla určena měřením na scintilačním počítači metodou kapalinové scintilační spektrometrie s využitím Brayova roztoku. Množství proteinu v homogenátu bylo určeno využitím Lowryho metody. Data byla analyzována s využitím programu GraphPad Prism 3.0 (GraphPad

Software, San Diego, CA). Zjištěné hodnoty vazebné konstanty (K_D) byly následně využity ke stanovení vazebných receptorových míst v "jednobodových stanoveních" s použitím jedné, saturující, koncentrace radioligandu s ohledem na limitované množství pokusné tkáně.

Jednobodová stanovení

Homogenáty byly inkubovány s jednou saturující koncentrací specifického radioligandu (2000pmol/l [3 H]prazosinu pro α -adrenergní receptory, 2000pmol/l [3 H]CGP 12177 pro β -adrenergní receptory a 2000pmol/l [3 H]QNB pro muskarinové receptory). Hodnoty B_{max} byly vypočítány na základě vztahu $B_{max} = B \times ([L] + K_L) / [L]$, kde B značí vazbu radioligandu [fmol/mg proteinu], L je koncentrace radioligandu [fmol/l] a K_L odpovídá K_d radioligandu [fmol/l]. Všechny experimenty byly prováděny v triplicátech.

Stanovení množství vazebných míst při použití jedné vysoké koncentrace ligandu jsou podrobně popsána v publikovaných pracech [30], [28].

Stanovení podtypů α_1 -adrenergních receptorů

Cílem kompetičních studií bylo stanovit množství vazebných míst odpovídajících jednotlivým podtypům α_1 -adrenergních receptorů.

Koncentrace selektivních antagonistů pro α_{1A} -AR (RS 17053), α_{1B} -AR (L-765,314) a α_{1D} -AR (BMY7378) vhodné ke stanovení α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenergních receptorů jsme určily v předběžných kompetičních experimentech s využitím tří koncentrací radioligandu na řád. Použité koncentrace antagonistů při jednobodových stanoveních byly následující: 10^{-8} mol/l RS17053, 10^{-8} mol/l L-765, a 10^{-7} mol/l BMY7378. K určení podílu nespecifické vazby bylo přidáno 100 μ mol/l phentolaminu. Použitá koncentrace [3 H]prazosinu byla 560pmol/l. Inkubace trvala 90minut při 25°C. Experimenty byly prováděny v triplicátech.

Stanovení podtypů β -adrenergních receptorů

Koncentrace selektivních antagonistů pro β_1 -AR (CGP 20712A) a β_2 -AR (ICI 118.552) jsme určily v předběžných kompetičních experimentech s využitím tří koncentrací radioligandu na řád. Použité koncentrace antagonistů byly následující 10^{-7} mol/l CGP 20712A a 10^{-8} mol/l ICI 118.552. K určení podílu nespecifické vazby bylo přidáno 5 μ mol/l propranololu. Použitá koncentrace [3 H]CGP 12177 byla 400pmol/l. Inkubace trvala 60minut při 38°C. Experimenty byly prováděny v triplicátech.

Kompetiční studie pro podtypy muskarinových receptorů

Kompetiční studie byly provedeny s využitím radioligandu [3 H]NMS, modifikováno dle Mysliveček a kol. [31].

Homogenáty odpovídající 2 a 5 mg čerstvé tkáně na zkumavku byly inkubovány 120 min při 25°C v celkovém objemu 1 ml. Nеспецифická vazba byla stanovena přidáním 5 µmol/l atropinu. Koncentrace jednotlivých antagonistů (pirenzepine, AFDX-116, 4-DAMP, PD 102807, p-F-HHSiD, DAU 5884, AQ-RA 741, methoctramin a tripinamid) viz práce [14]. Užili jsme tři koncentrace antagonisty na řád. K blokaci M₁-MR jsme užili selektivní MT7 toxin (jed zelené mamby), který má vysokou selektivitu pro M₁ podtyp. Použili jsme dva postupy: 1) vazba [3H]NMS (2 nmol/l) v homogenátech preinkubovaných 30 min s MT7 (10⁻¹¹- 10⁻⁷ mol/l); 2) vazebná saturační studie s [3H]NMS (0.125–4 mol /l) v homogenátu preinkubovaném 30 min MT7 (10⁻⁸ mol/l). Homogenáty byly preinkubovány 60 min při 38°C, následovala inkubace s [3H]NMS po dobu 60 minut. K detekci M₅ muskarinových receptorů byla použita modifikované metoda dle Reevera (1997). Nejprve jsme ověřili vazbu 0.5 nmol/l [3H]NMS v CHO buňkách exprimujících jednotlivé lidské MR podtypy. Tkáň byla preinkubována s MT7 toxin (10⁻⁶ mol/l) a s AQ-RA 741(10⁻⁶ mol/l) k zablokování všech MR podtypů kromě M₅. Tato procedura zablokuje 99% M₁, M₂, a M₄ receptorů a 85% M₃ receptorů. Následně byly zbylé receptory detekovány 60 min inkubací s 0.5 nmol/l [3H]NMS. Vazba [3H]NMS na specifické podtypy byla detekována také s přidáním pouze samotného AQ-RA 741 (10⁻⁶ mol/l).

Jednotlivé podtypy MR byly v CHO buňkách stanoveny metodou imunoprecipitace za využití podtyp-specifických antisér.

Genová exprese

Genová exprese byla stanovována metodou RT-PCR (PCR reakce za použití reverzní transkripce). Ve stručnosti jsme odizolovali mRNA (RNABee), přepsali ji za použití reverzní transkriptázy na cDNA a při použití specifických primerů pak zjišťovali genovou expresi v přepočítanou na housekeeping gen (GAPDH). Podrobnosti o teplotách, počtu cyklů a struktuře primerů jsou uvedeny v pracích [28, 32, 33]. Proteiny byly detekovány použitím metody Western blotting.

Aktivita adenylátcyklazy a fosfolipázy C

Aktivita adenylátcyklazy byly stanovována imunoenzymatickou metodou detekce cAMP za bazálních a stimulovaných podmínek (forskolin). Jako detekčního prostředku vznikajícího cAMP jsme použili komerčně dostupného kitu (Cayman Chemicals). Podrobnosti o protokolu jsou uvedeny v práci [30]. Aktivita fosfolipázy C byla stanovována radioenzymatickou metodou dle [34]. Podrobnosti o této metodě uvádíme v práci [30].

Koncentrace adrenalinu a noradrenalinu

Koncentrace adrenalinu (EPI) a noradrenalinu (NE) v plasmě byly zjištěny metodou detekce metylovaných produktů epinefrinu a norepinefrinu s využitím scintilační spektrometrie [35].

Krev byla získána exsanguinací po dekapitaci zvířete. Jedná se o metodu rutinně používanou v laboratoři dr. Kvetňanského [36].

Výsledky

Zastoupení podtypů α_1 -adrenergických receptorů v plicích

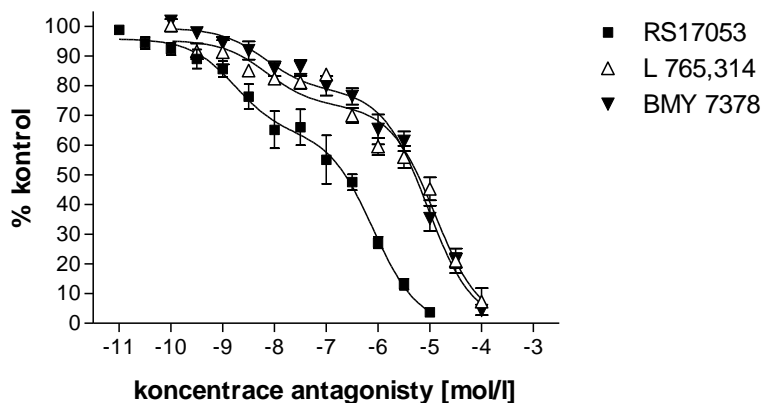
Provedli jsme sadu kompetičních vazebných studií s [³H]prazosinem (560 pmol/l) a využitím selektivních antagonistů pro α_{1A} (RS 17053), α_{1B} (L-765,314) a α_{1D} (BMY7378) s cílem detekovat vazebná místa odpovídající příslušným podtypům α_1 -adrenergických receptorů v plicích potkana a stanovit jejich poměrné zastoupení v plicích.

Použití antagonisté vykazovali specifickou vysokoafinní vazbu a jejich vazebné parametry odpovídaly hodnotám pro klonované α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -adrenergní podtypy (pKB1, viz Tab. 1.). Naše experimenty prokázaly v plicích potkanů výskyt tří vazebných míst pro [³H]prazosin, tj. specifictí antagonisté kompetovali s [³H]prazosinem s charakteristickou bifázickou křivkou (viz Graf. 1). Toto zjištění podporuje teorii o existenci všech tří podtypů α_1 -adrenergických receptorů v této tkáni: α_{1A} -, α_{1B} - a α_{1D} -podtypů adrenergických receptorů. Jednotlivé hodnoty pKB1 a pKB2 jsou zaznamenány v tabulce (viz Tab 1.).

Antagonista	Frakce 1 (%)	pKB1	pKB2
RS 17053	32.72 ± 3.49	9.76 ± 0.29	6.85 ± 0.16
L-765,314	23.06 ± 2.83	9.28 ± 0.29	5.79 ± 0.25
BMY 7378	21.07 ± 2.47	9.37 ± 0.25	5.90 ± 0.39

Tabulka 1. Afinity a frakce vzešlé z kompetiční vazebné studie. Data ze tří nezávislých studií provedených v triplikátech jsou v tabulce zanesena jako střední hodnoty ± S.E.M.

Podtypy α_1 -adrenergických receptorů v plicích



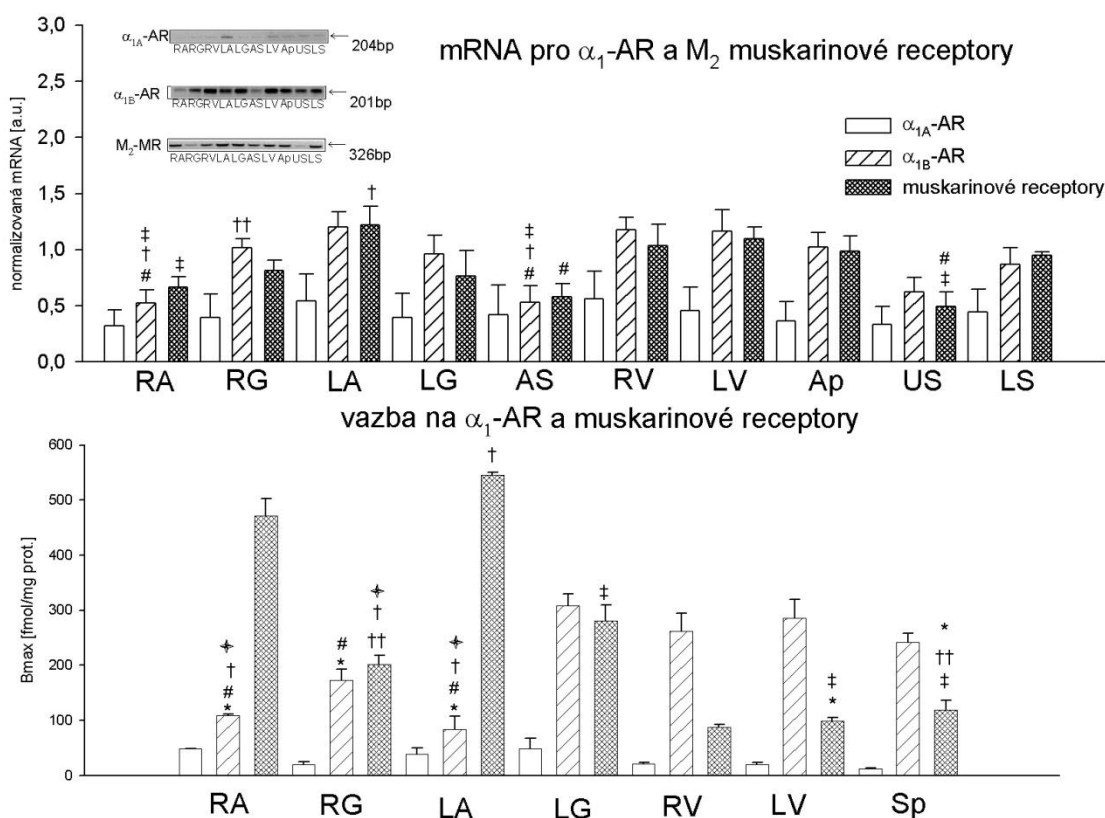
Graf 1: Kompetiční vazebné studie s [3 H]prazosinem a specifickými antagonisty. Data ze tří nezávislých experimentů vyjádřena jako střední hodnota \pm S.E.M. Osa x: společný log koncentrace antagonisty (c_{comp}) v mol/l. Osa Y: procento celkové vazby. Vysvětlivky součástí grafu.

