

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
ÚSTAV FYZIOLOGIE**



**Studium morfologických a funkčních změn
autonomní inervace srdce a cév a jejich příčin
u chronických chorobných stavů**

**Study of morphological and functional alterations of
autonomic cardiac and vessels innervation and its
causes in chronic diseases**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Eliška Mistrová

Školitel: doc. MUDr. Magdaléna Chottová Dvořáková, Ph.D

Plzeň 2016

Abstrakt

V posledních dekádách dochází k výraznému nárůstu diabetu mellitu a chronické stresové zátěže, které mají značný negativní dopad na tělesné i psychické zdraví jedince. Opakované a dlouhodobé působení zvýšené hladiny glukózy, vystupňovaná aktivita sympatického nervového systému a vzestup plazmatické hladiny stresových hormonů ovlivňuje většinu orgánů v těle, včetně srdce a cév. Činnost kardiovaskulárního systému je regulována značným množstvím neurotransmiterů, hormonů i neuropeptidů a změny v inervaci kardiovaskulárního systému v důsledku obou nemocí mohou vést k poškození jeho funkce.

Předložená dizertační práce se zaměřuje nejen na roli klasické, ale především peptidergní inervace srdce. Cílem bylo přispět k objasnění podílu neuropeptidů a jejich receptorových systémů na vzniku a vývoji poškození srdce - vlivem diabetu mellitu a působením stresoru. Poznání fyziologických vlastností neuropeptidů a jejich účasti na patogenezi obou onemocnění a s nimi spojených komplikací by mohlo pomoci ve stanovení optimálních terapeutických postupů řady onemocnění, popř. využití kardioprotektivního účinku neuropeptidů.

První oddíl práce je zaměřen na studium vlivu streptozotocinového diabetu na sensorickou část srdeční inervace laboratorního potkana, která se podílí na přenosu bolestivých podnětů. Stanovili jsme expresi genů signálního systému adrenomedulin/peptid odvozený od genu pro kalcitonin (AM/CGRP). Naše výsledky naznačují, že porucha přenosu sensorické informace ze srdce není pravděpodobně způsobena poruchou funkce signálního systému CGRP, protože jsme neprokázali, že by chronický diabetes u potkana způsobil pokles exprese zúčastněných mRNA. Sensorická vlákna v srdci kromě CGRP uvolňují substanci P, proto jsme se zaměřili na studium exprese genu substance P a NK1 receptoru. Z našich výsledků je patrné, že v síních se nachází významně vyšší množství mRNA i proteinu tohoto receptoru ve srovnání s komorami. Důvodem může být jeho přítomnost v některých tělech neuronů intrakardiálních ganglií, což naznačuje, že SP se může podílet na aktivitě intrakardiálního nervového systému.

Druhá část práce se věnuje ovlivnění srdeční inervace laboratorního potkana různými typy stresu. Při experimentální práci jsme využili dva kmeny potkanů: kontrolní Sprague-Dowley (SD) a Lewis (LE), kmen s geneticky podmíněnou sníženou reaktivitou HPA osy. Sledovali vliv rozdílných typů stresu na expresi a případně i distribuci genů enzymů tyrozin hydroxylázy (TH) a cholin

acetyl transferázy (ChAT) zároveň s M_2 receptory. Zjistili jsme, že úroveň exprese genů enzymů zodpovědných za syntézu klasických přenašečů noradrenalinu a acetylcholinu se u jedinců obou kmenů významně liší. Vyšší expresi mRNA pro TH jsme zaznamenali u jedinců kmene LE v srdečních síních, kde jsou u potkana lokalizována těla neuronů intrakardiálního nervového systému. Totéž platí i pro cholinergní receptory typu M_2 . Výjimkou je exprese mRNA pro ChAT v pravých srdečních síních, která je vyšší u jedinců kmene SD než u potkanů LE.

Dalším významným peptidem, který se tvoří a uvolňuje v srdci a uplatňuje se v regulaci kardiovaskulárního systému, je atriální natriuretický peptid. Rovněž jeho exprese je u jedinců kmene LE významně vyšší než u potkanů kmene SD. Při studiu exprese genu oxytocinového receptoru, jsme zaznamenali v pravé srdeční síni významný rozdíl mezi jedinci obou kmenů v reakci na akutní stres. Zatímco u kmene SD se relativní exprese genu zvýšila, u LE jsme zjistili signifikantní pokles. Analogické výsledky jsme v pravé síni zaznamenali i při stanovení exprese mRNA pro ANP. Tyto výsledky ukazují, že úroveň aktivity HPA osy při stresu ovlivňuje expresi zkoumaných genů v srdci.

Abstract

Within the span of few decades, there has been a significant increase in diabetes mellitus and chronic stress in developed countries, such as the Czech Republic. These conditions have a significant negative effect on physical and mental health. Repeated and long-term exposure to raised levels of glucose, overactivity of the sympathetic nervous system and the increase in plasma levels of stress hormones affects most of the organs in the body, including the heart. The cardiovascular system is regulated by a broad number of neurotransmitters, hormones and neuropeptides. Alterations in the innervation of the cardiovascular system, as a result of both diseases, can affect its physiological functions.

The present thesis focuses not only on the role of the classic, but primarily on the peptidergic innervation of the heart. The aim was to contribute to the explanation of the impact of neuropeptides and their shared receptor systems on the genesis and the development of heart damage due to diabetes mellitus and/or exposure to stressors. Knowledge of the physiological characteristics of neuropeptides and their involvement in the pathogenesis of both diseases and related complications could be helpful in determining the optimal treatment method or alternatively allow us to use the cardio protective effect of neuropeptides.

The first section is focused on the impact of experimentally induced diabetes on the sensory innervation of the rat heart, which participates in the transmission of pain impulses. We studied changes in the expression of the signal system of adrenomedulin/calcitonin gene-related peptide (CGRP). Our results suggest that insufficiency of the heart sensory system is not probably caused by a dysfunction of the CGRP signaling system. We have not shown a decrease in expression of involved mRNAs due to chronic diabetes in rats. Sensory fibres in the heart except for CGRP release substance P (SP), and therefore we focused on the study of gene expression of substance P and the NK1 receptor. Our results indicate that in the atria there are significantly higher amounts of mRNA and protein of this receptor in comparison to the ventricles. The reason may be in the presence in some neuronal bodies of the intracardiac ganglia, suggesting that SP may be involved in the activity of the intracardiac nervous system.

The second part deals with the influence of different types of stress on cardiac innervation in rats. In experimental work, we used two strains of rats: control Sprague-Dawley (SD) and Lewis (LE), a strain with genetically determined reduced reactivity of the HPA axis. We investigated the effect of different types of

stress on the expression, and possibly distribution of tyrosine hydroxylase enzyme genes (TH) and choline acetyl transferase (ChAT) simultaneously with the M₂ receptors.

We found that the level of gene expression of enzymes responsible for the synthesis of classical transmitters norepinephrine and acetylcholine in individuals of both strains differ significantly. Higher expression of mRNA for TH was noted in subjects of strain LE in the atria, which are localized the neuronal bodies of intracardiac nervous system in the rat. The same applies to the type M₂ cholinergic receptors. The exception is the mRNA expression of ChAT in the right atria, which is higher in SD-strain rats than in LE subjects.

Another important peptide that is produced and released in the heart and is regarded to the regulation of the cardiovascular system, atrial natriuretic peptide. Also, its expression in individual from strain LE was significantly higher than in SD rats. In studying gene expression of the oxytocin receptor we were observed in the right atrium a significant difference between individuals of both strains in response to acute stress. While in the strain SD, relative gene expression increased, at LE we found a significant decrease. Analogous results were observed in the right atrium and in determining expression of mRNA for ANP. These results show that the level of activity of HPA axis during stress affects the expression of genes in the heart.

1 Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří přispěli k vytvoření této dizertační práce.

Mé poděkování patří doc. MUDr. Milanovi Štenglovi, vedoucímu Ústavu fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni za vytvoření podmínek pro dokončení této dizertační práce, školitelce doc. MUDr. Magdaléně Chottové Dvořákové, Ph.D. a konzultantce doc. MUDr. Janě Slavíkové, CSc. za pomoc při výběru aktuálního a zajímavého tématu, odborné vedení, cenné rady a připomínky při přípravě rukopisu. Děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy, neboť v rámci projektu č. 99510 tato práce také vznikala.

Ráda bych poděkovala doc. MUDr. Jitce Švíglerové, Ph.D. za ochotu při hledání odpovědí na mé otázky, Ing. Dáše Jarkovské za morální a technickou podporu a laborantkám, paní Jaroslavě Lodrové a Monice Novákové za jejich laboratorní práci.

Děkuji doc. MUDr. Věře Klenerové, DrSc., vedoucí Neurofarmakologie Ústavu lékařské biochemie a lékařské diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za spolupráci v oblasti působení stresu.

Dále chci poděkovat profesorovi Wolfgangovi Kummerovi z Institutu anatomie a buněčné biologie Justus-Liebig Univerzity v Giessenu ve Spolkové republice Německo za zácvik a zdokonalení v různých laboratorních metodách molekulární biologie a za cenné konzultace experimentálních výsledků. Mé poděkování patří i dalším pracovníkům tohoto ústavu Renate Paddenberg, Tamaře Papadakis, Silke Wiegand a Patricii Berger.

A nakonec poděkování největší - mé rodině. Příteli Vaškovi za lásku, důvěru a trpělivost. Našim dětem Barče, Adamovi a Emě za jejich vynikající studijní výsledky, podíl na domácích pracích a všem za to, že mám to štěstí být s nimi.

Prohlášení o autorském podílu na předkládané práci

Prohlašuji, že jsem dizertační práci na téma „Studium morfologických a funkčních změn autonomní inervace srdce a cév a jejich příčin u chronických chorobných stavů“ vypracovala pod vedením školitelky samostatně, za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato dizertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Plzni, dne 18. 10. 2016

MUDr. Eliška Mistrová

Obsah

1	Poděkování.....	5
2	Teoretický úvod	11
2.1	Přehled srdeční inervace u zdravého jedince	11
2.1.1	Sympatická eferentní inervace srdce	12
2.1.2	Parasympatická eferentní inervace srdce.....	17
2.1.3	Senzorická inervace srdce	19
2.1.4	Vnitřní srdeční nervový systém	21
2.1.5	Neadrenergní necholinergní inervace srdce.....	23
	Neuropeptid Y	24
	Vazoaktivní intestinální peptid	25
	Substance P	26
	Peptid odvozený od genu pro kalcitonin	27
2.2	Diabetes mellitus a kardiovaskulární aparát.....	29
2.2.1	Diabetická angiopatie	30
2.2.2	Diabetická kardiomyopatie	31
2.2.3	Role neuropeptidů v diabetickém poškození srdce a cév	32
	Neuropeptid Y	32
	Vazoaktivní intestinální peptid	33
	Substance P	33
	Peptid odvozený od genu pro kalcitonin	34
2.3	Stres a kardiovaskulární systém	35
2.3.1	Změny srdeční inervace vlivem stresu.....	37
2.3.2	Úloha neuropeptidů v poškození srdce vlivem stresu	39
	Neuropeptid Y.....	39
	Vazoaktivní intestinální peptid	40
	Substance P	40
	Peptid odvozený od genu pro kalcitonin.....	41
3	Cíle práce	42
4	Použité metody.....	43
4.1	Příprava vzorků.....	43
4.2	Laserová mikrodisekce.....	44

4.3	Izolace RNA	44
4.4	Izolace proteinu.....	45
4.5	Reverzní transkripce	45
4.6	Polymerázová řetězová reakce kontrolovaná v reálném čase.....	46
4.7	Western blot	47
4.8	Nepřímá imunofluorescence.....	48
5	Experimentální část	50
5.1	Vliv experimentálně indukovaného diabetu na expresi signálních systémů neuropeptidů v srdci laboratorního potkana	50
5.1.1	Expresie genů signálního systému AM/CGRP v srdci a sensorických gangliích intaktního a diabetického laboratorního potkana	50
5.1.2	NK1 receptor v srdci normálního a diabetického potkana	59
5.2	Ovlivnění srdeční inervace laboratorního potkana různými typy stresu	65
5.2.1	Vliv dvou typů stresu na expresi a distribuci TH v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy	65
5.2.2	Účinek dvou typů stresu na expresi genů pro ChAT a M ₂ receptorů v srdečních síních potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy	71
5.2.3	Vliv dvou typů stresu na expresi a distribuci oxytocinového receptoru v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy	77
5.2.4	Vliv dvou typů stresu na expresi ANP v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy	84
6	Závěr	91
7	Literatura	94

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	adrenalin
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ACh	acetylcholin
AMK	aminokyselina
ANP	atriální natriuretický peptid
AP	akční potenciál
AR	adrenergní receptor
ATP	adenozintrifosfát
A.u.	arbitrární jednotka
cAMP	cyklický 3'5'-adenozinmonofosfát
cDNA	komplementární DNA
CGRP	peptid odvozený od genu pro kalcitonin
CGRPR	receptor pro peptid odvozený od genu pro kalcitonin
CNS	centrální nervový systém
Cq	kvantitativní cyklus
CRLR	receptor podobný kalcitoninovému receptoru
DBH	dopamin β -hydroxyláza
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
DRG	spinální ganglia, ganglia zadních kořenů míšních
FITC	fluorescein izothiocyánát
Gi	inhibiční G-protein
Gs	stimulační G-protein
h	hodina
HPA	hypotalamus–hypofýza–nadledviny
ChAT	cholinacetyltransferáza
ICA	intrakardiální katecholaminerní
ICS	kombinovaný imobilizační stres
Ig	imunoglobulin
IS	imobilizační stres
KA	katecholaminy
KAN	kardiovaskulární autonomní neuropatie
LA	levá síň
LE	Lewis

LV	levá komora
M	muskarinový
MAO	monoaminoxidáza
min	minuta
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
N	nikotinový
NA	noradrenalin
NANC	neadrenergní necholinergní
NK	neurokinin
OT	oxytocin
OTR	oxytocinový receptor
PACAP	skupina peptidů aktivovaných adenylátcyklázou
pb	pár bazí
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
PNMT	fenyletanolamin N - metyltransferáza
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RA	pravá síň
RAMP	protein modulující aktivitu receptoru
RE	relativní exprese
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní přepis následovaný polymerázovou řetězovou reakcí
RV	pravá komora
s	sekunda
SA	sinoatriální
SD	Sprague-Dowley
SDS	sodiumdodecylsulfát
SIF	malé intenzivně fluoreskující
SP	substance P
STZ	streptozotocin
TF	tepová frekvence
TH	tyrozinhydroxyláza
VIP	vazoaktivní intestinální polypeptid

2 Teoretický úvod

2.1 Přehled srdeční inervace u zdravého jedince

Srdeční sval fungující jako paralelní pumpa je zdrojem automatické elektrické aktivity, která předchází aktivitě mechanické. Vzhledem k tomu, že srdce musí za nejrůznějších okolností co nejpřesněji zajistit aktuální potřeby celého organismu, jsou kontrolní mechanismy jeho činnosti značně komplikované.

Činnost srdce je regulována na několika úrovních zahrnujících místní mechanismy i extrakardiální vlivy. Nejnižší úroveň je zprostředkována neurony srdečních ganglií, která informace nejen přepojují, jak se původně předpokládalo, ale zároveň vlastní aktivitou modulují činnost neuronů srdečního plexu. Experimentální výsledky posledních let pomohly k odhalení složitosti a významu funkce intrakardiálních neuronů, které vytvářejí vnitřní nervový systém srdce (Armour et al., 1997; Baptista a Kirby, 1997; Arora et al., 2001). S ohledem na morfologické a fyziologické vlastnosti je intrakardiální nervový systém také označován jako „malý mozek srdce“. Morfologie i funkce tohoto systému bude detailněji popsána v kapitole „Vnitřní srdeční nervový systém“. Za vyšší úroveň regulace je zodpovědný autonomní nervový systém. Nejvyšší stupeň řízení srdeční činnosti zahrnuje aktivitu neokortexu, limbického systému a hypotalamu (Armour, 1999).

Na autonomní regulaci srdce se podílí sympatická (adrenergní) a parasympatická (cholinergní) komponenta. Jejich prostřednictvím je ovlivňována srdeční frekvence (chronotropie), kontraktilita (inotropie), rychlost vedení vzruchu (dromotropie) a vzrušivost (bathmotropie). Sympatikus vykazuje účinky kardioexcitační na rozdíl od parasympatiku, jehož vliv je kardioinhibiční (Higgins et al., 1973; Bers, 2002).

Původní představa, že obě části autonomního nervového systému pracují odděleně, byla upřesněna na základě zjištění, že jejich aktivity se navzájem recipročně ovlivňují (Kollai a Koizumi, 1979). Tento funkční vztah vykazuje charakteristiku zesíleného antagonismu. Bylo zjištěno, že synchronní stimulace bloudivého nervu způsobí větší absolutní pokles srdeční frekvence za účasti sympatické aktivity, než bez ní (Levy, 1971).

Experimentální a klinické studie přinesly nový pohled na problematiku organizace periferní části autonomní inervace. Ukázalo se, že postgangliová eferentní vlákna obou systémů ovlivňují převodní systém srdeční a pracovní kardiomyocyty a zároveň sympatický systém usměrňuje průtok krve koronárním

řečištěm (Levy et al., 1966; Levy, 1971; Randall et al., 1972; Bonham et al., 1987; Feigl, 1998; Weihe et al., 2005). Dále bylo zjištěno, že sensorická inervace srdce umožňuje obousměrné spojení mezi srdcem a centrálním nervovým systémem (CNS; Kawashima, 2005; Surtees et al., 2008).

Hustota inervace je rozdílná mezi jednotlivými vrstvami srdeční svaloviny a zároveň je významně větší v síních než v komorách (Wittling et al., 1998a; Wittling et al., 1998b; Kawano et al., 2003). Srdeční komory, odpovědné za sílu kontrakce, jsou inervovány převážně sympatickými vlákny, zatímco parasympatické terminály inervují především srdeční síně (Zipes, 2008; Triposkiadis et al., 2009).

2.1.1 Sympatická eferentní inervace srdce

Vliv sympatické inervace na srdce je uskutečňován a regulován pomocí kardiovaskulárních reflexů, které mohou aktivitu sympatiku snižovat, jako reflexy vycházející z aortálních, karotických a plicních baroreceptorů; nebo ji zvyšovat, a to v případě stimulace periferních chemoreceptorů (Malliani et al., 1983; Triposkiadis et al., 2009).

Sympatická inervace srdce je tvořena dvouneuronovou sestupnou visceromotorickou dráhou. Buněčná těla pregangliových sympatických neuronů se nacházejí v intermediolaterálních jádrech postranních rohů míšních hrudních segmentů Th₁-Th₅₋₆. Pregangliová vlákna vystupují z míchy předními kořeny a jako rami communicantes albi směřují k paravertebrálnímu sympatickému kmeni, kde většina z nich končí synapsí s těly postgangliových neuronů (Kawashima, 2005; Langley, 1892; Čihák, 2004). Mediátorem pregangliových neuronů je acetylcholin (ACh) vázající se na nervový typ nikotinového acetylcholinového receptoru (Moaddel a Wainer, 2003; Goldstein, 2010).

Lokalizace těl postgangliových sympatických neuronů je složitá z důvodu značné mezidruhové a interindividuální variability (Axford, 1928; Wreth, 1959). Synapse mezi pregangliovými a postgangliovými neurony se u laboratorního potkana nacházejí převážně ve středním krční a hvězdicovitém gangliu (Pardini et al., 1989). U člověka je lokalizace těl postgangliových neuronů rozložena ve třech krčních gangliích, v hvězdicovitém gangliu (ggl. stellatum) vzniklém spojením dolního krčního a 1. hrudního ganglia a v prvních čtyřech hrudních gangliích sympatického kmene (Kuntz, 1947; Kawashima, 2005). Postgangliová vlákna jsou k srdci vedena cestou nn. cardiaci (n. cardiacus cervicalis superior, medius a inferior; nn. cardiaci thoracici). Po vstupu do srdce se dostávají do blízkosti

kardiomyocytů, kde se větví na terminální vlákna vytvářející síť okolo srdečních buněk (Triposkiadis et al., 2009). Ve svém průběhu mají vlákna varikozity obsahující váčky s mediátorem. Gradient sympatické inervace směřuje od srdeční baze ke hrotu (Pierpont et al., 1985).

Klasickým přenašečem postgangliových sympatických neuronů v srdci je noradrenalin (NA) a příslušná nervová vlákna jsou označována jako adrenergní (Jacobowitz, 1967; Hirst et al., 1996). Syntéza NA byla podrobně popsána již v roce 1956 von Eulerem a Hillarpem (von Euler a Hillarp, 1956). Výchozím substrátem pro tvorbu NA je esenciální aminokyselina (AMK) tyrozin. Prvním krokem kaskády je hydroxylace tyrozinu na 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA) za účasti enzymu tyrozinhydroxylázy (TH). DOPA je následně dekarboxylována na dopamin za katalýzy nesespecifickou dekarboxylázou. Z dopaminu účinkem enzymu dopamin-beta-hydroxylázy (DBH) vzniká NA, který je uskladněn v synaptických váčcích (Weiner, 1970). Limitujícím faktorem syntézy NA je aktivita TH (Smith, 1971) a dostupnost tyrozinu (Milner a Wurtman, 1986). NA je tvořen do zásoby, skladován v synaptických váčcích v postgangliových nervových zakončeních sympatiku a v případě potřeby uvolněn procesem exocytózy.

Akční potenciál (AP), který po axonu doputuje do míst s varikositami, vede k depolarizaci cytoplazmatické membrány, otevření napěťově řízených Ca^{2+} kanálů a vtoku Ca^{2+} do buňky. Zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} vyvolá pohyb váčků s mediátorem, umožní splnutí membrány vezikul s membránou axonu a uvolnění obsahu vezikul. V průběhu sympatické stimulace se uvolňuje pouze malé procento z vytvořeného a uskladněného NA (Goldstein, 2010). NA difunduje do okolí a váže se na adrenergní receptory (AR) lokalizované v membráně pracovních a převodních buněk (Ahlquist, 1948). Vazba mezi mediátorem a receptorem vyvolá účinek NA. Dalším místem působení NA jsou presynaptické AR typu α_{2A} a α_{2C} , které fungují na podkladě negativní zpětné vazby. Jejich prostřednictvím je kontrolováno množství uvolňovaného NA z nervových zakončení (Aggarwal et al., 2001; Balogh et al., 2009; Gyires et al., 2009). Srdce je zároveň ovlivňováno i katecholaminy (KA), které jsou k srdečním buňkám zaneseny krevním proudem z dřeně nadledvin.

Z extracelulárního prostoru je NA odstraňován prostřednictvím několika mechanismů. Přibližně 80 % NA vstupuje za pomoci specifického membránového transportéru typu 1 zpět do presynaptického zakončení (Leineweber et al., 2002). Zde se ukládá do granul nebo je metabolizován na zevní mitochondriální membráně enzymem monoaminoxidázou-A (MAO-A). Druhým místem

degradace jsou cílové buňky neneuronálního původu, kde se MAO nachází ve dvou formách MAO-A a MAO-B (Langer, 1974; Goldstein, 2010). Velmi malá část NA je degradována enzymem katechol O-methyltransferázou lokalizovaným v cytoplazmatické membráně cílových buněk (Leineweber et al., 2002). Zbývající množství NA přestupuje do krevního oběhu, kde se stává součástí celkové plazmatické hladiny KA.

Protein AR se vždy skládá ze 7 transmembránových domén spojených s heterotrimerickým G-proteinem, jehož heterogenita je velmi vysoká. Dosud byla prokázána existence desítek typů. Na základě struktury a funkce se rozlišují dvě základní skupiny AR, a to α -AR a β -AR, které se s ohledem na rozdílnou afinitu k agonistům a antagonistům dále dělí na jednotlivé podtypy. V současné době je známo celkem 9 podtypů AR: 3 typy α_1 -AR (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), 3 typy α_2 -AR (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) a 3 typy β -AR (β_1 , β_2 , β_3) (Bylund et al., 1994; Hieble et al., 1995). Alfa-AR se vzájemně liší v pořadí AMK, tkáňové expresi a signalizačních kaskádách (Graham et al., 1996). Jednotlivé podtypy β -AR byly definovány na základě rozdílné afinity k adrenalinu (A) a NA. Beta₁-AR mají stejnou afinitu k oběma agonistům, zatímco β_2 -AR vykazují 100krát vyšší afinitu k A než NA (Lands et al., 1967).

Původní představa, že jednotlivé podtypy β -AR jsou orgánově specifické, např. β_1 -AR na membráně kardiomyocytů nebo β_2 -AR v hladké svalovině cév a bronchů, byla již překonána (Lands et al., 1967). Jak dokládají četné studie, v rámci jednoho orgánu, avšak ne nutně na membráně stejné buňky, mohou být zastoupeny oba typy těchto receptorů (Brodde, 1990). V savčím srdci jsou přítomny oba typy AR, avšak s převahou β -AR, a to β_1 -AR na kardiomyocytech a β_2 -AR na srdečních fibroblastech (Porter a Turner, 2009; Triposkiadis et al., 2009).

Ze skupiny α_1 -AR byly v srdci laboratorních potkanů detekovány všechny 3 α_1 -AR podtypy mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA), ale pouze α_{1A} -AR a α_{1B} -AR typy jsou přítomny i ve formě proteinu (Rokosh et al., 1994; Stewart et al., 1994). AR typu α_1 se nacházejí ve všech srdečních oddílech laboratorního potkana s převahou v komorách a v porovnání se savci, jako jsou myši, morče nebo člověk, je jejich hladina přibližně 8krát vyšší (Steinfath et al., 1992; Michel et al., 1994). Přítomnost α_1 -AR byla detekována na povrchu kardiomyocytů, zatímco u srdečních fibroblastů prokázána nebyla (Vatner, 1988; Stewart et al., 1994).

Novější studie prokazují výskyt α_1 -AR na jaderné membráně komorových myocytů u novorozených i dospělých potkanů (Buu et al., 1993; Wright et al., 2008; Wright et al., 2012). U hlodavců i člověka se α_{1A} - a α_{1B} -AR vyskytují především na kardiomyocytech (O'Connell et al., 2003; Jensen et al., 2009a),

zatímco α_{1D} -AR v hladké svalovině koronárních tepen (Jensen et al., 2009b). Ukazuje se, že existuje analogie v expresi jednotlivých podtypů α_1 -AR v koronárních arteriích a myokardu, neboť lidské srdce, stejně jako potkaní, obsahuje rovněž všechny 3 podtypy α_1 -AR (Michel et al., 1994; Rokosh et al., 1996; Jensen et al., 2009a).

AR typu α_1 jsou velice dobře známy svým vazokonstrikčním účinkem na cévní stěnu. Alfa $_1$ -AR primárně kontrahují koronární arterie, zatímco α_2 -AR působí především na úrovni arteriol (Heusch et al., 2000). Stimulace α_1 -AR endogenními KA způsobuje za fyziologické situace pouze malé změny v průměru koronárních arterií (Hodgson et al., 1989; Lorenzoni et al., 1996), ale v cévách s ateroskleroticky změněným endotelem je zúžení výraznější a může vést k ischemii myokardu (Baumgart et al., 1999; Heusch et al., 2000). Použitím selektivních α_1 -AR antagonistů by mohla být navozena vazodilatace koronární cévy a zlepšení krevního zásobení srdeční tkáně bez vedlejších účinků na srdce (Kern et al., 1985; Shannon a Chaudhry, 2006; Jensen et al., 2009a).

AR podtypu α_{2A} spolu s α_{2C} jsou lokalizovány presynapticky a kontrolují množství uvolněného NA ze srdečních sympatických terminál. Jejich destrukce vede k srdeční hypertrofii s následným selháním v důsledku chronicky zvýšeného uvolňování KA (Triposkiadis et al., 2009).

V srdci člověka byly identifikovány rovněž všechny 3 podskupiny β -AR (Bylund et al., 1994) a to na pracovních kardiomyocytech (Lymperopoulos et al., 2013), fibroblastech, endoteliálních buňkách i na buňkách převodního systému srdečního (Lymperopoulos a Bathgate, 2013; Lymperopoulos et al., 2013). AR typu β_1 převažují a ve srovnání s β_2 -AR jsou exprimovány v poměru 70:30. Výskyt β_2 je vyšší v síních v porovnání s komorami (Ikezono et al., 1987). AR typu β_2 (60 %) byly spolu s α_1 -AR (30 %) rovněž detekovány ve větších tepnách a byl prokázán jejich vazodilatační efekt (Jensen et al., 2009b).

Přítomnost β_3 -AR mRNA byla v srdci opakovaně prokázána (Gauthier et al., 2000; Myslivecek et al., 2006) a protein β_3 -AR byl detekován imunohistochemicky (De Matteis et al., 2002). Beta $_3$ -AR jsou však za fyziologických podmínek neaktivní (Skeberdis et al., 2008).

Jak již bylo zmíněno, signální cesta všech β -AR je uskutečňována prostřednictvím G-proteinu. Zatímco β_1 -AR aktivují stimulační G protein (G_S), β_2 -AR stimulují jak G_S , tak i inhibiční G protein (G_i). K přechodu od G_S k G_i dochází vlivem dlouhodobé stimulace β_2 -AR (Communal et al., 1999). G_S pracuje jako receptorový akcelerátor, G_i jako receptorová brzda (Feldman et al., 2005). Mimo to

β -AR využívají dalších signálních cest, zejména protein kinázu aktivovanou mitogenem a Ca^{2+} / na kalmodulinu závislou protein kinázu II (Baker et al., 2003; Galandrin a Bouvier, 2006; Xiao et al., 2006).

Vazba ligandu na β -AR spojený s G_s vede k aktivaci adenylátcyklázy a tím ke zvýšené produkci intracelulárního cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který se váže na protein kinázu A. Ta poté vykazuje celou řadu funkcí: 1) fosforyluje L-typ Ca^{2+} kanálů a aktivuje ryanodinový receptor, zvyšující cytoplazmatickou hladinu Ca^{2+} a vedoucí k zesílené kontrakci (Benes et al., 2012), 2) stimuluje hyperpolarizací aktivovaný proud kationtů tekoucí do buňky, který ovlivňuje vznik a průběh rytmické aktivity pacemakerových buněk (Ludwig et al., 1998), 3) fosforylací fosfolambanu, modulátoru vápníkové pumpy závislé na přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP), snižuje jeho inhibiční efekt. Tím urychluje zpětný přenos Ca^{2+} iontů do sarkoplasmatického retikula a zkracuje dobu relaxace srdeční svaloviny (Sulakhe a Vo, 1995), 4) snižuje citlivost myofilament k Ca^{2+} a tím urychluje jejich relaxaci (Sulakhe a Vo, 1995), 5) aktivací fosfolemmanu, podjednotky Na^+/K^+ ATPázy, snižuje inhibiční vliv na aktivitu této pumpy. To vede k rychlejšímu přesunu Na^+/K^+ a zkrácení doby návratu potřebné k dosažení stavu klidového membránového napětí (Despa et al., 2005).

U člověka stimulace β_1 - a β_2 -AR vykazuje pozitivně inotropní a chronotropní účinek spolu s pozitivně lusitropním a dromotropním účinkem (Floras, 2009; Triposkiadis et al., 2009). Ve stěně koronárních artérií aktivace β_1 - a β_2 -AR vede k jejich dilataci (Amenta et al., 1991; Monopoli et al., 1993). Kromě již zmíněných vlivů, β_1 -AR podporují také apoptózu kardiomyocytů (Xiao et al., 1999), zatímco dlouhotrvající aktivace β_2 -AR má antiapoptotický efekt a tedy kardioprotektivní účinek (Chesley et al., 2000).

V protikladu k β_1 - a β_2 -AR je stimulace β_3 -AR spojena s výrazným poklesem kontraktility komorového myokardu (Gauthier et al., 2000). Tento negativně inotropní účinek byl zaznamenán i s použitím agonistů β_3 -AR (Tavernier et al., 2003). Signální dráha je pravděpodobně zprostředkována enzymem syntázou oxidu dusnatého, která je lokalizována na endotelových buňkách a kardiomyocytech (Schulz et al., 2005; Moens et al., 2010). Předpokládaný význam funkce těchto receptorů spočívá v ochraně myokardu během intenzivní adrenergní stimulace, fungující jako negativní zpětná vazba působící proti pozitivně inotropnímu vlivu KA (Gauthier et al., 1998; Rozec et al., 2009). Nicméně, úloha β_3 -AR v průběhu fyziologických i patologických podmínek je předmětem dalšího zkoumání.

Dlouhodobá stimulace α_1 -AR má příznivý trofický vliv na postnatální vývoj a růst srdce. V dospělosti vykazuje adaptivní a protektivní účinek při působení chronického stresu a v průběhu srdečního selhání, kdy množství α_1 -AR je zvýšeno bez změny funkce. To je v protikladu k β -AR, jejichž exprese na úrovni mRNA je u srdečního selhání snižena, a zároveň mají tyto receptory porušenou funkci (Bristow et al., 1982; Jensen et al., 2009a). Kardioprotektivní účinek KA zahrnuje několik adaptivních procesů, jako je inhibice zániku myocytů, zvýšený proteinový a glukózový metabolismus a zesílený pozitivně inotropní účinek (Jensen et al., 2011).

2.1.2 Parasympatická eferentní inervace srdce

Parasympatická inervace srdce je zajišťována prostřednictvím rami cardiaci nervi vagi. Těla pregangliových neuronů jsou lokalizována v prodloužené míše v nucleus ambiguus (Plecha et al., 1988), v menší míře v nucleus dorsalis nervi vagi a v oblasti mezi oběma jádry (Nosaka et al., 1979; Izzo et al., 1993; Taylor et al., 1999; Cheng et al., 2004). Axony těchto neuronů jsou součástí bloudivého nervu, který vystupuje z lebky skrze foramen jugulare, v jehož blízkosti je uloženo ganglion jugulare a nodosum. Část vláken inervujících srdce se oddělí a pokračuje k srdci, kde tvoří synapse s postgangliovými parasympatickými neurony. Ty jsou v srdci uloženy převážně subepikardiálně v gangliích čítajících desítky až stovky neuronů (Čihák, 2004).

Axony postgangliových neuronů jsou krátké, nemyelizované a tvoří bohatou srdeční pleteň. Hustota těchto vláken je v jednotlivých srdečních oddílech rozdílná s významnou převahou v síních. Stanovením obsahu ACh a aktivity cholinacetyltransferázy (ChAT) bylo zjištěno, že koncentrace ACh v komorách tvoří pouze asi 1/5 v porovnání s jeho koncentrací v síních (Kent et al., 1974). Nejvyšší hustota ChAT byla nalezena v oblasti sinoatriálního uzlu (SA; Slavíková a Tucek, 1982).

Syntéza ACh probíhá v cytoplasmě nervových zakončení ze substrátů acetylkoenzymu A a cholinu v reakci katalyzované enzymem ChAT (Macintosh, 1959). Předpokládá se, že množství cholinu v místě tvorby je limitujícím faktorem tvorby ACh (Geiger et al., 1992; Tucek, 1983). Zatímco acetylkoenzym A je tvořen procesem oxidativní dekarboxylace pyruvátu v mitochondriích, cholin je získáván z různých zdrojů. Jeho zásobárnou jsou jednak fosfolipidy tvořící součást membrány kardiomyocytů, dále plazma a významným poskytovatelem cholinu je

i sám ACh (Corradetti et al., 1983). Po uvolnění ACh a zprostředkování fyziologického účinku je štěpen enzymem acetylcholinesterázou (Massoulie et al., 1993) a více jak polovina vzniklého cholinu je opět využita k syntéze ACh (Collier a Macintosh, 1969). Cholin je do nervového zakončení transportován z extracelulárního prostředí cholinovým přenašečem závislým na přítomnosti sodíku (Yamamura a Snyder, 1973). Vytvořený ACh je skladován ve váčcích terminálních vláken (Macintosh, 1959), kam je přenesen prostřednictvím glykoproteinu nesoucího označení vezikulární acetylcholinový transportér (Anderson et al., 1983). Přítomnost tohoto přenašeče lze prokázat vazbou specifické protilátky proti vezikulárnímu acetylcholinovému transportéru, která je využívána k identifikaci cholinergních neuronů (Eiden, 1998).