Zastoupení receptorů pro ANS v srdci

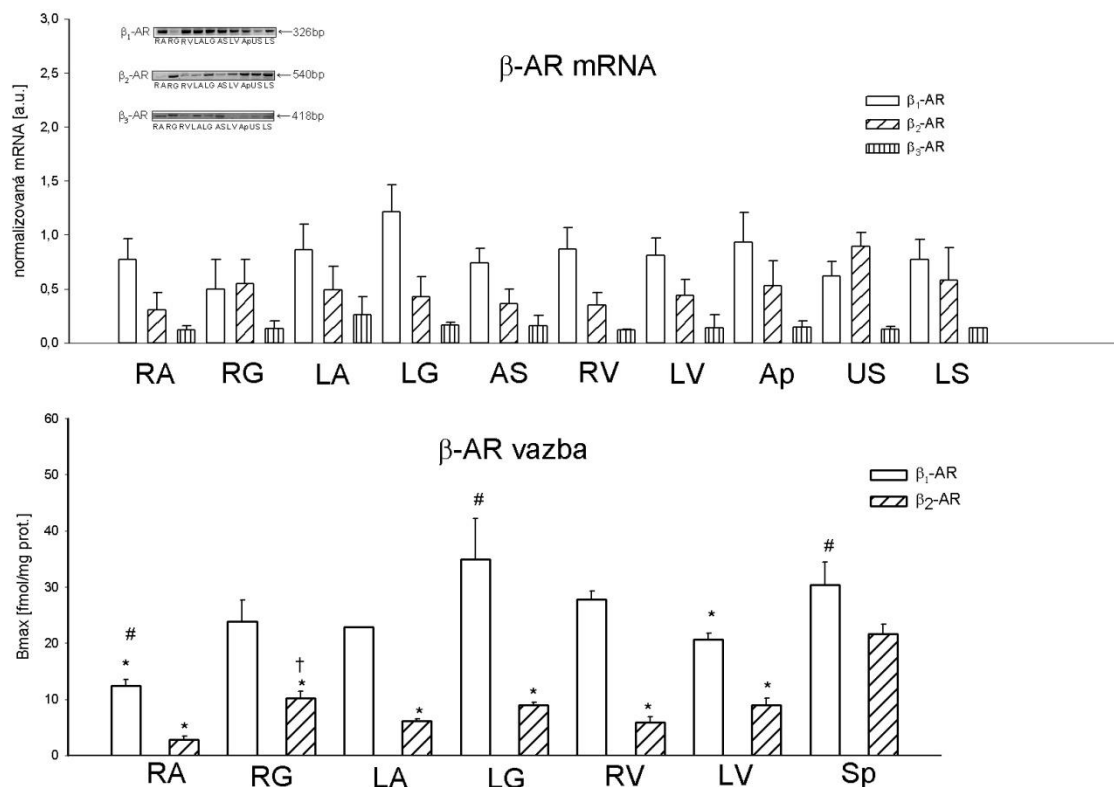
Stanovily jsme množství mRNA a následně provedly vazebné studie pro α_{1A} - a α_{1B} -AR, β_1 , β_2 a β_3 -adrenergní receptory a muskarinové receptory. Srdce jsme rozdělili do následujících oddílů: levá síň ganglionární, levá síň aganglionární, pravá síň ganglionární, pravá síň aganglionární, pravá komora, levá komora, horní oddíl komorového septa, dolní oddíl komorového septa, síňové septum a apex. Největší množství mRNA pro M_2 muskarinové receptory bylo exprimováno v části levé síně bez neuronálních ganglií (nicméně množství mRNA v komorách je pouze nepatrně menší). V této oblasti odpovídá množství mRNA pro M_2 muskarinové receptory hustotě vazebných míst a jedná se o oblast s nejvyšší hustotou vazebných receptorových míst pro muskarinové ligandy v srdci. Menší množství mRNA pro M_2 muskarinové receptory je exprimováno v levé síni, v části bohaté na gangliové buňky, což je v souladu s hustotou vazebných míst v této oblasti. Ačkoliv se množství mRNA M_2 muskarinových receptorů příliš nelišilo v srdečních komorách a síních, hustota vazebných míst byla vyšší v levých síních (v části bez nervových ganglií), než v komorách. Třeba, že jsme nezjistili žádný rozdíl v expresi mRNA pro β_1 - a β_2 -adrenergní receptory mezi jednotlivými srdečními oddíly, vazba na tyto receptory, zjištěná pomocí radioligandu, se mezi jednotlivými srdečními oblastmi lišila. To platí především pro β_2 -adrenergní receptory: mRNA pro tyto receptory byla téměř rovnoměrně exprimována v jednotlivých srdečních

oblastech, nicméně množství funkční receptorové bílkoviny (zjišťováno vazebnou studií) bylo nejvyšší v oblasti komorového septa.

Distribuce β_1 - a β_2 -adrenergní receptorové mRNA se mezi jednotlivými srdečními oddíly nelišila, zatímco vazba odpovídající příslušným receptorům v jednotlivých sledovaných srdečních oblastech srdce rozdílná byla. Množství mRNA pro α_{1B} -receptory se mezi jednotlivými oddíly lišila nespecificky, bez jasného trendu. Také množství receptorových vazebných míst pro α_{1B} -receptory se v jednotlivých srdečních oddílech lišila. Především v oblasti síní nekorespondovala s rozdíly v množství mRNA. Množství mRNA pro α_{1A} - a β_3 -adrenergní receptory měla podobnou distribuci v jednotlivých oblastech srdce, které jsme v rámci našeho experimentu použili.



Graf 3: Distribuce mRNA a vazebných míst pro α_{1A} -AR, α_{1B} -AR a M_2 MR v jednotlivých srdečních oddílech: RA – pravé síně bez gangliových buněk; RG – pravé síně bohaté na gangliové buňky; LA – levé síně bez gangliových buněk; LG – levé síně bohaté na gangliové buňky; RV – pravá komora; LV – levá komora; Sp – septum; Ap – apex; US – horní septum; LS – dolní septum. Data jsou vyjádřena jako střední hodnota \pm S.E.M. a jsou průměrem z pěti experimentů. Připojeny jsou příklady elektroforesy se specifickými α_{1A} -AR, α_{1B} -AR a M_2 MR primery. Horní graf: distribuce mRNA pro příslušné receptory; Dolní graf: množství vazebných míst pro příslušné receptory – legenda viz graf. *Signifikantní rozdíl vs LG. # Signifikantní rozdíl vs LV. † Signifikantní rozdíl vs RV. †† Signifikantní rozdíl vs RA. Signifikantní rozdíl vs Sp. ‡ Signifikantní rozdíl vs LA.



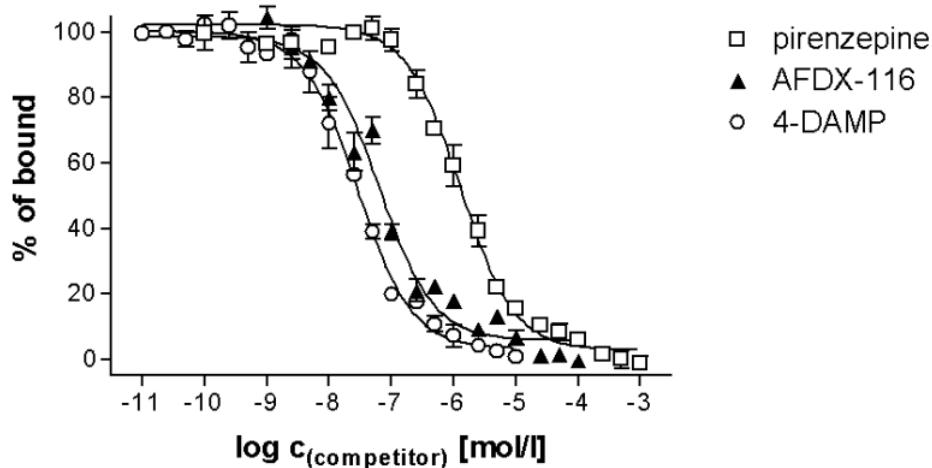
Graf 4: Distribuce mRNA a vazebných míst pro β_1 -AR a β_2 -AR v jednotlivých srdečních oddílech: RA – pravé síně bez gangliových buněk; RG – pravé síně bohaté na gangliové buňky; LA – levé síně bez gangliových buněk; LG – levé síně bohaté na gangliové buňky; RV – pravá komora; LV – levá komora; Sp – septum; Ap – apex; US – horní septum; LS – dolní septum. Data jsou vyjádřena jako střední hodnota \pm S.E.M. a jsou průměrem z pěti experimentů. Připojeny jsou příklady elektroforesy se specifickými β_1 -AR a β_2 -AR primery. Horní graf: distribuce mRNA pro příslušné receptory; Dolní graf: množství vazebných míst pro příslušné receptory – legenda viz graf. *Signifikantní rozdíl vs septum. # Signifikantní rozdíl vs LV. † Signifikantní rozdíl vs RA.

Non-M₂ muskarinové receptory v srdci potkanů

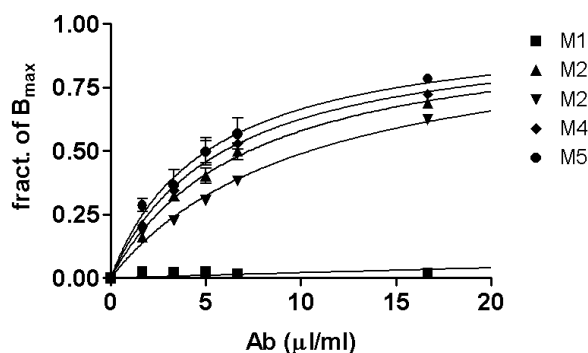
Naším cílem bylo stanovit non-M₂ muskarinové receptory v srdečních síních a komorách potkanů. Použili jsme více postupů: kompetiční vazbené studie s [3H]NMS a jednotlivými antagonisty: pirenzepin, AFDX-116, 4-DAMP, PD 102807, p-F-HHSiD, AQ-RA 741, DAU 5884, methoctramin a tripinamid. Dále blokování M₁ muskarinového receptoru MT7 toxinem, imunoprecipitační metody ke stanovení jednotlivých podtypů v CHO buňkách a stanovení aktivity fosfolipázy C. Další metodou bylo blokování M₁-M₄ muskarinových receptorů s využitím kombinace MT7 toxinu a AQ-RA 741.

Naše data ukazují, že v síních je exprimován pouze M₂-muskarinový receptor. Nicméně v komorách jsme byli schopni determinovat 20% z celkové vazby na muskarinové receptory, které neodpovídali podtypu M₂. V naprosté většině patřili tyto receptory k M₁ podtypu. Dále jsme byly schopni detekovat okrajovou frakci receptorů (6 \pm 2%), které patřili především k M₅

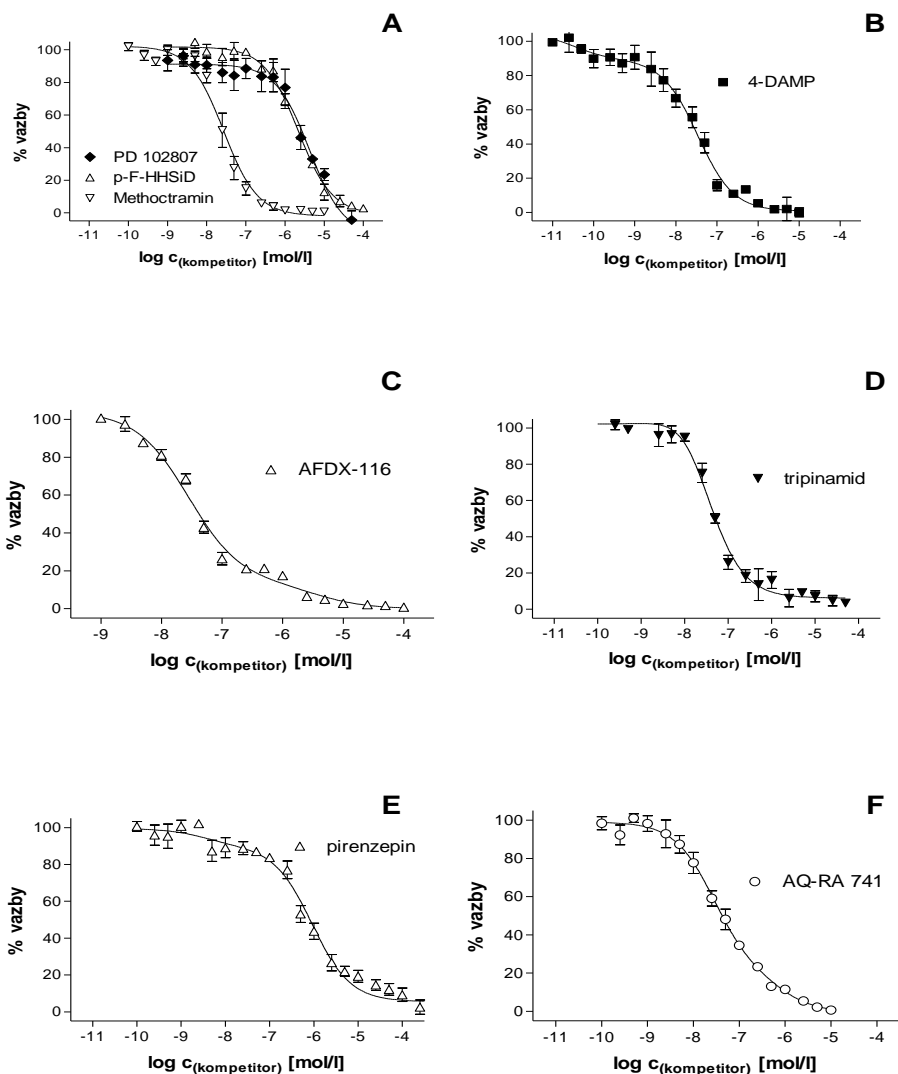
podtypu. Použití kombinace MT7 toxinu a AQ-RA741 nebyl dostatečnou metodou k zablokování M_1 - M_4 receptorů a není tedy vhodnou metodou detekce M_5 muskarinových receptorů jako náhrada za nepurifikovaný jed mamby zelené.



Graf 5: Kompetiční vazebná studie s $[3H]NMS$ a jednotlivými antagonisty v síních potkanů. Data pocházejí ze tří nezávislých experimentů, tkáně ze zvířat byly smíchány. Data jsou prezentována jako střední hodnoty \pm S.E.M. Osa X: obecný logaritmus koncentrace antagonisty v mol/l. Osa Y: procenta celkové vazby



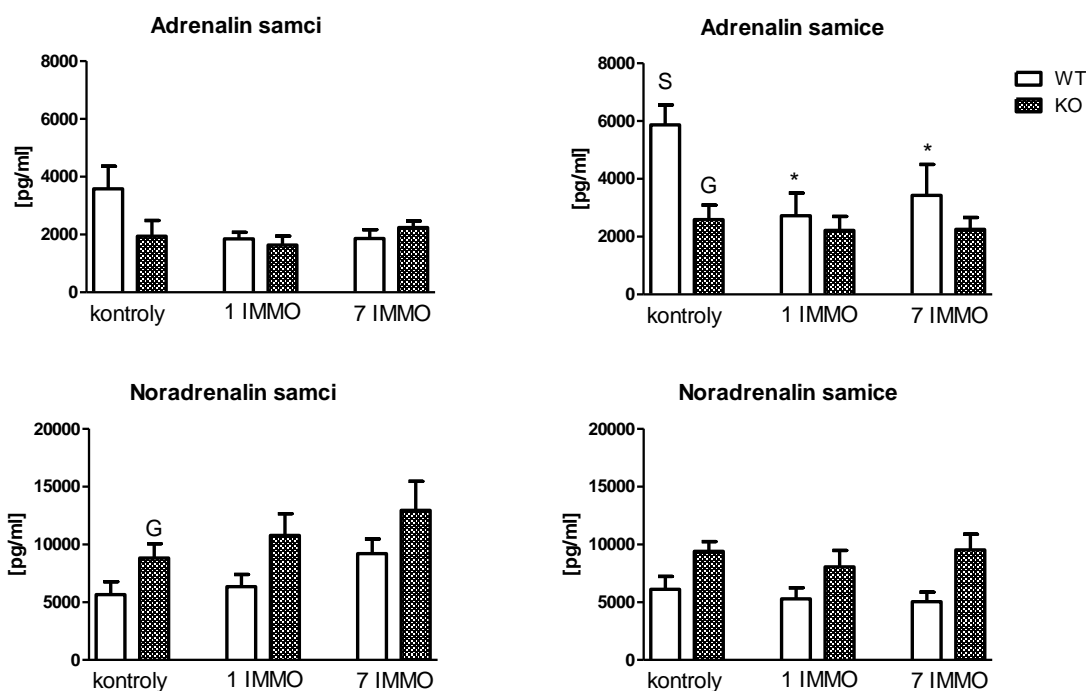
Graf 6: Výsledky imunoprecipitace (receptory izolované z CHO buněk tranfektovaných podtypy muskarinových receptorů). Při koncentraci $5 \mu\text{l/ml}$ (koncentrace užitá pro srdeční receptorovou imunoprecipitaci): anti-M2 protilátka precipitovala 41%, anti-M3 32%, anti-M4 45% a anti-M5 50% receptorů. $[3H]QNB$ bylo užit jako radioligad.



Graf 7: Kompetiční vazebná studie s $[3H]NMS$ a jednotlivými antagonisty v komorách potkanů. Data pocházejí ze pěti nezávislých experimentů, tkáň ze zvířat byly smíchány. Data jsou prezentována jako střední hodnoty \pm S.E.M. A: kompetiční vazebné křivky antagonistů, které vykazovaly pouze jedno vazebné místo. B-F: kompetiční vazebné křivky antagonistů, které vykazovaly dvě vazebná místa. Osa X: obecný logaritmus koncentrace antagonisty v mol/l. Osa Y: procenta celkové vazby

Vliv stresu v plicích a srdci, význam vyřazení genu pro CRH ve stresové reakci

Koncentrace adrenalinu byla u WT myši vyšší než u CRH KO myši a to především u samic. U WT myši se po jednorázové imobilizaci zvyšovala koncentrace adrenalinu, u CRH KO myši se koncentrace adrenalinu po imobilizaci neměnila.



Graf 8: Plazmatické koncentrace adrenalinu a noradrenalinu u WT a CRH KO myších samic a samců za klidových podmínek a po expozici jednorázovému (1IMMO) a chronickému imobilizačnímu stresu (7 IMMO). Vlevo: koncentrace adrenalinu a noradrenalinu u samců. Vpravo: koncentrace adrenalinu a noradrenalinu u samic. * $p < 0.05$ vs WT myši; S, $p < 0.05$ vs druhé pohlaví (označeno pouze u samic); G, $p < 0.05$ vs druhý fenotyp; $n = 6-8$ ve skupině.

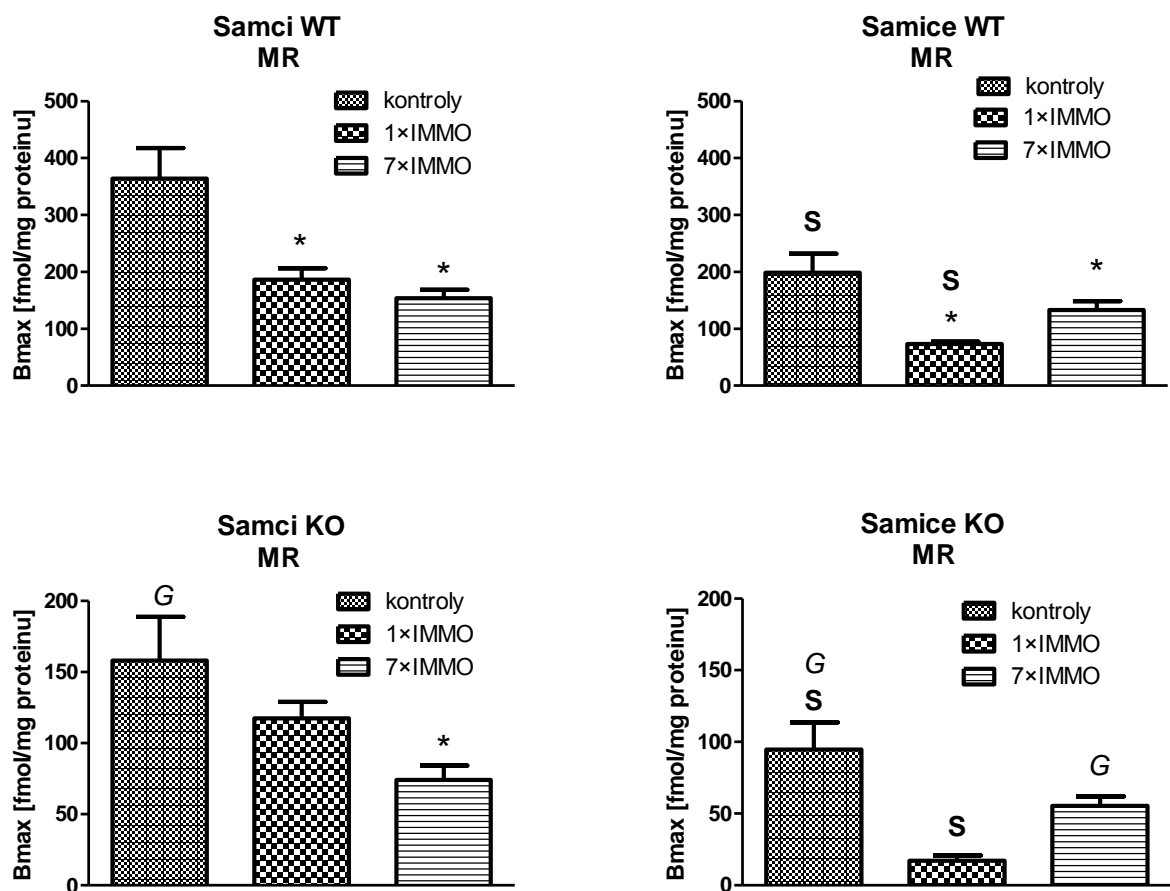
V plicích u intaktních WT myši jsme našli pohlavní rozdíly v množství α_1 -adrenergních a muskarinových receptorů. U samic byla zvýšená denzita α_1 -adrenergních receptorů oproti samcům, naopak množství vazebných míst pro muskarinové receptory bylo vyšší u samců. Pohlavní rozdíly v distribuci β -adrenergních receptorů jsme v plicích intaktních WT myši neprokázali. Stresová reakce způsobila následující rozdílné reakce u samců a samic WT myši: u samců se snižovaly α_{1A} -AR, β_1 -AR a MR, u samic však nastala mnohem komplexnější reakce: došlo ke snížení α_{1A} -AR, α_{1B} -AR, α_{1D} -AR, β_2 -AR a MR. β_1 -AR nebyly u samic WT myši stresem ovlivněny.

Intaktní CRH KO myši mají celkově méně receptorových vazebných míst, než WT myši, což platí pro všechny receptory, které jsme sledovali (u samic je větší množství vazebných receptorových míst než u samců). Chybějící nebo snížená receptorová reakce na stres u KO myši by mohla být v první řadě odrazem nižšího bazálního množství receptorů. Tento rozdíl v množství receptorů zhruba proporčně odpovídá poklesu v množství receptorů pod vlivem stresu u WT myši.

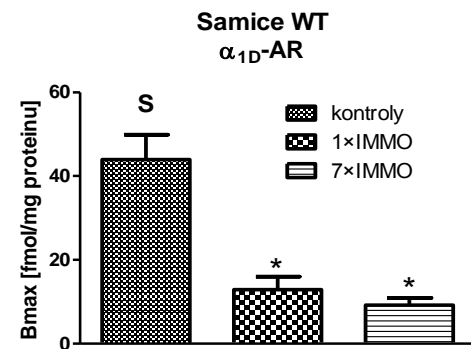
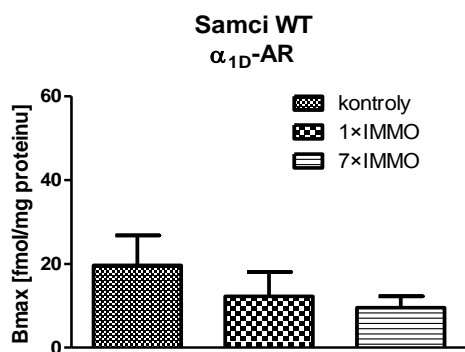
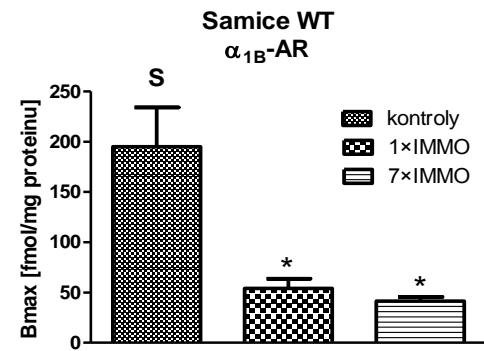
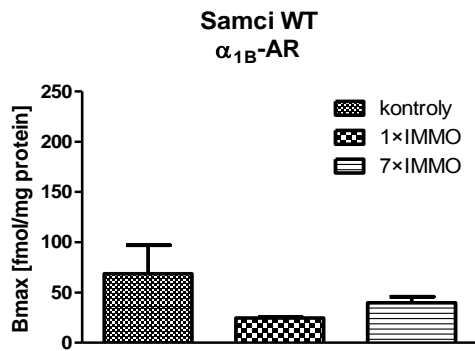
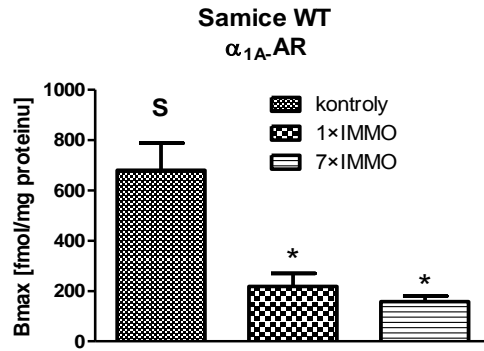
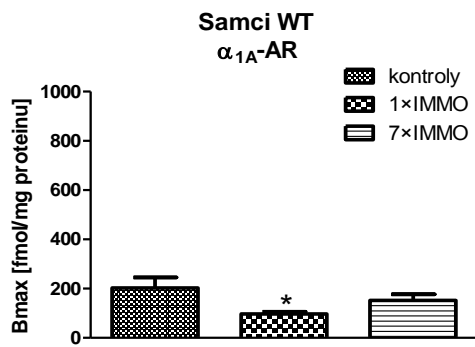
Změny u CRH KO myši vlivem stresu byly následující: α_{1A} -AR a β_2 -AR byly u samic CRH KO myši sníženy vlivem stresu (sníženy na přibližně polovinu) a to více než β_1 -AR. α_{1B} -AR,

α_{1D} -AR u samic CRH KO myši stresem ovlivněny nebyly na rozdíl od WT samic. Zatímco β_1 -adrenergní receptory se u samic CRH KO myši neměnily, snižovaly se u samců až na 62%. β_2 -AR byly sníženy u samců i samic CRH KO myši – u samic byla míra snížení ve srovnání s WT samicemi menší a nebyla signifikantní po opakovaných imobilizacích. U samců byl pokles β_2 -AR srovnatelný s WT skupinou.