Na buněčné úrovni je účinek ACh zprostředkován dvěma strukturně rozdílnými typy cholinergních receptorů. Ty se, s ohledem na jejich afinitu k přirozeným alkaloidům muskarinu a nikotinu, rozdělují na muskarinové (M) a nikotinové (N) (Hulme et al., 1990; Caulfield a Birdsall, 1998; Wess, 2004). Parasympatické regulace srdce se účastní především M receptory.

Dosud bylo popsáno celkem pět podtypů M receptorů, označující se M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ (Caulfield a Birdsall, 1998). V membránách srdečních buněk laboratorního potkana byla původně zjištěna existence pouze M₂ receptorů (Kirsch et al., 1988), avšak další studie, která byla založená na kvantitativním stanovení exprese genů pro M₁-M₅ receptory, potvrdila v srdci potkana přítomnost mRNA všech podtypů M receptorů. Z nich byla nejvíce zastoupena mRNA pro M₂ receptory. Exprese této mRNA byla v síních dvojnásobná v porovnání s komorami (Krejčí a Tucek, 2002). Tomuto zjištění odpovídají i výsledky další studie zaměřené na stanovení přítomnosti a množství proteinů jednotlivých typů M receptoru. Autoři zjistili, že v síních potkana jsou přítomny pouze M₂ receptory, zatímco v komorách jsou navíc i receptory typu M₁ a M₃₋₅, přičemž tyto receptory zde tvoří řádově jednotky procent všech přítomných M receptorů (Mysliveček et al., 2008). Naproti tomu studie provedená na lidských srdcích prokázala přítomnost M₁, M₂, M₃ a M₅ receptorů, přičemž receptory podtypu M₁ a M₅ byly nalezeny v síních i komorách. Dominantním podtypem byl stejně jako u potkana stanoven M₂ podtyp, jehož množství bylo v síních i komorách srovnatelné (Wang et al., 2001).

Aktivace M receptorů vede k poklesu srdeční frekvence změnou elektrické aktivity SA uzlu (Levy, 1997), zpomalením vedení elektrických impulsů přes atrioventrikulární uzel (Priola, 1980) a kromě toho i k méně výraznému snížení

komorové kontrakce (Reeves a Hefner, 1961). Pokles uvedených parametrů vyústí ve snížení srdečního výdeje. Za negativně chronotropní a inotropní efekt parasympatiku jsou na srdci zodpovědné M_2 receptory (Harvey a Belevych, 2003). M_2 a M_4 receptory se přednostně váží na G_i . Funkčně jsou tyto receptory spřaženy s adenylát cyklázou, na jejíž aktivitu mají inhibiční vliv, vedoucí k poklesu tvorby cAMP. Důsledkem této aktivace je prodloužení doby otevření draslíkových kanálů a zkrácení doby trvání pomalé diastolické depolarizace (Zholos et al., 2004). Receptory podtypů M_1 a M_3 aktivují fosfolipázu C s následným vzestupem koncentrace intracelulárního vápníku či aktivace opožděného rektifikujícího draslíkového proudu (Wang et al., 2004; Harvey, 2012).

Dosud popsané funkce M_3 receptorů zahrnují regulaci srdeční frekvence (Wang et al., 2004), modulaci stažlivosti, ovlivnění mezibuněčné komunikace a propagace AP (Yue et al., 2006). Tyto receptory mají pravděpodobně určitý podíl na vzniku a trvání síňové fibrilace (Liu et al., 2005). Selektivní aktivace M_3 receptorů na membráně pracovních buněk pomocí pilokarpinu zkracuje dobu trvání AP, aktivuje činnost protein kinázy C a spouští fosforylaci iontových kanálů jak v srdečních síních, tak i v komorách (Abramochkin et al., 2008; Abramochkin et al., 2013). Novější experimenty ukazují na kardioprotektivní účinek M_3 receptorů při srdečním infarktu u laboratorního potkana (Liu et al., 2004a; Liu et al., 2004b).

2.1.3 Senzorická inervace srdce

Senzorická nervová vlákna přenášejí informace ze srdce do páteřní a prodloužené míchy, kde prostřednictvím interneuronů ovlivňují sympatické a parasympatické eferentní pregangliové neurony. Hrají roli nejen v detekci a monitorování srdečních událostí, jako je ischemie a reperfúze (Zahner et al., 2003), ale mají mnohem komplexnější úlohu v udržování tkáňové homeostázy a v přenosu bolestivých podnětů (Dyavanapalli et al., 2014).

Langley popsal srdeční autonomní inervaci před více než sto lety, přičemž již tehdy předpokládal, že senzorická vlákna jsou důležitou součástí autonomního nervového systému a hrají významnou roli v autonomních reflexech, stejně tak jako v přenosu viscerální bolesti (Langley, 1903). Zavedl používání pojmu aferentní sympatická vlákna. Dnes je známo, že senzorická vlákna jsou součástí obou větví autonomního nervového systému, avšak větší část náleží k sympatické komponentě (Armour, 1999). Významné je zjištění, že terminály senzorických nervových vláken mohou být stimulovány také antidromně a uvolňovat v srdci

mediátory na základě axonálních reflexů (Lundberg, 1996). Tato oboustranná, aferentní i eferentní funkce sensorické srdeční inervace vedla k zavedení názvu sensorimotorická inervace (Burnstock, 1990).

Senzorická vlákna reagují na mechanické i chemické podněty (Gagliardi et al., 1988; Armour, 1999). Nervová zakončení jsou drážděna endogenními chemickými látkami jako je NA, ATP, neuropeptid Y (NPY), adenzin, opioidní peptidy, vazomotorní intestinální peptid (VIP) a také látkami uvolňovanými během ischemie jako je bradykinin, serotonin, histamin či tromboxan A₂ (Cinca a Rodriguez-Sinovas, 2000; Fu a Longhurst, 2009). Vyvolání bolestivého podnětu je u obou větví autonomního nervstva způsobeno podrážděním sensorických zakončení bradykininem, serotoninem a prostaglandiny (Meller a Gebhart, 1992). Dráždění srdečních sensorických neuronů vede k reflexní aktivaci sympatické komponenty, jejímž výsledkem je u člověka i laboratorního potkana zvýšení srdeční frekvence (Gennari a Fischer, 1985; Saito et al., 1986). Experimentálně lze jejich podráždění vyvolat u anestetizovaných zvířat epikardiální aplikací kapsaicinu, bradykininu nebo adenzinu (Staszewska-Woolley a Woolley, 1990).

Těla sensorických neuronů inervujících srdce leží v gangliích zadních kořenů míšních v rozsahu C₆-Th₆ (Vance a Bowker, 1983; Janes et al., 1986; Kukanova a Mravec, 2006). Podněty z epikardu, myokardu, endokardu a z koronárních arterií jsou vedeny nemyelinizovanými axony přes sympatický kmen a následně cestou zadních kořenů míšních do zadního rohu míšního (Cervero, 1994; Huang et al., 1996b). V šedé hmotě míšní vytvářejí axony sensorických neuronů synapse s interneurony na stejné úrovni, jako jsou lokalizována ganglia (Barr a Kirnan, 1993) nebo putují o několik segmentů výše či níže (Kuo et al., 1984). Vzruchy dále postupují k neuronům tvořícím jádro v prodloužené míše zvané nucleus tractus solitarius (Spyer, 1994). Zde se shromažďují aferentní viscerosenzorické informace přicházející ze srdce, z baro- a chemoreceptorů cév a dále z dýchacího a trávicího ústrojí (Xie et al., 1999).

Do nucleus tractus solitarius se sensorické informace ze srdce dostávají i prostřednictvím bloudivého nervu, a to díky sensorickým neuronům, jejichž těla leží v nodózním gangliu. Terminální vlákna těchto neuronů tvoří síť v blízkosti kardiomyocytů, nikoliv však v okolí hlavních intrakardiálních ganglií (Cheng et al., 1997).

Přenosu sensorických informací se účastní klasické mediátory i neuropeptidy (Zhuo et al., 1997). Syntéza neuropeptidů probíhá v tělech sensorických neuronů a do nervových zakončení jsou dopravovány axonálním

transportem (Mulderry et al., 1988; Yoshizawa et al., 2013). V srdci sensorická vlákna uvolňují neuropeptidy, jako je peptid odvozený od genu pro kalcitonin (CGRP, z angl. „Calcitonin Gene-Related Peptide“) a substance P (SP), které modulují tonus cévní svaloviny a vykazují pozitivně chronotropní a inotropní účinek (Franco-Cereceda a Lundberg, 1988; Hoover et al., 2000).

2.1.4 Vnitřní srdeční nervový systém

V původním konceptu nervové kontroly srdce byla srdeční ganglia považována pouze za jednoduché převodní stanice, které přenášely vzruchy mezi parasympatickými pregangliovými a postgangliovými neurony. Tato ganglia však mají mnohem komplexnější strukturu a funkci. Přijímají informace z CNS i ze srdce a hrudníku, zpracovávají je a výslednou odpovědí ovlivňují srdeční aktivitu v režimu označovaném v literatuře „from beat to beat“ (Horackova a Armour, 1995; Randall et al., 2003; Armour, 2004).

Vnitřní srdeční nervový systém je tvořen heterogenní populací buněk zahrnující těla postgangliových parasympatických i sympatických neuronů, sensorických neuronů, interneuronů a nervových zakončení. Početně významná populace unipolárních neuronů propojuje všechny součásti do bohaté sítě (Pauza et al., 1997; Slavíková et al., 2003; Kukanova a Mravec, 2006). V gangliích byla také prokázána přítomnost malých intenzivně fluoreskujících (SIF, z angl. „Small Intensely Fluorescent“) buněk (Shvalev a Sosunov, 1985). Těla neuronů jsou obklopena gliovými buňkami, nazývanými satelitní buňky (Pannese, 1981).

Počet neuronů v gangliích je velmi variabilní. Je odhadováno, že v lidském srdci se nachází několik tisíc neuronů a jejich těla mají různou velikost i tvar (Armour et al., 1997). Pomocí elektronové mikroskopie byly v lidských srdečních gangliích identifikovány axodendritické synapse. Axosomatické spoje byly nalezeny u laboratorního potkana, zatímco u člověka jsou spíše výjimečné (Ellison a Hibbs, 1976).

Srdeční ganglia jsou lokalizována především v okolí vstupu velkých žil, kolem kořene aorty a v oblasti mezisíňového septa (King a Coakley, 1958). Na zadním povrchu obou síní laboratorního potkana se nachází přibližně 5 srdečních ganglií. Více jak 50 % všech neuronů je lokalizováno v horní části interatriálního septa a jejich vlákna tvoří pleteně na předním povrchu obou síní a komor (přední pravosíňová a levosíňová pleteně). Přibližně čtvrtina neuronů se nachází na zadním povrchu levé síně, odkud axony směřují na zadní povrch síní i komor. Méně než

25 % neuronů se vyskytuje v dolní části mezisíňového septa a na zadním povrchu pravé síně, odkud jejich vlákna směřují k přední stěně pravé síně. Nejméně neuronů bylo nalezeno ve shluku obkružujícím aortu, který inervuje ventrální stěny obou komor a koronární tepny (Pardini et al., 1987).

U člověka se srdeční ganglia nacházejí subepikardiálně, v tukové tkáni na dorzální straně baze srdeční, při ústí plicních žil a v oblasti mezi nimi (Johnson et al., 2004). Do současné doby bylo identifikováno 10 oblastí nejčastějšího výskytu: 5 v oblasti obou síní a stejný počet v horních oblastech komor. Propojenost srdečních ganglií přibývá v průběhu intrauterinního života člověka, takže v novorozeneckém věku je systém již velmi dobře vyvinut (Navaratnam, 1965; Shvaley a Sosunov, 1989).

Za fyziologických podmínek je činnost srdeční nervové pleteně modulována sympatikem a parasympatikem (Armour et al., 1997; Hou et al., 2007). Lokální obvod však vykazuje aktivitu i za podmínek, kdy je extrakardiální regulace vyřazena z funkce, např. při chronické decentralizaci. Z této skutečnosti vyplývá, že intramurální srdeční neurony mohou být aktivovány i senzoryckými neurony plexu (Huang et al., 1993) monitorujícími aktuální situaci v myokardu. Tato skutečnost vedla k vytvoření konceptu „malého srdečního mozku“ (Randall, 2000).

Neurony v srdečních gangliích tvoří a uvolňují kromě ACh a NA celou řadu dalších přenašečů (Richardson et al., 2003; Slavíková et al., 2005). SIF buňky syntetizují dopamin a serotonin, některé magnocelulární neurony jsou schopny tvořit i A (Slavíková et al., 2003). Prokázána zde byla i přítomnost enzymů podílejících se na syntéze histaminu (Singh et al., 1999). Chemická rozmanitost intrakardiálních neuronů může odrážet funkční specializaci těchto neuronů (Richardson et al., 2003).

Význam funkce intrakardiálního nervového systému se může projevit v souvislosti s výkony prováděnými na srdci. Jeho důležitost se zvyšuje po transplantaci srdce, kdy je přerušen regulační vliv CNS, potransplantační decentralizaci, původně označované výrazem „potransplantační denervace“ (Schultz, 2001).

Potencionálně negativní dopad na intrakardiální nervový systém mají také chirurgické postupy při chlopenních náhradách, kdy řez tkáni je veden oblastmi s vysokým výskytem ganglií (Singh et al., 1996). Tuto hypotézu podporuje pozorování výrazného snížení pooperačních arytmí u pacientů s koronárním bypasem se zachovaným epikardiálním tukem v místech, kde se vyskytují intrakardiální ganglia (Cummings et al., 2004).

2.1.5 Neadrenergní necholinergní inervace srdce

Původně se předpokládalo, že každý neuron určité populace tvoří a uvolňuje pouze jeden typ přenašeče (Burnstock, 2009), a proto byly NA a ACh po dlouhou dobu považovány za jediné mediátory eferentní části autonomního nervstva. Počátkem 60. let 20. století byla tato teorie vyvrácena objevem neadrenergních necholinergních (NANC) visceromotorických vláken, jejichž terminály byly poprvé popsány v hladké svalovině trávicího traktu a v močovém měchýři (Von Euler a Gaddum, 1931; Itoh et al., 1995; Goyal a Hirano, 1996) a počátkem 90. let i v srdeční tkáni (Hoover et al., 2000). Prvním identifikovaným mediátorem byl ATP a příslušné neurony byly označeny jako purinergní. Vedle purinergních neuronů byla v srdečním plexu potvrzena bohatá škála dalších mediátorů zahrnující např. galanin, CGRP, SP, somatostatin, cholecystokinin či bombesin (Bayorh a Feuerstein, 1985; Raybould a Tache, 1988; Schindler et al., 1996).

Z postgangliových sympatických vláken se uvolňuje NA společně s NPY a z terminál postgangliových parasympatických vláken je s ACh secernován VIP. Podstatu této koexistence a kotransmise definoval na počátku 90. let minulého století Burnstock (Burnstock, 1990).

Neuropeptidy syntetizované a uvolňované neurony srdečních ganglií představují nejpočetnější a chemicky nejpestřejší skupinu NANC přenašečů autonomního nervového systému. Jsou syntetizovány na ribozomech drsného endoplazmatického retikula v těle nervové buňky a axonálním transportem dopraveny do nervových terminál (Ganten et al., 1991). Zde jsou skladovány ve velkých synaptických váčcích buď samostatně nebo ve vzájemné kombinaci s klasickými přenašeči (Fried, 1995). K jejich uvolnění dochází procesem exocytózy při vyšší frekvenci vzruchové aktivity neuronů (Edwards a Bloom, 1982). Neuropeptidy ovlivňují přenos informace nejen mezi neurony, ale také mezi neurony a buňkami efektoru, a proto jsou považovány za neuromodulátory. K místům jejich působení náleží i presynaptický element, ve kterém mohou měnit množství uvolňovaného mediátoru a současně vazbou na receptor v cílové tkáni ovlivňovat intracelulární pochody. Neuropeptidy také plní úlohu lokálních neurohormonů. Jsou pomalu degradovány, difundují do okolní tkáně a parakrinně ovlivňují funkci buněk (Bean et al., 1994).

Účinky neuropeptidů v tkáních jsou dvojí: krátkodobé a dlouhodobé. V porovnání s klasickými mediátory převládá dlouhodobé působení neuropeptidů,

kteře se uplatňuje pŕedevším bĕhem vŕvoje tkání, jejich cĕvního zászobení a inervace, ale také za rŕznŕch patologickŕch stavŕ (Sun et al., 1998; Burnstock, 2002; Protas et al., 2003; Burnstock a Verkhatsky, 2010).

V srdečním nervovĕm plexu jsou za hlavní a nejvŕznamnĕjší považovány: NPY, VIP, SP a CGRP.

Neuropeptid Y

NPY je tvořen 36 AMK, vzniká odštĕpením z dlouhĕ, prekurzorovĕ molekuly preproNPY v sekrečních vácčích v pŕbĕhu axonálního transportu. Poprvĕ byl izolován z prasečího mozku (Tatemoto, 1982).

NPY je považován za nejrozšířenĕjší peptid centrálního i periferního nervovĕho systému. NPY je skladován a uvolňován z postgangliovŕch sympatickŕch zakončení společně s NA (Lundberg et al., 1983). Pŕítomnost NPY vřak byla prokázána i v bunĕčných tĕlech intrakardiálních neuronŕ srdečních ganglií (Richardson et al., 2003; Slavíková et al., 2003). Neurony obsahující NPY se v kardiálním plexu laboratorního potkana vyskytují v hojnĕm poĕtu, ménĕ zastoupenĕ jsou v srdci lidskĕm (Wharton a Gulbenkian, 1987). Zdrojem NPY v srdci jsou kardiomyocyty síní a komor, buňky hladkĕ cĕvní svaloviny, endotel koronárních cĕv a endokardu (Jacques et al., 2003; Zukowska et al., 2003).

Na cílovĕ tkánĕ působí NPY pŕstřednictvím specifickŕch Y receptorŕ. Klasickými farmakologickými studiemi bylo prokázáno 6 podtypŕ receptorŕ spojenŕch s G-proteinem, označovánŕch jako Y1-6R (Silva et al., 2002). V plazmatickĕ membránĕ kardiomyocytŕ byly identifikovány Y1R a Y2R (McDermott et al., 1997).

NPY má vŕraznĕ odlišné ŕčinky v závislosti na podtypu receptorŕ, na kterĕ se váže. Signální cesta pŕstřednictvím současné aktivace receptorŕ Y2R a Y5R má nezbytnou ŕlohu v novotvorbĕ cĕvního zászobení v pŕbĕhu ischemickĕ revaskularizace (Ekstrand et al., 2003). Působí-li vřak NPY pŕstřednictvím Y1R a Y5R, je vŕsledkem této vazby zŕžení koronárních cĕv a podíl na vzniku srdeční hypertrofie (Kuo et al., 2007). Rŕst hladkĕ svaloviny cĕv je navozen aktivací Y1 receptoru (Pons et al., 2004). Vazbou NPY na Y1R dochází k zesílení vazokonstrikce koronárního řeĕiřtĕ navozenĕ NA a k prohloubení sníženĕho koronárního pŕtoku (Potter a McCloskey, 1992; Hauser et al., 1996). V srdci NPY vykazuje inhibiční vliv na ŕčinek vagu sníženým uvolňováním ACh, čímř zesiluje ŕčinnost působení sympatiku (Smith-White et al., 2003). Zároveň byly prokázány

trofické účinky NPY na myokard, jeho cévní zásobení a cévní endotel prostřednictvím Y1R a Y2R (Zukowska-Grojec et al., 1998a; Zukowska-Grojec et al., 1998b).

Vazoaktivní intestinální peptid

Molekula VIP je tvořena 28 AMK a vlastní účinná forma vzniká enzymatickým štěpením prekurzorové molekuly preproVIP (Itoh et al., 1983). Společně s dalšími látkami je VIP řazen do skupiny peptidů aktivujících adenylátcyklázu (PACAP), jejíž aktivace v srdci, v koronárních cévách a v aortě je závislá na množství uvolněného VIP (Taton et al., 1982; Schoeffter a Stoclet, 1985; Bell a McDermott, 1994). Stupeň aktivace adenylátcyklázy se liší jak mezidruhově, tak také tkáňově a orgánově (Chatelain et al., 1983; Huang a Rorstad, 1984). V 70. letech minulého století byl VIP poprvé izolován ze střeva prasete a zjištěn jeho vazodilatační účinek (Said a Mutt, 1970).

Poté, co bylo stanoveno, že zdrojem VIP v tenkém střevě jsou nervová vlákna, byla jeho přítomnost potvrzena také v centrálním i periferním nervovém systému, kde působí jako neuropřenašeč a neuromodulátor (Schutzberg et al., 1980). Později byl VIP nalezen i v dalších orgánech a tkáních, např. v dýchacím, vylučovacím a pohlavním systému (Alm et al., 1980; Dey et al., 1981).

V srdci jsou zdrojem VIP neurony intrakardiálních ganglií (DeHaven a Cuevas, 2004). Zde je VIP lokalizován spolu s klasickým mediátorem ACh ve velkých váčcích (Fried, 1995) a jeho uvolnění je podpořeno vysokou frekvencí vagové stimulace (Shvilkin et al., 1994). Původní domněnka, že VIP je hlavním kotransmiterem ACh byla pozměněna v souvislosti se zjištěním, že ne všechny neurony, které obsahují VIP, obsahují také ChAT, marker cholinergních neuronů. Přítomnost VIP tedy nelze vztahovat pouze k parasympatické inervaci (Horackova et al., 2000; Kuncová et al., 2003). Výskyt VIP imunopozitivních vláken byl prokázán v srdečních síních i komorách, s výraznou převahou v pravé komoře (Weihe et al., 1984). Vlákna uvolňující VIP byla detekována nejen v těsné blízkosti buněk pracovního myokardu, ale také s vysokou hustotou v oblasti SA a AV uzlu (Weihe a Reinecke, 1981; Weihe et al., 1984). VIP byl také prokázán v nervové pleteni probíhající podél koronárních tepen a žil.

Biologický efekt VIP je zprostředkován vazbou na specifické receptory spojené s G-proteinem, které se označují VPAC1, VPAC2 a PAC1 (Sreedharan et al., 1993; Usdin et al., 1994). Zatímco VPAC1 a VPAC2 vykazují srovnatelnou

afinitu k VIP i k peptidům PACAP, PAC1 váže VIP s 1000krát nižší afinitou než PACAP (Harmar et al., 1998). V kardiomyocytech, převážně pravé komory, byla prokázána přítomnost všech tří typů těchto receptorů, přičemž PAC1 početně převažovaly (Taton et al., 1982). Je však velmi pravděpodobné, že ne všechny kardiomyocyty mají na svém povrchu všechny typy VIP receptorů (Baron et al., 2001). Receptory VPAC2 a PAC1 byly v srdci dále identifikovány na povrchu fibroblastů (Sano et al., 2002) a bylo zjištěno, že PACAP vykazuje kardioprotektivní účinek inhibicí proliferace srdečních fibroblastů (Dvoráková, 2005).

VIP má pozitivně inotropní účinky, zesiluje atriální, a především ventrikulární stažlivost (Saetrum Opgaard et al., 2001). Současně zvyšuje srdeční frekvenci, kdy pozitivně chronotropní účinek je výrazně vyšší u VIP oproti NA (Popma et al., 1990; Champion et al., 1996). V souvislosti s kotransmisí ACh s VIP je zajímavý jejich protichůdný účinek, neboť ACh srdeční frekvenci snižuje (Hill et al., 1993).

V koronárních arteriích VIP reguluje normální vazomotorický tonus (Brum et al., 1986). Uvolnění většího množství VIP při vysokofrekvenčním dráždění parasympatických vláken způsobuje vazodilataci hladké svaloviny koronárních cév, snížení cévního odporu a následné zvýšení koronárního průtoku. Vazodilatační efekt VIP je výraznější u arterií v porovnání se žilami, vzhledem k výraznější hustotě VIP receptorů (Luu et al., 1993). Síla vazodilatačního účinku je rozdílná, VIP je v porovnání s ACh 50-100krát účinnější (Fahrenkrug, 1989).

Substance P

Objev SP je datován do roku 1931, kdy byla tato látka izolována z extraktu mozku a trávicího traktu koně (Von Euler a Gaddum, 1931). SP obsahuje pouze 11 AMK a je produktem enzymatického působení proteázy-konvertázy na prekurzorovou molekulu preprotachykininu. SP a neurokinin A jsou nejvýznamnějšími členy skupiny tachykininů, ke kterým se řadí společně s neurokininem B, neuropeptidem K a γ (Otsuka a Yoshioka, 1993; Regoli et al., 1994). Toto skupinové označení bylo zvoleno na základě schopnosti vyvolat rychlou kontrakci hladké svaloviny trávicího traktu. Savčí SP vzniká z genu TAC1 (dříve označovaného jako preprotachykinin-A), stejně tak NKA, NPK a NPy (Carter a Krause, 1990). Tvorba prekurzoru SP probíhá v tělech neuronů (Harmar et al., 1980; Harmar a Keen, 1982). Poté je skladována ve váčcích (Merighi et al., 1988;

Plenderleith et al., 1990) a axonálním transportem dopravena do terminálních zakončení, kde probíhá konečné enzymatické opracování.

SP působí jako neuropřenašeč/neuromodulátor v centrální i periferní nervové soustavě (Pernow, 1983). V srdci byla prokázána přítomnost SP v nervových zakončeních sensorických neuronů, a to převážně s CGRP (Weihe et al., 1981; Lundberg a Hökfelt, 1986). Tyto neurony jsou aktivovány bolestivými podněty a vykazují jak senzoryckou, tak i motorickou funkci. Bolestivé signály ze srdce jsou přenášeny prostřednictvím SP uvolňované na úrovni centrálního zakončení, zatímco ovlivnění motorické aktivity je umožněno uvolněním SP z periferního nervového výběžku (Franco-Cereceda, 1988). Zdrojem SP jsou těla neuronů lokalizovaných v nodózním gangliu a v gangliích zadních kořenů míšních (Sternini, 1991). Nervová vlákna obsahující SP jsou lokalizována v intrakardiálních srdečních gangliích, koronárních arteriích, a několika dalších srdečních oblastí jako jsou: převodní systém srdeční a kontraktální svalovina (Weihe et al., 1984).

Na cílové tkáni působí SP prostřednictvím neurokininových (NK) receptorů NK1-NK3 spojených s G-proteinem, přičemž nejvyšší afinitu vykazuje SP vůči NK1 receptoru (Mantyh et al., 1984; Dehlin et al., 2013). NK receptory jsou přítomny především v koronárních cévách a intrakardiálních gangliích (Hoover et al., 2000).

SP vykazuje silné vazodilatační účinky závislé na přítomnosti a uvolnění oxidu dusnatého (Bossaller et al., 1992). K zesílené vazodilataci přispívají i endoteliální buňky, které rovněž uvolňují SP (Loesch a Burnstock, 1988). Ovlivněním aktivity cholinergních neuronů podporuje SP negativně chronotropní i inotropní vliv parasympatiku na srdce (Hoover, 1990). Zároveň SP vykazuje stimulační efekt na kardiomyocyty a srdeční fibroblasty (Dehlin a Levick, 2014).

Peptid odvozený od genu pro kalcitonin

Neuropeptid CGRP je řazen do široké skupiny příbuzných peptidů, která zahrnuje adrenomedulin, intermedin, kalcitonin a amylin (Holmes et al., 2013). Tyto peptidy jsou si nejen strukturně a funkčně velmi blízké, ale sdílejí i stejné receptorové systémy.

CGRP je složený z 37 AMK (Amara et al., 1982). Lidská forma tohoto peptidu byla izolována z karcinomu štítné žlázy (Morris et al., 1984). Ve tkáních je CGRP přítomen ve dvou formách, které jsou označovány α CGRP a β CGRP. Tyto formy se u potkana od sebe navzájem odlišují pouze jednou AMK a u člověka

třemi AMK (Amara et al., 1985). Varianta α vzniká alternativním přepisem genu pro kalcitonin, zatímco při vzniku formy β se přepisuje zcela odlišný gen (Amara et al., 1985; Alevizaki et al., 1986). Obě formy vykazují velmi podobné účinky na cílovou tkáň, takže význam genové duplicity není zcela jasný.

CGRP je lokalizován v tenkých, nemyelinizovaných vláknech typu C sensorických neuronů, které mají aferentní i eferentní funkcí. Stimulace těchto neuronů vede k uvolnění CGRP společně se SP (Lundberg et al., 1985; Franco-Cereceda et al., 1987). V srdci se CGRP nachází v senzomotorických neuronech inervujících myokard i stěnu koronárních cév různých živočišných druhů včetně člověka (Franco-Cereceda, 1988; Franco-Cereceda, 1991; Maggi, 1995a). Tato nervová vlákna opřádají síňové i komorové kardiomyocyty, přičemž ve větší hustotě se nacházejí v oblasti SA a AV uzlu a také v perikardu i endokardu (Mulder et al., 1985). Největší koncentrace specifických vazebných míst byla identifikována v koronárních tepnách a pravé síni, menší pak v levé síni a obou komorách (Coupe et al., 1990).

Uvolnění CGRP spolu se SP z terminálních zakončení sensorických neuronů je v srdci zprostředkováno receptory TRPV1 (z angl. „Transient Receptor Potential Vanilloid 1“). Tento typ receptoru je aktivován bolestivým podnětem, extracelulární acidózou a kapsaicinem (Rosenbaum et al., 2004).

CGRP působí na cílové tkáně prostřednictvím dvou typů receptorů, CGRPR1 tzv. na antagonisty citlivý a CGRPR2 na antagonisty nereagující (Dennis et al., 1989; Dumont et al., 1997). Naklonováním CGRPR1 bylo zjištěno, že se jeho struktura zcela shoduje s receptorem podobným receptoru pro kalcitonin (CRLR, z angl. „Calcitonin Receptor-Like Receptor“), který byl již dříve označen jako receptor vázající CGRP. Biologická aktivita CGRP se uskutečňuje prostřednictvím komplexu, skládajícího se z CRLR spojeného s jedním ze tří modifikujících proteinů označovaných RAMP1-3 (z angl. „Receptor Activity-Modifying Protein“), které jsou nezbytné pro funkční aktivitu celého komplexu. Spojením CRLR s RAMP1 se vytvoří receptor pro CGRP a s RAMP3 sdílený receptor pro CGRP/AM (Muff et al., 1995; Poyner, 1995). Na buněčné úrovni stimuluje aktivitu adenylátcyklázy a zvyšuje tvorbu cAMP (Preibisz, 1993; Brain a Cambridge, 1996).

CGRP vykazuje celou řadu biologických účinků v centrální i periferní nervové soustavě (Sexton, 1991; Wimalawansa, 1997), ale také například v gastrointestinálním či dýchacím systému (Muff et al., 1995; Wimalawansa, 1996; van Rossum et al., 1997).

V cévním systému má CGRP výrazné vazodilatační účinky, které jsou v tepenné části více prozkoumány v porovnání se žilním řečištěm (Holzer, 1992). Relaxační vliv vykazuje CGRP i na hladkou svalovinu koronárního řečiště (Franco-Cereceda, 1991; Gulbenkian et al., 1993), čímž zvyšuje prokrvení myokardu (Miyachi et al., 1987; Wang a Fiscus, 1989). V porovnání s prostaglandiny má CGRP 10krát vyšší účinek na cévy a oproti klasickým látkám s vazodilatačním účinkem, jako je ACh, adenosin, histamin či SP, je CGRP dokonce 100 až 1000krát účinnější (Tippins, 1986). U potkana se CGRP podílí na regulaci bazálního koronárního průtoku (Yaoita et al., 1994) a je pokládán za kardioprotektivní látku při ischemickém poškození myokardu (Li et al., 1996).

V srdci se CGRP podílí na přenosu bolestivých podnětů ze srdeční tkáně do CNS (Caterina et al., 1997). Pozitivně chronotropní a inotropní účinky CGRP lze pozorovat na izolovaných kardiomyocytech člověka a laboratorního potkana i při velmi nízkých koncentracích (Miyachi et al., 1988; Saetrum Opgaard et al., 2000).

2.2 Diabetes mellitus a kardiovaskulární aparát

Diabetes mellitus (DM; úplavice cukrová, cukrovka) je heterogenní, chronické onemocnění vznikající při nedostatečné tvorbě nebo účinku inzulínu, jehož základním rysem je zvýšená koncentrace glukózy v krvi. DM je provázen komplexní poruchou metabolismu cukrů, tuků a bílkovin a veškeré příznaky tohoto onemocnění vznikají následkem hyperglykémie, inzulinorezistence a dyslipidémie (Fang et al., 2004). Z dlouhodobého pohledu výskyt DM roste a má charakter celosvětové epidemie, stejně jako počet chronických komplikací. V České republice dosahovala v roce 2012 prevalence DM 8,2 % (ÚZIS, 2015).

DM je jedním z nejdůležitějších rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. Kardiovaskulární komplikace se u diabetiků vyskytují v porovnání s nediabetickou populací až desetkrát častěji a jsou příčinou téměř 70 % úmrtí diabetických pacientů (Moss et al., 1991). K chronickým komplikacím DM se řadí mikro- a makro-vaskulární poškození, kardiovaskulární autonomní neuropatie (KAN) jako součást diabetické autonomní neuropatie (DAN) a diabetická kardiomyopatie.

S ohledem na experimentální cíle této práce se podrobněji zaměřím na diabetickou autonomní neuropatii, kardiomyopatii a především na změny postihující neuropeptidy a jejich receptory.

2.2.1 Diabetická angiopatie

Vaskulární komplikace DM jsou nejzávažnější komplikací a patří mezi nejčastější příčiny smrti, neboť v souvislosti s onemocněním cév umírá přibližně 80% diabetických pacientů (Aronson, 2008). Poškození v oblasti mikrocirkulace je označováno jako mikrovaskulární komplikace. Diabetická mikroangiopatie se klinicky manifestuje jako diabetická retinopatie, nefropatie a neuropatie.

Diabetická neuropatie je neurologickou komplikací postihující téměř každého diabetika s trváním nemoci nad 10 let (Tesfaye et al., 2010). Vývoj syndromu je postupný, často asymptomatický a proto je jeho záchyt a správná diagnostika zatížen značnou chybou. S jistotou lze konstatovat, že prevalence diabetické neuropatie se zvyšuje s přibývajícím věkem, délkou trvání DM a nedostatečnou kompenzací diabetu (Valensi et al., 1997). V progresi diabetické neuropatie hraje významnou roli hypercholesterolemie a hypertriglyceridémie, dále pak hypertenze, obezita i kouření (Adler et al., 1997; Wiggin et al., 2009). Diabetická neuropatie postihuje mimo jiné i autonomní nervy, a především jejich senzorkou část.

Příčina DANu není zcela objasněna a je pravděpodobně kombinací metabolických a neurovaskulárních faktorů. Zvýšená hladina glukózy spouští aktivaci protein kinázy C vedoucí k vazokonstrikci, sníženému krevnímu zásobení nervové tkáně a jejímu poškození (Veves a King, 2001; Obrosova, 2009). Oxidativní stres navozený zvýšenou hladinou glukózy vede k poškození cévního endotelu a snížení biologické dostupnosti oxidu dusnatého (Cameron a Cotter, 1997), jehož nízká hladina opět vede k poškození endotelu a nervové tkáně (Hoeldtke et al., 2002). Nedostatek růstových faktorů a esenciálních mastných kyselin, společně se vzniklými pozdními produkty glykace vede ke snížení krevního zásobení, nervové hypoxii a poškození funkce nervů (Winkler a Kempler, 2010). Podíl na poškození nervového přenosu má také autoimunitní zánět (Pittenger et al., 1999).

DAN zahrnuje poruchu funkce autonomní inervace gastrointestinálního traktu, pohlavního a močového systému a kardiovaskulárního aparátu (Vinik et al., 2003). DAN má negativní dopad na kvalitu života a dobu přežívání diabetických pacientů (Vinik a Erbas, 2001; Vinik a Erbas, 2006; Cohen-Solal et al., 2008).