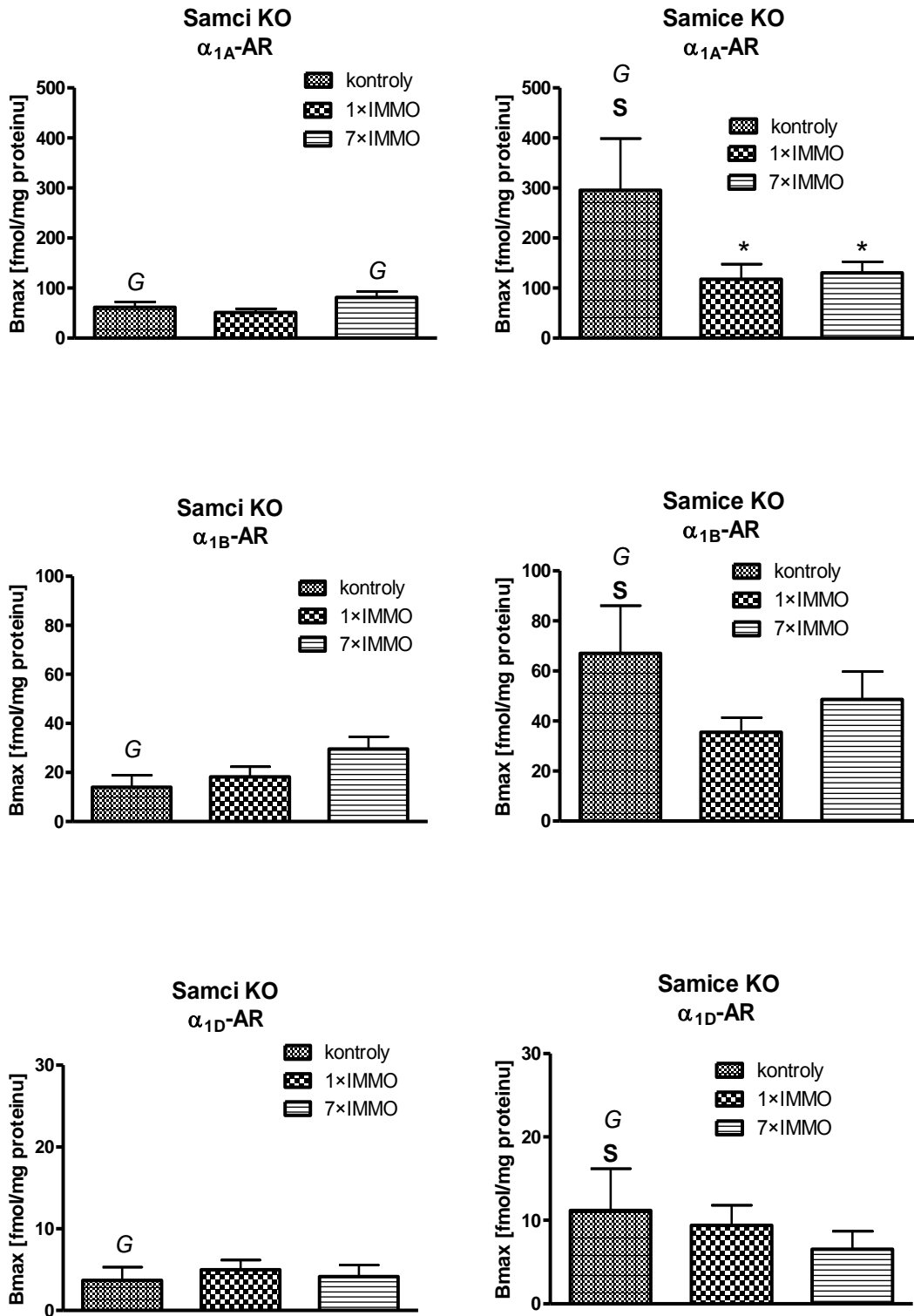
U CRH KO myši došlo ke snížení MR pouze po opakových imobilizacích.



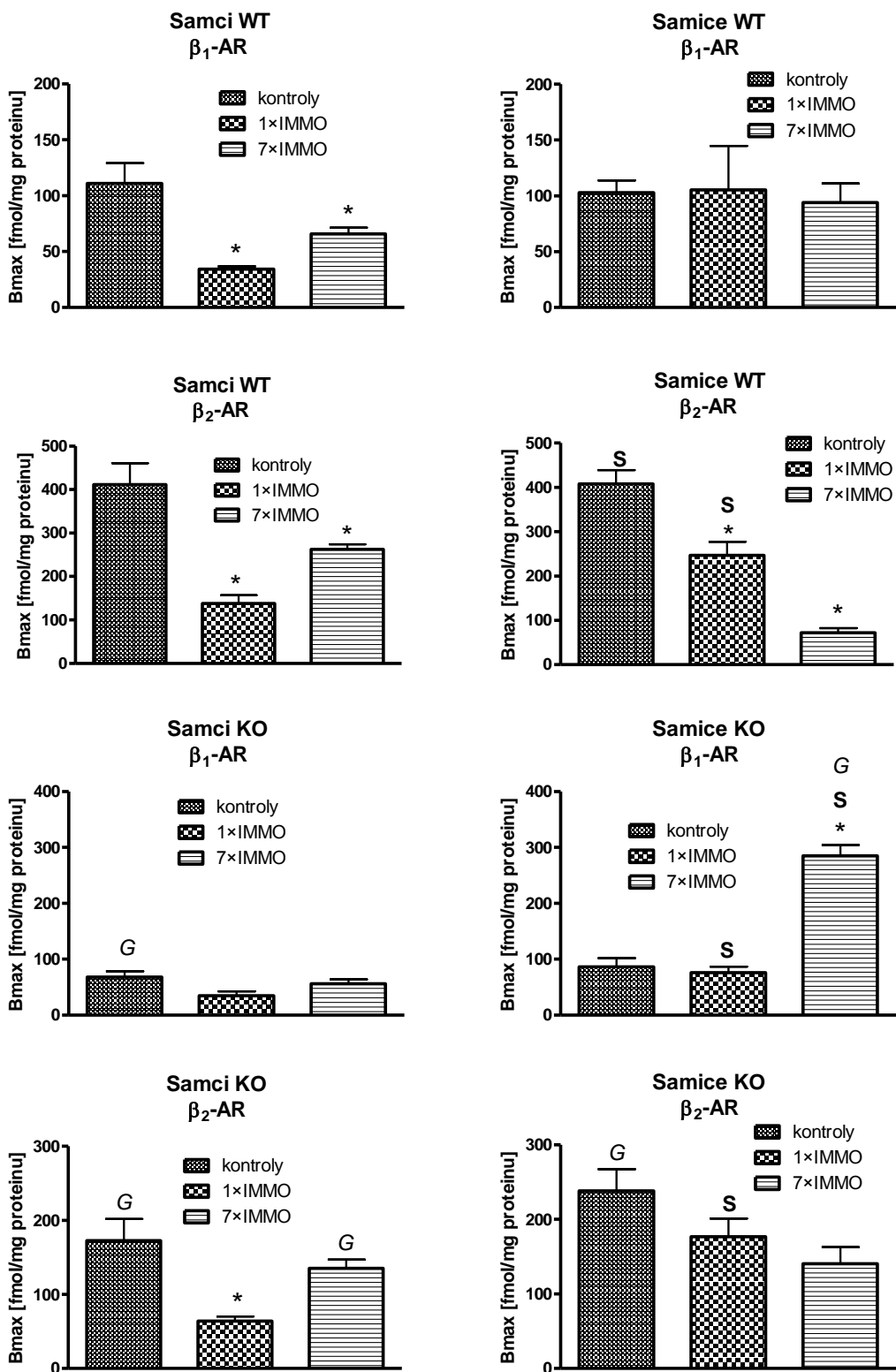
Graf 9: Změny v množství muskarinových receptorů v plicích WT a KO myši. Vlevo: samci, vpravo: samice. Legenda: kontrola – intaktní myši; 1xIMMO – myši vystavené jednorázové imobilizaci; 7xIMMO – myši vystavené sedminásobné imobilizaci; * $p < 0.05$ vs WT myši; S, $p < 0.05$ vs druhé pohlaví (označeno pouze u samic); G, $p < 0.05$ vs druhý fenotyp; $n = 5-7$ zvířat ve skupině.



Graf 10: Změny v množství α_1 -adrenergických receptorů (α_{1A} -AR, α_{1B} -AR, α_{1D} -AR) v plicích WT myši. Vlevo: samci. Vpravo: samice. Legenda: kontrola – intaktní myši; 1xIMMO – myši vystavené jednorázové imobilizaci; 7xIMMO – myši vystavené sedminásobné imobilizaci; *p < 0.05 vs WT myši; S, p < 0.05 vs druhé pohlaví (označeno pouze u samic); n = 5 zvířat ve skupině.



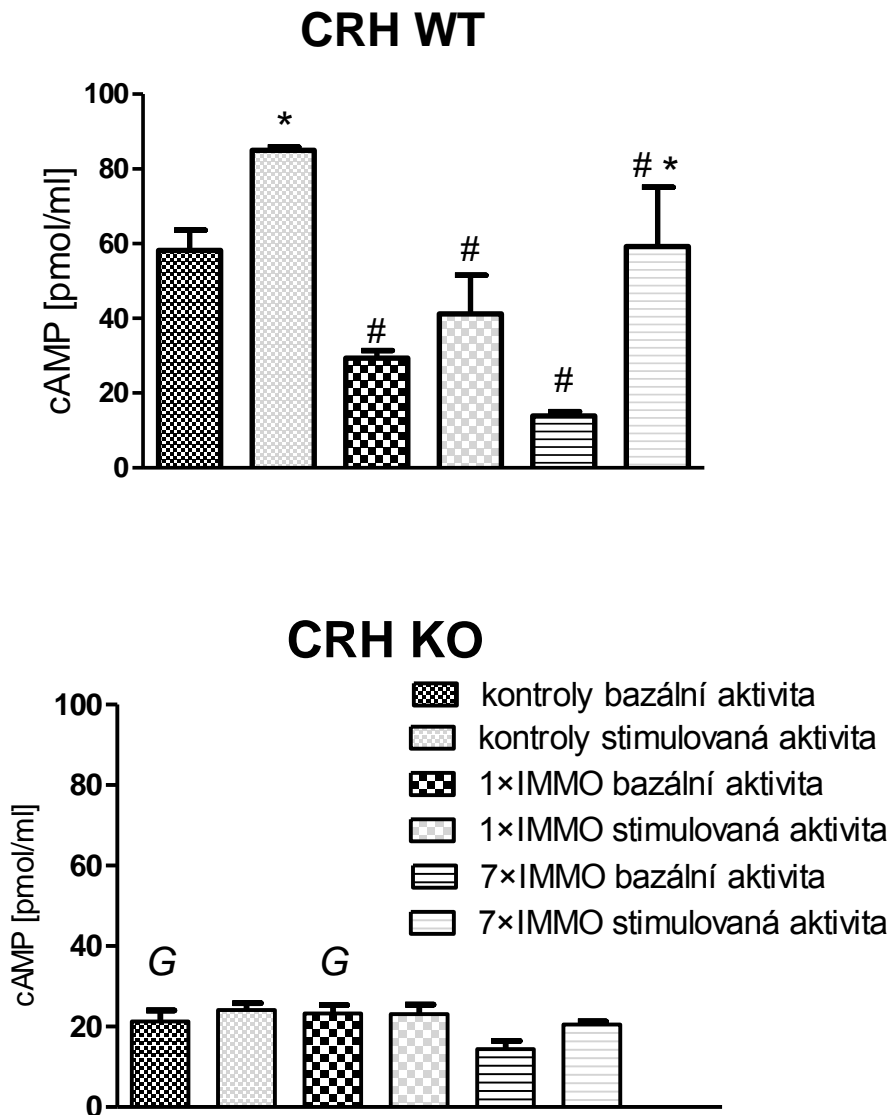
Graf 11: Změny v množství α_1 -adrenergických receptorů (α_{1A} -AR, α_{1B} -AR, α_{1D} -AR) v plicích KO myši. Vlevo: samci, vpravo: samice. Legenda: kontroly – intaktní myši; 1xIMMO – myši vystavené jednorázové imobilizaci; 7xIMMO – myši vystavené sedminásobné imobilizaci; * $p < 0.05$ vs WT myši; S, $p < 0.05$ vs druhé pohlaví (označeno pouze u samic); G, $p < 0.05$ vs druhý fenotyp; $n = 5$ zvířat ve skupině.



Graf 12: Změny v množství β_1 -AR a β_2 -AR v plicích WT a KO myši. Vlevo: samci, vpravo: samice. Legenda: kontroly – intaktní myši; 1xIMMO – myši vystavené jednorázové imobilizaci; 7xIMMO – myši vystavené sedminásobné imobilizaci; * $p < 0.05$ vs WT myši; S, $p < 0.05$ vs druhé pohlaví (označeno pouze u samic); G, $p < 0.05$ vs druhý fenotyp; $n = 5-7$ zvířat ve skupině.

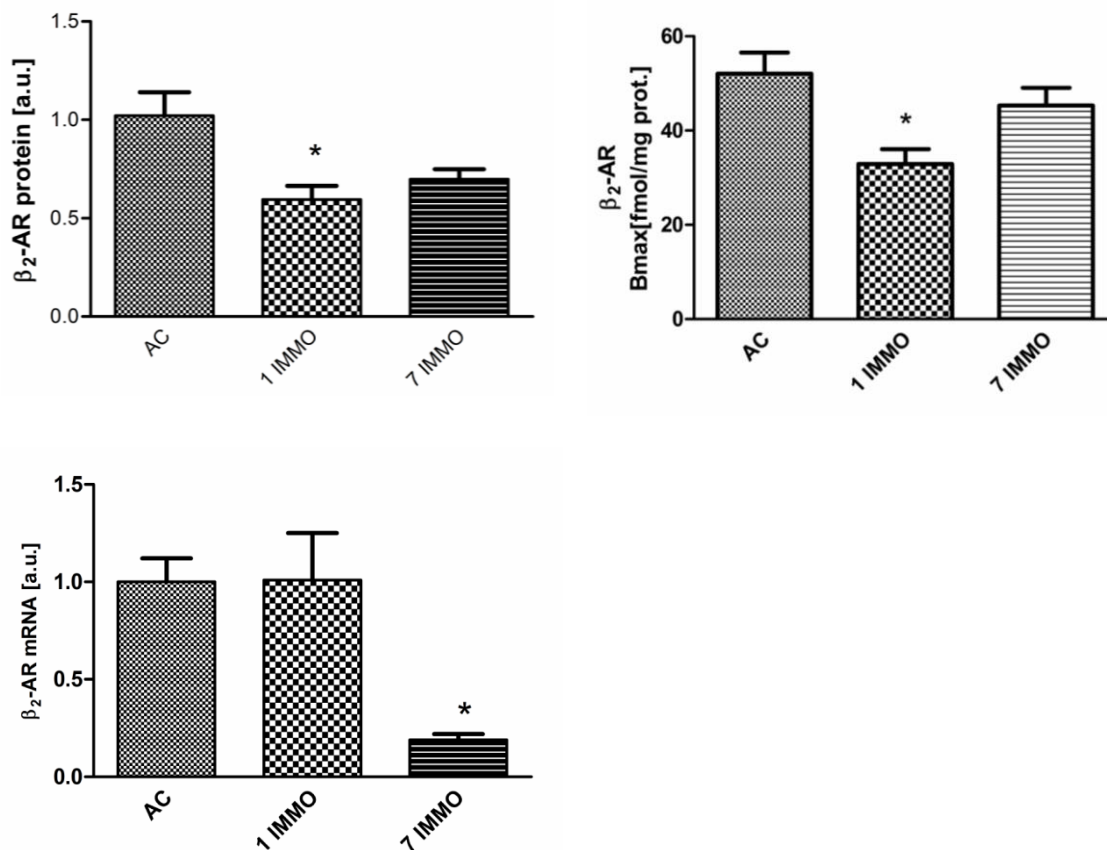
Bazální množství cAMP se snižovalo u WT myši po jednorázové i opakované imobilizaci. Forskolinem stimulovaná aktivita AC se snižovala vlivem jednorázového i opakovaného imobilizačního stresu. U CRH KO myši byl kompletně potlačen stimulační efekt forskolinu na aktivitu AC a stejně tak inhibiční efekt imobilizace na koncentraci cAMP.

Imobilizační stres nevykazoval žádný vliv na aktivitu PLC v obou skupinách myši, t.j. u WT i CRH KO myši.

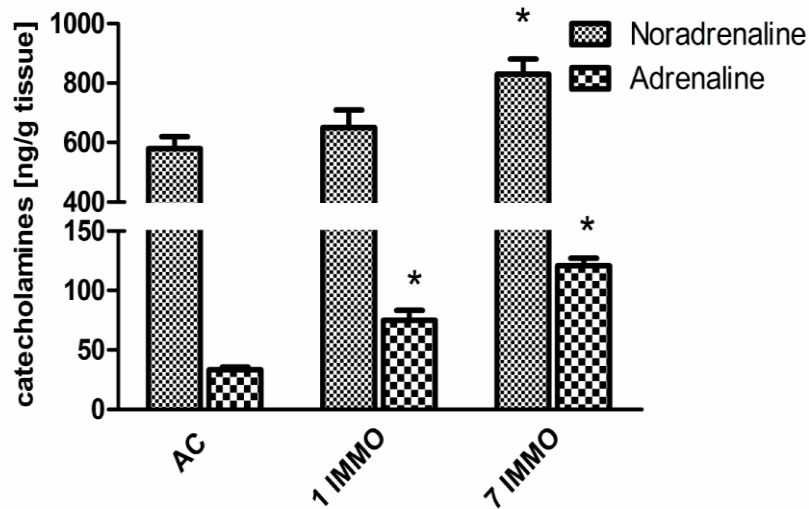


Graf 12: Změny v bazální koncentraci cAMP a aktivitě AC (stimulovaná 40 $\mu\text{mol/l}$ forskolinu) v plicích myši. #p < 0.05 vs příslušné kontroly (bazální vs bazální; stimulovaná vs stimulovaná); *p < 0.05 vs bazální; G, p < 0.05 vs druhý fenotyp (WT myši); n = 5-6 zvířat ve skupině.

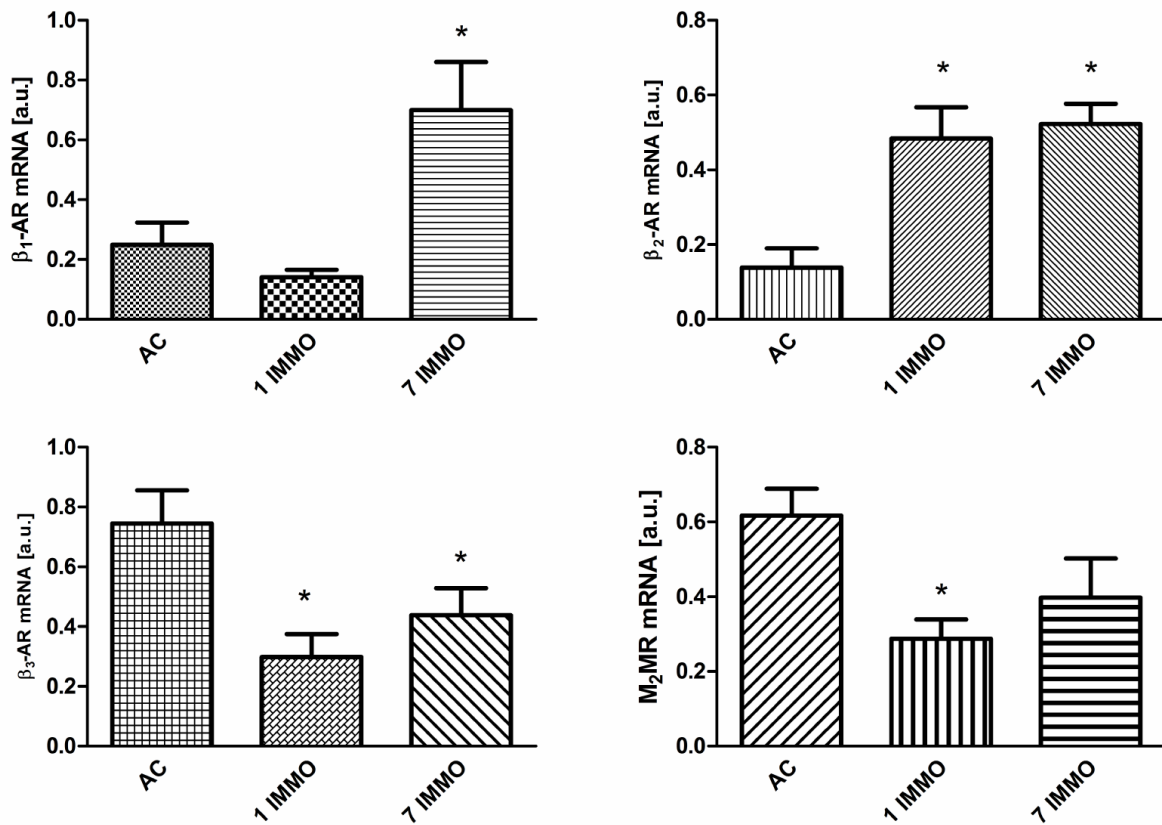
Detekovali jsme změny v množství β -adrenergických a muskarinových receptorů v srdci myší a potkanů pod vlivem imobilizačního stresu. Stanoveny byly koncentrace tkáňových katecholaminů a změny β_2 -AR na úrovni mRNA, množství proteinu i vazebných míst pod vlivem imobilizačního stresu v pravých komorách. V pravých síních byly sledovány změny na úrovni mRNA pro β_1 -, β_2 -, a β_3 -AR a muskarinové receptory. Množství tkáňových katecholaminů bylo zvýšeno a současně došlo ke snížení množství mRNA, proteinu i vazebných míst pro β_2 -AR v pravých komorách. Genová exprese β_1 - a β_2 -AR byla zvýšena v pravých síních, zatímco množství mRNA pro β_3 -AR a MR bylo sníženo.



Graf 13: Změny v množství mRNA, proteinu a vazebných míst (Bmax) pro β_2 -AR v pravých komorách potkanů vystavených imobilizačnímu stresu. AC – kontroly; 1 IMMO – jednorázová imobilizace; 7 IMMO – sedminásobná imobilizace. * $p < 0.05$ vs kontroly



Graf 14: Změny v množství tkáňových catecholaminů v pravých komorách potkanů vystavených imobilizačnímu stresu. AC – kontroly; 1 IMMO – jednorázová imobilizace; 7 IMMO – sedminásobná imobilizace. * $p < 0.05$ vs kontroly



Graf 15: Změny v množství mRNA β_1 -, β_2 -, a β_3 -AR a M₂-muskarinové receptory v pravých síních myši vystavených imobilizačnímu stresu. AC – kontroly; 1 IMMO – jednorázová imobilizace; 7 IMMO – sedminásobná imobilizace. * $p < 0.05$ vs kontroly

Diskuse

Z výsledků našich experimentálních prací lze shrnout, že se nám podařilo identifikovat všechny podtypy α_1 -adrenergních receptorů v plicích, identifikovat podtypy muskarinových receptorů v srdci včetně charakteristiky non- M_2 podtypů, a popsat distribuci mRNA pro příslušné receptory. Tato základní charakteristika receptorů a především zkoumání a porovnání jejich změn u stresovaných zvířat a kontrol nám umožnila některé nové nálezy, které ve známé literatuře dosud popsány nebyly. Za nejdůležitější zjištění považujeme, že se adrenergní a muskarinové receptory mění v plicích vlivem stresu, přičemž jsme prokázali jejich pohlavní závislost a nezbytnost přítomnosti CRH pro adekvátní průběh stresové reakce. Dále jsme prokázali i změny adrenergních a muskarinových receptorů v srdci pod vlivem stresu.

Pokud tyto závěry konfrontujeme s našimi hypotézami, které jsme stanovili v úvodu, pak lze konstatovat, že hypotéza o přítomnosti všech α_1 -adrenergních receptorových podtypů v plicích byla potvrzena. Navíc je třeba zdůraznit, že právě potvrzení přítomnosti všech těchto podtypů nám umožnilo, abychom se dále zabývali jejich významem ve stresové reakci. To se ukázalo jako významné ve stresové reakci v plicích, kde podtypy α_1 -adrenergních receptorů hrají zřejmě významnou úlohu. Mimoto jsme také zjistili významné rozdíly v množství vazebných míst mezi samci a samicemi, což by mohlo vzhledem k pohlavním rozdílům ve výskytu astmatu hrát možnou roli v patogenezi vzniku tohoto onemocnění. Hypotéza b) se v zásadě potvrdila: minoritní muskarinový podtyp se nám podařilo v srdečních komorách identifikovat, stejně jako na úrovni genové exprese zaznamenat přítomnost β_3 -adrenergních receptorů. Závislost mezi genovou expresí a vazbou na receptory existovala, i když ve všech oblastech zcela nekorespondovalo množství vazebných míst s mírou genové exprese. Zastoupení receptorových typů i podtypů se lišilo podle srdečních oblastí. Tento popis distribuce nám umožnil identifikovat oblasti srdce, u kterých jsme podrobně sledovali stresovou reakci. Tato reakce se lišila dle oblastí srdečních. Ukázalo se také, že i zde hrají důležitou úlohu α_1 -adrenergní receptory. Výsledky sledování vlivu stresu na receptory v plicích potvrdily naše hypotézy: stres nepůsobil pouze na adrenergní receptory, ale ovlivňoval i muskarinové receptory (hypotéza c) a vyřazení genu pro CRH mělo vliv na stresovou odpověď (hypotéza d). Kromě těchto zjištění jsme našli i významné rozdíly ve změnách množství příslušných receptorů mezi samci a samicemi a to jak za u kontrol, tak především u zvířat s vyřazeným genem pro CRH. Toto zjištění by mohlo mít význam

v patogenezi různých onemocnění, např. astmatu, onemocnění bezpochyby spojeného se stresovou reakcí.

α_1 -adrenergní receptory v plicích potkanů:

Naše výsledky, které prokazují tři podtypy α_1 -adrenergních vazebných míst pro [^3H]prazosin v plicích, podporují teorii o existenci všech tří podtypů α_1 -adrenergních receptorů v této tkáni: α_{1A} -, α_{1B} - a α_{1D} -podtypů adrenergních receptorů.