Postižení autonomní inervace kardiovaskulárního aparátu vede k rozvoji KAN. KAN zahrnuje aferentní i eferentní složku sympatické a parasympatické části autonomního nervstva. Porucha funkce způsobuje abnormality v srdeční frekvenci i cévní dynamice a vyúsťuje v nárůst klidové srdeční frekvence se sníženou

srdeční variabilitou (Weimer, 2010). KAN hraje významnou patofyziologickou roli v progresi ischemické choroby srdeční či srdečního selhání u obou typů DM (Gerritsen et al., 2001). Hypertenze a postižení koronárních tepen může vést k dysfunkci levé komory srdeční. Její příčinou může být snížený průtok krve srdeční svalovinou, sympatická denervace a změny postihující neuropeptidergní systém (Debono a Cachia, 2007). Klinicky se KAN manifestuje intolerancí k fyzické zátěži (Roy et al., 1989), asymptomatickou myokardiální ischemií (Marchant et al., 1993), ortostatickou hypotenzí (Low et al., 1975) a klidovou tachykardií (Ziegler, 1994).

2.2.2 Diabetická kardiomyopatie

Diabetická kardiomyopatie je definována jako porucha funkce myokardu způsobená DM nezávisle na vlivu ischemické choroby srdeční, arteriální hypertenze a bez prokazatelných chlopenních vad (Paillole et al., 1989). V důsledku systémového onemocnění dochází k sekundárnímu poškození myokardu, které se projevuje rozšířením jednotlivých srdečních oddílů, zejména levé komory (Maron et al., 2006). V důsledku nižší síly kontrakce komorové svaloviny je množství krve vypuzené do velkého oběhu nižší a vzniká porucha čerpací funkce srdce. Diabetická kardiomyopatie se u diabetiků podílí na vysokém výskytu srdečního selhání a na zhoršeném průběhu kardiovaskulárních příhod.

Přesný mechanismus vzniku diabetické kardiomyopatie není dosud zcela objasněn. Za hlavní rizikové faktory se považují věk, hypertenze, obezita a hyperlipidémie. Mezi nejdůležitější vyvolávající faktory, které se při vzniku a rozvoji kardiomyopatie uplatňují, se řadí poškození malých cév (mikroangiopatie se zhoršením koronárního průtoku a vaskulární endoteliální dysfunkce), metabolické poruchy (deplece glukózového transportéru GLUT-4 a nedostatek karnitinu), oxidativní stres a mitochondriální dysfunkce s následnou apoptózou, buněčnou smrtí a fibrózou myokardu spojenou se vzestupem zánětlivých cytokinů (Haudek et al., 2007; Westermann et al., 2007; Wang et al., 2009).

V časných fázích choroby se diabetická kardiomyopatie manifestuje poruchou diastolické funkce levé komory, později i poruchou funkce systolické (Mahgoub a Abd-Elfattah, 1998). Tyto změny způsobují, že srdce diabetiků má sníženou schopnost vyrovnat se s ischemií, koronárními příhodami nebo větším zatížením. Framinghamská studie prokázala, že diabetičtí muži mají 2krát vyšší a ženy 5krát vyšší pravděpodobnost srdečního selhání v porovnání s kontrolní

skupinou, která je představována lidmi stejného věkového rozpětí bez DM (Kannel a McGee, 1979).

2.2.3 Role neuropeptidů v diabetickém poškození srdce a cév

V posledních letech se výzkum mimo jiné zaměřuje na objasnění role neuropeptidů jako je NPY, VIP, SP, CGRP a jejich receptorových systémů na vzniku a vývoji diabetického poškození srdce a cév. Kardiovaskulární komplikace DM vznikají v důsledku diabetické neuropatie, mikro- a makro-vaskulárního postižení (Aneja et al., 2008). Poznání jejich fyziologických vlastností a podílu na patogenezi diabetických komplikací by mohlo pomoci ve stanovení optimálního terapeutického postupu, popř. využití kardioprotektivního účinku neuropeptidů.

Neuropeptid Y

NPY a jeho receptory, zejména Y1R, Y2R a Y6R, hrají významnou roli v patogenezi DM i jeho kardiovaskulárních komplikací. Zároveň se podílejí na onemocněních jako je hypertenze či ateroskleróza (Pedrazzini et al., 2003; Pons et al., 2004). U pacientů s DM II. typu byla nalezena zvýšená hladina cirkulujícího NPY (Sato et al., 1999; Ilhan et al., 2010; Matyal et al., 2011), zatímco koncentrace NPY ve tkáni pravé srdeční síně byla snížena (Ejaz et al., 2011; Matyal et al., 2011).

Ze studií receptorů pro NPY v lidském srdci vyplývá, že genová a proteinová exprese Y1R se u pacientů s DM II. typu v porovnání s jedinci bez DM tvořících kontrolní skupinu neliší, zatímco exprese Y2R a Y5R se snížila (Ejaz et al., 2011). V jiné práci však autoři prokázali vyšší expresi mRNA pro Y2R a Y5R i proteinu v pravé srdeční síni diabetického pacienta (Matyal et al., 2011). Příčinou těchto protichůdných výsledků může být rozdílný výskyt různých doprovodných onemocnění.

U modelu rozvinutého DM I. typu byl v srdci laboratorního potkana zjištěn pokles genové i proteinové exprese NPY, zatímco genová exprese Y1 receptoru byla zvýšena (Chottová Dvoráková et al., 2008). Částečná úprava DM vedla k nárůstu koncentrace NPY v srdečních síních (Kuncová et al., 2005). Rozdílné výsledky regulace NPY systému mohou být částečně zapříčiněny poklesem novotvorby cév, zvýšenou apoptózou a vzestupem proliferace hladké svaloviny cév (citace).

Vazoaktivní intestinální peptid

Negativní změny v syntéze a uvolňování VIP v srdci mohou být jedním z faktorů podílejících se na patogenezi srdečních onemocnění nejen u diabetických pacientů. Signifikantní pokles koncentrace VIP v srdci byl pozorován u pacientů s kardiomyopatií, u nichž byl snížen i počet specifických receptorů, které však vykazovaly vyšší afinitu k VIP (Hershberger et al., 1989; Kalfin et al., 1994). U modelu spontánně hypertenzních potkanů dochází k poklesu koncentrace VIP v myokardu a toto snížení koreluje se stupněm myokardiální fibrózy (Ye et al., 2002).

U diabetického potkana je hladina preproVIP mRNA, stejně tak jako VIP snížena ve všech 4 srdečních oddílech (Dvoráková et al., 2006). Exprese receptorů pro VIP, VPAC1 a VPAC2 vykazují značné rozdíly mezi jednotlivými srdečními oddíly. V síních je počáteční snížení exprese mRNA pro VPAC2 následováno zvýšením, zatímco iniciálně zvýšená exprese genu pro stejný receptor v komorách poklesla po 16 týdnech trvání DM až na úroveň hodnot u kontrolních zvířat (Dvoráková et al., 2006). Pravděpodobným vysvětlením pro tyto změny je přítomnost jiných, než neuronálních zdrojů VIP. Je známo, že VIP je secernován lymfocyty (Delgado et al., 2002) a že PACAP mRNA je exprimována v kultuře kardiomyocytů (Sano et al., 2002).

VIP je znám pro svůj výrazný protizánětlivý efekt. Jeho příznivý imunoregulační vliv byl ověřen na zvířecích modelech chronického zánětu (Pozo et al., 2007). VIP by se mohl stát nadějnou terapeutickou látkou v léčbě mnohých autoimunitních chorob, včetně DM (Sanlioglu et al., 2012).

Substance P

Experimentální i klinické studie ukazují, že signální systém SP je pevně spjat s regulací kardiovaskulárního systému a vlivem DM vykazuje určité abnormality (Iwasaki et al., 2006). U pacientů s DM I. typu, především u těch s výraznými příznaky diabetické neuropatie, byla sérová hladina SP významně snížena (Kunt et al., 2000). Snížená hladina SP v séru byla stanovena také u diabetických pacientů s ischemickou chorobou srdeční a předpokládá se určitý podíl SP na jejím vzniku a vývoji (Wang et al., 2012).

Exprese proteinu NK receptoru v pravé síni diabetických pacientů byla nižší v porovnání s kontrolní skupinou jedinců bez DM (Ejaz et al., 2011). Pokles

exprese NK1 receptoru byl zjištěn v pravé síni potkanů s DM vyvolaným aplikací streptozotocinu (STZ; Dvorakova et al., 2007). SP je jedním z neuropeptidů podílejících se na vzniku srdeční fibrózy (Melendez et al., 2011). Tyto údaje naznačují, že SP hraje roli v patogenezi diabetické kardiomyopatie.

Studium potencionální role SP při rozvoji kardiovaskulárních onemocnění u člověka je významně komplikováno jeho velmi krátkým poločasem rozpadu a nízkou hladinou v myokardu (Ernst et al., 2008). V současné době se úsilí zaměřuje na vývoj metody, která by detekovala místo labilní SP stabilnější molekuly pro-SP.

Peptid odvozený od genu pro kalcitonin

Jak již bylo zmíněno v úvodu, vysoký počet diabetických pacientů trpí výraznými a život ohrožujícími kardiovaskulárními komplikacemi, jako je infarkt myokardu nebo diabetická kardiomyopatie. V souvislosti s těmito onemocněními byly mimo jiné pozorovány změny neuropeptidu CGRP, a to konkrétně jeho snížená hladina v plazmě i v srdci pacientů trpících DM (Wang et al., 2012).

U vysokého počtu pacientů s DM se vyvine difúzní stenóza koronárních tepen, která vede k nedostatečnému zásobení srdeční tkáně kyslíkem a k následnému ischemickému poškození (Grundy et al., 1999). Současný rozvoj sensorické polyneuropatie může vyústit ve funkční a strukturální poškození nociceptivních neuronů u těchto pacientů (Kruglikov et al., 2004). To vede ke sníženému uvolňování CGRP (Song et al., 2009) a k podpoře ischemických změn na srdci (Howden et al., 1988).

U laboratorního potkana bylo zjištěno zvýšené množství CGRP ve všech srdečních oddílech po 16 týdnech od aplikace STZ. Toto zjištění může být vysvětleno sníženým uvolňování CGRP z nervových terminálů, které vedlo k nahromadění peptidu uvnitř axonu navzdory sníženému zásobení z těla neuronu (Chottová Dvoráková et al., 2005).

Exprese genů pro CRLR a RAMP3 vzrůstá v časně i pozdní fázi reperfúze (Li et al., 2009). Současně exprese genu pro RAMP3 byla zvýšená, zatímco CRLR, RAMP1 a RAMP2 zůstaly nezměněny v srdci laboratorní potkana s dlouhodobým DM (Mistrova et al., 2014).

Srdce diabetických pacientů je náchylnější k ischemicko-reperfuznímu poškození. Dlouhodobé působení zvýšené hladiny glukózy je spojováno s vleklým zotavováním srdečních funkcí po ischemii (Wei et al., 2009). Pokles exprese

kardiálních TRPV1 a neuropeptidu CGRP podporuje myšlenku funkčního zhoršení neuro-efektorového přenosu u diabetických potkanů. Ischemický „preconditioning“, což je metoda, při které se vyvolá několik period krátké, neletální, cíleně aplikované ischemie (Murry et al., 1986; Arstall et al., 1998; Yellon et al., 1998), nevyvolal uvolnění CGRP do koronárního oběhu. Ale exogenní aplikace CGRP obnovila pozitivní efekt preconditioningu na srdeční funkce (Lu et al., 2001).

Tyto nesrovnalosti ve výsledcích prokazují neuronální defekt vedoucí k poklesu uvolňování endogenního CGRP. Kardioprotektivní účinek CGRP u ischemicko-reperfuzního poškození srdce v laboratorních podmínkách byl již prokázán (Li et al., 1996; Liu et al., 2011; Zheng et al., 2012). Proto se u diabetických pacientů naskýtá možnost terapeutického zásahu exogenním podáním CGRP nebo ovlivněním mechanismu jeho uvolňování. Kardioprotektivní působení CGRP by mohlo vést ke zlepšení změn či k poklesu rozsahu poškození myokardu vlivem DM.

2.3 Stres a kardiovaskulární systém

Stres je obranná reakce organismu proti působícímu stresoru s cílem udržet homeostázu, zabránit poškození či smrti organismu (Cannon, 1929). Stresorem, tedy zátěžovým faktorem a spouštěčem stresové reakce, může být u člověka jakákoliv nepříznivá změna vnitřních nebo vnějších podmínek, fyzikální, chemické, biologické či psychické povahy. U laboratorního potkana využíváme k navození stresové odpovědi nejčastěji imobilizaci zvířete. Dopad stresových událostí závisí na různých faktorech, např. na tělesném, osobnostním či genetickém typu jedince, dále na intenzitě, závažnosti, načasování a době trvání stresové situace.

Všechny faktory, jež lze počítat mezi stresory, významně ovlivňují fyziologické i psychologické funkce (Goldstein, 1995). Rozlišujeme pozitivní zátěž neboli eustres, který ve vyvážené míře působí jako motivační síla stimulující jedince k větší aktivitě a k vyšším výkonům. Naproti tomu chronické nadměrné zatížení tzv. distres má potencionálně negativní dopad na psychické a tělesné zdraví jedince (Večeřová-Procházková, 2004).

Organismus reaguje na působení stresoru uniformní odpovědí. Podněty, jako je imobilizace, hypoglykémie či emoční stres, jsou v CNS zpracovány limbickým systémem, především amygdalou. Následně mozková kůra v koordinaci s hypotalamem aktivuje sympatoadrenální osu. Pregangliová sympatická vlákna vycházející z ncl. intermediolateralis, převážně ve výši Th₅-Th₉, končí

v modifikovaném sympatickém gangliu, ve dřeni nadledvin (Kuehnel, 2003). V první fázi, která bývá označována jako poplachová reakce, nervové stimuly vedou ke změnám v uvolňování KA. Jednorázové vystavení imobilizačnímu stresu (IS) po dobu 2 hod je provázeno poklesem celkového množství A v dřeni nadledvin bez signifikantních změn NA (Kvetnansky a Mikulaj, 1970). Opakovaná aplikace stejného stresoru navrátí hladinu KA k normálu a ustanoví novou, zvýšenou bazální hodnotu KA (Kvetnansky et al., 1970).

KA jsou spoluzodpovědné za behaviorální, biochemické a fyziologické změny. Jejich úkolem je připravit organismus na alarmovou reakci „boj nebo útek“ (Cannon, 1939; Cannon a Lissak, 1939). Dýchání se urychluje a stoupá srdeční výdej a tím i krevní tlak (Kvetnansky et al., 2013).

Převažujícím hormonem stresové reakce ze skupiny KA je A, který má kombinovanou α i β sympatomimetickou aktivitu. Jeho působením dochází k tzv. centralizaci oběhu, soustředění krve do životně důležitých orgánů, jako je např. mozek a srdce. Účinek A na srdce vykazuje pozitivně inotropní, chronotropní, dromotropní, bathmotropní i lusitropní efekt (Atkinson, 2003). Dále A ovlivňuje metabolické procesy: stimuluje glykogenolýzu, lipolýzu a proteokatabolismus, čímž zvyšuje hladinu glukózy v krvi (Ward a Linden, 2010).

Zvýšená hladina A je hlavním stimulem tvorby hypotalamického kortikoliberinu, jehož uvolněním je zahájena následující fáze obrany organismu (Selye, 1998), kontrovaná osou hypotalamus–hypofýza–nadledviny (HPA, z angl. „Hypothalamic-Pituitary-Adrenal“). A je spojovacím mezičlánkem obou regulačních os. Zvýšená hladina kortikoliberinu ovlivňuje uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z předního laloku hypofýzy do krevního oběhu (Buckingham, 1998). Cirkulující ACTH stimuluje kůru nadledvin k vyplavení glukokortikoidů, především kortizolu, ale také mineralokortikoidů.

Stresová obranná reakce je energeticky náročná a vyčerpává rezervy organismu. Pro organismus je užitečná pouze za situace, pokud trvá krátkou dobu. Při dlouhodobém působení stresových podnětů mohou obranné mechanismy organismus poškodit. Opakované a dlouhodobé uvolňování glukózy v kombinaci se sníženou citlivostí tkání na ni může být jedním z řady faktorů podílejících se na vzniku DM II. typu a jeho kardiovaskulárních komplikací (King a Grant, 2016). Nejrozšířenější civilizační choroba, ischemická choroba srdeční, jejímž nejobávanějším projevem je infarkt myokardu, se také může rozvinout v důsledku dlouhodobého působení stresu (Klener, 2011).

Zvýšená aktivita sympatiku a nárůst plazmatické hladiny stresových hormonů ovlivňuje většinu orgánů v těle včetně srdce a cév. Činnost kardiovaskulárního systému je za stavu stresu regulována řadou neurotransmiterů, hormonů a neuropeptidů.

2.3.1 Změny srdeční inervace vlivem stresu

Regulace srdeční aktivity v průběhu stresové odpovědi je zprostředkována vegetativním nervovým systémem (Gomez et al., 1999; Burnstock, 2009). Periferní sympatický nervový systém je složen z několika podsystémů, které jsou však vlivem odlišných stresorů rozdílně regulovány. Jeho součástí je sympatomedulární, sympatoneurální, dopaminergní auto/parakrinní systém a neneuronální systém, představovaný SIF buňkami a intrakardiálními katecholaminergními buňkami (ICA, z angl. „Intrinsic Cardiac Adrenergic“) (Goldstein a Kopin, 2008; Kvetnansky et al., 2009; Goldstein, 2010). ICA buňky, nejsou chromaffinní buňky a nemají původ v neuronální tkáni (Huang et al., 1996a). ICA buňky obsahují mRNA a proteiny enzymu fenyletanolaminu N-metyltransferázy (PNMT), účastní se tvorby KA i jejich zpětného vychytávání (Saygili et al., 2011). Přítomnost srdečních ICA buněk schopných plnit funkci adrenergního systému parakrinní cestou, byla nalezena v souvislosti se zjištěním, že transplantované srdce je schopno do určité míry reagovat na aktuální potřeby organismu i s vyřazenou sympatickou inervací (Goncalvesova et al., 2004).

Stres usměrňuje syntézu KA prostřednictvím regulace exprese tří klíčových enzymů: TH, DBH a PNMT (Kobayashi a Nagatsu, 2005; Goldstein, 2010).

Tvorba KA je vyvolána rozdílnými cestami v důsledku působení akutního nebo chronického stresu a zároveň odlišně na úrovni sympatických ganglií a dřeně nadledvin. Vliv stresorů, jako je chlad, bolest nebo cvičení, na sympatoneurální systém je méně prostudován, neboť postgangliové neurony uvolňující NA mají difúzní strukturu v porovnání se dřeně nadledvin. Vystavení laboratorního potkana působení stresoru spouští enzymatickou aktivitu TH a DBH, zvyšuje mRNA pro TH v sympatickém horním krčním a hvězdicovitým gangliu (Kiran a Ulus, 1992; Nankova et al., 1996). Přepis genu pro TH se zvyšuje 5 minut (min.) po aplikaci IS, ale tato odpověď má krátké trvání (Kvetnansky et al., 2013).

Koncentrace A je v srdci mnohonásobně nižší v porovnání s NA. Navzdory tomuto nízkému množství byl nalezen vzrůst koncentrace A vlivem jednorázového i opakovaného IS. IS u laboratorního potkana zvyšuje koncentraci A v obou

srdečních komorách, zatímco hladina NA v levé komoře klesá a naopak vzrůstá v pravé komoře, především u chronicky stresovaných zvířat (Tillinger et al., 2014). Nárůst hladiny A v komorách je následkem stresem indukovaného vychytávání z cirkulace nebo zvýšené tvorby A přímo v srdci (Krizanova et al., 2001). V levé komoře hladina A koreluje s množstvím mRNA pro β_2 -AR a β_3 -AR, i s β_2 -AR proteinem. Korelace je tedy výraznější v levé komoře, neboť v pravé komoře byla nalezena korelace jen mezi množstvími A a β_2 -AR mRNA i proteinem (Tillinger et al., 2014).

Stres také indukuje prostřednictvím glukokortikoidů aktivitu katecholaminergních enzymů v neneuronálních buňkách. Glukokortikoidy uvolněné v důsledku probíhající stresové odpovědi indukují syntézu A v ICA buňkách za účasti PNMT (Kvetnansky et al., 2009). Aktivita PNMT byla detekována v sympatických gangliích novorozenech i dospělých laboratorních potkanů a je zvýšena po aplikaci kortikosteronu (Paivarinta et al., 1989). Vlivem akutního i chronického IS vzrůstá exprese genu pro PNMT i PNMT protein ve hvězdicovitém gangliu (Kubovcaková et al., 2006). Z enzymů účastnících se tvorby KA byl v srdečních SIF buňkách zjištěn enzym TH, ale ne DBH (Slavíková et al., 2003). Podíl účasti SIF buněk na změnách srdeční inervace vlivem stresu nebyl dosud objasněn.

Opakovaně byla potvrzena hypotéza, že pro udržení homeostatické rovnováhy nervového tonu obou větví autonomního systému je požadována rovnováha ve funkci a množství β -AR a M receptorů v srdeční tkáni (Myslivecek et al., 1996; Brodde a Leineweber, 2004; Stavrakis et al., 2011). Aktivace určitého typu receptorového systému, adrenergního nebo cholinergního ovlivňuje nejen aktivovaný systém, ale zároveň způsobuje změny antagonistické soustavy (Myslivecek et al., 2004; Myslivecek et al., 2007).

Změny srdečních β_1 -AR a β_2 -AR vyvolané stresem byly poprvé popsány v 80. letech minulého století (Torda et al., 1981; Torda et al., 1985). Bylo zjištěno, že jednorázová i chronická aplikace stresu má rozdílný vliv na jednotlivé srdeční oddíly. Aplikace stresoru vyvolává složité změny receptorového proteinu β -AR i vazebných míst s výraznou převahou v levé komoře v porovnání s komorou pravou (Laukova et al., 2014). V levé komoře množství mRNA, koncentrace proteinu a počet vazebných míst β_3 -AR signifikantně vzrostly vlivem chronického stresu, zatímco tyto parametry pro β_2 -AR klesly působením akutního i chronického stresu. Pokles kardiostimulačních β_2 -AR je významným mechanismem, který přispívá k udržení srdeční homeostázy (Tillinger et al., 2014). Obdobně byl

následkem chronické aplikace stresu prokázán vzestup β_3 -AR a pokles β_2 -AR v levé síni (Laukova et al., 2014).

Působením chronického stresu byl v pravé komoře zjištěn pokles mRNA pro β_2 -AR a vzestup mRNA pro β_3 -AR, ale nebyly zaznamenány změny v genové expresi ani množství proteinů u β_1 -AR vlivem obou typů stresu (Tillinger et al., 2014). V srdci laboratorního potkana klesá v průběhu opakovaného IS počet α_1 -AR. Tato změna přetrvává i 24 hod po ukončení aplikace stresoru a koreluje se změnou uvolnění periferních KA (Torda et al., 1985).

IS vedl k poklesu hustoty M receptorů i snížení aktivity adenylátcyklázy. Změny hustoty receptorů se lišily v jednotlivých srdečních oddílech a byly závislé na čase od ukončení imobilizační periody. Nejvýraznější snížení počtu M receptorů bylo zaznamenáno v pravé síni se zachovalými gangliovými buňkami (Myslivecek et al., 2004).

2.3.2 Úloha neuropeptidů v poškození srdce vlivem stresu

Neuropeptid Y

Již řadu let je známa účast NPY a jeho receptorů v patogenezi řady onemocnění způsobených stresem (Zukowska-Grojec, 1995; Heilig, 2004; Morales-Medina et al., 2010). Na centrální úrovni vykazuje NPY inhibiční vliv na sympatickou aktivitu, projevující se poklesem krevního tlaku, srdeční frekvence a metabolického obratu (Heilig, 2004; Kormos a Gaszner, 2013). NPY uvolňující se ze sympatických nervových zakončení společně s NA (Lundberg a Hökfelt, 1986) působí naopak stimulačně a podporuje účinky KA a glukokortikoidů (Kuo et al., 2007).

NPY a NA společně působí na sympatickém neuro-efektorovém spojení a jejich výsledný účinek na regulaci vaskulárních funkcí se liší vlivem rozdílných podmínek. Akutní stres přednostně uvolňuje NA a primární odpověď je zodpovědná za udržení krevního tlaku, přechodný vzestup cévního napětí a srdečních funkcí (Kuo et al., 2007). Naopak působením chronického nebo intenzivního stresu, jako je vyčerpávající fyzické cvičení (Goldstein, 1987), panické ataky (Esler et al., 2006) či vystavení chladu (Zukowska-Grojec a Vaz, 1988) se uvolňuje především NPY, který způsobuje protražovanou vazokonstrikci a přestavbu cévní stěny (Morris, 1999).

Působením chronického stresu se účinek NPY na cévní stěnu zesiluje (Li et al., 2003). Aktivace Y1R ve stěně cévy způsobí přímé zvýšení krevního tlaku a zároveň NPY stupňuje vazokonstrikci navozenou NA. Prostřednictvím vaskulárního Y1R v tunica media se množí buňky hladké svaloviny za vzniku neointimy. Vytváří se poškození cévní stěny podobné aterosklerotické lézi. Zesílenou intimou, vzniklým trombem a uloženými makrofágy naplněnými lipidy se lumen cévy zužuje a způsobuje tkáňovou ischemii (Li et al., 2005). Y1 antagonisté blokují stresem vyvolanou vazokonstrikci a okluzi cévy, proto by mohly být využívány při terapii anginy pectoris (Li et al., 2005).

Jednou z metod k navození stresové odpovědi u laboratorních zvířat je chladový test. Působení chladu vede k nárůstu plazmatické hladiny NPY (Li et al., 2005), zvýšení středního arteriálního tlaku a srdeční frekvence a tyto změny přetrvávají 1 hod po ukončení chladového stresu (Zukowska-Grojec et al., 1996). Užití antagonistů Y1R inhibuje až 80 % vazokonstrikce vyvolané chladem (Zukowska-Grojec et al., 1996). Podobně u člověka NPY aplikovaný do koronární artérie způsobí výraznou vazokonstrikci a snížení krevního zásobení myokardu (Clarke et al., 1987). U zvířat i u lidí je stresem indukované zvýšení koncentrace NPY a vazokonstrikce výraznější u mužského pohlaví oproti ženskému. Tento na pohlaví závislý rozdíl vzniká pravděpodobně vlivem silné androgeny řízené stimulace genové exprese NPY (Zukowska-Grojec et al., 1991).

Chronickému stresu je přisuzována spoluúčast na kardiovaskulárním a metabolickém onemocnění, především obezitě. Zvýšená plazmatická hladina NPY se podílí na nárůstu plazmatické hladiny lipidů a negativně ovlivňuje glukózovou toleranci organismu (Vahatalo et al., 2016).

Vazoaktivní intestinální peptid

Do současné doby nebyly publikovány práce týkající se podílu VIP na změnách srdeční inervace vlivem akutního či chronického stresu. Jsou známy práce zabývající se distribucí VIP v srdci (Onuoha et al., 1999) a kardiovaskulárního vlivu VIP u zdravých lidí (Frase et al., 1987).

Substance P

Trvalé působení IS u laboratorního potkana vede k nárůstu sérové hladiny SP a ke zvýšené expresi NK1 receptoru ve sliznici, svalové i nervové vrstvě vzestupného tračníku. Potencionální roli v hypermobilitě tlustého střeva hraje L-ty

vápníkových kanálů hladké svaloviny (Lu et al., 2016). S ohledem na některé shodné znaky a vlastnosti mezi svalovinou hladkou a srdeční, a dále také přítomnost L typu Ca kanálů v srdci, se nabízí možnost určité spojitosti a přenesení výsledků výzkumné práce z gastrointestinálního traktu na srdce.

Působením lehkého psychogenního stresu se zvyšuje aktivita sympatického systému, krevní tlak, srdeční frekvence i srdeční variabilita (Feetham a Barrett-Jolley, 2014). Dlouhodobý emoční stres indukuje tvorbu a uvolnění hormonu/ neurotransmiteru kortikoliberinu v paraventriculárním jádru hypotalamu. Kortikoliberin se v součinnosti s SP podílí na vzniku hypertenze a poruchy čerpací funkce srdce (Ku et al., 1998).

U pacientů trpících posttraumatickou stresovou poruchou bylo na úrovni CNS, v amygdale, detekováno zvýšené množství NK1 receptorů (Frick et al., 2015). Ve stejné oblasti, ale u myší, SP prostřednictvím NK1receptoru ovlivňuje inhibiční neurony, jejichž neurotransmiterem je kyselina gama-aminomáselná (Sosulina et al., 2015).

Peptid odvozený od genu pro kalcitonin

Tepelný stres má za následek zvýšené uvolnění CGRP, které vykazuje časnou i opožděnou ochranu myokardu i endotelových buněk (Song et al., 1999). Uvolnění CGRP spolu s dalšími endogenními mediátory má spojitost se zprostředkováním preconditioningu (Li et al., 2000).

3 Cíle práce

Z přehledu současného stavu poznání vyplývá nová představa o morfologii a funkci srdeční inervace rozšířená o existenci a funkci intrakardiálního nervového plexu, který ovlivňuje srdeční činnost působením celé řady přenašečů. Poznatky o funkci signálních systémů těchto přenašečů v srdci jsou neúplné, stejně jako poznatky o účincích nově identifikovaných nenervových faktorů. Nekonzistentní jsou pozorování týkající se ovlivnění těchto regulačních působků chorobnými stavy nebo působením stresorů. Cílem mého postgraduálního studia bylo přispět k dalšímu poznání vybraných mechanismů některých signálních kaskád za fyziologických nebo patologických stavů. Do dizertační práce jsem zahrnula následující studie:

1. Expresi genů signálního systému AM/CGRP v srdci a sensorických gangliích intaktního a diabetického laboratorního potkana.
2. Expresi a distribuci NK1 receptoru v srdci normálního a diabetického potkana.
3. Stanovení vlivu dvou typů akutního stresu na expresi a distribuci TH v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy.
4. Výzkum účinku dvou typů akutního stresu na expresi genů pro ChAT a M₂ receptorů v srdečních síních potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy.
5. Studium vlivu dvou typů stresu na expresi a distribuci oxytocinového receptoru v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy.
6. Stanovení vlivu dvou typů stresu na expresi genu pro ANP v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy.

4 Použité metody

4.1 Příprava vzorků

V experimentech jsme používali laboratorní potkany kmene Wistar, Sprague-Dawley (SD) a Lewis (LE). Všechny experimenty na zvířatech jsme prováděli v souladu s Evropskou směrnicí pro ochranu obratlovců pro experimentální a ostatní vědecké účely (European Directive for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, 86/609/EU) po schválení Odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Dále jsme dbali na to, aby počet zvířat použitý v jednotlivých experimentech byl co nejnižší, avšak dostatečný pro statistické zpracování získaných dat.

- Experimentální model diabetu I typu

DM I. typu lze u laboratorního potkana navodit aplikací STZ, který selektivně ničí pankreatické β buňky tím, že způsobuje fragmentaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA; Yamamoto et al., 1997).

Dospělým samicím laboratorního potkana kmene Wistar jsme nejdříve stanovili hladinu glykémie spektrofotometricky (Bio-La-Test, Lachema, CZ) a poté jsme jim jednorázově intravenózně aplikovali STZ v dávce 65 mg/kg nebo vehikulum (citrátový pufr) ve stejném objemu. Po uplynutí 48 hodin (h) jsme opět stanovili hodnotu glykémie. Jedince s glykemií vyšší než 18 mmol/l jsme zařadili do skupiny diabetických zvířat a použili v experimentu. V 8., 26. a 53. týdnu po aplikaci STZ či vehikula jsme samice usmrtili inhalací éteru a následně vyjmuli srdce, spinální ganglia (z úrovně Th₁ – Th₄) a nodózní ganglia. Některé preparáty srdce jsme rozdělili na čtyři základní oddíly (levou síň se síňovým septem, pravou síň, levou komoru, pravou komoru) a rychle zamrazili (pro následnou izolaci RNA nebo proteinu), jiné jsme celé ponořili do fixačního roztoku Zamboni na 24 h a poté propláchnuli ve fosfátovém pufru a zamrazili (pro nepřímou imunofluorescenci), Srdce určená pro analýzu pomocí laserové mikrodisekce jsme celá šokově zmrazili ve vychlazeném izopentanu.

- Experimentální model akutního stresu

Jednoduchý IS s převahou psychogenní komponenty účinku byl proveden fixací předních i zadních končetin (Klenerova a Sida, 1994). Při kombinaci IS s ponořením zvířat do vodní lázně o teplotě 22 °C (ICS) se na odpovědi podílí jak psychogenní, tak fyzická složka (Klenerova et al., 2007).

Dospělí samci kmene SD a kmene LE byli po dobu 60 min vystaveni jednomu či druhému typu akutního stresu, poté byli vráceni zpět do chovné klece. Dekapitováni byli 1 nebo 3 h po ukončení stresového podnětu (číslice 1 či 3 za zkratkou typu stresu). Kontrolní zvířata zůstala do ukončení pokusu v chovných klecích. Po usmrcení pokusného jedince jsme co nejrychleji vyjmuli srdce, z nichž některá jsme následně rozdělili na čtyři základní oddíly a jednotlivé vzorky zamrazili (pro izolaci RNA) a jiná ponořili do fixačního roztoku Zamboni na 24 h a poté propláchli ve fosfátovém pufru a zamrazili (pro nepřímou imunofluorescenci).

Vzorky tkání získané v jednotlivých experimentech jsme buď okamžitě zpracovali, nebo jsme je zamrazili a uchovávali zmrazené při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby zpracování.

4.2 Laserová mikrodisekce

Čerstvě připravené tkáňové řezy srdečních síní i komor jsme nanесли na speciální membránová podložní sklíčka a nabarvili hematoxylinem. Pod inverzním mikroskopem (IX71, Olympus, Japonsko) jsme identifikovali požadované buňky (respektive jejich profily), které jsme přídatným laserem (mmi Cellcut, Olympus, Švýcarsko) vyřízli a mikromanipulátorem s připevněnou zkumavkou přenesli do víčka zkumavky. Toto jsme několikrát zopakovali, takže v každém vzorku bylo nakonec obsaženo 50-80 profilů buněk. Do zkumavky jsme poté přidali pufr z kitu pro izolaci RNA a zamrazili nebo pokračovali izolací RNA přesně dle protokolu výrobce (Qiagen, Hilden, BRD).

4.3 Izolace RNA

- Vzorky celé tkáně

Izolaci RNA jsme prováděli za pomoci modifikované metody publikované Chromczynskim a Sacchim (1987). Použili jsme RNAzol B (WAK-Chemie; Bad-Soden, Germany) nebo TRI REAGENT (Sigma, Praha, CZ) a postupovali dle návodu výrobce. Ke každému vzorku jsme nejdříve přidali RNAzol B nebo TRI REAGENT a následně jsme ho zhomogenizovali pomocí homogenizačního přístroje (Mixer Mill MM300; Retsch GmbH, Haan, BRD). Poté jsme zkumavku se vzorkem zchladili v ledu, přidali chloroform (100 μl na 1 ml; Sigma, Praha, CZ) a důkladně protřepali. Následovala centrifugace vzorku při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 min při 10 000 g) a přenesení vrchní, vodní, fáze do nové zkumavky. Přidali jsme

isopropanol (Sigma, Praha, CZ) v poměru 1:1, který způsobil precipitaci RNA. Po opětovném zchlazení v ledu (30 min) a zcentrifugování (15 min při 12 000 g) vzorku při 4 °C se získaná RNA nacházela na dně zkumavky ve formě pelety. Odstranili jsme supernatant a RNA promyli v 70% etanolu. Nakonec jsme získanou peletu nechali vyschnout a poté ji rozpustili v malém množství redestilované vody. Čistotu a koncentraci RNA ve vzorku jsme změřili spektrofotometricky (Eppendorf, BRD). Pomocí DNázy I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) jsme ze vzorku odstranili případnou kontaminující DNA.

- **Vzorky získané pomocí laserové mikrodisekce**

RNA z materiálu získaného prostřednictvím laserové mikrodisekce jsme izolovali pomocí RNeasy Micro kitu (Qiagen). Při izolaci jsme postupovali přesně podle návodu dodaného výrobcem.

4.4 Izolace proteinu

Do zkumavky jsme dali vzorek tkáně a extrakční roztok v množství 10 µl/1 mg tkáně. Extrakční roztok jsme připravili smícháním 1000 µl 8M urey, 100 µl glycerolu, 50 µl 20% sodiumdodecylsulfátu (SDS), 10 µl 1M Tris (pH 6,8), 5 µl 1M dithiothreitolu, 5 µl 100 mM fenylmethylsulfonyl fluoridu a 50 µl 20krát proteáze inhibitoru. Vzorek jsme zhomogenizovali, zchladili v ledu a centrifugovali (3 min při 8 000 g). Následně jsme koncentraci získaného proteinu změřili spektrofotometricky.