Je třeba zmínit, že množství vazebných míst s nízkou afinitou (pK_{B2}) poukazuje na suspektní výskyt většího množství vazebných míst s obdobnými vazebnými charakteristikami. Jinak řečeno, tato skutečnost svědčí pro existence jednoho vazebného místa s vysokou afinitou a současně dalšího vazebného místa s nízkou afinitou, které je nejspíše směsí dvou dalších podtypů α_1 -adrenergních receptorů. Dále zde existují další vazebná místa pro ^3H -prazosin, která nelze identifikovat za pomoci α_1 antagonistů (viz. Tab. 1.). Tuto skutečnost by mohlo vysvětlovat, že [^3H]prazosin se současně minimálně váže i na α_2 -adrenergní receptory, tudíž by tato vazebná místa mohla odpovídat α_2 -adrenergním receptorům. Tento podtyp α -adrenergních receptorů se v plicích rovněž vyskytuje, jak bylo demonstrováno ve více případech [37]. Naše zjištění tří vazebných míst pro ^3H -prazosin v plicích koresponduje s výsledky předešlých studií potvrzujících výskyt mRNA pro tyto podtypy α_1 -adrenergních receptorů [38] a [39]. Stejně tak Hiramatsu a kol.[40] identifikoval na podkladě vazebných studií 3 vazebná místa v plicích potkanů. Vzhledem k úrovni tehdejších znalostí však mohl pouze uzavřít, že se jedná α_{1A} -, α_{1B} - adrenergní podtypy a další třetí neznámý podtyp α_1 -adrenergního receptoru.

Na druhou stranu Yang et al. (1998)[41] identifikovali u myši pouze α_{1A} a α_{1B} vazebné podtypy. Obdobně Calzada a kol.[42] dokumentovali expresi pouze dvou typů mRNA pro α_1 -adrenergní receptory (α_1 a α_{1B} -adrenergní podtyp).

Zastoupení receptorů receptorů ANS v srdci

Množství mRNA kódující adrenergní a muskarinové receptory v dané oblasti srdce koreluje s hustotou příslušných receptorových vazebných míst v této oblasti. Některé výjimky je možné nalézt, např. množství α_{1B} mRNA a množství vazebných míst v síních, ať už v oblastech bohatých na autonomní ganglia, či v oblastech prakticky aganglionárních. Ačkoliv se množství mRNA M_2 muskarinových receptorů příliš nelišilo v srdečních komorách a síních, hustota vazebných míst byla vyšší v levých síních (v části bez nervových ganglií), než

v komorách. Tyto výsledky naznačují, že by u muskarinových receptorů mohla existovat receptorová rezerva. Dalo by se spekulovat, že tato rezerva (respektive rezerva mRNA) by mohla v komorách umožnit rychlou akutní proteosyntézu příslušné receptorové bílkoviny a umožnit tak rychlejší funkční změnu. Dále je třeba zmínit, že třebaže jsme nezjistili žádný rozdíl v expresi mRNA pro β_1 - a β_2 -adrenergní receptory mezi jednotlivými srdečními oddíly, vazba na tyto receptory, zjištěná pomocí radioligandu, se mezi jednotlivými srdečními oblastmi lišila. To platí především pro β_2 -adrenergní receptory: mRNA pro tyto receptory byla téměř rovnoměrně exprimována v jednotlivých srdečních oblastech, nicméně množství receptorové bílkoviny (zjišťováno vazebnou studií) bylo nejvyšší v oblasti komorového septa.

Stručně řečeno, naše údaje souhlasí s výzkumy na lidském srdci [9] v následujících závěrech:

- 1) množství β_1 -adrenergních receptorů ve všech srdečních oddílech je mnohem vyšší než množství β_2 -adrenergních receptorů,
- 2) množství α_{1B} -adrenergních receptorů v srdečních oddílech je mnohem vyšší než α_{1A} -adrenergních receptorů,
- 3) množství α_1 -adrenergních receptorů je mnohem vyšší v komorách, než v síních
- 4) hustota muskarinových vazebných míst je mnohem vyšší v atriích než v komorách, ačkoliv množství mRNA se výrazně neliší (v síních je nepatrně vyšší).
- 5) množství β_3 -adrenergní mRNA je velmi nízká ve všech oddílech.

Naše výsledky jsou také v souladu s údaji Wolffa a kol.[43] o distribuci mRNA pro α_1 -adrenergní receptory v různých částech srdce, i když rozdíly v distribuci mRNA pro α_{1A} -adrenergní receptory jsme nedetekovali. Navíc jsme byli schopni identifikovat nejen rozdíly v distribuci mRNA, ale také ve vazbě ligandu na α_{1B} -adrenergní receptory.

Dále jsme získali obdobné výsledky jako [44]. Tito autoři popsali distribuci mRNA pro β_2 -adrenergní receptory v různých částech srdce, nicméně nerozlišovali mezi ganglionárními a aganglionárními částmi síní.

Ačkoliv exprese mRNA pro M_2 muskarinové receptory, β_1 -, β_2 a α_{1B} -adrenergní receptory byla opakovaně popsána v myokardu potkana (pro přehled [45], stále existují pochybnosti o expresi mRNA pro β_3 -adrenergní receptory v srdci. Také α_{1A} -adrenergní receptorová mRNA není v srdeční tkáni pravidelně nacházena a není vyloučeno, že mohou existovat značné mezidruhové rozdíly [9]. Receptory β_3 -adrenergní a jejich výskyt v srdci je doposud stále předmětem diskuzí. Zatímco většina autorů ([46]) stanovila β_3 -adrenergní receptory v srdci

funkčně i na úrovni mRNA, některé výzkumné skupiny [10, 47] prokázali pouze marginální vliv β_3 -adrenergických agonistů na srdeční funkce. Ačkoliv některým skupinám [48-50] se mRNA pro β_3 -adrenergické receptory v jednotlivých oblastech srdce identifikovat nepodařilo, my jsme identifikovali mRNA pro β_3 -adrenergické receptory ve všech námi sledovaných oblastech. Na druhou stranu je třeba si uvědomit, že průměrná genová exprese β_3 -adrenergických receptorů (ve všech sledovaných oblastech srdce) byla asi $5\times$ nižší než exprese β_1 -adrenergických receptorů a asi $2-3\times$ nižší než exprese β_2 -adrenergických receptorů.

Podle našich znalostí se jedná o první studii popisující rozdíly v hustotě vazebných receptorových míst a množství mRNA v srdci, kdy bylo použito dělení síní na části bohaté na autonomní ganglia a na části prakticky aganglionární. Naše data přinesla nové poznatky o rozložení všech podtypů receptorů v oblastech srdce bohatých na buňky neuronálních ganglií. Tato skutečnost může mít velký význam při regulaci receptorů a při vzájemném propojení mezi různými podtypy receptorů jak v myocytech, tak v nervových buňkách.

Zjistili jsme, že srdeční receptory pro neurotransmitery, které jsou uvolňovány na autonomních nervových zakončeních, mají různou a specifickou distribuci v srdečních oblastech. Distribuce mRNA pro tyto receptory vykazovala menší rozdíly, než pozorované rozdíly v distribuci vazebných míst. To naznačuje, že by mohly existovat další mechanismy (např. na úrovni posttranskripčních a posttranslačních modifikací), které jsou schopny determinovat množství receptorových vazebných míst na membránách a regulovat tak funkční efekt na buňku.

Non-M2 muskarinové receptory v srdcích

Naše data jsou v dobré shodě s Colecraftem a kol. [11], kteří identifikovali M_1 receptor v komorových myocytech novorozeneckých potkanů jak na funkční rovině, tak na úrovni mRNA. Yang a kol. [51] detekovali M_3 muskarinové receptory jako minoritní podtyp MR v srdcích, ke stejným výsledkům došla i další skupina [12, 52] a stejně tak [53]. Některé výsledky prokazovaly výskyt M_1 , M_3 a M_5 receptorů v lidských síních [54, 55]. V myocytech ze síní potkanů se mRNA pro M_3 -receptory prokázat nepodařilo [56]. Fisher a kol. [57] jasně prokázali, že srdeční frekvence se u M_3 deficitních myší nemění, ačkoliv bronchokonstrikční odpověď je zcela potlačena. Tyto nálezy také zbohybňují roli M_3 muskarinových receptorů v regulaci srdečních funkcí. Důležité je zmínit, že existují mezidruhové rozdíly ve výskytu MR.

V srdečních síních psů byla potvrzena přítomnost M_2 a M_4 muskarinových receptorů a nepřítomnost M_1 muskarinových receptorů, přetrvává nejistota v existenci M_5 MR [12, 52, 54].

Data ze srdečních síní člověka jednoznačně dokumentují přítomnost M_1 podtypu na úrovni proteinu i jejich funkci v regulaci K^+ kanálů[5] za podmínek síňové fibrilace. Ačkoliv nelze shrnout, že se M_1 MR vyskytují v síních pouze za patologických podmínek, jejich výskyt je obecným jevem, nicméně nikoliv u všech zkoumaných druhů[12].

Dále jsme demonstrovali, $MT7$ toxin nemůže nahradit nepurifikovaný jed mamby zelené v detekci M_5 muskarinových receptorů[58]. Vzájemná vazba [3H]NMS na receptory, došlo-li k podání AQ-RA, pouze demonstrovala pozitivní alosterickou vazbu či pozitivní kooperativní vazbu s $MT7$ toxinem. Shrnutí-li, naše data dále rozvíjejí poznatky o existenci non M_2 muskarinových receptorů v srdci, ikdyž je patrné, že se jedná o velmi složitou problematiku, které není zatím definitivně dořešena.

Vliv stresu v plicích a srdci, význam vyřazení genu pro CRH ve stresové reakci

Klíčovým zjištěním naší práce [30] je nález významných, pohlavně odlišných změn, v množství receptorů autonomního nervového systému v plicích u WT a CRH KO myši. Tyto změny jsme pozorovali jak za fyziologických podmínek, tak především pod vlivem stresu.

Stresová reakce způsobila následující rozdílné reakce u samců a samic WT myši: u samců se snižovaly β_1 -AR a MR, u samic však nastala mnohem komplexnější reakce: došlo ke snížení α_{1A} -AR, α_{1B} -AR, α_{1D} -AR, β_2 -AR a MR. β_1 -adrenergní receptory nebyly u samic stresem ovlivněny. Tyto jevy nebyly dosud pozorovány a jsou zajímavé v souvislosti s CRH KO fenotypem. Muglia a kol. pozorovali u těchto myši sexuální dimorfní reakce na stres (zvýšení kortikosteronu ([59])). U WT myši doposud žádné pohlavní rozdíly popsány nebyly. Kromě toho může být nález pohlavního dimorfismu ve stresové odpovědi důležitý z hlediska výskytu některých plicních onemocnění, především astmatu. Výskyt astma bronchiale jeví pohlavní rozdíly [60, 61] a stres je prokazatelně jedním z faktorů, které přispívají k rozvoji astmatu [62]. Pohlavní rozdíly ve změnách adrenergních a muskarinových receptorů jako odpověď na působení stresu by tedy mohly pomoci osvětlit rozdíly mezi pohlavími u astmatu. Prevalence astmatu v populaci severní Ameriky je až do 20. roku věku vyšší u mužů, pak klesá a stává se opět vyšší krátce před 80. rokem [60]. Úmrtnost na astma je vyšší u mužů [60]. V našem modelu, porovnáme-li stáří myši a lidský věk, naše myši odpovídaly přibližně mladým dospělým.

Bylo prokázáno, že u myších samic je nižší citlivost dýchacích cest na cholinergní stimulaci, tj. méně intenzivní bronchokonstrikce [63]. To koresponduje s naším zjištěním téměř dvakrát větší hustoty MR v plicní tkáni u samců než u samic (a žádného rozdílu v denzitě β -AR).

Plazmatické koncentrace adrenalinu a noradrenalinu se u WT a CRH KO myši měnily odlišně. Koncentrace adrenalinu byla závislá i na pohlaví. Plazmatické hladiny katecholaminů byly naměřeny ve vzorcích krve získaných exsanguinací, tj. v koncentracích, které by měly být vyšší než v arteriální krvi nebo v srdeční tkáni [36]. Koncentrace adrenalinu byla u WT myši vyšší než u CRH KO myši a to především u samic. Toto zjištění znamená snížení syntézy adrenalinu u KO myši, což souhlasí s předchozími výsledky [64, 65]. V chromafinních buňkách dřeně nadledvin působení stresoru zvyšuje genovou expresi PNMT, která katalyzuje přeměnu noradrenalinu na adrenalin. Pro tento děj je nezbytná normální funkce HPA osy, neboť genová exprese zmíněného enzymu je stimulována působením glukokortikoidů, které jsou nezbytné i pro její správnou funkci [64, 65]. Tímto způsobem je možné vysvětlit změněné koncentrace cirkulujících katecholaminů u CRH KO myši [64, 65]. Přítomnost GRE na promotérových sekvencích genů β_1 -AR [66], β_2 -AR [67] a α_{1B} -AR [68] ukazuje na mechanismus působení glukokortikoidních hormonů během stresu. Dosavadní data o vlivu stresu na tyto receptory jsou neúplná. Někteří autoři efekt opakované imobilizace na β_1 -AR u potkanů neprokázali [69, 70]. V jiných pracích se autoři věnovali vlivu oxidativního stresu a také nenašli účinky na muskarinové a β -adrenergní funkce u potkana, pD_2 hodnoty se nezměnily [71]. Naproti tomu v naší práci podáváme důkazy, že BAR a překvapivě významně i AAR, stejně jako MR jsou na úrovni plic do stresové odpovědi zapojeny. Kromě toho jsme pozorovali významný sexuální dimorfismus ve stresové odpovědi. Naše výsledky překvapivě ukazují, že α_1 -AR mohou hrát důležitou roli v plicní fyziologii u samic. Současně se ukazuje, že tyto receptory mají zřejmě nevýznamný podíl na regulaci plicních funkcí u samců.

Některé buňky v plicní tkáni (epiteliální buňky, bronchiální hladké svalové buňky, buňky plicního parenchymu) by mohly představovat základ pro systém heterologní regulace, protože exprimují receptory s významným antagonismem (tj. MR a β -AR) Proto bychom mohli předpokládat, že změny v množství adrenergních receptorů mohou mít v dalším kroku vliv na množství receptorů muskarinových. Důležitost rovnováhy mezi podtypy MR byla uvedena výše, a rovnováha mezi muskarinovými a adrenergními receptory by v tomto kontextu mohla být rovněž důležitá. Tato heterologní regulace, tedy vliv jednoho systému na jiný receptorový systém, byla opakovaně prokázána [72, 73]. Další možností je, že změny v množství MR jsou důsledkem přímého účinku nepřítomnosti nebo přítomnosti glukokortikoidů. Předběžný důkaz o přítomnosti GRE na genu pro M_1 -muskarinový receptor byl publikován [74], ale přítomnost GRE v promoterové oblasti genů MR nebyla zatím definitivně potvrzena.

Také u α_1 -AR podtypů jsme zjistili pohlavní rozdíly v bazálních hladinách (samice měly větší množství receptorů než samci). Pohlavní rozdíly jsme pozorovali i u MR (samci mají více MR než samice). Naproti tomu, receptorová denzita β -adrenergních receptorů se nelišila mezi pohlavími. Ve vztahu k problematice receptorové rovnováhy, by rozdíl v reakci na stres mohl být důsledkem rozdílů v receptorových denzitách v plicích mezi samci a samicemi přítomných již za fyziologických podmínek. Zajímavé je zejména vyšší množství muskarinových receptorů u samců, tedy receptorů vyvolávající bronchokonstrikci, což by mohlo být faktorem zodpovědným za rozdíly mezi pohlavími u astmatu, jak bylo uvedeno výše.

Důležité je také, že B_{max} , tj. celková receptorová vazba, se lišila mezi samci a samicemi. Samci mají celkově nižší množství receptorů, což se týkalo všech podtypů. Tato skutečnost by mohla vést k tomu, že u samců nedochází k výraznějším změnám v množství receptorů pod vlivem stresu.

Signál přenášený přes cAMP je neutralizován hydrolýzou cAMP na AMP enzymem fosfodiesteráza. Koncentrace cAMP v buňce je tedy výsledkem poměru aktivity adenylátcyklázy a fosfodiesterázy. V naší práci jsme zjistili, že hladiny cAMP v plicním parenchymu u samců klesají během stresové reakce a kopírují tak změny v množství vazebných míst na β_1 -adrenergní a muskarinové receptory. To by mohlo znamenat, že rovnováha mezi syntézou cAMP, jež je stimulována β_1 -adrenergními receptory a inhibicí této produkce, jež je výsledkem aktivace muskarinových receptorů, je u stresovaných zvířat narušena. Je zřejmé, že stres snižuje expresi adenylátcyklázy (jak lze usuzovat z neschopnosti forskolinu stimulovat produkci cAMP u stresovaných zvířat). Naproti tomu aktivita fosfolipázy C se neměnila. Tento jev by mohl mít souvislost s tím, že množství α_1 -adrenergních receptorů u samců se pod vlivem stresu výrazněji nemění.

Dále jsme se v rámci našich experimentů zajímali o důsledek vyřazení genu pro CRH. Nepřítomnost genu pro CRH vedla ke snížení AR a MR receptorů v plicní tkáni u myši za fyziologických podmínek. Množství všech receptorů u obou pohlaví (s výjimkou β_1 -AR u samic) bylo sníženo. Toto je nutné zmínit, neboť myši, kterým chybí gen pro CRH, mají snížené koncentrace glukokortikoidů jak za fyziologických podmínek, tak při reakci na stres [64, 65]. Podobně, u CRH KO myši, nedochází ke zvýšení hladin glukokortikoidů v cirkadiálním peaku [75]. Kromě toho se snižují hladiny PNMT, noradrenalin není efektivně methylován na adrenalinu a hladiny noradrenalinu v plazmě se zvyšují. Toto pozorování je v souladu s poklesem mRNA PNMT a nízkou plazmatickou koncentrací PNMT proteinu [65].

V rámci naší práce obdobně nacházíme zvýšené plazmatické koncentrace noradrenalinu u CRH KO samců za fyziologických podmínek. Takto odlišné koncentrace adrenalinu a noradrenalinu stejně jako zvýšení koncentrace noradrenalinu během imobilizačního stresu by mohly přispívat k rozdílným změnám v množství adrenergních a muskarinových receptorů během stresu u samců a samic CRH KO myši.

Pozorovali jsme hlavně neschopnost CRH KO myši reagovat na stres změnami v množství α_1 -, β_1 -, β_2 -AR a MR. Konkrétně, α_1 -AR a β_2 -AR byly u samic CRH KO myši ovlivněny více (sníženy na přibližně polovinu) než β_1 -AR. Zatímco β_1 -adrenergní receptory se u samic CRH KO myši neměnily, snižovaly se u samců až na 62%. β_2 -AR byly sníženy u samců i samic CRH KO myši. Vyřazení genu pro CRH mělo tedy větší účinek na β_2 -AR. To může mít souvislost s jejich zvýšenou citlivostí na glukokortikoidy ve srovnání s jinými receptory [76]. Reakce receptorů na stres byla v plicích méně ovlivněna u CRH KO samců než u samic. To koresponduje se zjištěním, že reakce na stres CRH KO myši jsou sexuálně dimorfní [59].

Kromě toho je také nutné si uvědomit, že intaktní KO myši mají celkově méně receptorových vazebných míst, než WT myši, což platí pro všechny receptory, které jsme sledovali. Proto může chybějící nebo snížená receptorová reakce na stres u KO myši být v první řadě odrazem nižšího bazálního množství receptorů. Tento rozdíl v množství receptorů zhruba proporčně odpovídá poklesu v množství receptorů pod vlivem stresu u WT myši.

V souhrnu můžeme předpokládat, že:

- 1) plicní zastoupení adrenergních a muskarinových receptorů a rozdíly v jejich pohlavním zastoupení mohou hrát důležitou roli v rozvoji některých plicních onemocnění (např. astma),
- 2) HPA osa, především CRH, hraje důležitou roli v propojení AR a plicní patologie. Naše práce jako první popisuje účinky stresu (imobilizace) na receptorové systémy v plicní tkáni, které by mohly být podkladem poruchy plicních funkcí u CRH-KO myši, tak, jak byly popsány výše.

Můžeme tedy uzavřít, že:

- 1) CRH KO zvířata vykazují změny v množství MR, α_1 -AR a β -AR na úrovni plicní tkáně za fyziologických podmínek. Naše původní hypotéza, že vyřazení genu pro CRH může mít vliv na počet vazebných receptorových míst v plicích, se tedy potvrdila.

- 2) Naše hypotéza, že receptory autonomního nervového systému (adrenergní i muskarinové) v plicích u CRH-KO myší budou sníženy, se potvrdila.
- 3) Prokázali jsme pohlavně odlišné změny v množství zmíněných receptorů jako odpověď na působení imobilizačního stresu. U CRH KO myší byla intenzita změn v množství receptorů pod vlivem stresu snížena ve srovnání se situací u WT myší. Ačkoliv je úloha α_1 -adrenergních podtypů obecně považována za minoritní, naše výsledky ukazují, že podtypy α_1 -adrenergních receptorů mění své množství v závislosti na působení stresu a mohou tedy hrát významnější roli v odpovědi na stresové podněty, než se obecně předpokládá. Tyto změny byly pozorovatelné ovšem pouze u samic, u samců se α_1 -adrenergní receptory v rámci stresové odpovědi významněji neměnily.

Vliv stresu na srdeční receptory pro působky autonomního nervového systému vykazoval podobné charakteristiky, jaké jsme pozorovali u adrenergních a muskarinových receptorů v plicní tkáni. Naše nálezy jsou v dobré shodě s dříve publikovanými daty o změnách počtu vazebných míst pro β -adrenergní ligandy vlivem stresu [3, 70, 77-79]. Naše nálezy rozvíjejí tyto poznatky o regionální rozdíly v množství receptorů v rámci odpovědi na působení imobilizačního stresu. Mimoto nález, že se vlivem stresu v srdci snižují i muskarinové receptory, je zcela nový (jedna dřívější práce ruských autorů, našla up-regulaci muskarinových receptorů [80]).

Celkově vzato, naše data popisují současné změny AR a MR, které jsou důležité v rámci reakce na stres. Těmto změnám předchází masivní nárůst koncentrace katecholaminů (viz data naší práce (5) a také dřívější pozorování diskutované v této práci).

Důležitým bodem v procesu receptorových regulací je porovnání genové exprese, změn proteinu a změn počtu vazebných míst. Hladiny katecholaminů negativně korelují s množstvím proteinu či vazebných míst pro adrenergní receptory. Nicméně je třeba poznamenat, že se v mnoha pracích je změna proteinu a změny vazebných míst považovány za identický jev, ale to nemusí vždy odpovídat skutečnosti. Často se totiž může stát, že v procesu degradace receptoru, imunodetekce proteinu metodou Western blotting zachytí protein i přesto, že již žádná vazba na receptor (a tedy žádný funkční receptor) není přítomen. Je tomu tak proto, že se protilátka váže na specifický fragment proteinu, aniž by byla schopná zachytit intaktní vazebné místo, jak to dokáže vazebná studie. Proto by bylo vhodnější v rámci receptorových změn spíše sledovat vazbu ligandů na receptory než množství receptorového proteinu. Genová exprese nemusí být stresem ovlivněna paralelně

s receptorovými funkcemi a proto, jako další, spíše metodický závěr naší práce, bychom doporučili sledovat paralelně změny genové exprese, proteinu a vazby, čímž lze dosáhnout podrobného obrazu změn daných stresovou reakcí.

Závěry

Na základě výsledků a diskuze můžeme tedy shrnout:

- 1) identifikovali jsme mRNA a vazebná místa pro všechny podtypy α_1 -adrenergních receptorů v plicích potkana,
- 2) identifikovali jsme non-M2 podtypy muskarinových receptorů v srdci: identifikovali jsme podtyp M_1 a další podtyp, který by nejspíše mohl odpovídat podtypu M_5 , ale nikoliv M_3 .
- 3) popsali jsme distribuci mRNA pro podtypy adrenergní receptorů a pro receptory muskarinové. Současně jsme stanovili množství vazebných míst odpovídajících těmto receptorům ve sledovaných deseti srdečních oblastech. U některých receptorů jsme v regionech našli rozdíly v množství mRNA ve srovnání s množstvím vazebných míst (α_1 -adrenergní receptory, M_2 -receptory v srdečních komorách)
- 4) prokázali jsme změny v množství adrenergních (překvapivě i významné změny podtypů α_1 -adrenergních receptorů) a muskarinových receptorů v plicích myši vlivem stresu. Prokázali jsme pohlavní závislost těchto změn a vliv přítomnosti či absence CRH na receptorovou stresovou odpověď v plicích,
- 5) prokázali jsme změny adrenergních a muskarinových receptorů v srdci vlivem stresu a odlišnost těchto změn v jednotlivých srdečních oddílech.

Literatura

1. U'Prichard, D.a.R.K., *Central and peripheral adrenergic receptors in acute and repeated immobilization stress*. Catecholamines and stress: Recent advances, 1980. **1980**: p. 299-308.
2. Kvetnansky, R., et al., *Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **771**: p. 131-58.
3. Torda, T., R. Kvetnansky, and M. Petrikova, *Effect of repeated immobilization stress on central and peripheral adrenoceptors in rats*. Endocrinol Exp, 1985. **19**(3): p. 157-63.
4. Myslivecek, J., et al., *The effects of short-term immobilization stress on muscarinic receptors, beta-adrenoceptors, and adenylyl cyclase in different heart regions*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1018**: p. 315-22.
5. Dobrev D, K.D., Richter F, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens, *Functional identification of m1 and m3 muscarinic acetylcholine receptors in human atrial myocytes: influence of chronic atrial fibrillation*. . UCirculation, 2002(106): p. 11–154.
6. Guimaraes, S. and D. Moura, *Vascular adrenoceptors: an update*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 319-56.
7. Lohse, M.J., S. Engelhardt, and T. Eschenhagen, *What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?* Circ Res, 2003. **93**(10): p. 896-906.
8. Wess, J., et al., *M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system*. Receptors Channels, 2003. **9**(4): p. 279-90.
9. Brodde O.E. and M. M.C., *Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart*. Pharmacol. Rev, 1999. **51**(4): p. 651-690.
10. Kaumann, A.J. and P. Molenaar, *Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997. **355**(6): p. 667-81.
11. Colecraft, H.M., et al., *Signaling mechanisms underlying muscarinic receptor-mediated increase in contraction rate in cultured heart cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 32158-66.
12. Wang, Z., H. Shi, and H. Wang, *Functional M3 muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts*. Br J Pharmacol, 2004. **142**(3): p. 395-408.
13. Hamilton, S.E., et al., *Alteration of cardiovascular and neuronal function in M1 knockout mice*. Life Sci, 2001. **68**(22-23): p. 2489-93.
14. Myslivecek J, K.M., Novakova M, Ricny J., *The detection of the non-M2 muscarinic receptor subtype in the rat heart atria and ventricles*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. , 2008. **Jul**(378(1)): p. 103-16.
15. Morris, A.J. and C.C. Malbon, *Physiological regulation of G protein-linked signaling*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1373-430.
16. Selbie, L.A. and S.J. Hill, *G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways*. Trends Pharmacol Sci, 1998. **19**(3): p. 87-93.
17. Bunemann, M. and M.M. Hosey, *G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling*. J Physiol, 1999. **517** (Pt 1): p. 5-23.
18. Cordeaux, Y. and S.J. Hill, *Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors*. Neurosignals, 2002. **11**(1): p. 45-57.
19. Hur, E.M. and K.T. Kim, *G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity*. Cell Signal, 2002. **14**(5): p. 397-405.
20. Myslivecek, J. and S. Trojan, *Regulation of adrenoceptors and muscarinic receptors in the heart*. Gen Physiol Biophys, 2003. **22**(1): p. 3-14.
21. Myslivecek, J., *Regulatory mechanisms of receptor-mediated signal transduction*. Cesk Fysiol, 1996. **45**(4): p. 190-202.