4.5 Reverzní transkripce

- **Vzorky RNA izolované z homogenátu celé tkáně**

Z 1-4 µg získané RNA jsme syntetizovali komplementární DNA (cDNA) pomocí Superscript RNase H⁻ Reverse Transcriptázy II (200 U; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Do reakční směsi jsme dále přidali oligo(dT) primery (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ) nebo random hexamery (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a nukleotidy (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Postupovali jsme přesně dle protokolu výrobce. Reakce probíhala 50 min při 42 °C.

- **Vzorky RNA z materiálu získaného pomocí laserové mikrodisekce**

Vzorky jsme v termocykleru po dobu 10 min hřáli při 70 °C a poté zchladili na 4 °C po dobu 5 min. Následně jsme do zkumavky se vzorkem přidali roztok obsahující 2,5 µl H₂O, 2 µl 10krát pufr pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR,

z angl. „Polymerase Chain Reaction“), 4 μ l 25 mM $MgCl_2$, 1 μ l 10 mM roztok nukleotidů, 1 μ l Random Hexamers, 0,5 μ l RNase inhibitoru a 1 μ l MuLV reverzní transkriptázy (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Vzorke jsme opět umístili do termocyklieru a spustili program reakce: 10 min při 20 °C, 75 min při 43 °C, 5 min při 99 °C následovaný zchlazením na 4 °C.

Získanou cDNA jsme uchovávali při -80 °C a následně použili pro stanovení exprese vybraných genů pomocí PCR kontrolované v reálném čase (qPCR).

4.6 Polymerázová řetězová reakce kontrolovaná v reálném čase

Reakce probíhala v termocyklieru I-Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA). Reakční směs o objemu 25 μ l obsahovala iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), primery (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ) a cDNA nebo plazmidovou DNA. Podmínky reakce byly následovné: 12 min denaturace při 94 °C, poté 35-50 amplifikačních cyklů. Každý amplifikační cyklus zahrnoval 3 kroky: denaturace (30 s při 94 °C), hybridizace (30 s při 59–62 °C dle použitých primerů) a syntéza (30 s při 72 °C). Následně byly vzorky zahřívány z 65 °C na 95 °C za současného měření úrovně fluorescence. Výsledkem byla křivka tání získaných produktů reakce, která nám sloužila k posouzení specifity reakce. Pouze vzorky s křivkou obsahující jediný hrot jsme vybrali pro vyhodnocení výsledků. Jako negativní kontrola nám sloužily vzorky RNA bez provedené reverzní transkripce a dále vzorky, u nichž byl templát nahrazen vodou. U každého vzorku jsme pro každý gen provedli qPCR třikrát. Pro vyhodnocení výsledků jsme použili aritmetický průměr získaných hodnot.

Oligonukleotidové primery jsme navrhli tak, aby byly přepisovány sekvence odpovídající nukleotidům studovaných proteinů, a zároveň jsme se snažili dodržet veškerá doporučení vedoucí k získání fungujících primerů. Sekvence použitých primerů i jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v tab. 1.

Relativní exprese (RE) byla vypočítána porovnáním průměrných hodnot kvantitativních cyklů (C_q) získaných pro každý stanovovaný gen vůči průměrné hodnotě C_q kontrolního genu. Výsledné exprese genů byly vypočteny podle vzorce $2^{-\Delta\Delta C_q}$, což odpovídá rovnici podle Pfaffla (Pfaffl, 2001), kde mRNA testovaného genu je vztahováno ke kontrolnímu genu. Statistickou analýzu získaných dat jsme prováděli za pomoci neparametrických testů Kruskal-Wallisova (porovnání více skupin) a Mann-Whitneyova (porovnání dvou skupin). Výsledky byly vyhodnoceny jako statisticky významně rozdílné pouze v případě, že hodnota

$p < 0,05$. Při analýzách jsme používali software STATISTICA (StatSoft, Tulsa, USA).

Pro stanovení účinnosti reakce jsme používali sériově naředěnou plazmidovou DNA, která v sobě zahrnovala fragment stanovované DNA. Tento fragment jsme získali tak, že jsme provedli PCR s primery ohraničujícími potřebný fragment. Produkt této reakce jsme elektroforeticky rozdělili na 1,5% agarózovém gelu, band odpovídající délky jsme z gelu vyřízli a následně vyizolovali DNA. Poté jsme získaný fragment za pomoci kitu pGEM-T Vector System (Promega, Madison, USA) přesně dle návodu výrobce vložili do genomu bakterie E. Coli. Ty jsme nechali přes noc narůst na agarovém gelu umístěném v inkubátoru při teplotě 37 °C. Z buněk obsahujících vložený DNA fragment vyrostly čistě bílé kolonie, které jsme přeočkovali na novou plotnu. Po 18-ti hodinové inkubaci v termostatu jsme získané kolonie přenesli do LB-média (10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 10 g NaCl v 950 ml deionizované vody) s ampicilinem (v koncentraci 100 µg/ml), kde jsme je následně pěstovali. Zároveň jsme pomocí PCR provedli kontrolu, zda získaná kultura obsahuje potřebný fragment. V kladném případě jsme lahev s kulturou umístili na 2 h do třepačky s vodní lázní (150 kvů/min a 37 °C). Poté jsme kulturu centrifugovali (15 min při 16 000 g) a ze získané pelety (namnožené E. Coli) jsme vyizolovali DNA pomocí Genelute Plasmid Mini-Prep kitu (Sigma, Praha, CZ). Při izolaci jsme postupovali přesně dle návodu výrobce.

4.7 Western blot

Vzorek obsahující 20 µg proteinu, pufovaný fyziologický roztok (PBS, z angl. „Phosphate Buffered Saline“ a pufr jsme nejdříve zahřáli na 95 °C po dobu 5 min, centrifugovali (1 min při 5 000 g) a zchladili v ledu. Následně jsme ho přenesli do jamky v SDS gelu a elektroforeticky rozdělili. Poté jsme na gel obsahující elektroforeticky rozdělený vzorek přiložili membránu a ve speciální komoře pomocí elektrického proudu indukovali přenos proteinů z gelu na membránu. Pak jsme provedli blokování nescifických vazebných míst na membráně pomocí 10% roztoku mléčného prášku v TTBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl a 0,05% Tween 20; 1 h na kyvné desce) a následně aplikaci primární protilátky (inkubace přes noc). Následující den jsme membránu opláchli v TTBS a aplikovali jsme na ní sekundární protilátku. Po uplynutí 1 h jsme membránu opět

opláchli a na 5 min ji ponořili do chemiluminiscenčního roztoku. Nakonec jsme v temné komoře přiložením k membráně exponovali film.

4.8 Nepřímá imunofluorescence

Na kryostatu (Leica Biosystems, CM3050, Bernshaim, BRD) jsme nařezali zmrazenou tkáň na řezy o tloušťce 10 μm , které jsme následně nanесли na speciální podložní skla (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD). V případě, že řezaná tkáň nebyla před zamrazením fixována, jsme provedli fixaci ponořením sklíčka s řezy do fixačního roztoku, poté opláchli v PBS a nechali oschnout. S ohledem na protilátky následně na daný řez aplikované, jsme pro fixaci použili Zamboni, 4% paraformaldehyd, aceton nebo isopropanol.

Na tkáňové řezy jsme aplikovali preinkubační roztok (10% normálního prasečího séra, 0,5% Tweenu, 0,1% hovězího sérového albuminu v 0,6 M roztoku chloridu sodného ve fosfátovém pufru; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) a nechali 1 h stát při pokojové teplotě. Poté jsme roztok ze sklíček odstranili a aplikovali jsme roztok jedné či více primárních protilátek. Následovala inkubace přes noc. Druhý den jsme sklíčka opláchli ve fosfátovém pufru a nanесли na ně roztok sekundárních protilátek značených Texas Red, Cy3, fluorescein isothiocyánátem (FITC), nebo Alexa Fluor (Calbiochem, Darmstadt, BRD; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA). Inkubace probíhala za pokojové teploty po dobu 2 h. Přebytek protilátky jsme odstranili ze sklíček pomocí fosfátového pufru, poté jsme odsáli přebytečnou tekutinu, řezy převrstvili glycerolem (pH 8,6) a překryli krycím sklíčkem. Hotové preparáty jsme prohlíželi pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus BX60). Výsledky jsme dokumentovali pomocí připojené barevné kamery (Olympus DP71).

Primer	Délka a poloha produktu	Teplota amplifikace	Číslo v GeneBank
AM			
Forward: GTC TTG GAC TTT GCG GGT TT Reverse: TAA CAT CAG GGC GAT GGA AA	138 bp (60-197)	59 °C	NM_012715
ANP			
Forward: CAA CAC AGA TCT GAT GGA TTT CA Reverse: CCT CAT CTT CTA CCG GCA TC	71 bp (172-242)	58 °C	NM_012612.2
β-aktin			
Forward: TTC CTT CCT GGG TAT GGA ATC Reverse: GTT GGC ATA GAG GTC TTT ACG G	97 bp (873-969)	60 °C	NM_31144
CGRP			
Forward: GTT CTC CCC TTT CCT GGT TG Reverse: GCT CCC TGA CTT TCA TCT GC	175 bp (122-297)	61 °C	NM_001033956
CRLR			
Forward: TGTAAGAGCCACTCTCATCTTGG Reverse: TGCCAAATTGGATTTTATACTGG	221 bp (1407-1627)	62 °C	NM_012717
ChAT			
Forward: AGC TCA GTG ACA CCC ACA GG Reverse: GAA TGC TCA CAC ACC ACA CC	139 bp (1175-1313)	62 °C	NM_001170593
M₂R			
Forward: GTC ACG AAA CCT CTG ACC TAC C Reverse: ATG ATG ACA GGC AGA TAG AAC G	230 pb (824-1053)	61 °C	NM_031016
NK1 R			
Forward: GGT ACT ACG GCC TCT TCT ATT GC Reverse: CAG GAA GTA GATCAGTACAGTCACG	329 pb (869-1197)	60 °C	NM_012667
OTR			
Forward: ATG ACC TTC ATC ATC GTA CTG G Reverse: GTG GAT GAG TTG CTC TTC TTG C	284 bp (823-1106)	61 °C	NM_012871
RAMP1			
Forward: CAT GGA GAC CAT AGG GAA GAC T Reverse: AGA ACT TGT CCA CTT CCG GAT TG	137 bp (157-293)	60 °C	AF181550
RAMP2			
Forward: CTC CCT CCG CTG TTA CTG CT Reverse: TAC CAG CAA GGT AGG ACA TTT GTT	152 bp (99-250)	60 °C	AF181551
RAMP3			
Forward: CAA CCT GTC GGA GTT CAT CGT Reverse: ACT GCC TAT GGA TAC CCG TGA T	128 bp (200-327)	60 °C	NM_020100
TH			
Forward: CTT CTC TGA CCA GGT GTA TCG Reverse: CTC TCG GTA GCC CAC GTA CC	220 bp (949-1168)	59 °C	L22651.1

Tab. 1: Seznam použitých primerů a jejich charakteristika.

5 Experimentální část

5.1 Vliv experimentálně indukovaného diabetu na expresi signálních systémů neuropeptidů v srdci laboratorního potkana

5.1.1 Exprese genů signálního systému AM/CGRP v srdci a sensorických gangliích intaktního a diabetického laboratorního potkana

Úvod

U diabetického jedince dochází v srdci k poškození autonomní inervace, což mimo jiné vede k asymptomatické myokardiální ischemii (Marchant et al., 1993) ukazující na postižení sensorické části inervace. Hlavním mediátorem této inervace je CGRP, který působí na cílové tkáně prostřednictvím specifického receptoru označovaného CRLR s připojeným regulačním proteinem typu RAMP1 (Bell a McDermott, 2008). Prostřednictvím stejného receptoru pouze s jiným regulačním proteinem, RAMP2 nebo RAMP3, působí na cílové tkáně také AM. Tento signální systém byl již studován v ledvinách laboratorního potkana s indukovaným DM, a byla zde zjištěna zvýšená exprese mRNA pro AM a RAMP2 aniž by došlo ke změnám v expresi pro RAMP3 (Hiragushi et al., 2004).

Přítomnost AM byla prokázána v myokardu srdečních síní a komor a i v hladké svalovině koronárních artérií (Sakata et al., 1994). V srdci AM, stejně jako CGRP, vykazuje vazodilační účinek (Chu et al., 2000), který je zprostředkován přímým účinkem na hladkou svalovinu cév a také působením na endotelové buňky následně uvolňující oxid dusnatý (Hinson et al., 2000). Mimo to AM vykazuje i pozitivně inotropní efekt (Ihara et al., 2000).

Změny v expresi genů tohoto signálního systému byly v srdci popsány u řady patologických stavů včetně diabetické kardiomyopatie, kde však byly zkoumány pouze v průběhu prvních 16 týdnů trvání STZ diabetu u laboratorního potkana (Chottová Dvoráková et al., 2005). Komplexní stanovení vlivu tohoto onemocnění na signální systém AM/CGRP zahrnující i stanovení exprese jednotlivých regulačních proteinů RAMP stále chybí.

Materiál a metody

Indukci DM, přípravu vzorků, izolaci RNA, reverzní transkripci i qPCR jsme prováděli dle postupu popsaného v kapitole 3.

Kvantitativní RT-PCR

Podmínky pro PCR amplifikační reakci byly následující: iniciální denaturace v jednom cyklu 15 min při 95 °C, následovalo 47 cyklů po 30 sekundách (s) při 95 °C, 25 s při 60 °C pro β -aktin, RAMP1-3, 59 °C pro AM, 61 °C pro CGRP, 62 °C pro CRLR a nakonec 30 s při 72 °C. Byly použity primery (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ) specifické pro β -aktin, AM, CGRP, CRLR, RAMP1, RAMP2 a RAMP3 (tab. 1).

Měření srdeční frekvence

Potkani obou experimentálních skupin byli umístěni do malé komůrky s elektrodami zabudovanými v podlaze, které byly připojeny k elektrokardiografii (EKG Seiva Praktik, CZ). Po uplynutí 20 min adaptace bylo provedeno minutové měření, které jsme zopakovali pětkrát ($n = 6-10$ z každé skupiny). Pro stanovení spontánní srdeční aktivity jsme pokusným jedincům intraperitoneálně (i.p.) aplikovali atropin (antagonista M receptorů; 4mg/kg tělesné hmotnosti) a metipranolol (antagonista β -AR; 2mg/kg tělesné hmotnosti) a po uplynutí 15 min jsme opět provedli měření elektrokardiografie. Ze získaných hodnot jsme vypočítali průměr.

Měření síly kontrakce

Pokusným zvířatům byl intraperitoneálně aplikován heparin (500 i. u.) a 10 min poté byli anestetizováni intraperitoneální injekcí uretanu (1,5 g/1 kg). Srdce bylo rychle vyjmuto a z pravé srdeční komory byly vystřiženy vhodné papilární svaly. Preparát byl umístěn do stimulační lázně a připojen k mechanoelektrickému převaděči F30 (Hugo Sachs, SRN). Klidové napětí svalu bylo nastaveno tak, aby síla kontrakce dosahovala 90-95% maxima při stimulační frekvenci 1 Hz. Sval byl elektricky stimulován pravoúhlými impulsy přiváděnými prostřednictvím optoizolační jednotky z komerčního stimulátoru Pulsemaster A300 (WPI, USA). Délka stimulačního pulsu byla 1 ms, amplituda byla o 50 % vyšší než nalezený stimulační práh. Preparát byl perfundován oxygenovaným Tyrodovým roztokem (složení v mmol/l: NaCl 137, KCl 4,5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, glukóza 10, Hepes 5; pH upraveno na 7,4 pomocí NaOH) o teplotě 36 °C. Preparát byl stimulován frekvencí 1 Hz, data byla nahrávána po 30 min stabilizaci. Síla kontrakce byla vyjádřena v arbitrárních jednotkách (a.u.; z angl. „Arbitrary Unite“), klidové napětí odpovídalo nule. Nahrávání a analýza dat byla provedena pomocí programu DiSys (Merlin, Česká republika).

Výsledky

U kontrolních jedinců byla plazmatická hladina glukózy na lačno $5,0 \pm 0,9$ mmol/l (N=21), u jedinců 8 týdnů po aplikaci STZ (STZ8) dosahovala hladina glukózy $24,9 \pm 3,1$ mmol/l (N=12) a u jedinců 26 týdnů po aplikaci STZ (STZ26) $22,4 \pm 2,0$ mmol/l (N=11; hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.D.). Potkani s indukovaným DM měli statisticky významně nižší tělesnou hmotnost než kontrolní jedinci ($p < 0,0001$; tab. 2).

Nejdříve jsme se zaměřili na stanovení vlivu aplikace STZ na základní srdeční funkce, srdeční kontraktilitu a frekvenci. Zjistili jsme, že u diabetických potkanů dochází ke statisticky významnému poklesu síly kontrakce v pravém papilárním svalu v obou experimentálních skupinách, tedy 8 i 26 týdnů po aplikaci STZ. V kontrolní skupině byla síla kontrakce $49 \pm 5,1$ a. u. 8 týdnů a $47 \pm 2,8$ a. u. 26 týdnů po začátku experimentu, zatímco u diabetických potkanů tyto hodnoty činily $26 \pm 3,1$ a.u. a $23 \pm 2,9$ a.u. (obr. 4.1.1.1a).

Klidová tepová frekvence (TF) se v souvislosti s věkem významně nezměnila. U kontrolních jedinců 8 týdnů po začátku experimentu činila TF 334 ± 7 a 26 týdnů po začátku experimentu 322 ± 6 . Aplikace STZ způsobila u potkanů významný pokles klidové TF, přičemž její průměrná hodnota u jedinců skupiny STZ8 činila 248 ± 7 a skupiny STZ26 245 ± 9 . Po bloádě vlivu sympatické a parasympatické inervace na srdeční frekvenci byla u kontrolních jedinců naměřena průměrná hodnota TF 364 ± 6 a 363 ± 6 . Jedinci skupiny STZ8 měli TF 269 ± 5 a skupiny STZ26 261 ± 5 (obr. 4.1.1.1b).

Při studiu genové exprese jsme v srdci kontrolních jedinců prokázali přítomnost mRNA pro AM, CRLR, RAMP1, RAMP2 a RAMP3 ve všech srdečních oddílech bez významných rozdílů mezi síněmi a komorami, či levou a pravou stranou. Z těchto genů jsme pozorovali nejsilnější expresi mRNA pro AM, RAMP2 a CRLR, zatímco exprese mRNA pro RAMP1 a RAMP3 byla nižší (obr. 4.1.1.2).

V srdci diabetických jedinců jsme zaznamenali čtyřnásobný vzestup exprese mRNA pro CRLR v pravé komoře u skupiny STZ8. Kromě toho se u jedinců této skupiny v pravé síni zvýšila exprese mRNA pro RAMP3 a naopak snížila exprese mRNA pro RAMP2, avšak tyto změny nedosáhly statistické významnosti (obr. 4.1.1.3). U potkanů experimentální skupiny STZ26 stoupla exprese mRNA pro RAMP3 na trojnásobek v levé komoře a dvojnásobně v pravé síni, přičemž exprese ostatních sledovaných genů zůstala nezměněna (obr. 4.1.1.4).

V gangliích zadních kořenů míšních z oblasti (Th_1 - Th_4) a v nodózních gangliích jsme prokázali přítomnost mRNA pro oba testované neuropeptidy, přičemž

exprese genu pro CGRP byla několikanásobně vyšší než exprese genu pro AM. Dále jsme zde prokázali přítomnost mRNA pro jednotlivé komponenty receptorového systému AM/CGRP, přičemž u intaktních jedinců exprese sledovaných genů v gangliích zadních míšních kořenů vykazovala sled RAMP3>RAMP2>CRLR>RAMP1, zatímco v nodózním gangliu RAMP3>RAMP2=CRLR>RAMP1 (obr. 4.1.1.5). U potkanů po aplikaci STZ došlo k malému (1,4 násobek), avšak signifikantnímu vzestupu exprese mRNA pro CGRP v nodózním gangliu (obr. 4.1.1.6).

Diskuse

V srdci diabetických jedinců dochází k významnému poškození inervace i kardiomyocytů (Herlitz a Malmberg, 1999). Předpokládá se, že je poškozena i sensorická část inervace, protože u pacientů s DM byla opakovaně popsána absence bolesti při akutní ischemii myokardu (Marchant et al., 1993; Adeghate, 2004). Konkrétní změny nervového přenosu zodpovědné za tento fenomén, však dosud dostatečně popsány nebyly. Je známo, že potkani s indukovaným STZ diabetem mají sníženou expresi mRNA pro CGRP v sensorických neuronech lumbálních ganglií zadních kořenů míšních (Rittenhouse et al., 1996; Zochodne et al., 2001). Dalo by se tedy předpokládat, že stejným způsobem jsou poškozeny i sensorické neurony v hrudní oblasti. Naše výsledky však ukazují, že exprese signálního systému AM/CGRP zůstává v hrudních gangliích zadních kořenů míšních u diabetických potkanů nezměněná. Kromě toho bylo zjištěno, že obsah CGRP v srdci potkana s DM se v porovnání s kontrolními jedinci nesnižuje, ale naopak se u dlouhodobějšího onemocnění mírně zvyšuje (Chottová Dvoráková et al., 2005). To přispělo k domněnce, že vliv DM na expresi a obsah CGRP je orgánově specifický, neboť v kůži a oční duhovce byl popsán vzestup peptidu CGRP (Karanth et al., 1990; Marfurt a Echtenkamp, 1995), naopak v tenkém střevě pokles (Belai a Burnstock, 1996), zatímco v rohovce zůstal beze změny (Marfurt a Echtenkamp, 1995).

Informace o bolestivých podnětech sensorické neurony nodózního ganglia pravděpodobně do CNS nepřenášejí (Fu a Longhurst, 2009), přestože populace těchto buněk CGRP obsahuje a je tedy jedním z jeho zdrojů v srdci (Hayakawa et al., 2011). Na rozdíl od spinálních ganglií vede stimulace těchto neuronů k poklesu srdeční frekvence a krevního tlaku (Fu a Longhurst, 2009). Tyto funkčně rozdílné sensorické neurony srdce reagují rozdílně na dlouhodobé působení DM. V naší studii jsme zjistili, že aplikace STZ vyvolala vzestup exprese mRNA pro CGRP v nodózních

gangliích. Ten může být způsoben buď zvýšením exprese v neuronech, které produkují tento neuropeptid i před onemocněním, nebo, jako např. v dýchacích cestách při alergii, expresí v neuronech, které CGRP doposud netvořily (Fischer et al., 1996). Vzhledem k tomu, že počet neuronů vykazujících CGRP-imunoreaktivitu se v nodózních gangliích u potkanů po aplikaci STZ nezvyšuje (Regalia et al., 2002), lze předpokládat, že pravděpodobnější příčinou je vzestup exprese mRNA pro CGRP v neuronech tvořících CGRP i před aplikací STZ.

Diabetická kardiomyopatie je definována jako patologický proces, který postihuje myokard diabetických pacientů, v jehož důsledku dochází ke vzniku strukturních změn vedoucích k hypertrofii levé komory a diastolické i systolické dysfunkci (Hayat et al., 2004). Řada potkaních modelů s hypertrofií levé komory je spojena se zvýšenou expresí mRNA pro AM, RAMP2 a RAMP3 (Kuwasako et al., 2011).

AM je v srdci uvolňován z buněk hladké cévní svaloviny, endotelových buněk a fibroblastů a působí zde jako parakrinní faktor s významnou úlohou v regulaci kardiovaskulární homeostázy (Hinson et al., 2000). Bylo zjištěno, že AM má pozitivní inotropní efekt, čímž zvyšuje srdeční výdej (Ihara et al., 2000), dále inhibuje vznik hypertrofie myokardu a proliferaci fibroblastů (Tsuruda et al., 1998; Horio et al., 1999). Navíc bylo zjištěno, že AM působí preventivně proti vzniku myokardiálního poškození (Shimekake et al., 1995). Vzhledem k tomu, že se exprese mRNA pro AM ve všech srdečních oddílech neliší, jak ukazují výsledky našich experimentů, může AM tímto způsobem ovlivňovat činnost celého srdce.

Exprese a úloha AM byla studována nejen za fyziologické situace, ale i u řady patologických stavů. Bylo např. zjištěno, že exprese AM v srdci stoupá při hypertenzi (Pan et al., 2006), městnavé srdeční slabosti (Jougasaki et al., 1996; Oie et al., 2000), srdeční ischemii (Oie et al., 2000) či akutním DM (Tang et al., 2007). Řada těchto patologických stavů včetně DM je zároveň spojena se vzestupem plazmatické hladiny AM, která je ukazatelem tíže onemocnění (García-Unzueta et al., 1998; Brain a Grant, 2004). Zda a jakým způsobem je ovlivněna exprese AM v srdci jedinců s chronickým DM však dosud dostatečně popsáno nebylo. V naší studii jsme zjistili, že dlouhotrvající DM nevyvolá v žádném ze srdečních oddílů změny v expresi mRNA pro AM, avšak ovlivňuje expresi jeho receptorů. Na cílové tkáni působí AM prostřednictvím dvou specifických receptorů tvořených CRLR a RAMP2 nebo RAMP3 (Muff et al., 1995; McLatchie et al., 1998). Oie spolu se svými spolupracovníky (Oie et al., 2005) stanovil přítomnost obou těchto heterodimerů v srdci, a zároveň zjistil, že zde převládá komplex CRLR/RAMP2. Tento poznatek je

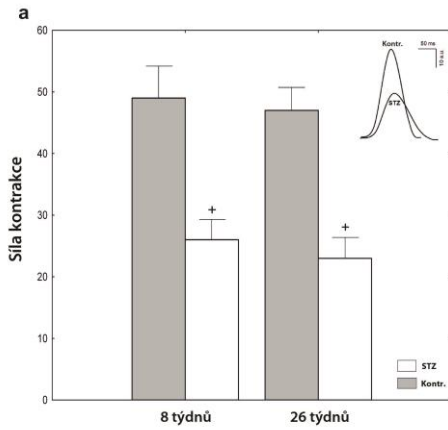
v souladu s našimi výsledky, které ukazují na dvacetinásobně vyšší expresi RAMP2 než RAMP3 ve všech srdečních oddílech kontrolních potkanů.

Výsledky řady studií naznačují, že v souvislosti s různými kardiovaskulárními onemocněními dochází v srdci ke změně exprese regulačních proteinů RAMP. Při městnavém srdečním selhání byl popsán vzestup exprese RAMP2 (Totsune et al., 2000), naopak chronické srdeční selhání vyvolané aortální stenózou je spojeno se vzestupem exprese RAMP1 a RAMP3, avšak nikoliv RAMP2 v síních i komorách (Cueille et al., 2002). Řada dalších modelů hypertenze je spojena se zvýšenou expresí RAMP3 v kardiovaskulárním systému (Nishikimi et al., 2003; Pan et al., 2006; Zhao et al., 2006).

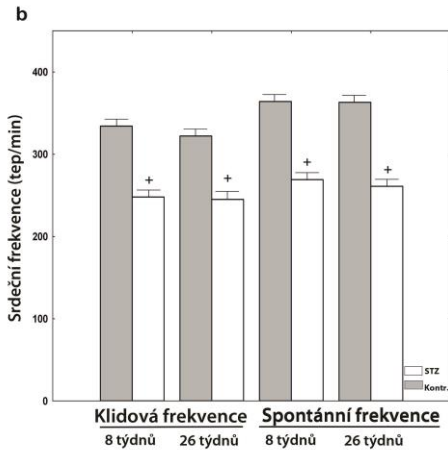
Z našich výsledků vyplývá, že za poruchu přenosu sensorické informace ze srdce není pravděpodobně zodpovědný signální systém CGRP, protože jsme na úrovni exprese jednotlivých genů neprokázali pokles exprese. Nedostatečný přenos signálu nemusí být tedy způsoben nedostatečnou tvorbou mediátoru či receptoru, ale může být způsoben poruchou uvolňování mediátoru z nervových zakončení. Pro tuto skutečnost svědčí vzestup obsahu CGRP peptidu v srdci potkana s chronickým DM (Chottová Dvoráková et al., 2005; Lu et al., 2001). V této práci jsme navíc prokázali, že v diabetickém srdci je nejvíce zasažena exprese RAMP3. RAMP3 je považován za kardioprotektivní faktor, protože zesiluje signál AM při kardiovaskulárním stresu (Gibbons et al., 2007). Lze předpokládat, že protektivní úloha AM se může uplatnit rovněž v diabetickém srdci. K tomuto závěru nás vede skutečnost, že exprese genu pro AM zůstává v srdci zachována i při chronickém DM, zatímco exprese genu pro RAMP3 se zvyšuje.

	Kontroly	STZ	p
Glykémie (mmol/l)			
8 týdnů	4,89 ± 0,81	24,92 ± 3,09	< 0,0001
26 týdnů	5,16 ± 0,98	22,44 ± 2,02	< 0,0001
Tělesná hmotnost (g)			
8 týdnů	220 ± 9,6	168 ± 15,3	< 0,0001
26 týdnů	239 ± 13,3	170 ± 12,8	< 0,0001

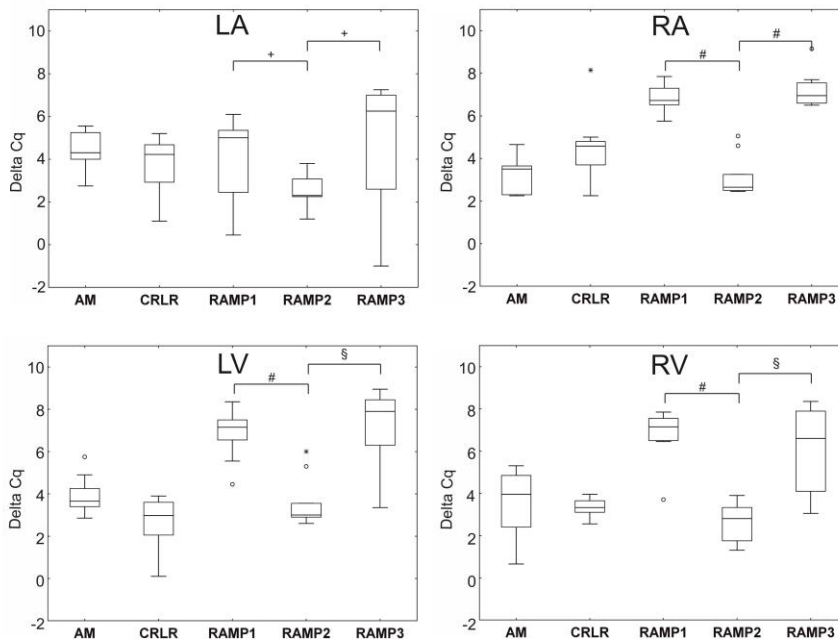
Tab. 2: Průměrné hodnoty plazmatické hladiny glukózy a tělesné hmotnosti jedinců v jednotlivých experimentálních skupinách. Naměřené hodnoty kontrolních jedinců a diabetických zvířat se signifikantně liší.



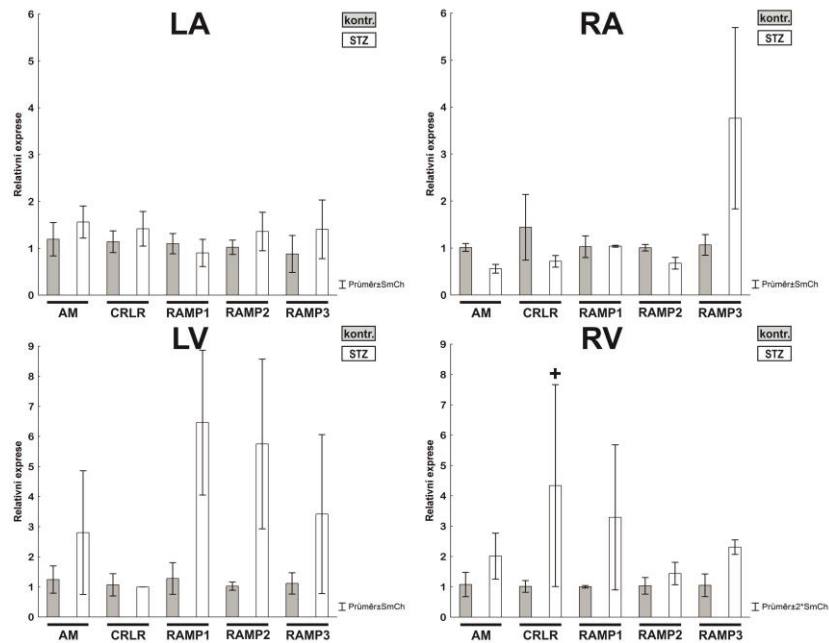
Obr. 4.1.1.1a: Síla kontrakce při frekvenci stimulace 1 Hz; * $p < 0,05$, ve srovnání s kontrolami.



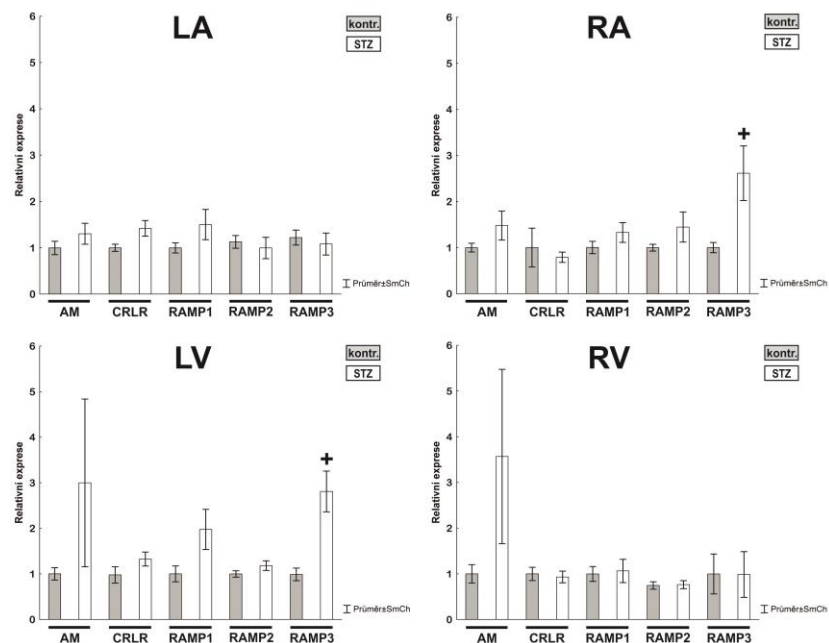
Obr. 4.1.1.1b: Klidová a spontánní srdeční frekvence u kontrolních a diabetických potkanů; * $p < 0,05$, ve srovnání s kontrolami. Naměřené hodnoty síly kontrakce i srdeční frekvence jsou u diabetických jedinců statisticky významně nižší než u kontrolních zvířat.



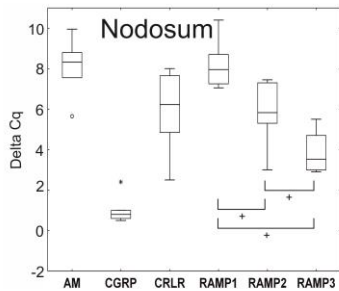
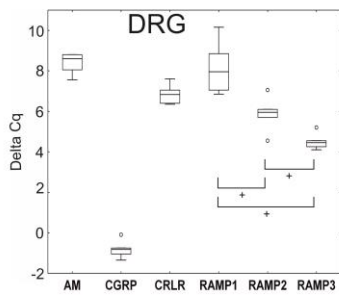
Obr. 4.1.1.2: RT-qPCR, srdce kontrolních zvířat. Kvantitativní stanovení mRNA pro AM, CRLR, RAMP1, RAMP2 a RAMP3 v srdci (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora). Expres sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔCq (vztaženo k expresi β -aktinu). Nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň exprese. Mediátorová RNA pro AM, CRLR, RAMP1, RAMP2 a RAMP3 je přítomna bez významných rozdílů mezi síněmi a komorami, či levou a pravou stranou. Nejvíce jsou exprimovány geny pro AM, CRLR a RAMP2. * $p < 0,05$; § $p < 0,0005$; # $p < 0,0001$.



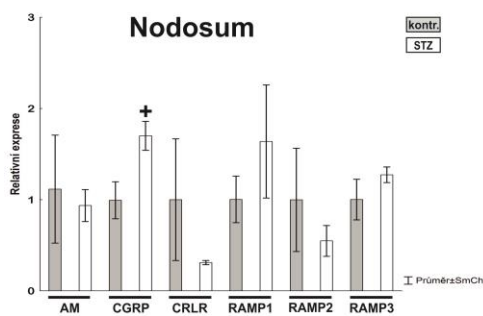
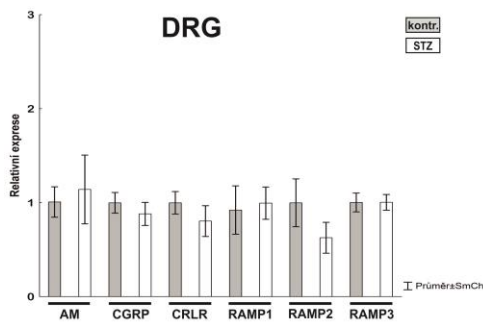
Obr. 4.1.1.3: RT-qPCR, vliv aplikace STZ na expresi sledovaných genů v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) 8 týdnů po aplikaci. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. Relativní exprese u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty ΔCq u diabetických potkanů byly vztaženy k této hodnotě. Statisticky významný vzestup exprese mRNA pro CRLR je patrný v pravé komoře diabetických jedinců. * $p < 0,05$



Obr. 4.1.1.4: RT-qPCR, vliv aplikace STZ na expresi sledovaných genů v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) 26 týdnů po aplikaci. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. Relativní exprese u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty ΔCq u diabetických potkanů byly vztaženy k této hodnotě. Statisticky významný vzestup exprese mRNA pro RAMP3 je patrný v pravé síni a levé komoře diabetických jedinců. * $p < 0,05$



Obr. 4.1.1.5: RT-qPCR, spinální (DRG) a nodózní ganglia kontrolních potkanů. Expresе sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔCq (vztaženo k expresi β -aktinu), kdy nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň expresе. Expresе genu pro CGRP je v obou gangliích několikanásobně vyšší než expresе genu pro AM. Expresе mRNA pro jednotlivé komponenty receptorového systému CGRP/AM má ve spinálních gangliích následující sled: RAMP3>RAMP2>CRLR>RAMP1, zatímco v nodózním gangliu RAMP3>RAMP2=CRLR>RAMP1. $^+p<0,05$



Obr. 4.1.1.6: RT-qPCR, vliv aplikace STZ na expresi sledovaných genů ve spinálních (DRG) a nodózních gangliích 26 týdnů po aplikaci STZ. Data jsou prezentována jako relativní expresе (RE) vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. Relativní expresi u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty ΔCq u diabetických potkanů byly vztaženy k této hodnotě. Z grafu je patrný signifikantní vzestup expresе mRNA pro CGRP v nodózním gangliu. $^+p<0,05$

5.1.2 NK1 receptor v srdci normálního a diabetického potkana

Úvod

V předcházející kapitole bylo zmíněno, že chronický DM mimo jiné poškozuje senzorickou srdeční inervaci. Srdeční senzorická vlákna kromě již zmíněného CGRP uvolňují také SP (Lundberg, 1996). Největší koncentrace těchto vláken byla v srdci prokázána v oblastech SA a AV uzlu a ve stěně koronárních cév (Weihe a Reinecke, 1981). Dále bylo zjištěno, že zdrojem SP v srdci mohou být i buňky nenervového původu, např. endotelové buňky, makrofágy nebo lymfocyty (Lai et al., 1998; Chang et al., 2013). Na cílové tkáni působí SP prostřednictvím NK receptorů, přičemž nejvyšší afinitu vykazuje SP vůči NK1 receptoru (Maggi, 1995b; Mantyh, 2002). Třebaže byla v srdci potkana prokázána přítomnost vazebných míst pro SP a to zejména v okolí koronárních arterií a srdečních chlopní (Walsh et al., 1996), podrobné informace o lokalizaci a typu těchto receptorů nejsou dosud dostupné.

Cílem naší studie bylo v první řadě prokázat přítomnost specifické mRNA a proteinu NK1 receptoru v srdci pomocí metod kvantitativní RT-PCR a Western blotu, a dále stanovit tkáňovou distribuci NK1 v srdci intaktního laboratorního potkana prostřednictvím nepřímé imunohistochemie a laserové mikrodisekce. Následně jsme zjišťovali, zda a do jaké míry je exprese genu pro NK1 receptor v srdci potkana ovlivněna chronickým DM.

Materiál a metody

Indukci DM, přípravu vzorků, izolaci RNA a proteinu, laserovou mikrodisekci, nepřímou imunofluorescenci, reverzní transkripci i qPCR jsme prováděli dle postupu popsaného v kapitole 3.

Kvantitativní RT-PCR

Podmínky pro PCR amplifikační reakci byly následující: iniciální denaturace 15 min při 95 °C, následovalo 47 cyklů po 30 s při 95 °C, 25 s při 60 °C a 30 s při 72 °C. Byly použity primery (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ) specifické pro β -aktin a NK1 receptor (tab. 1).

Western blot

Pracovní postup byl popsán v kapitole 3. Pro detekci NK1 proteinu receptoru jsme použili králičí primární protilátky proti NK1 receptoru (1:2 000; MBL International Corporation, Woburn, USA), kterou jsme následně označili pomocí kitu Vectastain

ABC obsahujícího křenu peroxidázu a DAB s 3,3'-diaminobenzidinem (Vector Lab, CA, USA).

Nepřímá imunofluorescence

Značení jsme provedli za pomoci králičí primární protilátky proti NK1 receptoru (1:500, MBL International Corporation). Zároveň s touto protilátkou jsme aplikovali myšší protilátku proti RECA1 (1:20, Serotec, Oxford, UK; Duijvestein et al. 1992), která se používá jako marker pro endotelové buňky. Jako sekundární protilátky jsme použili kozí imunoglobulin (Ig) proti králičí protilátce navázaný na FITC (1:30, Calbiochem, San Diego, CA) a oslí Ig proti myšší protilátce navázaný na Cy3 (1:50, Dianova, Hamburg, BRD).

Laserová mikrodisekce

Připravili jsme čerstvé řezy srdce laboratorního potkana, které jsme nanесли na speciální podložní sklíčka. Následně jsme postupovali dle pracovního protokolu popsaneho v kapitole 3. Vyizolovali jsme kardiomyocyty, těla intrakardiálních neuronů a buňky hladké cévní svaloviny koronárních arterií.

Výsledky

Výsledky RT-qPCR provedené u vzorků RNA vyizolované z homogenátů tkání jednotlivých srdečních oddílů prokázaly přítomnost mRNA pro NK1 receptor. Velmi vysoké hodnoty C_q však naznačují, že exprese tohoto receptoru je v srdci nízká. V srdci kontrolních potkanů jsme zjistili, že exprese genu pro NK1 receptor je nejvyšší v levé síni, přičemž rozdíl proti zbývajícím srdečním oddílům je přibližně stonásobný (obr. 4.1.2.1). Western blot prokázal přítomnost NK1 receptoru v jednotlivých srdečních oddílech laboratorního potkana, přičemž tloušťka bandy vykazujícího imunoreakci se specifickou protilátkou naznačuje, že v síních je obsah NK1 receptoru významně vyšší než v komorách (obr. 4.1.2.2). Za pomoci imunofluorescence jsme zaznamenali specifickou imunoreakci na povrchu některých intrakardiálních neuronů, dále v nervových vláknech a v malých buňkách, které však nevykazovaly reakci s protilátkou proti RECA1, markeru endotelových buněk. Z toho je zřejmé, že se nejedná o endotelové buňky. Za účelem přesnějšího určení typu těchto buněk jsme provedli laserovou mikrodisekci buněk hladké cévní svaloviny koronárních cév, kardiomyocytů a intrakardiálních neuronů (obr. 4.1.2.3). Přítomnost mRNA pro NK1 receptor jsme zaznamenali pouze v jednom vzorku neuronů ze tří, vzorky kardiomyocytů i buněk hladké svaloviny byly negativní (obr. 4.1.2.4).

Chronický DM o délce trvání 26 a 53 týdnů ovlivnil expresi mRNA pro NK1 receptor následovně: došlo ke statisticky významnému poklesu exprese sledovaného genu v pravé síni po uplynutí 53 týdnů od indukce DM, zatímco v pravé komoře se naopak exprese NK1 receptoru zvýšila. V ostatních srdečních oddílech jsme žádné změny nezaznamenali (obr. 4.1.2.5).

Diskuse

V první části této práce jsme se zaměřili na průkaz přítomnosti NK1 receptoru v srdci intaktního laboratorního potkana a na jeho tkáňovou distribuci. Prokázali jsme přítomnost sledovaného receptoru ve všech srdečních oddílech, a to jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu. Zároveň jsme zjistili, že nejvíce je tento receptor zastoupen v levé síni. Toto zjištění spolu s výsledky nepřímé imunofluorescence prokazujícími přítomnost sledovaného receptoru na povrchu těl některých intrakardiálních neuronů je v souladu se skutečností, že většina těl intrakardiálních neuronů je v srdci laboratorního potkana lokalizována v oblasti levé síně a mezisíňového septa (Pardini et al., 1987).

Úroveň exprese NK1 receptoru v srdci lze celkově označit za velmi nízkou. V porovnání s expresí CRLR, což je specifický receptor pro CGRP, peptid uvolňovaný spolu se SP ze sensorických nervových zakončení, se jedná o hodnoty více než stonásobně nižší (Mistrova et al., 2014). Důvodem absence signálu u dvou vzorků srdečních ganglií z laserové mikrodisekce může být relativně vyšší zastoupení neuronů neobsahujících daný receptor, čímž se mohlo dostat celkové množství mRNA pro NK1 receptor v těchto vzorcích pod detekční limit použité metody. Mediátorová RNA pro NK1 receptor, jež jsme prokázali v komorách, by mohla pocházet z buněk vykazujících imunoreakci s protilátkou proti NK1 receptoru, jejichž typ se nám nepodařilo přesně určit, ale předpokládáme, že se jedná o fibroblasty.

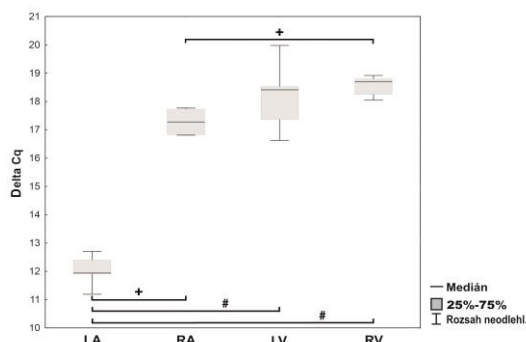
Prostřednictvím laserové mikrodisekce jsme prokázali, že kardiomyocyty ani buňky hladké cévní svaloviny koronárních cév neexprimují detekovatelné množství mRNA pro NK1 receptor. Rovněž nepřímá imunofluorescence neprokázala přítomnost specifické reakce těchto buněk s protilátkou proti NK1 receptoru. Výše popsané skutečnosti tedy naznačují absenci NK1 receptoru v těchto typech buněk. Kromě toho jsme prostřednictvím nepřímé imunofluorescence prokázali absenci imunoreakce s protilátkou proti NK1 receptoru v endotelových buňkách. Tento výsledek jsme nemohli potvrdit laserovou mikrodisekcí, protože touto metodou nelze

z tkáňového řezu získat endotelové buňky v množství dostatečném pro RT-qPCR analýzu.

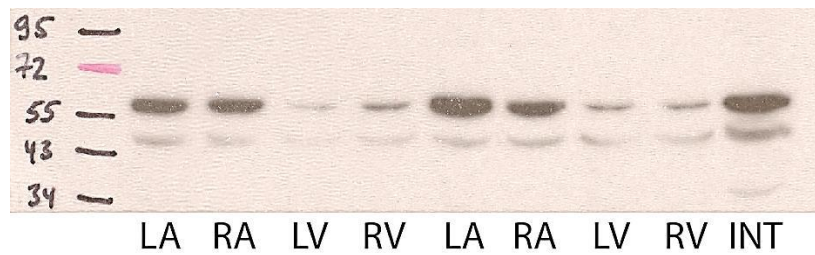
Následně jsme se zaměřili na výzkum případného vlivu DM na expresi NK1 receptoru v jednotlivých srdečních oddílech. NK1 receptor v srdci zprostředkovává vazodilatační účinky SP na koronární arterie (Hoover et al., 2000). Význam tohoto účinku „*in vivo*“ nebyl dosud dostatečně stanoven, protože SP je uvolňována ze sensorických nervových zakončení spolu s CGRP, látkou s významným vazodilatačním účinkem.

Dosavadní výsledky experimentů naznačují, že CGRP vykazuje v srdci významnější vazodilatační účinek než SP (Harrison a Geppetti, 2001). Význam signálního systému SP pro dilataci koronárního řečiště by se mohl zvýšit za situace, kdy by došlo k poškození signálního systému CGRP například vlivem onemocnění. Kromě toho bylo zjištěno, že SP moduluje srdeční činnost prostřednictvím intrakardiálního nervového systému, neboť potencuje účinek ACh (Zhang et al., 2001).

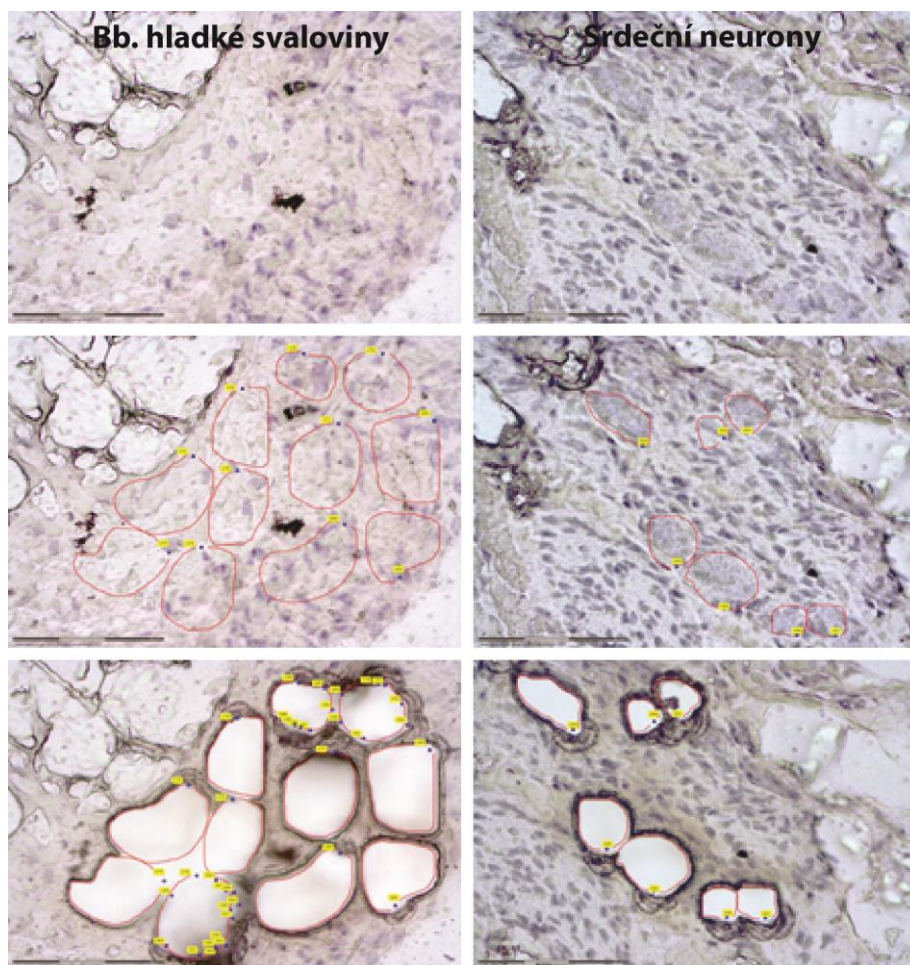
Z našich experimentů vyplývá, že některé neurony srdečních ganglií mají na svém povrchu NK1 receptory. V levé srdeční síni potkana, kde se nachází větší množství srdečních ganglií, jsme u diabetických potkanů nezaznamenali významnou změnu exprese NK1 receptoru. Ale v pravé síni jsme zjistili statisticky významný pokles exprese sledovaného receptoru. Bylo zjištěno, že součástí klinického obrazu diabetika je i klidová tachykardie (Voulgari et al., 2010). Nižší vazebná schopnost NK1 receptorů v důsledku poklesu jejich exprese v pravé síni by mohla být jednou z příčin zjištěné tachykardie.



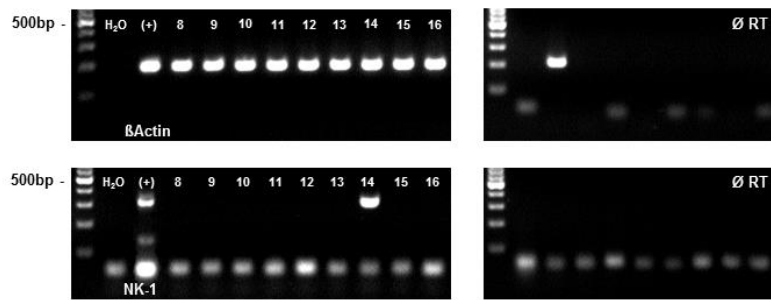
Obr. 4.1.2.1: RT-qPCR, srdce kontrolních zvířat. Kvantitativní stanovení mRNA pro NK1 receptor v srdci (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) u intaktních zvířat. Expres sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔCq (vztaženo k expresi β -aktinu). Nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň exprese. V LA je exprese receptoru statisticky významně vyšší než v ostatních srdečních oddílech. Signifikantní rozdíl v expresi NK1 receptoru je patrný i mezi pravou síní a pravou komorou. + $p < 0,05$; # $p < 0,0001$



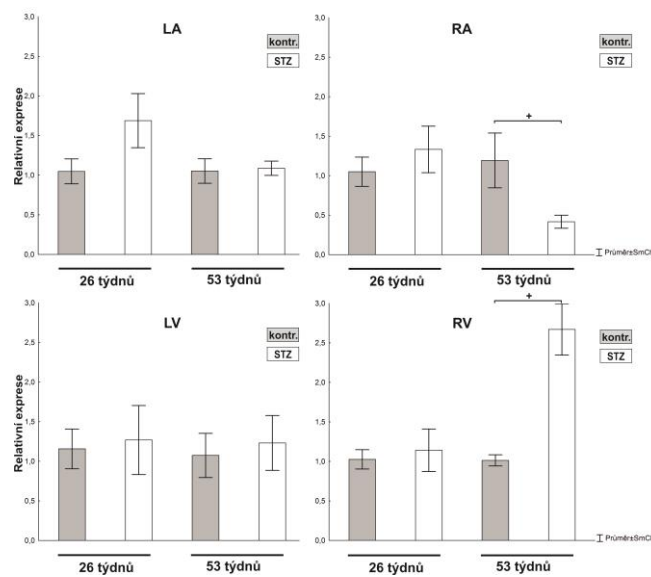
Obr. 4.1.2.2: Western blot. Průkaz přítomnosti proteinu NK1 receptoru v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) a v tenkém střevě (INT). Širší bandy u vzorků srdečních síní ukazují na výrazně vyšší přítomnost sledovaného receptoru v síních než v komorách.



Obr. 4.1.2.3: Laserová mikrodisekce. Příklad výběru a disekce zkoumaných buněk.



Obr. 4.1.2.4: Gelová elektroforéza zobrazující výsledek analýzy vzorků získaných laserovou mikrodisekcí. Jeden vzorek intrakardiálních neuronů obsahuje mRNA pro NK1 receptor. Vzorek 8 – neurony spinálních ggl.; vzorek 9 – kardiomyocyty; vzorek 10 – bb. hladké svaloviny; vzorek 11 – intrakardiální neurony; vzorek 12 – bb. hladké svaloviny; vzorek 13 – bb. hladké svaloviny; vzorek 14 – intrakardiální neurony; vzorek 15 – neurony spinálních ggl.; vzorek 16 – neurony spinálních ggl.



Obr. 4.1.2.5: RT-qPCR, vliv aplikace STZ na expresi NK1 receptoru v jednotlivých srdečních oddílech (LA=levá síň, RA=pravá síň, LV=levá komora, RV=pravá komora) kontrolních jedinců a jedinců 26 a 53 týdnů po aplikaci STZ. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. Relativní expresi u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty ΔCq u diabetických potkanů byly vztaženy k této hodnotě. Expresie sledovaného genu se statisticky významně snížila v pravé síni po uplynutí 53 týdnů od indukce diabetu, zatímco v pravé komoře se naopak exprese NK1 receptoru zvýšila. * $p < 0,05$

5.2 Ovlivnění srdeční inervace laboratorního potkana různými typy stresu

5.2.1 Vliv dvou typů stresu na expresi a distribuci TH v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy

Úvod

V srdci se TH nachází v sympatických nervových vláknech, subpopulaci intrakardiálních neuronů (Slavíková et al., 2003), SIF buňkách (Kriebel et al., 1991) a rovněž v ICA buňkách, které se nacházejí nejenom v blízkosti srdečních ganglií v síních, ale i v komorách (Huang et al., 1996a). Vzhledem k tomu, že transkripce a translace genu probíhá v tělech buněk a nikoliv v nervových vláknech, jsou zdrojem mRNA pro TH v srdci pravděpodobně katecholaminergní intrakardiální neurony, SIF a ICA buňky.

Cílem této studie bylo zjistit, zda každý ze srdečních oddílů exprimuje mRNA pro TH, a dále zda je tato exprese ovlivněna akutním psychogenním či kombinovaným stresem. Kromě toho nás zajímalo, zda a do jaké míry se na regulaci této exprese podílí aktivita HPA osy. Jako model jsme použili potkany dvou kmenů, referenční kmen SD a kmen LE, u kterého je geneticky podmíněná snížená reaktivita HPA osy určující výslednou stresovou odpověď zvířete (Klenerova et al., 2002).

Materiál a metody

Aplikaci stresu, přípravu vzorků, izolaci RNA, reverzní transkripci qPCR i nepřímou imunofluorescenci jsme prováděli dle postupu popsaného v kapitole 3.

Kvantitativní RT-PCR

Podmínky pro PCR amplifikační reakci byly následující: iniciální denaturace 15 min při 95 °C, následovalo 47 cyklů po 30 s při 95 °C, 25 s při 60 či 64 °C a 30 s při 72 °C. Byly použity primery (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ) specifické pro TH a β -aktin (tab. 1).

Nepřímá imunofluorescence

Značení jsme provedli za pomoci králičí primární protilátky proti TH (1:500, Calbiochem, San Diego, CA) a myší primární protilátky proti DBH (1:100, Biotrend, Köln, BRD). Ke zviditelnění pozitivní imunoreakce jsme použili sekundární protilátky s navázanou fluorescenční barvou Texas Red (1:30, Calbiochem, San Diego, CA) nebo FITC (1:50, Calbiochem, San Diego, CA).

Výsledky

U kontrolních potkanů obou kmenů byla exprese genu pro TH významně vyšší v srdečních síních ve srovnání s komorami. V některých vzorcích srdečních komor se nám sice podařilo detekovat přítomnost mRNA pro TH, avšak její množství bylo tak malé, že nebylo možné provést kvantitativní hodnocení. U jedinců obou kmenů byla exprese genu statisticky významně vyšší v levých síních než v síních pravých. Rozdíl v expresi tohoto genu mezi jedinci obou kmenů byl rovněž významný, přičemž vyšší hladiny exprese jsme zaznamenali u jedinců kmene LE (obr. 4.2.1.1).

Aplikace obou typů akutního stresu vyvolala u potkanů kmene SD vzestup exprese mRNA pro TH, přičemž lze říci, že pravé srdeční síně reagovaly citlivěji než levé. V levých síních jsme statisticky významný vzestup exprese zaznamenali pouze 3 hod po aplikaci kombinovaného stresu (ICS3), zatímco v pravých síních již 1 hod po aplikaci obou typů stresu (IS1 a ICS1) a tento vzestup byl ještě výraznější v obou experimentálních skupinách za 3 hod (IS3 a ICS3; obr. 4.2.1.2). U potkanů kmene LE jsme rovněž zaznamenali statisticky významný vzestup sledovaného genu, avšak pouze v levé síni 3 hod po aplikaci psychogenního stresu (IS3). Expresi sledovaného genu v pravé síni aplikace žádného z typů stresu neovlivnila. (obr. 4.2.1.3). Hodnoty exprese mRNA pro TH v pravých srdečních síních kontrolních jedinců kmene LE korelují s nejvyššími hodnotami exprese tohoto genu v pravých srdečních síních kmene SD 3 hod po aplikaci obou typů stresu (IS3 a ICS3; obr. 4.2.1.4).

Imunofluorescencí jsme prokázali přítomnost SIF a ICA buněk v intrakardiálních gangliích jedinců každé experimentální skupiny. SIF buňky vykazovali imunoreakci pouze s protilátkou proti TH, zatímco ICA buňky reagovali s protilátkou proti TH i proti DBH. Kromě toho jsme v intrakardiálních gangliích, srdeční svalovině síní a stěně arteriol zaznamenali TH-imunoreaktivní nervová vlákna (obr. 4.2.1.5). V distribuci imunoreakce mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly patrné žádné rozdíly.

Diskuse

V této práci jsme se zaměřili na stanovení exprese genu pro TH v srdečních síních za klidového stavu a po aplikaci dvou typů stresu. Jak již bylo zmíněno v přehledu současného stavu poznání, TH je limitujícím enzymem syntézy KA. Vzestup exprese tohoto genu byl zaznamenán při stresu např. v sympatických gangliích či dření nadledvin (Nankova et al., 1996; Kvetnansky et al., 2004).

Z našich pokusů vyplývá, že exprese mRNA pro TH je významně vyšší v síních než v komorách, což je v souladu s poznáním, že většina intrakardiálních neuronů se v srdci laboratorního potkana nachází v levých a v menší míře v pravých síních (Pardini et al., 1987). Vzhledem k tomu, že některé z těchto neuronů vykazují charakteristiku sympatických neuronů včetně syntézy KA (Slavíková et al., 2003), lze rozdíly exprese v síních očekávat. Zdrojem KA v komorách jsou pravděpodobně poměrně málo početné ICA buňky (Huang et al., 1996a) a dále i buňky hladké cévní svaloviny a endotelu, které jsou rovněž schopny produkovat malé množství TH (Sorriento et al., 2012; Pfeil et al., 2014). Malý počet buněk produkujících TH v komorách odpovídá nízké expresi tohoto genu v komorách.

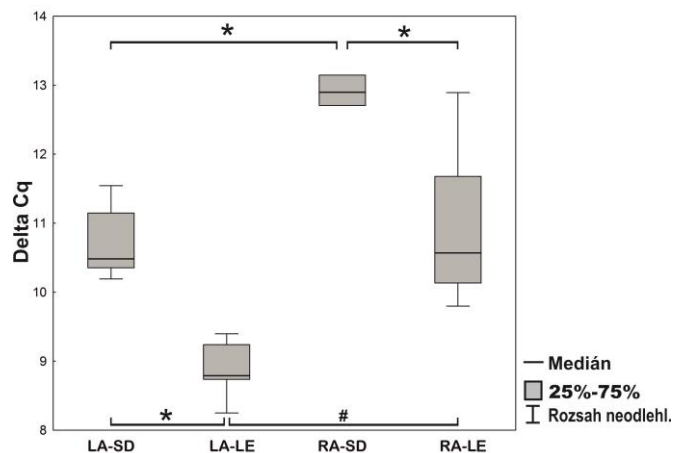
V souvislosti se stresem se v srdci potkana významně zvyšuje obsah TH, DBH i PNMT (Gavrilovic et al., 2010). Dosud se hlavní význam při regulaci odpovědi organismu na stres přisuzoval především HPA ose. Zdrojem výše zmíněných enzymů v srdci však mohou být kromě sympatických nervových vláken, která do srdce přicházejí ze sympatických ganglií, také intrakardiálně lokalizované sympatické neurony a další nenervové buňky obsahující TH. Studium genomové exprese enzymů podílejících se na tvorbě KA přispívá k novému poznání mechanismů regulace srdeční činnosti při stresu.

Námi zaznamenaný vzestup exprese mRNA pro TH v síních potkana po aplikovaném stresu naznačuje, že při stresové situaci se na adaptačním procesu srdeční činnosti podílí rovněž intrakardiální nervový systém.

Vyšší množství KA v srdci zodpovědných za vzestup srdeční frekvence i stažlivosti při stresu nepochází tedy výhradně z extrakardiálních zdrojů, ale určitá část těchto KA je tvořena přímo v srdci. Není bez zajímavosti, že na této zvýšené tvorbě se významněji podílí pravá síň než síň levá. Klidová exprese mRNA pro TH je vyšší v levé síni, což odpovídá i skutečnosti, že v levé síni se nachází větší množství srdečních gangliových buněk než vpravo. Ganglia intrakardiálního plexu plní rozdílné úkoly. Příkladem mohou být ganglia v pravé síni, jejichž hlavní funkcí je regulace srdeční frekvence (Gray et al., 2004). Z našich výsledků vyplývá, že právě tato srdeční ganglia jsou pravděpodobně nejvíce ovlivněna aplikovaným stresem.

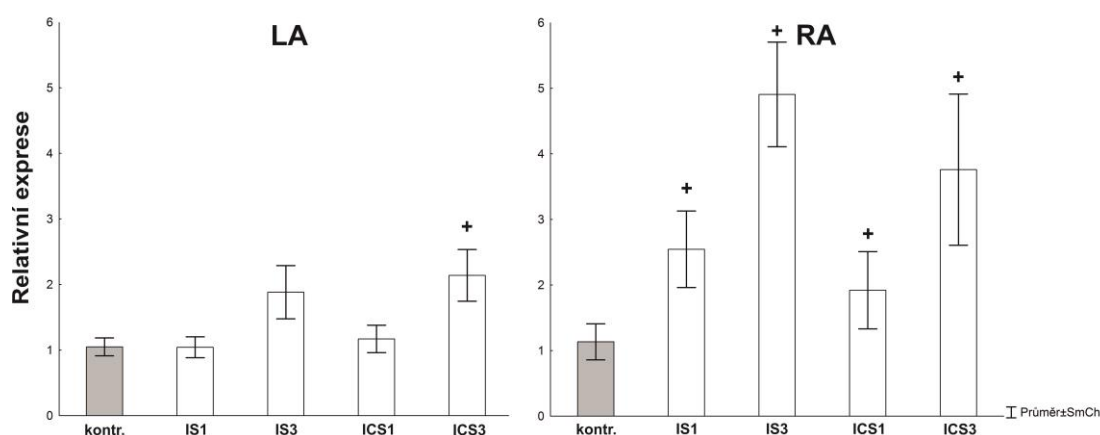
Zajímavé je zjištění, že klidová hodnota exprese genu pro TH je v síních potkanů kmene LE významně vyšší než u jedinců kmene SD, avšak aplikace stresu u těchto jedinců nevedla k jejímu vzestupu. Námi aplikovaný stres vyvolal vzestup exprese tohoto genu v pravých síních všech experimentálních skupin jedinců kmene SD, přičemž tato hodnota byla vyšší u jedinců s delší prodlevou od skončení stresu

(skupiny IS3 a ICS3). Nejvyšší naměřené hodnoty u zvířat kmene SD byly shodné s hodnotami naměřenými u kontrolních jedinců kmene LE.



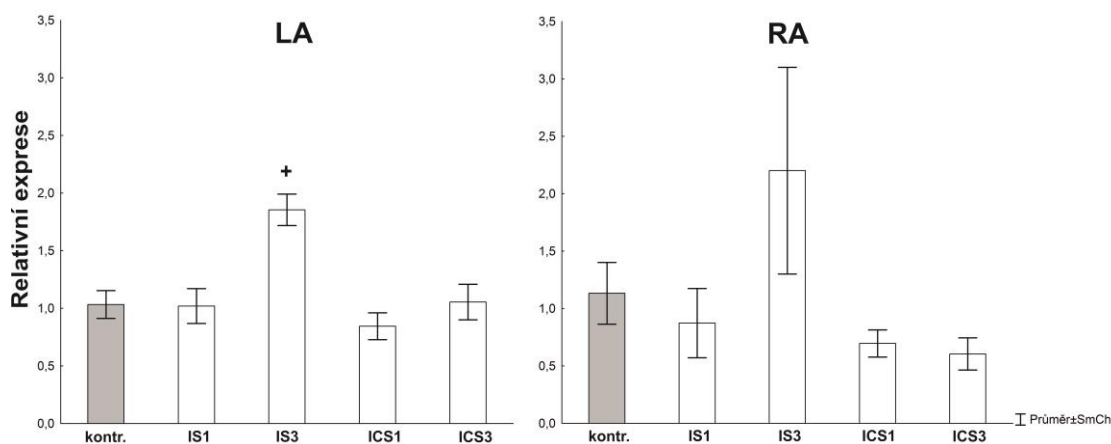
Obr. 4.2.1.1: RT-qPCR, srdce kontrolních zvířat. Kvantitativní stanovení mRNA pro TH v srdečních síních intaktních jedinců kmene SD a LE (LA = levá síň, RA = pravá síň). Expze sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔCq (vztaženo k expresi β -aktinu), kdy nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň expze. Expze genu pro TH je statisticky významně vyšší u jedinců kmene LE v porovnání s potkany kmene SD. Rozdíl v expresi tohoto genu je rovněž mezi síněmi, kdy v levých síních je významně vyšší než v síních pravých u jedinců obou studovaných kmenů. # $p < 0,01$; * $p < 0,005$

SPRAGUE-DAWLEY

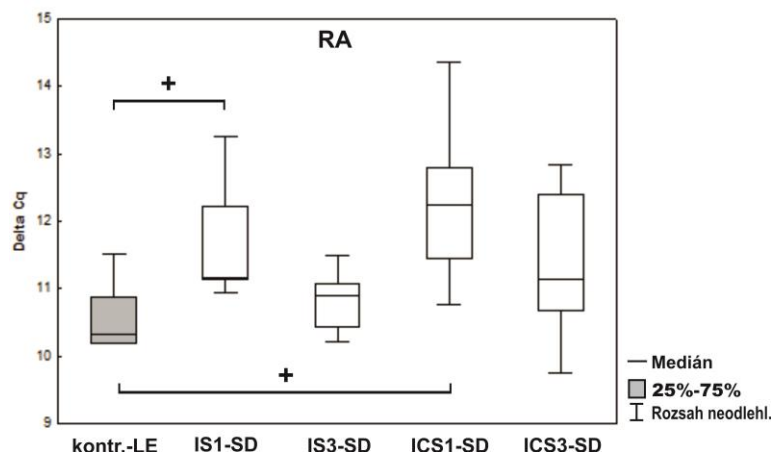


Obr. 4.2.1.2: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů akutního stresu (IS - imobilizační stres, ICS – imobilizační stres kombinovaný s chladovým stresem) na expresi TH v srdečních síních (LA = levá síň, RA = pravá síň) potkanů kmene SD. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) mRNA pro TH vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. RE u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty ΔCq u stresovaných potkanů byly vztaženy k této hodnotě. V levých síních je statisticky významný vzestup exprese pouze 3 hod po aplikaci kombinovaného stresu, zatímco v pravých síních již 1 hod po aplikaci obou typů stresu a tento vzestup je ještě výraznější v obou experimentálních skupinách za 3 hod. * $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

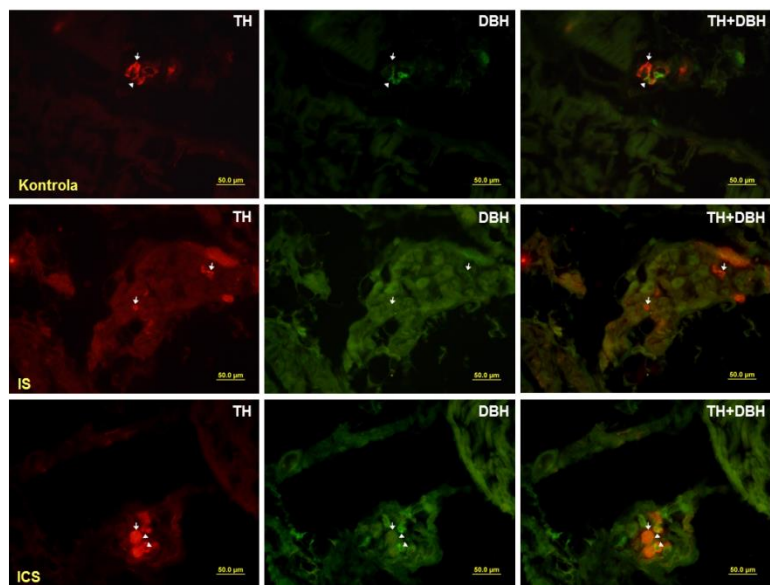
LEWIS



Obr. 4.2.1.3: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů stresu (IS - imobilizační stres, ICS – imobilizační stres kombinovaný s chladovým stresem) na expresi TH v srdečních síních (LA = levá síň, RA = pravá síň) potkanů kmene LE. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) mRNA pro TH vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. RE u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty ΔCq u stresovaných potkanů byly vztaženy k této hodnotě. Vzestup exprese mRNA pro TH je signifikantní pouze v levé síni jedinců experimentální skupiny IS3. V pravých síních aplikace stresu úroveň exprese sledovaného genu v porovnání s kontrolní skupinou neovlivnila. * $p < 0,05$



Obr. 4.2.1.4: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů stresu (IS - imobilizační stres, ICS – imobilizační stres kombinovaný s chladovým stresem) na expresi TH v pravých srdečních síních (RA) kontrolních potkanů kmene LE a stresovaných jedinců kmene SD. Expresie sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔCq (vztaženo k expresi β -aktinu), kdy nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň exprese. Jedinci kmene SD z experimentálních skupin IS3 a ICS3, u nichž byl změněn nejvýraznější vzestup exprese genu pro TH, dosáhli klidových hodnot stanovených u jedinců kmene LE. * $p < 0,05$



Obr. 4.2.1.5: Nepřímá imunofluorescence. Imunohistochemický průkaz lokalizace TH a DBH v srdečních síních kontrolního potkana kmene SD, potkana po aplikaci imobilizačního stresu (IS) a kombinovaného stresu (ICS). SIF (šipky) a ICA (hlavičky šipek) buňky byly lokalizovány uvnitř intrakardiálního ganglia jedince každé experimentální skupiny. SIF buňky vykazovaly pouze TH-imunoreaktivitu (IR), zatímco ICA buňky byly TH a DBH-imunopozitivní. Kromě toho jsou zde patrná TH-IR nervová vlákna, která jsou lokalizovaná uvnitř srdečních ganglií i mezi kardiomyocyty síní jedinců všech experimentálních skupin.