22. J.Myslivecek, J.Sedl c.S.T.a.S.T., *Cross-regulation between muscarinic and beta-adrenergic receptors in mammalian and avian heart*. Second conference of the Czech neuroscience society with international participation. Programme and abstracts., 1996: p. 80.
23. Myslivecek, J., *Cross-regulation between muscarine and beta-adrenergic receptors*. *Cesk Fysiol*, 1998. **47**(3): p. 115-21.
24. Myslivecek, J. and S. Trojan, *Mechanisms of G-protein coupled receptor regulation*. *Sb Lek*, 2000. **101**(3): p. 205-13.
25. Myslivecek, J., *Regulation of G-protein-coupled receptors*. *Cesk Fysiol*, 2003. **52**(1): p. 4-9.
26. Venihaki, M. and J. Majzoub, *Lessons from CRH knockout mice*. *Neuropeptides*, 2002. **36**(2-3): p. 96-102.
27. Venihaki, M., J. Zhao, and K.P. Karalis, *Corticotropin-releasing hormone deficiency results in impaired splenocyte response to lipopolysaccharide*. *Journal of Neuroimmunology*, 2003. **141**(1-2): p. 3-9.
28. Myslivecek, J., et al., *Distribution of mRNA and binding sites of adrenoceptors and muscarinic receptors in the rat heart*. *Life Sci*, 2006. **79**(2): p. 112-20.
29. Novakova, M. and J. Myslivecek, *Identification of all alpha1-adrenoceptor subtypes in rat lung*. *Gen Physiol Biophys*, 2005. **24**(3): p. 349-53.
30. Novakova, M., R. Kvetnansky, and J. Myslivecek, *Sexual dimorphism in stress-induced changes in adrenergic and muscarinic receptor densities in the lung of wild type and CRH-knockout mice* *Stress*, 2010. **13**(1): p. 22–35.
31. Myslivecek, J. and S. Trojan, *Muscarinic receptor subtypes in the heart--how many and why?* *Sb Lek*, 2001. **102**(3): p. 361-7.
32. Myslivecek, J., et al., *Regulation of Adrenoceptor and Muscarinic Receptor Gene Expression after Single and Repeated Stress*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008. **1148**(1): p. 367-376.
33. Tillinger, A., et al., *Gene Expression of Adrenoceptors in the Hearts of Cold-Acclimated Rats Exposed to a Novel Stressor*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008. **1148**(1): p. 393-399.
34. Dwivedi, Y. and G.N. Pandey, *Repeated Administration of Dexamethasone Increases Phosphoinositide-Specific Phospholipase C Activity and mRNA and Protein Expression of the Phospholipase C β 1 Isozyme in Rat Brain*. *Journal of Neurochemistry*, 1999. **73**(2): p. 780-790.
35. Kvetnansky, R. and R.A. Tigranian, *[Adrenaline and noradrenaline concentrations in the rat heart ventricles and atria after a flight on the Kosmos-1129 biosatellite]*. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1982. **16**(4): p. 87-9.
36. Kvetnansky, R., et al., *Changes of adrenal catecholamines and their synthesizing enzymes during ontogenesis and aging in rats*. *Mech Ageing Dev*, 1978. **7**(3): p. 209-16.
37. Goldie, R.G., J.W. Paterson, and K.M. Lulich, *Adrenoceptors in airway smooth muscle*. *Pharmacol Ther*, 1990. **48**(3): p. 295-322.
38. Faure, C., et al., *Expression of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat tissues: implications for alpha 1-adrenoceptor classification*. *Eur J Pharmacol*, 1994. **268**(2): p. 141-9.
39. Alonso-Llamazares, A., et al., *Molecular cloning of alpha 1d-adrenergic receptor and tissue distribution of three alpha 1-adrenergic receptor subtypes in mouse*. *J Neurochem*, 1995. **65**(6): p. 2387-92.
40. Hiramatsu, Y., et al., *Identification of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat lung by binding of [3H]-prazosin and [3H]-WB4101*. *J Recept Res*, 1994. **14**(2): p. 75-98.
41. Yang, M., et al., *Murine alpha1-adrenoceptor subtypes. I. Radioligand binding studies*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. **286**(2): p. 841-7.
42. Calzada, B.C. and A.A. De Artinano, *Alpha-adrenoceptor subtypes*. *Pharmacol. Res.* , 2001. **44**: p. 195-208.
43. Wolff, D.W., et al., *Distribution of alpha1-adrenergic receptor mRNA species in rat heart*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998. **32**(1): p. 117-22.

44. Hardouin, S., et al., *Beta-adrenergic and muscarinic receptor mRNA accumulation in the sinoatrial node area of adult and senescent rat hearts*. Mech Ageing Dev, 1998. **100**(3): p. 277-97.
45. Brodde, O.E., et al., *Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart*. Basic Res Cardiol, 2001. **96**(6): p. 528-38.
46. Gauthier C., Langin D., and B. J.-L., *β 3-adrenoceptors in the cardiovascular system*. Trends Pharmacol. Sci., 2000. **21**(11): p. 426-431.
47. Oostendorp, J. and A.J. Kaumann, *Pertussis Toxin Suppresses Carbachol-Evoked Cardiodepression but Does Not Modify Cardiac Stimulation Mediated Through Beta(1)- and Putative Beta(4)-Adrenoceptors in Mouse Left Atria: No Evidence for Beta(2)- and Beta(3)-Adrenoceptor Function*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2000. **361**(2): p. 134-145.
48. Evans, B.A., et al., *Expression of beta(3)-adrenoceptor mRNA in rat tissues*. British Journal of Pharmacology, 1996. **117**(1): p. 210-216.
49. Berkowitz, D.E., et al., *Distribution of beta 3-adrenoceptor mRNA in human tissues*. Eur J Pharmacol, 1995. **289**(2): p. 223-8.
50. Krief, S., et al., *Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 344-9.
51. Yang, C.M., et al., *Pharmacological characterization of muscarinic receptors in neonatal rat cardiomyocytes*. Am J Physiol, 1993. **265**(3 Pt 1): p. C666-73.
52. Wang, H., Y. Lu, and Z. Wang, *Function of cardiac M3 receptors*. Auton Autacoid Pharmacol, 2007. **27**(1): p. 1-11.
53. Ponicke, K., I. Heinroth-Hoffmann, and O.E. Brodde, *Demonstration of functional M3-muscarinic receptors in ventricular cardiomyocytes of adult rats*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(1): p. 156-60.
54. Wang, H., et al., *Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(5): p. 1029-36.
55. Willmy-Matthes, P., et al., *Existence of functional M3-muscarinic receptors in the human heart*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2003. **368**(4): p. 316-9.
56. Meyer T, W.-K.M., Biewald A, Bender K, Eickel A, Pott L., *Depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by activation of phospholipase C-coupled receptors causes slow inhibition but not desensitization of G protein-gated inward rectifier K⁺ current in atrial myocytes*. J Biol Chem, 2001. **Feb 23**(276(8)): p. 5650-8.
57. Fisher JT, V.S., Gomez J, Yamada M, Wess J, *Loss of vagally mediated bradycardia and bronchoconstriction in mice lacking M2 or M3 muscarinic acetylcholine receptors*. FASEB J, 2004(18): p. 711-713.
58. Reever, C.M., G. Ferraridileo, and D.D. Flynn, *The M5 (m5) receptor subtype: Fact or fiction?* Life Sciences, 1997. **60**(13-14): p. 1105-1112.
59. Muglia, L., et al., *Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need*. Nature, 1995. **373**(6513): p. 427-32.
60. Carey, M.A., et al., *It's all about sex: gender, lung development and lung disease*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2007. **18**(8): p. 308-313.
61. Almqvist, C., M. Worm, and B. Leynaert, *Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review*. Allergy, 2008. **63**(1): p. 47-57.
62. Vig, R.S., P. Forsythe, and H. Vliagoftis, *The Role of Stress in Asthma: Insight from Studies on the Effect of Acute and Chronic Stressors in Models of Airway Inflammation*. Ann NY Acad Sci, 2006. **1088**(1): p. 65-77.
63. Reever CM, F.-D.G., Flynn DD, *The M5 (m5) receptor subtype: fact or fiction?* Life Sci, 1997(60): p. 1105-1112.
64. Kvetnansky, R., et al., *Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure*. Cell Mol Neurobiol, 2006. **26**(4-6): p. 735-54.

65. Jeong, K.H., et al., *Impaired basal and restraint-induced epinephrine secretion in corticotropin-releasing hormone-deficient mice*. *Endocrinology*, 2000. **141**(3): p. 1142-50.
66. Tseng, Y.T., et al., *A novel glucocorticoid regulatory unit mediates the hormone responsiveness of the beta1-adrenergic receptor gene*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. **181**(1-2): p. 165-78.
67. Cornett, L.E., et al., *Identification of a glucocorticoid response element in the rat beta2-adrenergic receptor gene*. *Mol Pharmacol*, 1998. **54**(6): p. 1016-23.
68. Gao, B. and G. Kunos, *Isolation and characterization of the gene encoding the rat alpha 1B adrenergic receptor*. *Gene*, 1993. **131**(2): p. 243-7.
69. Torda, T., et al., *Quinacrine-blocked desensitization of adrenoceptors after immobilization stress or repeated injection of isoproterenol in rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981. **216**(2): p. 334-8.
70. Torda T., K., I.J., *Lack of preventive effect of 6-hydroxy-dopamine on a decrease of beta-adrenergic receptors induced by repeated stress in the heart of rats*. *Endocrinol. Exp.*, 1985 **19**: p. 47-51.
71. van Hoof, I.H., L. van Bree, and A. Bast, *Changes in receptor function by oxidative stress in guinea pig tracheal smooth muscle*. *Cent Eur J Public Health*, 1996. **4 Suppl**: p. 3-5.
72. Krohn, M. and J.P. Hildebrandt, *Cross-talk of phosphoinositide- and cyclic nucleotide-dependent signaling pathways in differentiating avian nasal gland cells*. *J Comp Physiol [B]*, 2004. **174**(6): p. 461-70.
73. Myslivecek, J. and R. Kvetnansky, *The effects of stress on muscarinic receptors. Heterologous receptor regulation: yes or no?* *Auton Autacoid Pharmacol*, 2006. **26**(3): p. 235-51.
74. Klett, C.P. and T.I. Bonner, *Identification and characterization of the rat M1 muscarinic receptor promoter*. *J Neurochem*, 1999. **72**(3): p. 900-9.
75. Muglia, L.J., et al., *Impaired diurnal adrenal rhythmicity restored by constant infusion of corticotropin-releasing hormone in corticotropin-releasing hormone-deficient mice*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(12): p. 2923-9.
76. Myslivecek, J., et al., *The effects of hydrocortisone on rat heart muscarinic and adrenergic alpha 1, beta 1 and beta 2 receptors, propranolol-resistant binding sites and on some subsequent steps in intracellular signalling*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003. **368**(5): p. 366-76.
77. U'Prichard, D.C., Kvetnansky, R, *Central and peripheral adrenergic receptors in acute and repeated immobilization stress*, in *Catecholamines and Stress: Recent Advances*, K. Usdin E., R., Kopin, I.J., Editor. 1980, Elsevier: New York. p. 299-308.
78. Torda T., R.K., Petrikova, M. , *Effect of repeated immobilization stress on rat central and peripheral adrenoceptors*, in *Stress: The Role of Catecholamines and Other Neurotransmitters*, R.K. E.Usdin, J.Axelrod, Editor. 1984, Gordon and Breach Sci Publ: New York. p. 691-701.
79. Kirby, R.F. and A.K. Johnson, *Role of beta 2-adrenoceptors in cardiovascular response of rats to acute stressors*. *Am-J-Physiol*, 1990. **1990**.
80. Meerson, F.Z., I.N. Kopylov, and B. G.N., *Alpha1 desensitization of the heart during adaptation to stress*. *Fiziol Zh.*, 1991. **37**: p. 3-6.