5.2.2 Účinek dvou typů stresu na expresi genů pro ChAT a M₂ receptorů v srdečních síních potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy

Úvod

V předchozí studii jsme prokázali, že stres ovlivňuje produkci KA, jejichž zdrojem jsou v srdci potkana mimo jiné sympatické neurony. Vzhledem k tomu, že intrakardiální nervový systém obsahuje sympatické i parasympatické neurony a funguje jako celek, zajímalo nás, zda a do jaké míry je stresem ovlivněna cholinergní komponenta. Konkrétně jsme se zabývali studiem exprese dvou genů: genu pro ChAT (EC 2.3.1.6), enzym syntetizující ACh, a genu pro M₂ receptor, který účinky ACh na cílovou tkáň zprostředkovává. Stejně jako v předcházející práci jsme sledovali vliv dvou odlišných stresových podnětů na expresi obou těchto genů v levé a pravé srdeční síni 3 h po aplikaci stresu, tedy době, kdy byla nejvíce ovlivněna exprese genu pro TH. Dále nás zajímal vliv aktivity HPA osy na výslednou expresi mRNA uvedených genů.

Materiál a metody

Aplikaci stresu, přípravu vzorků, izolaci RNA, reverzní transkripci i qPCR jsme prováděli dle postupu popsaného v kapitole 3.

Kvantitativní RT-PCR

Podmínky pro PCR amplifikační reakci byly následující: iniciální denaturace v jednom cyklu 15 min při 95 °C, následovalo 47 cyklů po 30 s při 95 °C, 25 s při 59 °C a 30 s při 72 °C. Byly použity primery (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ) specifické pro β -aktin, ChAT a M₂ receptor (tab. 1).

Výsledky

U kontrolních potkanů obou kmenů byla exprese mRNA pro ChAT vyšší v levých síních než v síních pravých, přičemž tento rozdíl byl vyšší u kmene LE než u kmene SD (obr. 4.2.2.1). Klidová exprese genu pro M₂ receptory byla v levé i pravé síni přibližně shodná jak u potkanů kmene SD, tak i u jedinců kmene LE, přičemž při srovnání těchto kmenů navzájem bylo zjištěno, že množství mRNA pro M₂ receptor je statisticky signifikantně vyšší v síních potkanů kmene LE v porovnání s jedinci kmene SD (obr. 4.2.2.1).

Aplikace kombinovaného stresu (psychogenní a fyzická složka účinku) vyvolala vzestup exprese mRNA pro ChAT v pravé srdeční síni u jedinců

experimentální skupiny ICS3 obou testovaných kmenů, avšak pouze u kmene SD tato změna dosáhla statistické významnosti (tab. 4.2.2.3). V levé síni jsme rovněž zaznamenali tendenci k vzestupu exprese genu pro ChAT. Třebaže tento vzestup nedosáhl statistické významnosti, došlo k vymizení rozdílu v expresi sledovaného genu mezi kontrolními jedinci kmene LE a jedinci kmene SD experimentální skupiny ICS3 (obr. 4.2.2.2). Naopak v pravé síni potkanů kmene LE došlo působením kombinovaného stresu k vzestupu exprese na úroveň klidové hodnoty potkanů kmene SD (obr. 4.2.2.2). U potkanů SD jsme v pravé síni po aplikaci stresorů zaznamenali tendenci k poklesu exprese M_2 receptoru, zatímco u potkanů LE jsme stejný, avšak signifikantní, pokles zaznamenali v levé síni jedinců po aplikaci psychogenního stresu skupiny IS3 (tab. 3; obr. 4.2.2.3).

Diskuse

Vyšší úroveň exprese mRNA pro ChAT v levé srdeční síni než v pravé odráží skutečnost, že v oblasti levé síně a síňového septa, které bylo v našich preparátech součástí vzorku označeného LA, se nachází větší počet srdečních ganglií (Baptista a Kirby, 1997). Z našich výsledků dále vyplývá, že za fyziologických podmínek existují významné kvantitativní rozdíly v srdeční expresi ChAT mezi jedinci kmene SD a LE. Tyto rozdíly dosud nebyly nikde popsány a o jejich důvodu lze pouze spekulovat. O jedincích kmene LE je známo, že vykazují významně nižší aktivitu HPA osy, což je způsobeno nižší produkcí kortikoliberinu a následným uvolňováním menšího množství kortikosteronu do krve (Sternberg et al., 1992). Zda a do jaké míry se tyto rozdíly mohou promítnout do exprese některých genů, dosud nebylo studováno. Zároveň dosud nebyly popsány ani případné další genetické rozdíly mezi těmito kmeny.

Z našich výsledků vyplývá, že, zatímco úroveň exprese genu pro ChAT se v levé síni po aplikaci různých typů stresu nezměnila, v pravé srdeční síni ke změně exprese mRNA pro ChAT došlo, a to konkrétně po aplikaci kombinovaného stresu (imobilizace a chladu). U jedinců kmene LE tato změna nedosáhla statistické významnosti, avšak u jedinců kmene SD byl vzestup desetinásobný. Vzhledem k tomu, že v pravé síni se gangliové buňky nacházejí především v blízkosti vstupu vena cava superior (Baptista a Kirby, 1997), tedy v oblasti, kde je rovněž umístěn SA uzel, můžeme předpokládat, že zjištěné změny v expresi ChAT budou souviset se změnami srdeční frekvence. Možný vzestup tvorby mediátoru, který vykazuje negativní chronotropní efekt, se může na první pohled jevit v souvislosti se stresem

nelogický, ale mohl by hrát úlohu ve vzájemném působení srdečního sympatiku a parasympatiku formou zesíleného antagonismu. Zvýšená tvorba ACh tedy může napomoci k vzestupu srdeční frekvence.

Při srovnání exprese M_2 receptoru mezi jedinci kmenů SD a LE jsme zaznamenali statisticky významné rozdíly u obou síní. Významně vyšší expresi tohoto genu u potkanů kmene LE v pravých síních by bylo možné vysvětlit prostou reakcí buněk na nedostatek mediátoru, protože u potkanů kmene LE je zde v porovnání s potkany SD signifikantně nižší exprese genu pro ChAT. Opodstatněnost této spekulace by bylo možné potvrdit stanovením množství proteinu ChAT v pravé síni potkanů kmene LE. V literatuře však dosud tyto informace dostupné nejsou.

Aplikace stresu měla u jedinců obou kmenů rozdílný vliv na expresi genu pro M_2 receptory. Zatímco u potkanů kmene LE způsobila pokles exprese sledovaného genu v levých síních, u jedinců kmene SD byl zaznamenán pokles pouze v pravé síni skupiny IS3. Odlišný efekt IS3 na expresi mRNA pro M_2 receptory u kmenů LE a SD lze přisoudit genetické odlišnosti obou kmenů, které se liší aktivitou HPA osy. Důvod pro silnější inhibiční působení IS3 než ICS3 není znám a vyžádá si další studie.

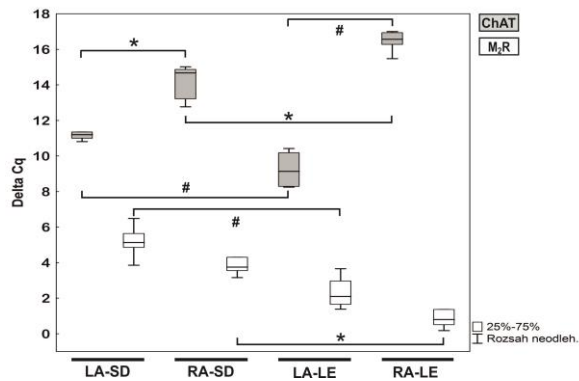
Závěrem lze říci, že stres ovlivňuje i parasympatickou složku srdeční inervace, přičemž významnější změny jsme zaznamenali v srdeční síni pravé. Expese obou sledovaných genů se v srdečních síních potkanů kmene LE významně liší od potkanů kmene SD, a to za klidového stavu i po aplikaci stresu. Podstata tohoto rozdílu není dosud dostatečně objasněna.

	skupina	srdeční oddíl	RE	SEM	p
SD	kontroly	levá síň	1,00	0,17	-
		pravá síň	1,00	0,37	-
	IS3	levá síň	0,83	0,21	0,31
		pravá síň	2,11	0,73	0,48
	ICS3	levá síň	3,01	0,80	0,39
		pravá síň	9,99	1,82	0,004
LE	kontroly	levá síň	1,00	0,41	-
		pravá síň	1,00	0,20	-
	IS3	levá síň	0,81	0,12	0,76
		pravá síň	0,93	0,69	0,25
	ICS3	levá síň	3,42	2,44	1,00
		pravá síň	5,96	2,06	0,09

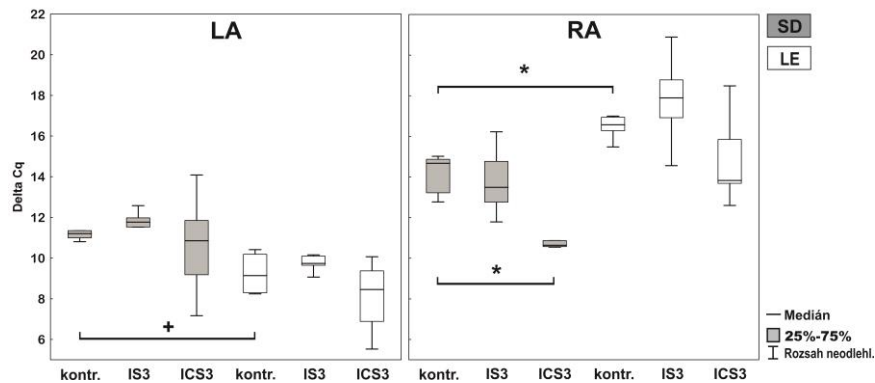
Tab. 3. Expres ChAT v obou srdečních síních u kontrol a potkanů po aplikaci imobilizačního (IS3) a kombinovaného (ICS3) stresu. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) mRNA pro ChAT vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. RE u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty ΔC_q po stresu byly vztaženy k této hodnotě. Signifikance pro $p < 0,05$ je vyjádřena v posledním sloupci tučně.

	skupina	srdeční oddíl	RE	SEM	p
SD	kontroly	levá síň	1,00	0,29	-
		pravá síň	1,00	0,24	-
	IS3	levá síň	1,68	0,33	0,31
		pravá síň	0,37	0,10	0,04
	ICS3	levá síň	1,25	0,38	0,82
		pravá síň	0,60	0,20	0,13
LE	kontroly	levá síň	1,00	0,31	-
		pravá síň	1,00	0,23	-
	IS3	levá síň	0,44	0,17	0,04
		pravá síň	1,10	0,22	0,70
	ICS3	levá síň	0,63	0,26	0,41
		pravá síň	0,85	0,17	0,31

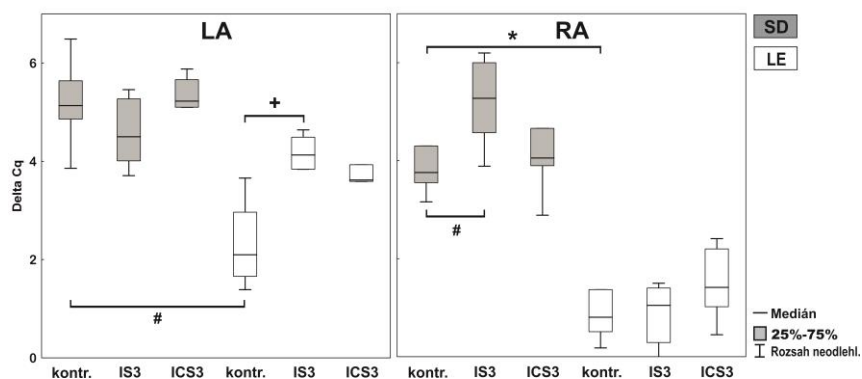
Tab. 4. Expres M_2 receptorů v obou srdečních síních u kontrol a potkanů po aplikaci imobilizačního (IS3) a kombinovaného (ICS3) stresu. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) mRNA pro M_2 receptory vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. RE u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty ΔC_q po stresu byly vztaženy k této hodnotě. Signifikance pro $p < 0,05$ je vyjádřena v posledním sloupci tučně.



Obr. 4.2.2.1: RT-qPCR, srdce kontrolních zvířat. Kvantitativní stanovení mRNA pro ChAT a M₂ receptory (M₂R) v srdečních síních intaktních jedinců kmene SD a LE (LA = levá síň, RA = pravá síň). Expze sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔC_q (vztaženo k expresi β -aktinu) pro porovnání úrovně expze v srdečních síních (nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň expze). Expze genu pro ChAT je v levé síni statisticky významně vyšší než v síni pravé u jedinců obou kmenů. U jedinců kmene LE je expze genu pro ChAT vyšší v levé síni a nižší v pravé síni v porovnání s potkany kmene SD. Expze genu pro M₂R je statisticky významně vyšší u jedinců kmene LE v porovnání s potkany kmene SD. # $p < 0,01$; * $p < 0,005$



Obr. 4.2.2.2: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů stresu (IS - imobilizační stres, ICS – imobilizační stres kombinovaný s chladovým stresem) na expresi ChAT v levých (LA) a pravých (RA) srdečních síních kontrolních a stresovaných jedinců kmenů SD a LE. Expze sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔC_q (vztaženo k expresi β -aktinu) pro porovnání úrovně expze v jednotlivých experimentálních skupinách (nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň expze). Expze u kontrolních jedinců obou kmenů se signifikantně odlišuje. Aplikace stresu nevyvolala v levé síni změny v expresi genu pro ChAT v žádné z experimentálních skupin, zatímco v pravé síni vyvolala vzestup expze sledovaného genu v experimentální skupině ICS3 u jedinců kmene SD. * $p < 0,05$; * $p < 0,005$



Obr. 4.2.2.3: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů stresu (IS - imobilizační stres, ICS – imobilizační stres kombinovaný s chladovým stresem) na expresi M_2 receptorů v pravých srdečních síních (RA) kontrolních potkanů a stresovaných jedinců kmenů SD a LE. Expresie sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔC_q (vztaheno k expresi β -aktinu), kdy nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň exprese. Expresie u kontrolních jedinců obou kmenů se významně odlišuje. Aplikace psychického stresu (IS3) vyvolala v levé síni pokles exprese sledovaného genu u jedinců kmene LE, zatímco v pravé síni je tento pokles patrný u jedinců kmene SD. * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; * $p < 0,005$

5.2.3 Vliv dvou typů stresu na expresi a distribuci oxytocinového receptoru v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy

Úvod

Oxytocin (OT) je neurohormon, který se zároveň uplatňuje i jako neuromediátor a neuromodulátor. Úloha OT v nervovém přenosu byla zjištěna a popsána mnohem později než jeho hormonální působení (Gutkowska et al., 2000).

Zdrojem OT v organismu není výhradně CNS, ale jeho produkce byla zdokumentována i v celé řadě periferních tkání (Jankowski et al., 2000; Monstein et al., 2004). V srdci vykazuje negativně inotropní a chronotropní účinky (Jankowski et al., 1998; Mukaddam-Daher et al., 2001) a ovlivňuje uvolňování atriálního natriuretického peptidu (Gutkowska et al., 1997; Gutkowska a Jankowski, 2008). Kromě toho se předpokládá, že OT se může v srdci uplatňovat i jako regulátor za stresové situace (Petersson a Uvnas-Moberg, 2007). Navíc se pravděpodobně účastní i v průběhu srdečního vývoje (Jankowski et al., 2004). Dosud však nebyl dostatečně popsán mechanismus jeho účinku. Působení OT na cílové tkáně je zprostředkováno specifickým oxytocinovým receptorem (OTR). Gutkowska se spolupracovníky (Gutkowska et al., 2000) popsala přítomnost těchto receptorů v kardiomyocytech srdečních síní.

Cílem naší práce bylo stanovit klidovou expresi, prokázat přítomnost proteinu OTR a jeho přesnou lokalizaci v srdci potkanů dvou kmenů: kontrolního SD a kmene LE charakterizovaného sníženou reaktivitou HPA osy na stres. Následně jsme studovali vliv dvou typů akutního stresu, psychického a kombinovaného zahrnujícího psychickou a fyzickou složku, na expresi mRNA pro OTR a distribuci OTR proteinu v jednotlivých srdečních oddílech.

Materiál a metody

Aplikaci stresu, přípravu vzorků, izolaci RNA a proteinu, Western blot, nepřímou imunofluorescenci, reverzní transkripci i qPCR jsme prováděli dle postupu popsaného v kapitole 3.

Kvantitativní RT-PCR

Podmínky pro PCR amplifikační reakci byly následující: iniciální denaturace v jednom cyklu 15 min při 95 °C, následovalo 47 cyklů po 30 s při 95 °C, 25 s při 60 °C a 30 s při 72 °C. Byly použity primery (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ) specifické pro β -aktin a pro OTR (tab. 1).

Western blot

Pracovní postup byl popsán v kapitole 3. Pro detekci OTR proteinu jsme použili králičí primární protilátky proti OTR (1:15 000; Abcam, Cambridge, UK). Následně jsme primární protilátku označili pomocí kitu Vectastain ABC obsahujícího křenuvou peroxidázu a DAB s 3,3'-diaminobenzidinem (Vector Lab, CA, USA).

Nepřímá imunofluorescence

Pracovní postup byl popsán v kapitole 3. Značení OTR jsme provedli za pomoci králičí primární protilátky proti OTR (1:500; Abcam, Cambridge, UK). Zároveň s touto protilátkou jsme aplikovali myší protilátku proti neuronálnímu proteinu beta-tubulinu (1:500; Abcam). Jako sekundární protilátky jsme použili Ig proti králičí protilátce Alexa Fluor 488 (1:400; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a Ig proti myší protilátce Alexa Fluor 546 (1:600; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Výsledky

Přítomnost mRNA pro OTR jsme prokázali ve všech srdečních oddílech (levá a pravá síň, levá a pravá komora) potkanů obou kmenů. Expresi tohoto genu byla statisticky významně vyšší v síních ve srovnání s komorami. Mezi korespondujícími srdečními oddíly u potkanů kmene SD a kmene LE jsme žádný významný rozdíl nezaznamenali (obr. 4.2.3.1). Metodou Western blotu jsme prokázali přítomnost proteinu OTR ve všech čtyřech srdečních oddílech (obr. 4.2.3.2).

Nepřímou imunofluorescencí jsme OTR identifikovali v plazmatické membráně kardiomyocytů. Neurony OTR neobsahovaly (obr. 4.2.3.3). Rozdíl v intenzitě pozitivní imunoreakce v síních a komorách kontrolních a stresovaných jedinců jsme nezaznamenali. U stresovaných potkanů jsme však pozorovali změnu distribuce imunopozitivity v kardiomyocytech, kdy imunoreaktivita byla lokalizována zejména v oblasti buněčných jader (obr. 4.2.3.3).

Vliv obou sledovaných typů stresu na expresi mRNA pro OTR se lišil. Největší rozdíl exprese genu jsme u obou kmenů zaznamenali v pravé síni. Zatímco u kmene SD se relativní exprese genu zvýšila, u LE jsme zjistili signifikantní pokles. V myokardu komor jsme pozorovali silnější působení kombinovaného stresu, který v levé i pravé komoře obou kmenů vyvolal signifikantní vzestup exprese OTR. Levé síně jedinců obou kmenů reagovaly na stres poklesem exprese mRNA pro OTR (obr. 4.2.3.4 a 4.2.3.5).

Diskuse

Naše výsledky potvrzují přítomnost OTR v kardiomyocytech. Expresi mRNA pro OTR jsme zaznamenali ve všech srdečních oddílech, přičemž nejvyšší hodnoty exprese jsme naměřili v levé síni a nejnižší v levé komoře. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky experimentů Gutkowské a jejích spolupracovníků (Gutkowska a Jankowski, 2008).

OT se v organismu uplatňuje zejména při procesech spojených s reprodukcí. Kromě toho však bylo prokázáno, že se OT uvolňuje do oběhu v souvislosti s řadou typů akutního stresu, např. fyzickým, metabolickým či osmotickým (Hashiguchi et al., 1997; Engelmann et al., 1998; Nishioka et al., 1998), ale i se stresem chronickým (Ondrejčakova et al., 2010). Po aplikaci různých typů stresu byla naměřena zvýšená plazmatická hladina OT (Dubovický et al., 2007; Grippo et al., 2007), jejíž fyziologická funkce není zatím zcela objasněna. Je pravděpodobné, že se OT podílí na regulaci objemu tělesných tekutin při stresu (Hew-Butler et al., 2008) a kontrole krevního tlaku (Bakos et al., 2008). Výsledky nedávných studií naznačují kardioprotektivní efekt OT při ischemii (Ondrejčakova et al., 2009).

V srdci byl v souvislosti s vyšší fyzickou aktivitou popsán pokles koncentrace OT (Bakos et al., 2007) a vzestup exprese OTR (Gutkowska et al., 2007). Naše výsledky ukazují, že psychický stres ovlivňuje expresi OTR odlišně v srdečních síních a komorách. V levé síni jsme zaznamenali pokles exprese na polovinu hodnoty kontrolních potkanů, zatímco v levé komoře se exprese sledovaného genu zvýšila na trojnásobek. Kombinovaný stres ovlivnil expresi OTR zejména v komorách, kde jsme naměřili několikanásobné zvýšení oproti hodnotám kontrolních jedinců. Tyto rozdíly v reakci jednotlivých srdečních oddílů na stres by mohly spočívat v rozdílné funkci, kterou zde OT plní. Bylo zjištěno, že chronická aplikace OT vede ke zvýšení hmotnostního poměru srdce/tělo, které by mohlo být způsobeno zvětšením kardiomyocytů (Ondrejčakova et al., 2010). Vzestup počtu OTR by tomuto efektu mohl napomáhat. Je třeba však mít na paměti, že zvýšená exprese mRNA pro OTR nemusí nutně znamenat vzestup počtu receptorů.

OT v podmínkách stresu nepůsobí pouze na periferní tkáň, ale ovlivňuje reaktivitu organismu na stres působením na HPA osu, jejíž aktivitu zvyšuje především stimulací uvolňování ACTH (Jezova et al., 1995; Ondrejčakova et al., 2010). Kromě toho stimuluje uvolňování KA (Mahata a Ghosh, 1991). K tomu, abychom zjistili, do jaké míry se aktivita HPA osy podílí na změnách exprese OTR

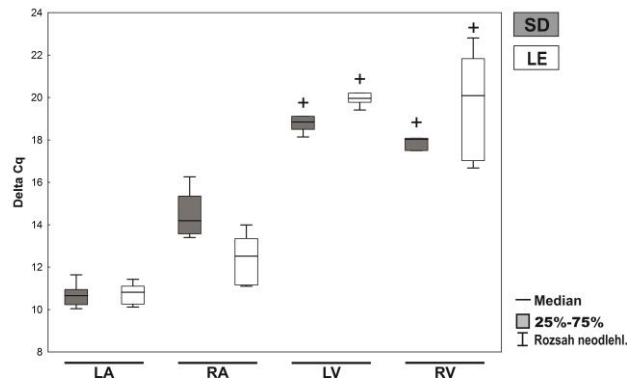
v srdci vyvolaných stresem, jsme porovnali výsledky u dvou kmenů potkanů: kontrolního SD a LE, pro který je charakteristická nízká aktivita HPA osy.

Zjistili jsme, že komory i síně obou zkoumaných kmenů reagují na stres stejným způsobem s výjimkou pravé síně, a že významný rozdíl v reakci mezi těmito kmeny spočívá i v intenzitě odpovědi levé síně i komory.

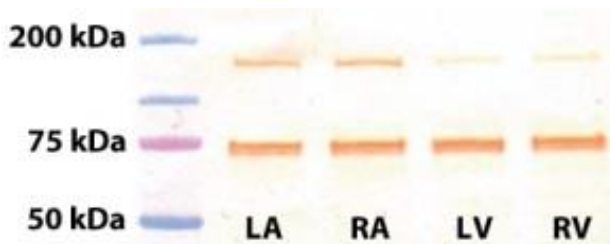
Psychogenní stres vyvolal u obou kmenů pokles exprese OTR v levé síni, u SD potkanů byl tento pokles signifikantní pouze v experimentální skupině IS3, zatímco u potkanů kmene LE byl tento pokles signifikantní v experimentálních skupinách IS1 i IS3. Pokles exprese OTR jsme u LE potkanů zaznamenali i v pravých síních obou zmíněných skupin, zatímco u SD potkanů jsme naopak pozorovali zvýšenou expresi OTR.

Kombinovaný stres vyvolal v komorách obou kmenů významný vzestup exprese sledovaného genu. U potkanů kmene LE bylo zvýšení výrazně vyšší v levých komorách, zatímco u jedinců kmene SD byl vzestup v obou komorách přibližně stejný. V levých srdečních síních jsme zaznamenali pokles exprese OTR, statisticky významný však byl pouze u LE potkanů experimentální skupiny ICS3. Tyto výsledky ukazují, že úroveň aktivity HPA osy při stresu ovlivňuje expresi OTR v srdci, protože jedinci s porušenou aktivitou HPA osy vykazují při stresu větší změny exprese OTR. Z toho lze usuzovat, že aktivita HPA osy při stresu vykazuje stabilizační účinek na expresi OTR receptoru v srdci.

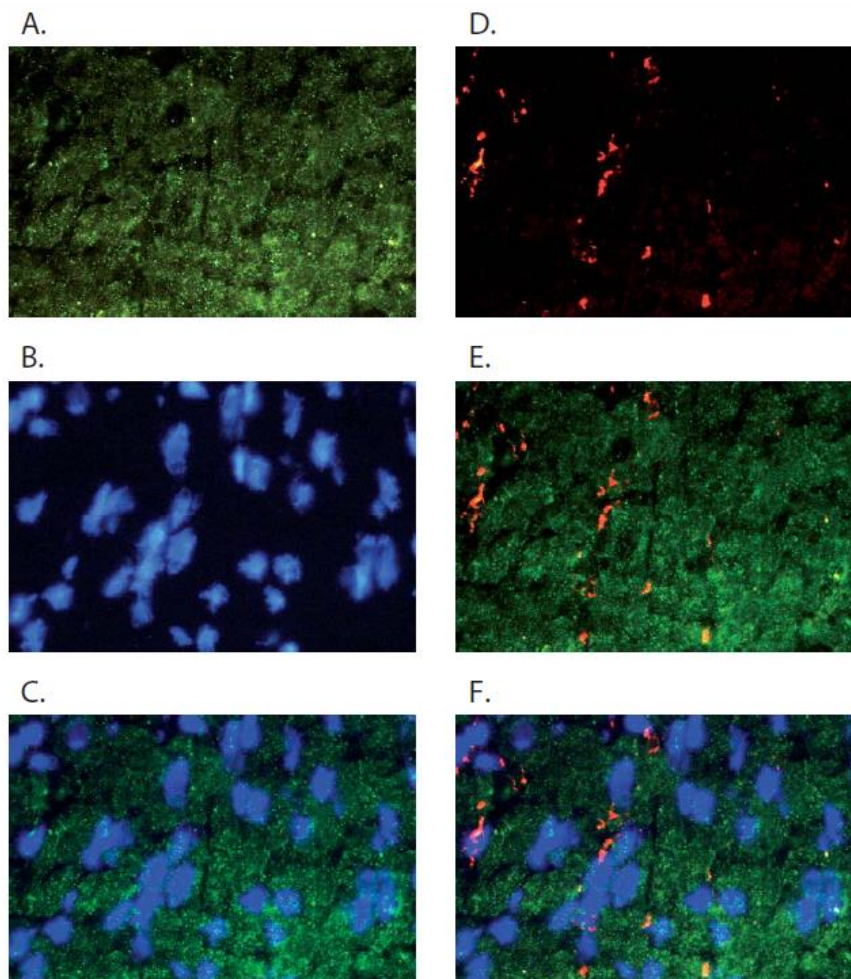
Imunohistochemické experimenty ukázali, že po aplikaci stresu dochází pravděpodobně k redistribuci OTR v rámci kardiomyocytu. Klidová lokalizace OTR je především v buněčné membráně, což je typické i pro ostatní receptory patřící do skupiny receptorů vážících se ke G-proteinu. U stresovaných jedinců jsme však zaznamenali v levé komoře agregaci OTR imunoreaktivity v oblasti buněčného jádra. V poslední době bylo zjištěno, že některé receptory spřažené s G-proteinem mohou být po aktivaci translokovány do membrány buněčného jádra (Gobeil et al., 2006; Tadevosyan et al., 2012). Podobným způsobem se chová i OTR, který je v některých typech buněk přítomen v jádře i bez kontaktu buňky s OT, ale u jiných typů buněk se do jádra dostává až po styku buňky s OT (Kinsey et al., 2007). Tyto receptory se mohou uplatňovat při regulaci některých signálních drah, což by mohlo vést ke vzniku srdečních poruch. Jejich konkrétní úloha ve fyziologických i patologických procesech však musí být ještě objasněna.



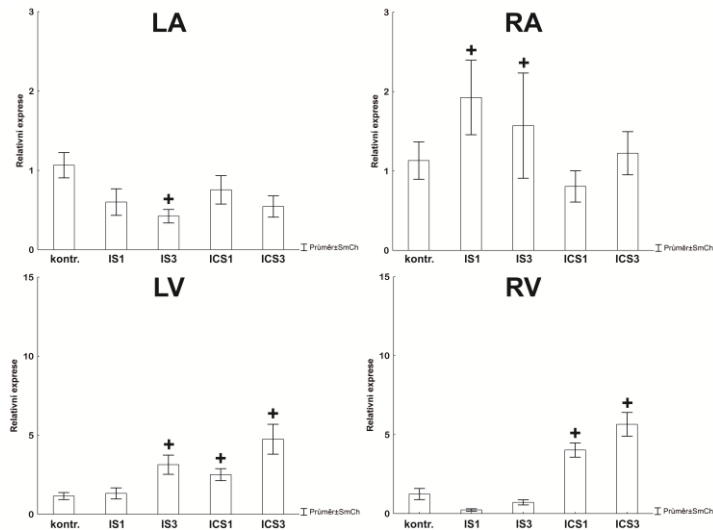
Obr. 4.2.3.1.: RT-qPCR, srdce kontrolních zvířat. Kvantitativní stanovení mRNA pro OTR v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) u intaktních zvířat kmene SD a LE. Expresе sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔCq (vztaženo k expresi β -aktinu), kdy nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň exprese. Signifikanční rozdíl jsme zaznamenali mezi síněmi a komorami u obou kmenů. * $p < 0,05$



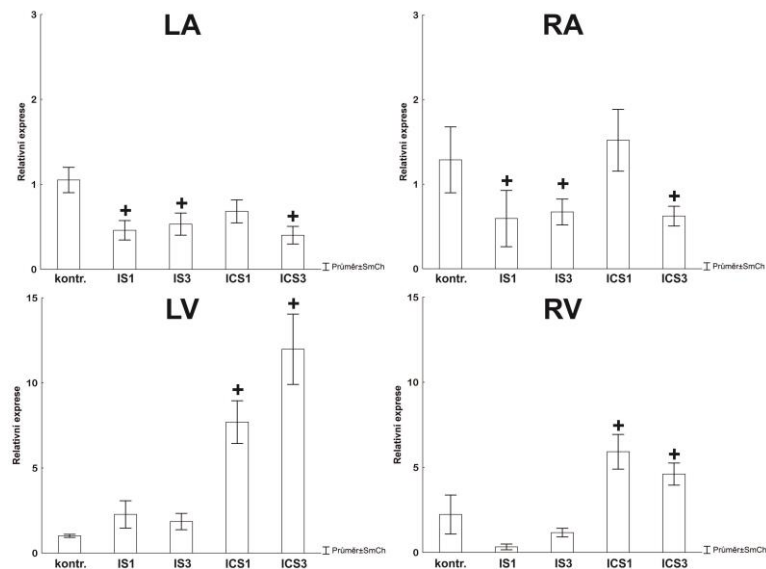
Obr. 4.2.3.2.: Western blot. Průkaz přítomnosti OTR v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora).



Obr. 4.2.3.3.: Nepřímá imunofluorescence. Imunohistochemický průkaz lokalizace OTR v levé srdeční síni potkana. A) Specifické značení OTR; B) značení buněčných jader; C) OTR a buněčná jádra; D) specifické značení neuronů; E) OTR a neuronální marker; F) OTR, buněčná jádra a neuronální marker.



Obr. 4.2.3.4.: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů stresu na expresi OTR v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) potkanů kmene SD. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. RE u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty Δ Cq u stresovaných potkanů byly vztaženy k této hodnotě. IS způsobil pokles exprese v levé síni, ale vzestup exprese v pravé síni a levé komoře. Kombinovaný stres vyvolal v obou komorách signifikantní vzestup exprese OTR. $^+p<0,05$



Obr. 4.2.3.5.: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů stresu na expresi OTR v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) potkanů kmene LE. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. RE u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty Δ Cq u stresovaných potkanů byly vztaženy k této hodnotě. Imobilizační stres způsobil pokles exprese v levé i pravé síni. Kombinovaný stres vyvolal v obou síních statisticky významný pokles a v komorách signifikantní vzestup exprese OTR. $^+p<0,05$

5.2.4 Vliv dvou typů stresu na expresi ANP v srdci potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy

Úvod

Srdeční atriální natriuretický peptid (ANP) se podílí na regulaci krevního tlaku a homeostáze tělesných tekutin (Imura et al., 1992). V kardiomyocytech srdečních síní je syntetizován atriální natriuretický peptid a mozkový natriuretický peptid, které jsou uvolňovány při zvýšeném protažení stěny síní (Edwards et al., 1988). Další ze skupiny těchto peptidů je natriuretický peptid typu C, který je tvořen endotelovými buňkami cév. Atriální i mozkový natriuretický peptid jsou tvořeny rovněž v srdečních komorách, avšak v mnohem menším množství než v síních (McGrath et al., 2005). Účinky obou těchto peptidů jsou podobné, zvyšují diurézu, natriurézu a vyvolávají vazodilataci (Vesely et al., 2001).

Stress vede k rychlé aktivaci HPA osy a sympatoadrenálního systému s následkem zvýšené resorpce vody a solí, který může způsobit oběhové přetížení. Exprese, syntéza i sekrece ANP se v srdci zvyšuje zejména za situace chronického dynamického přetížení, přičemž stimulační sekrece jsou mechanické, ale i neuroendokrinní impulzy (de Bold et al., 1996). U kardiovaskulárních poruch, na jejichž vzniku se podílel stres, byly zaznamenány zvýšené plazmatické hladiny natriuretických peptidů (Hayek a Nemer, 2011). Veselý a spolupracovníci (Vesely et al., 2001) prokázali, že natriuretické peptidy specificky inhibují HPA systém u potkana i u člověka.

Dosud však není známo, zda akutní stres ovlivňuje expresi genu pro ANP v srdci a jakou roli v této expresi hraje aktivita HPA osy. Cílem našich experimentů bylo potvrdit přítomnost ANP v srdci potkana, stanovit kvantitativní expresi jeho genu v jednotlivých srdečních oddílech, zjistit, zdali exprese mRNA proANP je ovlivněna působením různých typů akutního stresu a zda a jaký podíl na expresi tohoto genu má aktivace HPA osy.

Materiál a metody

Aplikaci stresu, přípravu vzorků, izolaci RNA, reverzní transkripci i qPCR jsme prováděli dle postupu popsaneho v kapitole 3.

Kvantitativní RT-PCR

Podmínky pro PCR amplifikační reakci byly následující: iniciální denaturace v jednom cyklu 15 min při 95 °C, následovalo 47 cyklů po 30 s při 95 °C, 25 s při

58 °C a 30 s při 72 °C. Byly použity primery (Generi Biotech, Hradec Králové, CZ) specifické pro β -aktin a pro ANP (tab. 1).

Nepřímá imunofluorescence

Pracovní postup byl popsán v kapitole 3. Značení ANP jsme provedli za pomoci králičí primární protilátky proti ANP (1:100; Millipore, Temecula, CA, USA). Zároveň s touto protilátkou jsme aplikovali myší protilátku proti neuronálnímu proteinu PGP (1:100; UltraClone Limited, UK), který se používá jako marker pro neurony. Jako sekundární protilátky jsme použili Ig proti králičí primární protilátce s navázaným barvivem Texas Red (1:200; Calbiochem, Darmstadt, BRD) a Ig proti myší primární protilátce s navázaným biotinem (1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) po čemž následovala inkubace se streptavidinem označeným FITC (1:200; Calbiochem, San Diego, CA).

Výsledky

Přítomnost imunoreakce s protilátkou proti ANP jsme sledovali ve všech srdečních oddílech kontrolních i stresovaných jedinců. V obou srdečních síních jedinců obou kmenů jsme zaznamenali pozitivní imunoreakci na přítomnost ANP lokalizovanou v cytoplazmě kardiomyocytů, zatímco v komorách jsme přítomnost specifické imunoreakce neprokázali. Pomocí metody dvojího značení jsme zjistili, že ANP není přítomen v tělech intrakardiálních neuronů ani v nervových vláknech nacházejících se v oblasti srdečních ganglií či v blízkosti kardiomyocytů. Třebaže tato metoda je především kvalitativní, v některých případech je možné zaznamenat kvantitativní rozdíly, pokud je obsah sledovaného proteinu u porovnávaných vzorků významně odlišný. V tomto případě jsme však žádné viditelné kvantitativní rozdíly mezi kontrolními a stresovanými jedinci nezaznamenali (obr. 4.2.4.1).

Expresi genu pro proANP jsme zaznamenali ve všech čtyřech srdečních oddílech kontrolních jedinců i jedinců po aplikaci stresu obou testovaných kmenů. Zjistili jsme, že úroveň exprese sledovaného genu není v jednotlivých srdečních oddílech stejná, a dále, že existuje rozdíl v expresi proANP i mezi jedinci kmene SD a kmene LE (obr. 4.2.4.2). Pro přehlednější vyjádření rozdílů jsme zvolili úroveň exprese proANP v LV jako referenční (tedy rovnu jedné) a vůči ní jsme vyjádřili expresi v ostatních srdečních oddílech. U kontrolních jedinců kmene SD byla exprese následující: LA ($F = 138,8$; $p > 0,005$) > RA ($F = 39,2$; $p > 0,005$) > RV ($F = 10,1$; $p > 0,005$) > LV, zatímco u potkanů kmene LE takováto: LA ($F = 465,9$; $p > 0,005$) > RA ($F = 267,6$; $p > 0,005$) > LV ($F = 1$) > RV ($F = 0,14$; $p > 0,01$). Při porovnání

exprese sledovaného genu ve stejných oddílech obou kmenů jsme zjistili, že s výjimkou RV je exprese vyšší u potkanů LE než potkanů SD, přičemž rozdíl mezi síněmi byl výraznější než rozdíl mezi komorami (obr. 4.2.4.3).

Dále jsme sledovali vliv dvou typů stresu na expresi proANP v jednotlivých srdečních oddílech. Psychogenní stres vyvolal vzestup exprese sledovaného genu v obou síních a levé komoře potkanů kmene SD, který jsme zaznamenali 1 h (IS1) i 3 h (IS3) po aplikaci stresu (obr. 4.2.4.4). Indukce kombinovaného stresu (psychogenní a fyzická složka účinku) vedla rovněž k vzestupu exprese proANP, a to v levé síni a levé komoře v experimentální skupině ICS3 (obr. 4.2.4.4). Reakce potkanů kmene LE na aplikovaný stres se odlišovala od reakce potkanů kmene SD. Přechodný pokles exprese sledovaného genu jsme zaznamenali v pravých síních již 1 h po aplikaci obou typů stresu (IS1 a ICS1; obr. 4.2.4.5).

Diskuse

Naše výsledky potvrdily přítomnost ANP v kardiomyocytech srdečních síní. Gen proANP kóduje syntézu prohormonu o délce 126 AMK. Tento prohormon zahrnuje několik peptidů: (a) prvních 30 AMK tvoří tzv. LANH, z angl. „*Long-Acting Natriuretic Hormone*“, (b) následující AMK (31–67) tvoří peptid s vazodilatačním účinkem, (c) AMK 79–98 tvoří kaliuretický peptid a (d) AMK 99–126 tvoří vlastní ANP.

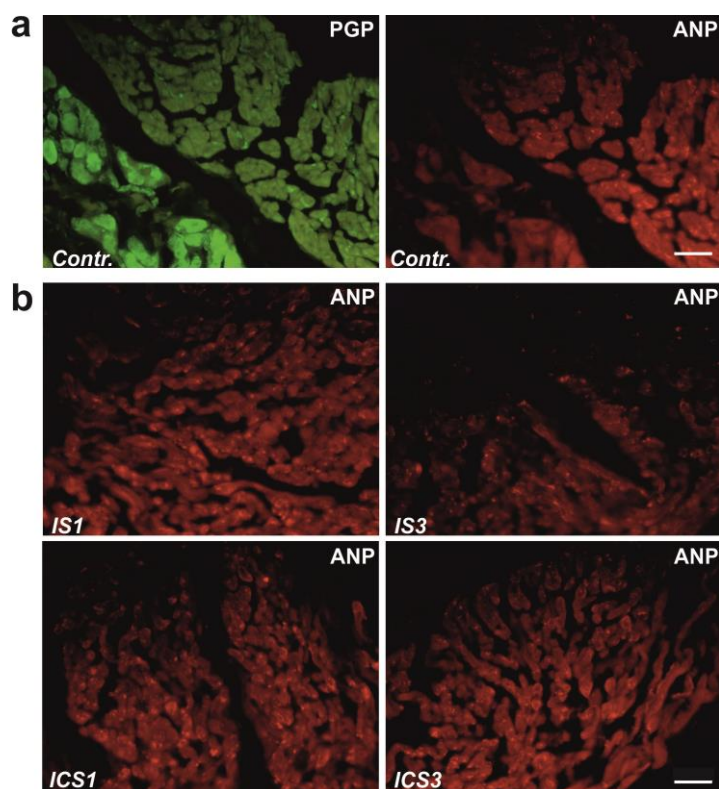
Naše zjištění ukazující na významně vyšší expresi genu proANP v srdečních síních než komorách jsou v souladu s již dříve publikovanými výsledky (Ogawa et al., 1995; Ruskoaho, 2003).

Při stresu dochází k aktivaci HPA osy, což vede k uvolnění antidiuretického hormonu a kortikoliberinu do hypofyzárního portálního systému a následnému zvýšení sekrece ACTH. Výsledkem je zvýšená hladina kortikoidů v plazmě (Franci et al., 1992). Kromě toho se v periferní krvi zvyšuje i hladina KA. Důsledkem této kaskády hormonálních změn je zadržování vody a soli v organismu spojené se zvýšeným objemem krve a krevním tlakem (Espiner, 1987; Nicholls et al., 1987). Psychogenní stres vyvolal významný vzestup exprese proANP genu v obou síních a levé komoře, zatímco kombinovaný stres působil stejným způsobem v levé síni a levé komoře. V roce 1996 De Bold se spolupracovníky popsal rozdílnou regulaci exprese genu proANP v síních a komorách: v síních je regulována prostřednictvím mechanických stimulů, zatímco v komorách závisí především na hormonální situaci v organismu (de Bold et al., 1996). Kromě toho zaznamenali, že i transkripční kontrola produkce ANP se v síních a komorách liší (Bianciotti a De Bold, 2000;

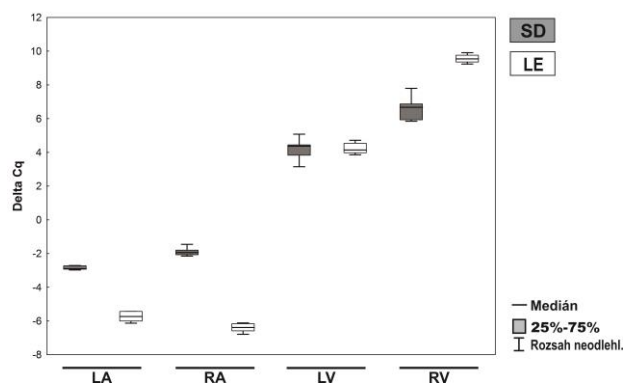
Bianciotti a de Bold, 2001). Ty mohou korespondovat s našimi výsledky, kdy nejvýraznější zvýšení exprese proANP bylo u potkanů kmene SD zaznamenáno v levé komoře při stresu. Jak již bylo výše zmíněno, v takové situaci dochází v organismu k významným hormonálním změnám. Vliv hormonů na proANP expresi byl popsán i po aplikaci mineralokortikoidů a glukokortikoidů, přičemž aplikace deoxykortikosteronu vyvolala u potkana vzestup plazmatické hladiny ANP a zvýšení exprese mRNA pro proANP v srdečních síních (Ballermann et al., 1986). Gardner se spolupracovníky (Gardner et al., 1988) zjistil, že aplikace dexamethazonu vedla u potkana k dvojnásobnému vzestupu exprese mRNA pro proANP v síních i komorách. Naproti tomu byla pozorována i negativní zpětná vazba mezi kortizolem a expresí genu proANP, neboť vzestup ANP snížil koncentraci cirkulujícího kortizolu (Vesely et al., 2001). Příčinou tohoto poklesu je pravděpodobně působení ANP na hladinu kortikoliberinu v krvi, kterou snižuje. Tím dochází k redukci množství uvolňovaného ACTH, který fyziologicky stimuluje produkci kortizolu (Vesely et al., 2001). Kromě toho bylo také zjištěno, že NA stimuluje transkripci a sekreci proANP (Vesely, 2002).

Aplikace stresu však u potkanů kmene LE expresi genu proANP v žádné části srdce nezvýšila. U těchto jedinců se sníženou aktivitou HPA osy jsme zaznamenali po působení psychogenního stresu dokonce pokles exprese sledovaného genu v pravé síni. Avšak vysoká klidová exprese mRNA pro ANP v obou síních těchto potkanů svědčí pro schopnost kardiomyocytů syntetizovat a eventuálně uvolňovat dostatečné množství ANP v případě potřeby.

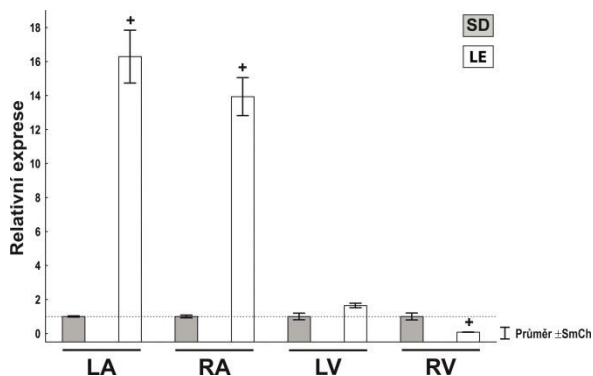
Závěrem lze konstatovat, že pravděpodobnou příčinou uvedených rozdílů exprese genu za různých podmínek je odlišné složení ECT působící na kardiomyocyty.



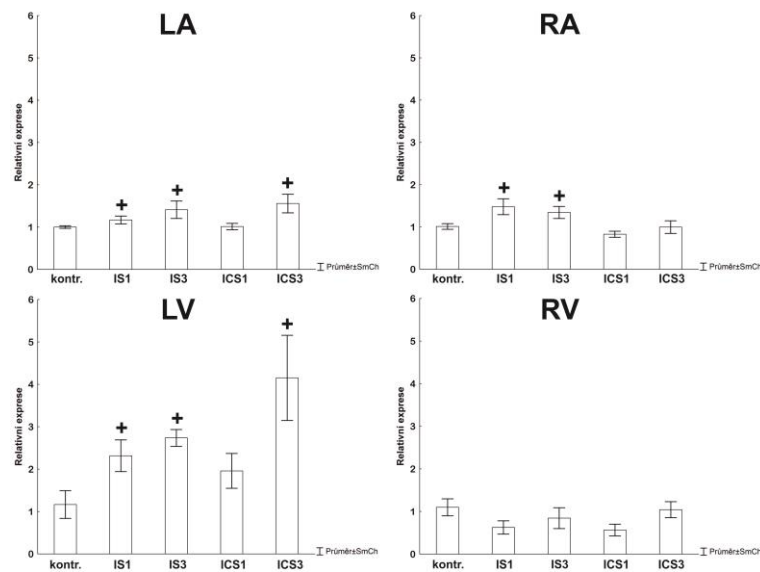
Obr. 4.2.4.1.: Nepřímá imunofluorescence. Metoda dvojího značení aplikovaná na levou síň kontrolního potkana kmene SD. Pomocí PGP jsme lokalizovali nervová vlákna a těla intrakardiálních neuronů. Lokalizace ANP je zřetelně mimo nervovou tkáň, nachází se v cytoplazmě kardiomyocytů. Měřítko odpovídá 100 μm . b: Lokalizace ANP v síních stresovaných potkanů kmene SD se viditelně neodlišuje od kontrolních jedinců. Nezaznamenali jsme žádné viditelné změny ani v intenzitě fluorescence v srdci potkana žádné experimentální skupiny. Měřítko odpovídá 100 μm .



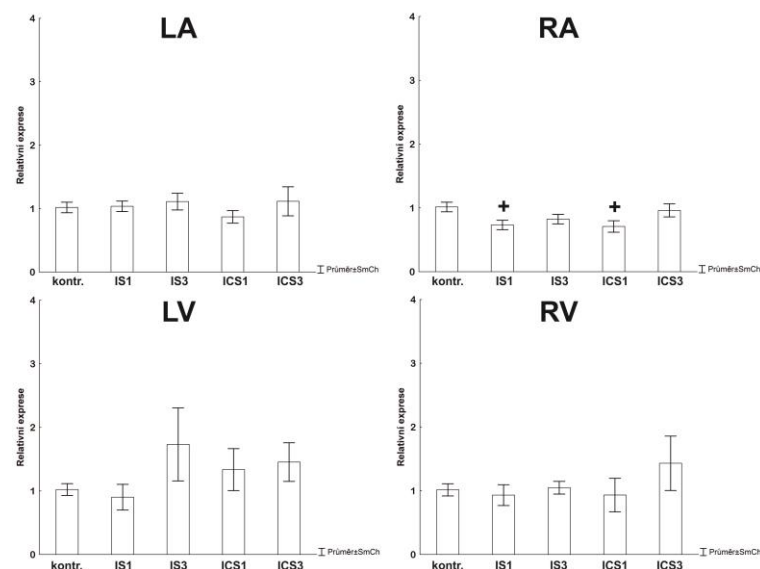
Obr. 4.2.4.2.: RT-qPCR, srdce kontrolních zvířat. Kvantitativní stanovení mRNA pro preproANP v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) u intaktních potkanů kmene SD a LE. Expresse sledovaných genů je vyjádřena v hodnotách ΔCq (vztaženo k expresi β -aktinu) pro porovnání úrovně exprese v jednotlivých srdečních oddílech (nízké hodnoty znamenají vysokou úroveň exprese). V síních je úroveň exprese významně vyšší než v komorách. Signifikantní rozdíl jsme zaznamenali mezi síněmi a pravými komorami u obou kmenů.



Obr. 4.2.4.3.: RT-qPCR, srdce kontrolních zvířat kmenů SD a LE. Porovnání exprese mRNA pro preproANP v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) u intaktních jedinců mezi kmeny SD a LE, přičemž úroveň exprese sledovaného genu v jednotlivých srdečních oddílech jedinců kmene SD byla přiřazena hodnota 1 a vůči ní porovnána exprese v odpovídajícím srdečním oddílu jedinců kmene LE. V obou síních a levé komoře je exprese vyšší u potkanů LE než potkanů SD, přičemž rozdíl mezi síněmi je výraznější než rozdíl mezi komorami. V pravé komoře je exprese nižší u potkanů LE než potkanů SD. * $p < 0,05$



Obr. 4.2.4.4.: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů stresu na expresi ANP v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) potkanů kmene SD. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. RE u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty Δ Cq u stresovaných potkanů byly vztaženy k této hodnotě. Vzestup exprese sledovaného genu je patrný v obou síních a levé komoře potkanů kmene SD 1 hodinu (IS1) i 3 hodiny (IS3) po aplikaci imobilizačního stresu a v levých síních a komorách 3 hodiny po aplikaci kombinovaného stresu (ICS3). * $p < 0,05$



Obr. 4.2.4.5.: RT-qPCR, vliv aplikace dvou typů stresu na expresi ANP v jednotlivých srdečních oddílech (LA = levá síň, RA = pravá síň, LV = levá komora, RV = pravá komora) potkanů kmene LE. Data jsou prezentována jako relativní exprese (RE) vztažená k β -aktinu jako referenčnímu genu. RE u kontrol byla přiřazena hodnota 1 a hodnoty Δ Cq u stresovaných potkanů byly vztaženy k této hodnotě. Na grafu je viditelný přechodný pokles exprese sledovaného genu v pravých síních experimentálních skupin IS1 a ICS1. * $p < 0,05$

6 Závěr

Pravidelná aktivita srdce, pokrývající stále se měnící požadavky celého organismu, musí být co nejspolehlivěji řízena a kontrolována. Regulační mechanismy srdeční činnosti jsou značně komplikované a dosud ne zcela objasněny. Cílem našich experimentů bylo přispět k objasnění role autonomní inervace srdce prostřednictvím klasických mediátorů, ale i neuropeptidů a jejich receptorových systémů.

Intrakardiální nervový systém je tvořen sympatickými a parasympatickými eferentními neurony, aferentními neurony a interneurony, které vytvářejí lokální okruhy. Informace přicházející do srdce prostřednictvím autonomního nervového systému spolu se signály z místních sensorických neuronů jsou tímto nervovým systémem zpracovány a výsledný signál pak ovlivňuje činnost srdce. Přenos informací mezi neurony tohoto nervového systému i mezi neurony a kardiomyocyty je zprostředkován řadou mediátorů zahrnujících jak klasické přenašeče NA a ACh, tak neuropeptidy a další látky (Kukanová a Mravec, 2006). Pro správné fungování tohoto systému je nezbytná nejen adekvátní tvorba a uvolňování všech zúčastněných přenašečů, ale i funkční receptory v cílových buňkách. Studium těchto signálních systémů nám umožňuje lépe pochopit jejich funkci i co změny, které doprovázejí některé patologické stavy zahrnujících i diabetes mellitus, znamenají.

Častou komplikací diabetu mellitu je kardiovaskulární autonomní neuropatie, která hraje významnou patofyziologickou roli v genezi a progresi ischemické choroby srdeční či srdečního selhání u obou typů diabetu. U diabetických pacientů je častým příznakem poškození intrakardiálního nervového systému asymptomatický průběh ischemie myokardu. Absence bolesti charakteristické pro akutní fázi srdeční ischemie by mohla být způsobena poškozením sensorické části srdeční inervace. Proto jsme se zaměřili na studium signálního systému CGRP, peptidu uvolňovaného v srdci sensorickými nervovými vlákny.

Naše výsledky naznačují, že porucha přenosu sensorické informace ze srdce není pravděpodobně způsobena poruchou funkce signálního systému CGRP, protože jsme neprokázali, že by chronický diabetes u potkana způsobil pokles exprese zúčastněných mRNA. Problém nedostatečného přenosu signálu nemusí být způsoben nedostatečnou tvorbou mediátoru či receptoru, nýbrž může být způsoben poruchou uvolňování mediátoru z nervových zakončení (Chottová Dvořáková et al., 2005). V této práci jsme naopak prokázali, že v rámci signálního systému AM/CGRP je v diabetickém srdci nejvíce změněna exprese RAMP3. Vzhledem k tomu, že RAMP3 je považován za kardioprotektivní faktor, protože zesiluje signál AM při

kardiovaskulárním stresu (Gibbons et al., 2007), je předpoklad, že protektivní úloha AM se může uplatnit rovněž v diabetickém srdci. K tomuto závěru nás vede skutečnost, že exprese genu pro AM zůstává v srdci zachována i při chronickém diabetu, zatímco exprese genu pro RAMP3 se zvyšuje.

Senzorická nervová vlákna v srdci kromě CGRP uvolňují také SP, jehož signální systém je v srdci zmapován pouze částečně. Zjistili jsme, že exprese genu NK1 receptoru, který zodpovídá za působení SP na cílové buňky, je v srdci asi stonásobně nižší než exprese genu receptoru pro CGRP. Z našich výsledků je dále patrné, že v síních se nachází významně vyšší množství mRNA i proteinu tohoto receptoru ve srovnání s komorami. Důvodem může být jeho přítomnost v některých tělech neuronů intrakardiálních ganglií, což naznačuje, že SP se může podílet na regulaci aktivity intrakardiálního nervového systému. V diabetickém srdci jsme prokázali pokles exprese genu pro tento receptor v pravé síni. Do jaké míry je tato změna zodpovědná za popsané poruchy přenosu informace o bolesti při srdeční ischemii u diabetického pacienta, bude předmětem našeho dalšího výzkumu.

Při studiu vlivu stresu na mechanismy signálního přenosu jsme využili dva kmeny potkanů: kontrolní SD a LE, kmen s geneticky podmíněnou sníženou reaktivitou HPA osy. Jedinci kmene LE jsou často využíváni při výzkumu vztahů mezi neuroendokrinní a imunitní odpovědí na podněty. Je o nich známo, že vykazují významně nižší aktivitu HPA osy při aplikaci různých typů stresu, což je pravděpodobně způsobeno nižší produkcí kortikoliberinu a následným uvolňováním menšího množství kortikosteronu než je běžné za analogických podmínek u jedinců kmene SD. Dosud však nebylo popsáno, zda a jaké jsou konkrétní rozdíly mezi jedinci těchto dvou kmenů v inervaci srdce. Z našich experimentů vyplývá, že úroveň exprese genů enzymů zodpovědných za syntézu klasických přenašečů NA a ACh se u jedinců obou kmenů významně liší. Vyšší expresi mRNA pro TH jsme zaznamenali u jedinců kmene LE v srdečních síních, kde jsou u potkana lokalizována těla neuronů intrakardiálního nervového systému, než v síních potkanů kmene SD. Totéž platí i pro cholinergní receptory typu M_2 . Výjimkou je exprese mRNA pro ChAT v pravých srdečních síních, která je vyšší u jedinců kmene SD než u potkanů LE. Dalším významným peptidem, který se tvoří a uvolňuje v srdci a uplatňuje se v regulaci kardiovaskulárního systému, je ANP. Rovněž jeho exprese je u jedinců kmene LE významně vyšší než u potkanů kmene SD.

Stres je důležitý stav organismu, jenž je navozen podněty, které se označují jako stresory. Důsledkem působení těchto stresorů je adaptační odpověď organismu, jejímž cílem je zachování homeostázy a zabránění poškození či smrti organismu. Při stresu dochází k aktivaci HPA osy, k aktivaci sympatoadrenálního systému a také k aktivaci mozkového emočního systému (Koob a Nestler, 1997). Rozsáhlé výzkumy

prokázaly, že odlišné stresory vyvolávají specifickou odpověď organismu, výsledný efekt je rovněž závislý na stavu organismu, a to především na aktivitě HPA osy (Pacák et al., 1995). Účinky stresu na myokard byly zatím prozkoumány jen částečně. Pozornost byla věnována především účasti sympatiku (Aisa et al., 2009, Brain 2010), zatímco případná aktivita parasympatiku za těchto stavů byla dosud opomíjena. Z našich pozorování vyplývá, že stres ovlivňuje jak sympatickou, tak parasympatickou složku srdeční inervace, přičemž významnější změny jsme zaznamenali v pravé srdeční síni než v síni levé. U jedinců kmene SD se v souvislosti s akutním stresem významně zvýšila exprese genů enzymů, které se účastní syntézy TH a ACh, čímž se úroveň exprese těchto genů přiblížila úrovni klidové exprese u jedinců kmene LE. V pravých síních potkanů SD se exprese mRNA pro ChAT významně zvýšila, čímž se ještě prohloubil rozdíl mezi jedinci obou kmenů, neboť u potkanů kmene LE jsme signifikantní vzestup po aplikaci stresu nezaznamenali.

Významný rozdíl mezi jedinci obou kmenů v reakci na akutní stres jsme zaznamenali při studiu exprese OTR v pravé srdeční síni. Zatímco u kmene SD se relativní exprese genu zvýšila, u LE jsme zjistili signifikantní pokles. Analogické výsledky jsme v pravé síni zaznamenali i při stanovení exprese mRNA pro ANP. Tyto výsledky ukazují, že úroveň aktivity HPA osy při stresu ovlivňuje expresi zkoumaných genů v srdci. Zajímavé je zjištění, že klidové exprese těchto genů jsou ve většině případů u jedinců se sníženou aktivitou HPA osy vyšší. Příčina tohoto jevu není dosud objasněna, proto bychom se tomu chtěli v následujících letech věnovat.

V navazující práci bychom chtěli pokračovat ve studiu ovlivnění srdeční inervace stresem a jinými patologickými stavy, např. jaterního selhání. Náš zájem je stále směřován i do oblasti diabetu mellitu. Rádi bychom k výzkumné činnosti použily laboratorní kmen potkanů ZDF (Zucker Diabetic Fatty).

Diabetes mellitus a stres, samostatně i společně, představují závažné faktory podílející se na vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Jednou z významných, ale někdy opomíjených cest řešení je předcházení jejich vzniku. Prevencí DM i stresu je dodržování zásad zdravého životního stylu, pravidelná sportovní aktivita spojená s odpočinkem, omezení konzumace alkoholu, nekuřáctví a udržování kvalitních sociálních vazeb s rodinou a přáteli.

7 Literatura

- Abramochkin, D.V., M.A. Suris, G.S. Sukhova, and L.V. Rozenshtraukh. 2008. Acetylcholine-induced suppression of electric activity of working myocardium of the cod atrium. *Dokl Biol Sci.* 419:73-76.
- Abramochkin, D.V., S.V. Tapilina, and G.S. Sukhova. 2013. Effect of selective stimulation of muscarinic M3 cholinergic receptors on electrical and contractile activity of rat ventricular myocardium. *Bull Exp Biol Med.* 154:295-298.
- Adeghate, E. 2004. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol Cell Biochem.* 261:187-191.
- Adler, A.I., E.J. Boyko, J.H. Ahroni, V. Stensel, R.C. Forsberg, and D.G. Smith. 1997. Risk factors for diabetic peripheral sensory neuropathy. Results of the Seattle Prospective Diabetic Foot Study. *Diabetes Care.* 20:1162-1167.
- Aggarwal, A., M.D. Esler, F. Socratous, and D.M. Kaye. 2001. Evidence for functional presynaptic alpha-2 adrenoceptors and their down-regulation in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 37:1246-1251.
- Ahlquist, R.P. 1948. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 153:586-600.
- Aisa, B., Elizalde, N., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., Ramírez, M.J. 2009. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus.* 19(12):1222-31.
- Alevizaki, M., A. Shiraishi, F.V. Rassool, G.J. Ferrier, I. MacIntyre, and S. Legon. 1986. The calcitonin-like sequence of the beta CGRP gene. *FEBS Lett.* 206:47-52.
- Alm, P., J. Alumets, R. Håkanson, O. Owman, N.O. Sjöberg, F. Sundler, and B. Wallis. 1980. Origin and distribution of VIP (vasoactive intestinal polypeptide)-nerves in the genito-urinary tract. *Cell Tissue Res.* 205:337-347.
- Amara, S.G., J.L. Arriza, S.E. Leff, L.W. Swanson, R.M. Evans, and M.G. Rosenfeld. 1985. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science.* 229:1094-1097.
- Amara, S.G., V. Jonas, M.G. Rosenfeld, E.S. Ong, and R.M. Evans. 1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature.* 298:240-244.
- Amenta, F., L. Coppola, P. Gallo, F. Ferrante, A. Forlani, A. Monopoli, and P. Napoleone. 1991. Autoradiographic localization of beta-adrenergic receptors in human large coronary arteries. *Circ Res.* 68:1591-1599.
- Anderson, D.C., S.C. King, and S.M. Parsons. 1983. Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles. *Mol Pharmacol.* 24:48-54.
- Aneja, A., W.H. Tang, S. Bansilal, M.J. Garcia, and M.E. Farkouh. 2008. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. *Am J Med.* 121:748-757.
- Armour, J.A. 1999. Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. *Cardiovasc Res.* 41:41-54.
- Armour, J.A. 2004. Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287:R262-271.
- Armour, J.A., D.A. Murphy, B.X. Yuan, S. Macdonald, and D.A. Hopkins. 1997. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec.* 247:289-298.
- Aronson, D. 2008. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol.* 45:1-16.
- Arora, R.C., G.M. Hirsch, K. Johnson Hirsch, C. Hancock Friesen, and J.A. Armour. 2001. Function of human intrinsic cardiac neurons in situ. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280:R1736-1740.

- Arstall, M.A., Y.Z. Zhao, L. Hornberger, S.P. Kennedy, R.A. Buchholz, R. Osathanondh, and R.A. Kelly. 1998. Human ventricular myocytes in vitro exhibit both early and delayed preconditioning responses to simulated ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 30:1019-1025.
- Atkinson, R. 2003. Psychologie. Portál. 500-501.
- Axford, M. 1928. Some Observations on the Cervical Sympathetic in Man. *J Anat.* 62:301-318.
- Baker, J.G., I.P. Hall, and S.J. Hill. 2003. Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol.* 64:1357-1369.
- Bakos, J., P. Bobryshev, A. Tillinger, R. Kvetnansky, and D. Jezova. 2008. Phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression in the heart and blood pressure response to oxytocin treatment in rats exposed to voluntary wheel running. *Ann N Y Acad Sci.* 1148:302-307.
- Bakos, J., N. Hlavacova, A. Makatsori, K. Tybitanclova, S. Zorad, H. Hinghofer-Szalkay, B.B. Johansson, and D. Jezova. 2007. Oxytocin levels in the posterior pituitary and in the heart are modified by voluntary wheel running. *Regul Pept.* 139:96-101.
- Ballermann, B.J., K.D. Bloch, J.G. Seidman, and B.M. Brenner. 1986. Atrial natriuretic peptide transcription, secretion, and glomerular receptor activity during mineralocorticoid escape in the rat. *J Clin Invest.* 78:840-843.
- Balogh, B., A. Szilágyi, K. Gyires, D.B. Bylund, and P. Mátyus. 2009. Molecular modelling of subtypes (alpha(2A), alpha(2B) and alpha(2C)) of alpha(2)-adrenoceptors: a comparative study. *Neurochem Int.* 55:355-361.
- Baptista, C.A., and M.L. Kirby. 1997. The cardiac ganglia: cellular and molecular aspects. *Kaohsiung J Med Sci.* 13:42-54.
- Baron, A., D. Monnier, A. Roatti, and A.J. Baertschi. 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activates K(ATP) current in rat atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H1058-1065.
- Barr, J.A., and J.A. Kirnan. 1993. Visceral innervation. In *The Human Nervous system – an anatomical view point.* Pippinctott Company. 364-376.
- Baumgart, D., M. Haude, G. Gorge, F. Liu, J. Ge, C. Grosse-Eggebrecht, R. Erbel, and G. Heusch. 1999. Augmented alpha-adrenergic constriction of atherosclerotic human coronary arteries. *Circulation.* 99:2090-2097.
- Bayorh, M.A., and G. Feuerstein. 1985. Bombesin and substance P modulate peripheral sympathetic and cardiovascular activity. *Peptides.* 6 Suppl 1:115-120.
- Bean, A.J., X. Zhang, and T. Hökfelt. 1994. Peptide secretion: what do we know? *FASEB J.* 8:630-638.
- Belai, A., and G. Burnstock. 1996. Acrylamide-induced neuropathic changes in rat enteric nerves: similarities with effects of streptozotocin-diabetes. *J Auton Nerv Syst.* 58:56-62.
- Bell, D., and B.J. McDermott. 1994. Secretin and vasoactive intestinal peptide are potent stimulants of cellular contraction and accumulation of cyclic AMP in rat ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 23:959-969.
- Bell, D., and B.J. McDermott. 2008. Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol.* 153 Suppl 1:S247-262.
- Benes, J., M. Novakova, J. Rotkova, V. Farar, R. Kvetnansky, V. Riljak, and J. Myslivecek. 2012. Beta3 adrenoceptors substitute the role of M(2) muscarinic receptor in coping with cold stress in the heart: evidence from M(2)KO mice. *Cell Mol Neurobiol.* 32:859-869.
- Bers, D.M. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415:198-205.
- Bianciotti, L.G., and A.J. De Bold. 2000. Effect of selective ET(A) receptor blockade on natriuretic peptide gene expression in DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279:H93-h101.
- Bianciotti, L.G., and A.J. de Bold. 2001. Modulation of cardiac natriuretic peptide gene expression following endothelin type A receptor blockade in renovascular hypertension. *Cardiovasc Res.* 49:808-816.

- Bonham, A.C., D.D. Gutterman, J.M. Arthur, M.L. Marcus, G.F. Gebhart, and M.J. Brody. 1987. Neurogenic regulation of coronary blood flow: evidence for a central nervous system pathway. *Circ Res.* 61:1142-46.
- Bossaller, C., K. Reither, C. Hehlert-Friedrich, W. Auch-Schwelk, K. Graf, M. Grafe, and E. Fleck. 1992. In vivo measurement of endothelium-dependent vasodilation with substance P in man. *Herz.* 17:284-290.
- Brain, S.D., and H. Cambridge. 1996. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol.* 27:607-611.
- Brain, S.D., and A.D. Grant. 2004. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 84:903-934.
- Bristow, M.R., R. Ginsburg, W. Minobe, R.S. Cubicciotti, W.S. Sageman, K. Lurie, M.E. Billingham, D.C. Harrison, and E.B. Stinson. 1982. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 307:205-211.
- Brodde, O.E. 1990. Physiology and pharmacology of cardiovascular catecholamine receptors: implications for treatment of chronic heart failure. *Am Heart J.* 120:1565-1572.
- Brodde, O.E., and K. Leineweber. 2004. Autonomic receptor systems in the failing and aging human heart: similarities and differences. *Eur J Pharmacol.* 500:167-176.
- Brum, J.M., A.A. Bove, Q. Sufan, W. Reilly, and V.L. Go. 1986. Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation: evidence for nonadrenergic, noncholinergic coronary regulation. *J Am Coll Cardiol.* 7:406-413.
- Buckingham, J.C. 1998. Stress and the hypothalamo-pituitary-immune axis. *Int J Tissue React.* 20:23-34.
- Burnstock, G. 1990. The fifth Heymans memorial lecture-Ghent, February 17, 1990. Co-transmission. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 304:7-33.
- Burnstock, G. 2002. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:364-373.
- Burnstock, G. 2009. Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 49:1-30.
- Burnstock, G., and A. Verkhratsky. 2010. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis.* 1:e9.
- Buu, N.T., R. Hui, and P. Falardeau. 1993. Norepinephrine in neonatal rat ventricular myocytes: association with the cell nucleus and binding to nuclear alpha 1- and beta-adrenergic receptors. *J Mol Cell Cardiol.* 25:1037-1046.
- Bylund, D.B., D.C. Eikenberg, J.P. Hieble, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman, P.B. Molinoff, R.R. Ruffolo, and U. Trendelenburg. 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46:121-136.
- Cameron, N.E., and M.A. Cotter. 1997. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes.* 46 Suppl 2:S31-37.
- Cannon, W.B. 1929. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev.* 9:399-431.
- Cannon, W.B. 1939. The wisdom of the body.
- Cannon, W.B., and K. Lissak. 1939. Evidence for adrenalin in adrenergic neurones. *Am J Physiol.* 125:765-777.
- Carter, M.S., and J.E. Krause. 1990. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci.* 10:2203-2214.
- Caterina, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, and D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389:816-824.
- Caulfield, M.P., and N.J. Birdsall. 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50:279-290.
- Cervero, F. 1994. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev.* 74:95-138.

- Champion, H.C., J.A. Santiago, E.A. Garrison, D.Y. Cheng, D.H. Coy, W.A. Murphy, R.J. Ascuitto, N.T. Ross-Ascuitto, D.B. McNamara, and P.J. Kadowitz. 1996. Analysis of cardiovascular responses to PACAP-27, PACAP-38, and vasoactive intestinal polypeptide. *Ann N Y Acad Sci.* 805:429-441; discussion 442.
- Chang, V.T., C. Yook, and P. Rameshwar. 2013. Synergism between fibronectin and transforming growth factor-beta1 in the production of substance P in monocytes of patients with myelofibrosis. *Leuk Lymphoma.* 54:631-638.
- Chatelain, P., P. Robberecht, M. Waelbroeck, P. De Neef, J.C. Camus, A.N. Huu, J. Roba, and J. Christophe. 1983. Topographical distribution of the secretin- and VIP-stimulated adenylate cyclase system in the heart of five animal species. *Pflugers Arch.* 397:100-105.
- Cheng, Z., T.L. Powley, J.S. Schwaber, and F.J. Doyle, 3rd. 1997. A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: chemoreceptors as well as baroreceptors. *J Auton Nerv Syst.* 67:1-14.
- Cheng, Z., H. Zhang, S.Z. Guo, R. Wurster, and D. Gozal. 2004. Differential control over postganglionic neurons in rat cardiac ganglia by NA and DmnX neurons: anatomical evidence. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286:R625-633.
- Chesley, A., M.S. Lundberg, T. Asai, R.P. Xiao, S. Ohtani, E.G. Lakatta, and M.T. Crow. 2000. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res.* 87:1172-1179.
- Chottová Dvoráková, M., J. Kunčová, U. Pfeil, G.P. McGregor, J. Svíglerová, J. Slavíková, and W. Kummer. 2005. Cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetes involves intra-axonal accumulation of calcitonin gene-related peptide and altered expression of its receptor in rats. *Neuroscience.* 134:51-58.
- Chottová Dvoráková, M., S. Wiegand, M. Pesta, J. Slavíková, V. Grau, J. Reischig, J. Kunčová, and W. Kummer. 2008. Expression of neuropeptide Y and its receptors Y1 and Y2 in the rat heart and its supplying autonomic and spinal sensory ganglia in experimentally induced diabetes. *Neuroscience.* 151:1016-1028.
- Chu, D.Q., M. Choy, P. Foster, T. Cao, and S.D. Brain. 2000. A comparative study of the ability of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin(13 - 52) to modulate microvascular but not thermal hyperalgesia responses. *Br J Pharmacol.* 130:1589-1596.
- Cinca, J., and A. Rodriguez-Sinovas. 2000. Cardiovascular reflex responses induced by epicardial chemoreceptor stimulation. *Cardiovasc Res.* 45:163-171.
- Clarke, J.G., G.J. Davies, R. Kerwin, D. Hackett, S. Larkin, D. Dawbarn, Y. Lee, S.R. Bloom, M. Yacoub, and A. Maseri. 1987. Coronary artery infusion of neuropeptide Y in patients with angina pectoris. *Lancet.* 1:1057-1059.
- Cohen-Solal, A., F. Beauvais, and D. Logeart. 2008. Heart failure and diabetes mellitus: epidemiology and management of an alarming association. *J Card Fail.* 14:615-625.
- Collier, B., and F.C. Macintosh. 1969. The source of choline for acetylcholine synthesis in a sympathetic ganglion. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 47:127-135.
- Communal, C., K. Singh, D.B. Sawyer, and W.S. Colucci. 1999. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation.* 100:2210-2212.
- Corradetti, R., R. Lindmar, and K. Löffelholz. 1983. Mobilization of cellular choline by stimulation of muscarine receptors in isolated chicken heart and rat cortex in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 226:826-832.
- Correa, M.V., M.O. da Costa Rocha, G.R. de Sousa, M. do Carmo Pereira Nunes, K.J. Gollob, W.O. Dutra, and C.A. da Silva Menezes. 2013. Low levels of vasoactive intestinal peptide are associated with Chagas disease cardiomyopathy. *Hum Immunol.* 74:1375-1381.
- Coupe, M.O., J.C. Mak, M. Yacoub, P.J. Oldershaw, and P.J. Barnes. 1990. Autoradiographic mapping of calcitonin gene-related peptide receptors in human and guinea pig hearts. *Circulation.* 81:741-747.

- Cueille, C., E. Pidoux, M.C. de Vernejoul, R. Ventura-Clapier, and J.M. Garel. 2002. Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 294:340-346.
- Cummings, J.E., I. Gill, R. Akhrass, M. Dery, L.A. Biblo, and K.J. Quan. 2004. Preservation of the anterior fat pad paradoxically decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation in humans. *J Am Coll Cardiol.* 43:994-1000.
- de Bold, A.J., B.G. Bruneau, and M.L. Kuroski de Bold. 1996. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res.* 31:7-18.
- De Matteis, R., J.R. Arch, M.L. Petroni, D. Ferrari, S. Cinti, and M.J. Stock. 2002. Immunohistochemical identification of the beta(3)-adrenoceptor in intact human adipocytes and ventricular myocardium: effect of obesity and treatment with ephedrine and caffeine. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26:1442-1450.
- Debono, M., and E. Cachia. 2007. The impact of Cardiovascular Autonomic Neuropathy in diabetes: is it associated with left ventricular dysfunction? *Auton Neurosci.* 132:1-7.
- DeHaven, W.I., and J. Cuevas. 2004. VPAC receptor modulation of neuroexcitability in intracardiac neurons: dependence on intracellular calcium mobilization and synergistic enhancement by PAC1 receptor activation. *J Biol Chem.* 279(39):40609-21.
- Heterogeneity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat intrinsic cardiac neurons. *Neurosci Lett.* 328:45-49.
- Dehlin, H.M., and S.P. Levick. 2014. Substance P in heart failure: the good and the bad. *Int J Cardiol.* 170:270-277.
- Dehlin, H.M., E.J. Manteufel, A.L. Monroe, M.H. Reimer, Jr., and S.P. Levick. 2013. Substance P acting via the neurokinin-1 receptor regulates adverse myocardial remodeling in a rat model of hypertension. *Int J Cardiol.* 168:4643-4651.
- Delgado, M., C. Abad, C. Martinez, M.G. Juarranz, A. Arranz, R.P. Gomariz, and J. Leceta. 2002. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl).* 80:16-24.
- Dennis, T., A. Fournier, S. St Pierre, and R. Quirion. 1989. Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 251:718-725.
- Despa, S., J. Bossuyt, F. Han, K.S. Ginsburg, L.G. Jia, H. Kutchai, A.L. Tucker, and D.M. Bers. 2005. Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circ Res.* 97:252-259.
- Dey, R.D., W.A. Shannon, and S.I. Said. 1981. Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cat, and human subjects. *Cell Tissue Res.* 220:231-238.
- Dubovicky, M., M. Mach, M. Key, M. Morris, S. Paton, and J.B. Lucot. 2007. Diurnal behavioral and endocrine effects of chronic shaker stress in mice. *Neuro Endocrinol Lett.* 28:846-853.
- Dumont, Y., A. Fournier, S. St-Pierre, and R. Quirion. 1997. A potent and selective CGRP2 agonist, [Cys(Et)2,7]hCGRP alpha: comparison in prototypical CGRP1 and CGRP2 in vitro bioassays. *Can J Physiol Pharmacol.* 75:671-676.
- Dvorakova, M., J. Slavikova, and W. Kummer. 2007. Substance P receptor in normal and diabetic rat heart. Vol. 56. 13P.
- Dvoráková, M.C. 2005. Cardioprotective role of the VIP signaling system. *Timely Top Med Cardiovasc Dis.* 9:E33.
- Dvoráková, M.C., U. Pfeil, J. Kuncová, J. Svíglerová, G. Galvis, G. Krasteva, P. König, V. Grau, J. Slavíková, and W. Kummer. 2006. Down-regulation of vasoactive intestinal peptide and altered expression of its receptors in rat diabetic cardiomyopathy. *Cell Tissue Res.* 323:383-393.
- Dyavanapalli, J., H. Jameson, O. Dergacheva, V. Jain, M. Alhusayyen, and D. Mendelowitz. 2014. Chronic intermittent hypoxia-hypercapnia blunts heart rate responses and alters

- neurotransmission to cardiac vagal neurons. *In J Physiol*. Vol. 592. 2014 The Authors. The Journal of Physiology 2014 The Physiological Society., England. 2799-2811.
- Edwards, A.V., and S.R. Bloom. 1982. Recent physiological studies of the alimentary autonomic innervation. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 71:77-89.
- Edwards, B.S., R.S. Zimmerman, T.R. Schwab, D.M. Heublein, and J.C. Burnett, Jr. 1988. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res*. 62:191-195.
- Eiden, L.E. 1998. The cholinergic gene locus. *J Neurochem*. 70:2227-2240.
- Ejaz, A., F.W. LoGerfo, K. Khabbaz, and L. Pradhan. 2011. Expression of Neuropeptide Y, Substance P, and their receptors in the right atrium of diabetic patients. *Clin Transl Sci*. 4:346-350.
- Ekstrand, A.J., R. Cao, M. Bjorndahl, S. Nystrom, A.C. Jonsson-Rylander, H. Hassani, B. Hallberg, M. Nordlander, and Y. Cao. 2003. Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:6033-6038.
- Ellison, J.P., and R.G. Hibbs. 1976. An ultrastructural study of mammalian cardiac ganglia. *J Mol Cell Cardiol*. 8:89-101.
- Engelmann, M., C.T. Wotjak, and R. Landgraf. 1998. Differential central and peripheral release of vasopressin and oxytocin in response to swim stress in rats. *Adv Exp Med Biol*. 449:175-177.
- Ernst, A., J. Suhr, J. Kohrle, and A. Bergmann. 2008. Detection of stable N-terminal protachykinin A immunoreactivity in human plasma and cerebrospinal fluid. *Peptides*. 29:1201-1206.
- Esler, M., M. Alvarenga, C. Pier, J. Richards, A. El-Osta, D. Barton, D. Haikerwal, D. Kaye, M. Schlaich, L. Guo, G. Jennings, F. Socratous, and G. Lambert. 2006. The neuronal noradrenaline transporter, anxiety and cardiovascular disease. *J Psychopharmacol*. 20:60-66.
- Espiner, E.A. 1987. The effects of stress on salt and water balance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1:375-390.
- Fahrenkrug, J. 1989. VIP and autonomic neurotransmission. *Pharmacol Ther*. 41:515-534.
- Fang, Z.Y., J.B. Prins, and T.H. Marwick. 2004. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 25:543-567.
- Feetham, C.H., and R. Barrett-Jolley. 2014. NK1-receptor-expressing paraventricular nucleus neurones modulate daily variation in heart rate and stress-induced changes in heart rate variability. *Physiol Rep*. 2.
- Feigl, E.O. 1998. Neural control of coronary blood flow. *J Vasc Res*. 35:85-92.
- Feldman, D.S., C.A. Carnes, W.T. Abraham, and M.R. Bristow. 2005. Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors--alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2:475-483.
- Fischer, A., G.P. McGregor, A. Saria, B. Philippin, and W. Kummer. 1996. Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. 98:2284-2291.
- Floras, J.S. 2009. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol*. 54:375-385.
- Franci, C.R., J.A. Anselmo-Franci, and S.M. McCann. 1992. The role of endogenous atrial natriuretic peptide in resting and stress-induced release of corticotropin, prolactin, growth hormone, and thyroid-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:11391-11395.
- Franco-Cereceda, A. 1988. Calcitonin gene-related peptide and tachykinins in relation to local sensory control of cardiac contractility and coronary vascular tone. *Acta Physiol Scand Suppl*. 569:1-63.
- Franco-Cereceda, A. 1991. Calcitonin gene-related peptide and human epicardial coronary arteries: presence, release and vasodilator effects. *Br J Pharmacol*. 102:506-510.
- Franco-Cereceda, A., H. Henke, J.M. Lundberg, J.B. Petermann, T. Hökfelt, and J.A. Fischer. 1987. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive

- sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin. *Peptides*. 8:399-410.
- Franco-Cereceda, A., and J.M. Lundberg. 1988. Actions of calcitonin gene-related peptide and tachykinins in relation to the contractile effects of capsaicin in the guinea-pig and rat heart in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 337:649-655.
- Frase, L.L., F.A. Gaffney, L.D. Lane, J.C. Buckey, S.I. Said, C.G. Blomqvist, and G.J. Krejs. 1987. Cardiovascular effects of vasoactive intestinal peptide in healthy subjects. *Am J Cardiol*. 60:1356-1361.
- Frick, A., F. Ahs, A.M. Palmquist, A. Pissioti, U. Wallenquist, M. Fernandez, M. Jonasson, L. Appel, O. Frans, M. Lubberink, T. Furmark, L. von Knorring, and M. Fredrikson. 2015. Overlapping expression of serotonin transporters and neurokinin-1 receptors in posttraumatic stress disorder: a multi-tracer PET study. *Mol Psychiatry*.
- Fried, G. 1995. Synaptic vesicles and release of transmitters: new insights at the molecular level. *Acta Physiol Scand*. 154:1-15.
- Fu, L.W., and J.C. Longhurst. 2009. Regulation of cardiac afferent excitability in ischemia. *Handb Exp Pharmacol*:185-225.
- Gagliardi, M., W.C. Randall, D. Bieger, R.D. Wurster, D.A. Hopkins, and J.A. Armour. 1988. Activity of in vivo canine cardiac plexus neurons. *Am J Physiol*. 255:H789-800.
- Galandrin, S., and M. Bouvier. 2006. Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol*. 70:1575-1584.
- Ganten, D., M. Paul, and R.E. Lang. 1991. The role of neuropeptides in cardiovascular regulation. *Cardiovasc Drugs Ther*. 5:119-130.
- García-Unzueta, M.T., C. Montalbán, C. Pesquera, J.R. Berrazueta, and J.A. Amado. 1998. Plasma adrenomedullin levels in type 1 diabetes. Relationship with clinical parameters. *Diabetes Care*. 21:999-1003.
- Gardner, D.G., B.J. Gertz, C.F. Deschepper, and D.Y. Kim. 1988. Gene for the rat atrial natriuretic peptide is regulated by glucocorticoids in vitro. *J Clin Invest*. 82:1275-1281.
- Gauthier, C., D. Langin, and J.L. Balligand. 2000. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*. 21:426-431.
- Gauthier, C., V. Leblais, L. Kobzik, J.N. Trochu, N. Khandoudi, A. Bril, J.L. Balligand, and H. Le Marec. 1998. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest*. 102:1377-1384.
- Gavrilovic, L., N. Spasojevic, and S. Dronjak. 2010. Subsequent stress increases gene expression of catecholamine synthetic enzymes in cardiac ventricles of chronic-stressed rats. *Endocrine*. 37:425-429.
- Geiger, J., P. Stránský, J. Slavíková, J. Vlk, J. Rícný, and S. Tucek. 1992. [The effect increased choline levels on the synthesis and release of acetylcholine in heart atria in white rats]. *Bratisl Lek Listy*. 93:610-614.
- Gennari, C., and J.A. Fischer. 1985. Cardiovascular action of calcitonin gene-related peptide in humans. *Calcif Tissue Int*. 37:581-584.
- Gerritsen, J., J.M. Dekker, B.J. TenVoorde, P.J. Kostense, R.J. Heine, L.M. Bouter, R.M. Heethaar, and C.D. Stehouwer. 2001. Impaired autonomic function is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease: the Hoorn Study. *Diabetes Care*. 24:1793-1798.
- Gibbons, C., R. Dackor, W. Dunworth, K. Fritz-Six, and K.M. Caron. 2007. Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *In Mol Endocrinol*. Vol. 21, United States. 783-796.
- Gobeil, F., A. Fortier, T. Zhu, M. Bossolasco, M. Leduc, M. Grandbois, N. Heveker, G. Bkaily, S. Chemtob, and D. Barbaz. 2006. G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol*. 84:287-297.

- Goldstein, D.S. 1987. Stress-induced activation of the sympathetic nervous system. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1:253-278.
- Goldstein, D.S. 1995. Stress as a scientific idea: a homeostatic theory of stress and distress. Vol. 4. 177-215.
- Goldstein, D.S. 2010. Catecholamines 101. *Clin Auton Res.* 20:331-352.
- Goldstein, D.S., and I.J. Kopin. 2008. Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis. *Endocr Regul.* 42:111-119.
- Gomez, J., H. Shannon, E. Kostenis, C. Felder, L. Zhang, J. Brodtkin, A. Grinberg, H. Sheng, and J. Wess. 1999. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1692-1697.
- Goncalvesova, E., L. Micutkova, B. Mravec, L. Ksinantova, O. Krizanova, J. Fabian, and R. Kvetnansky. 2004. Changes in gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in the transplanted human heart. *Ann N Y Acad Sci.* 1018:430-436.
- Goyal, R.K., and I. Hirano. 1996. The enteric nervous system. *N Engl J Med.* 334:1106-1115.
- Graham, R.M., D.M. Perez, J. Hwa, and M.T. Piascik. 1996. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res.* 78:737-749.
- Gray, A.L., T.A. Johnson, J.L. Ardell, and V.J. Massari. 2004. Parasympathetic control of the heart. II. A novel interganglionic intrinsic cardiac circuit mediates neural control of heart rate. *J Appl Physiol (1985).* 96:2273-2278.
- Grippe, A.J., B.S. Cushing, and C.S. Carter. 2007. Depression-like behavior and stressor-induced neuroendocrine activation in female prairie voles exposed to chronic social isolation. *Psychosom Med.* 69:149-157.
- Grundy, S.M., I.J. Benjamin, G.L. Burke, A. Chait, R.H. Eckel, B.V. Howard, W. Mitch, S.C. Smith, Jr., and J.R. Sowers. 1999. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 100:1134-1146.
- Gulbenkian, S., O. Saetrum Opgaard, R. Ekman, N. Costa Andrade, J. Wharton, J.M. Polak, J. Queiroz e Melo, and L. Edvinsson. 1993. Peptidergic innervation of human epicardial coronary arteries. *Circ Res.* 73:579-588.
- Gutkowska, J., and M. Jankowski. 2008. Oxytocin revisited: It is also a cardiovascular hormone. *J Am Soc Hypertens.* 2:318-325.
- Gutkowska, J., M. Jankowski, C. Lambert, S. Mukaddam-Daher, H.H. Zingg, and S.M. McCann. 1997. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:11704-11709.
- Gutkowska, J., M. Jankowski, S. Mukaddam-Daher, and S.M. McCann. 2000. Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Braz J Med Biol Res.* 33:625-633.
- Gutkowska, J., A. Paquette, D. Wang, J.M. Lavoie, and M. Jankowski. 2007. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293:R267-275.
- Gyires, K., Z.S. Zadori, T. Torok, and P. Matyus. 2009. alpha(2)-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem Int.* 55:447-453.
- Harmar, A., and P. Keen. 1982. Synthesis, and central and peripheral axonal transport of substance P in a dorsal root ganglion-nerve preparation in vitro. *In Brain Res.* Vol. 231, Netherlands. 379-385.
- Harmar, A., J.G. Schofield, and P. Keen. 1980. Cycloheximide-sensitive synthesis of substance P by isolated dorsal root ganglia. *Nature.* 284:267-269.
- Harmar, A.J., A. Arimura, I. Gozes, L. Journot, M. Laburthe, J.R. Pisegna, S.R. Rawlings, P. Robberecht, S.I. Said, S.P. Sreedharan, S.A. Wank, and J.A. Waschek. 1998. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev.* 50:265-270.
- Harrison, S., and P. Geppetti. 2001. Substance p. *In Int J Biochem Cell Biol.* Vol. 33, England. 555-576.

- Harvey, R.D. 2012. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function. *Handb Exp Pharmacol*:299-316.
- Harvey, R.D., and A.E. Belevych. 2003. Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *Br J Pharmacol*. 139:1074-1084.
- Hashiguchi, H., S.H. Ye, M. Morris, and N. Alexander. 1997. Single and repeated environmental stress: effect on plasma oxytocin, corticosterone, catecholamines, and behavior. *Physiol Behav*. 61:731-736.
- Haudek, S.B., G.E. Taffet, M.D. Schneider, and D.L. Mann. 2007. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J Clin Invest*. 117:2692-2701.
- Hauser, G.J., M.R. Danchak, M.P. Colvin, R.A. Hopkins, B. Wocial, A.K. Myers, and Z. Zukowska-Grojec. 1996. Circulating neuropeptide Y in humans: relation to changes in catecholamine levels and changes in hemodynamics. *Neuropeptides*. 30:159-165.
- Hayakawa, T., S. Kuwahara-Otani, S. Maeda, K. Tanaka, and M. Seki. 2011. Projections of calcitonin gene-related peptide immunoreactive neurons in the vagal ganglia of the rat. *J Chem Neuroanat*. 41:55-62.
- Hayat, S.A., B. Patel, R.S. Khattar, and R.A. Malik. 2004. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *In Clin Sci (Lond)*. Vol. 107, England. 539-557.
- Hayek, S., and M. Nemer. 2011. Cardiac natriuretic peptides: from basic discovery to clinical practice. *Cardiovasc Ther*. 29:362-376.
- Heilig, M. 2004. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides*. 38:213-224.
- Herlitz, J., and K. Malmberg. 1999. How to improve the cardiac prognosis for diabetes. *Diabetes Care*. 22 Suppl 2:B89-96.
- Hershberger, R.E., F.L. Anderson, and M.R. Bristow. 1989. Vasoactive intestinal peptide receptor in failing human ventricular myocardium exhibits increased affinity and decreased density. *Circ Res*. 65:283-294.
- Heusch, G., D. Baumgart, P. Camici, W. Chilian, L. Gregorini, O. Hess, C. Indolfi, and O. Rimoldi. 2000. alpha-adrenergic coronary vasoconstriction and myocardial ischemia in humans. *Circulation*. 101:689-694.
- Hew-Butler, T., T.D. Noakes, S.J. Soldin, and J.G. Verbalis. 2008. Acute changes in endocrine and fluid balance markers during high-intensity, steady-state, and prolonged endurance running: unexpected increases in oxytocin and brain natriuretic peptide during exercise. *Eur J Endocrinol*. 159:729-737.
- Hieble, J.P., D.B. Bylund, D.E. Clarke, D.C. Eikenburg, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman, and R.R. Ruffolo, Jr. 1995. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev*. 47:267-270.
- Higgins, C.B., S.F. Vatner, and E. Braunwald. 1973. Parasympathetic control of the heart. *Pharmacol Rev*. 25:119-155.
- Hill, M.R., D.W. Wallick, P.J. Martin, and M.N. Levy. 1993. Frequency dependence of vasoactive intestinal polypeptide release and vagally induced tachycardia in the canine heart. *J Auton Nerv Syst*. 43:117-122.
- Hinson, J.P., S. Kapas, and D.M. Smith. 2000. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 21:138-167.
- Hiragushi, K., J. Wada, J. Eguchi, T. Matsuoka, A. Yasuhara, I. Hashimoto, T. Yamashita, K. Hida, Y. Nakamura, K. Shikata, N. Minamino, K. Kangawa, and H. Makino. 2004. The role of adrenomedullin and receptors in glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int*. 65:540-550.
- Hirst, G.D., J.K. Choate, H.M. Cousins, F.R. Edwards, and M.F. Klemm. 1996. Transmission by post-ganglionic axons of the autonomic nervous system: the importance of the specialized neuroeffector junction. *In Neuroscience*. Vol. 73, United States. 7-23.

- Hodgson, J.M., M.D. Cohen, S. Szentpetery, and M.D. Thames. 1989. Effects of regional alpha- and beta-blockade on resting and hyperemic coronary blood flow in conscious, unstressed humans. *Circulation*. 79:797-809.
- Hoeldtke, R.D., K.D. Bryner, D.R. McNeill, G.R. Hobbs, J.E. Riggs, S.S. Warehime, I. Christie, G. Ganser, and K. Van Dyke. 2002. Nitrosative stress, uric Acid, and peripheral nerve function in early type 1 diabetes. *Diabetes*. 51:2817-2825.
- Holmes, D., M. Campbell, M. Harbinson, and D. Bell. 2013. Protective effects of intermedin on cardiovascular, pulmonary and renal diseases: comparison with adrenomedullin and CGRP. *Curr Protein Pept Sci*. 14:294-329.
- Holzer, P. 1992. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 121:49-146.
- Hoover, D.B. 1990. Effects of substance P on rate and perfusion pressure in the isolated guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 252:179-184.
- Hoover, D.B., Y. Chang, J.C. Hancock, and L. Zhang. 2000. Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol*. 84:367-373.
- Horackova, M., and J.A. Armour. 1995. Role of peripheral autonomic neurones in maintaining adequate cardiac function. *Cardiovasc Res*. 30:326-335.
- Horackova, M., J. Slavikova, and Z. Byczko. 2000. Postnatal development of the rat intrinsic cardiac nervous system: a confocal laser scanning microscopy study in whole-mount atria. *Tissue Cell*. 32:377-388.
- Horio, T., T. Nishikimi, F. Yoshihara, H. Matsuo, S. Takishita, and K. Kangawa. 1999. Effects of adrenomedullin on cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *In Eur J Pharmacol*. Vol. 382, Netherlands. 1-9.
- Hou, Y., B.J. Scherlag, J. Lin, Y. Zhang, Z. Lu, K. Truong, E. Patterson, R. Lazzara, W.M. Jackman, and S.S. Po. 2007. Ganglionated plexi modulate extrinsic cardiac autonomic nerve input: effects on sinus rate, atrioventricular conduction, refractoriness, and inducibility of atrial fibrillation. *In J Am Coll Cardiol*. Vol. 50, United States. 61-68.
- Howden, C.W., C. Logue, K. Gavin, L. Collie, and P.C. Rubin. 1988. Haemodynamic effects of intravenous human calcitonin-gene-related peptide in man. *Clin Sci (Lond)*. 74:413-418.
- Huang, M., and O.P. Rorstad. 1984. Cerebral vascular adenylate cyclase: evidence for coupling to receptors for vasoactive intestinal peptide and parathyroid hormone. *J Neurochem*. 43:849-856.
- Huang, M.H., D.S. Friend, M.E. Sunday, K. Singh, K. Haley, K.F. Austen, R.A. Kelly, and T.W. Smith. 1996a. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J Clin Invest*. 98:1298-1303.
- Huang, M.H., M. Horackova, R.M. Negoescu, S. Wolf, and J.A. Armour. 1996b. Polysensory response characteristics of dorsal root ganglion neurones that may serve sensory functions during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*. 32:503-515.
- Huang, M.H., F.M. Smith, and J.A. Armour. 1993. Amino acids modify activity of canine intrinsic cardiac neurons involved in cardiac regulation. *Am J Physiol*. 264:H1275-1282.
- Hulme, E.C., N.J. Birdsall, and N.J. Buckley. 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 30:633-673.
- Ihara, T., U. Ikeda, Y. Tate, S. Ishibashi, and K. Shimada. 2000. Positive inotropic effects of adrenomedullin on rat papillary muscle. *Eur J Pharmacol*. 390:167-172.
- Ikezono, K., M.C. Michel, H.R. Zerkowski, J.J. Beckeringh, and O.E. Brodde. 1987. The role of cyclic AMP in the positive inotropic effect mediated by beta 1- and beta 2-adrenoceptors in isolated human right atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 335:561-566.
- Ilhan, A., S. Rasul, A. Dimitrov, A. Handisurya, W. Gartner, S. Baumgartner-Parzer, L. Wagner, A. Kautzky-Willer, and W. Base. 2010. Plasma neuropeptide Y levels differ in distinct diabetic conditions. *Neuropeptides*. 44:485-489.

- Imura, H., K. Nakao, and H. Itoh. 1992. The natriuretic peptide system in the brain: implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol.* 13:217-249.
- Itoh, H., J. Sakai, A. Imoto, and K.E. Creed. 1995. [The control of smooth muscle tissues by nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve fibres in the autonomic nervous system]. *J Smooth Muscle Res.* 31:67-78.
- Itoh, N., K. Obata, N. Yanaihara, and H. Okamoto. 1983. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature.* 304:547-549.
- Iwasaki, H., M. Kajimura, S. Osawa, S. Kanaoka, T. Furuta, M. Ikuma, and A. Hishida. 2006. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol.* 41:1076-1087.
- Izzo, P.N., J. Deuchars, and K.M. Spyer. 1993. Localization of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the rat: immunocytochemical evidence of synaptic inputs containing 5-hydroxytryptamine. *J Comp Neurol.* 327:572-583.
- Jacobowitz, D. 1967. Histochemical studies of the relationship of chromaffin cells and adrenergic nerve fibers to the cardiac ganglia of several species. *J Pharmacol Exp Ther.* 158:227-240.
- Jacques, D., S. Sader, C. Perreault, A. Fournier, G. Pelletier, A.G. Beck-Sickinger, and M. Descorbeth. 2003. Presence of neuropeptide Y and the Y1 receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium. *Can J Physiol Pharmacol.* 81:288-300.
- Janes, R.D., J.C. Brandys, D.A. Hopkins, D.E. Johnstone, D.A. Murphy, and J.A. Armour. 1986. Anatomy of human extrinsic cardiac nerves and ganglia. *Am J Cardiol.* 57:299-309.
- Jankowski, M., B. Danalache, D. Wang, P. Bhat, F. Hajjar, M. Marcinkiewicz, J. Paquin, S.M. McCann, and J. Gutkowska. 2004. Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:13074-13079.
- Jankowski, M., F. Hajjar, S.A. Kawas, S. Mukaddam-Daher, G. Hoffman, S.M. McCann, and J. Gutkowska. 1998. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14558-14563.
- Jankowski, M., D. Wang, F. Hajjar, S. Mukaddam-Daher, S.M. McCann, and J. Gutkowska. 2000. Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6207-6211.
- Jensen, B.C., T.D. O'Connell, and P.C. Simpson. 2011. Alpha-1-adrenergic receptors: targets for agonist drugs to treat heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 51:518-528.
- Jensen, B.C., P.M. Swigart, T. De Marco, C. Hoopes, and P.C. Simpson. 2009a. α 1-Adrenergic receptor subtypes in nonfailing and failing human myocardium. *Circ Heart Fail.* 2:654-663.
- Jensen, B.C., P.M. Swigart, M.E. Laden, T. DeMarco, C. Hoopes, and P.C. Simpson. 2009b. The alpha-1D is the predominant alpha-1-adrenergic receptor subtype in human epicardial coronary arteries. *In J Am Coll Cardiol.* Vol. 54, United States. 1137-1145.
- Jezova, D., I. Skultetyova, D.I. Tokarev, P. Bakos, and M. Vigas. 1995. Vasopressin and oxytocin in stress. *Ann N Y Acad Sci.* 771:192-203.
- Johnson, T.A., A.L. Gray, J.M. Lauenstein, S.S. Newton, and V.J. Massari. 2004. Parasympathetic control of the heart. I. An interventriculo-septal ganglion is the major source of the vagal intracardiac innervation of the ventricles. *J Appl Physiol (1985).* 96:2265-2272.
- Jougasaki, M., R.J. Rodeheffer, M.M. Redfield, K. Yamamoto, C.M. Wei, L.J. McKinley, and J.C. Burnett. 1996. Cardiac secretion of adrenomedullin in human heart failure. *J Clin Invest.* 97:2370-2376.
- Kalfin, R., N. Maulik, R.M. Engelman, G.A. Cordis, K. Milenov, L. Kasakov, and D.K. Das. 1994. Protective role of intracoronary vasoactive intestinal peptide in ischemic and reperfused myocardium. *J Pharmacol Exp Ther.* 268:952-958.

- Kannel, W.B., and D.L. McGee. 1979. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *Jama*. 241:2035-2038.
- Karanth, S.S., D.R. Springall, S. Francavilla, D.J. Mirrlees, and J.M. Polak. 1990. Early increase in CGRP- and VIP-immunoreactive nerves in the skin of streptozotocin-induced diabetic rats. *Histochemistry*. 94:659-666.
- Kawano, H., R. Okada, and K. Yano. 2003. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart Vessels*. 18:32-39.
- Kawashima, T. 2005. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. *Anat Embryol (Berl)*. 209:425-438.
- Kent, K.M., S.E. Epstein, T. Cooper, and D.M. Jacobowitz. 1974. Cholinergic innervation of the canine and human ventricular conducting system. Anatomic and electrophysiologic correlations. *Circulation*. 50:948-955.
- Kern, M.J., J.D. Horowitz, P. Ganz, J. Gaspar, W.S. Colucci, B.H. Lorell, W.H. Barry, and G.H. Mudge, Jr. 1985. Attenuation of coronary vascular resistance by selective alpha 1-adrenergic blockade in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 5:840-846.
- King, R.J., and P.J. Grant. 2016. Diabetes and cardiovascular disease: pathophysiology of a life-threatening epidemic. *Herz*.
- King, T.S., and J.B. Coakley. 1958. The intrinsic nerve cells of the cardiac atria of mammals and man. *J Anat*. 92:353-376.
- Kinsey, C.G., G. Bussolati, M. Bosco, T. Kimura, M.C. Pizzorno, M.I. Chernin, P. Cassoni, and J.F. Novak. 2007. Constitutive and ligand-induced nuclear localization of oxytocin receptor. *J Cell Mol Med*. 11:96-110.
- Kiran, B.K., and I.H. Ulus. 1992. Selective response of rat peripheral sympathetic nervous system to various stress situations. *Godrdon and Breach*. 561-568 pp.
- Kirsch, G.E., A. Yatani, J. Codina, L. Birnbaumer, and A.M. Brown. 1988. Alpha-subunit of Gk activates atrial K⁺ channels of chick, rat, and guinea pig. *Am J Physiol*. 254:H1200-1205.
- Klenerova, V., O. Kaminsky, P. Sida, I. Krejci, Z. Hlinak, and S. Hynie. 2002. Impaired passive avoidance acquisition in Sprague-Dawley and Lewis rats after restraint and cold stress. *Behav Brain Res*. 136:21-29.
- Klenerova, V., and P. Sida. 1994. Changes in beta-adrenergic receptors in the neurohypophysis and intermediate lobe of rat hypophysis exposed to stress. *Physiol Res*. 43:289-292.
- Klenerova, V., P. Sida, I. Krejci, Z. Hlinak, and S. Hynie. 2007. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Physiol Pharmacol*. 58:83-94.
- Kobayashi, K., and T. Nagatsu. 2005. Molecular genetics of tyrosine 3-monooxygenase and inherited diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 338:267-270.
- Koob, G.F., and Nestler, E.J. 1997. The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 9(3):482-97.
- Kollai, M., and K. Koizumi. 1979. Reciprocal and non-reciprocal action of the vagal and sympathetic nerves innervating the heart. *J Auton Nerv Syst*. 1:33-52.
- Kormos, V., and B. Gaszner. 2013. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 47:401-419.
- Krejci, A., and S. Tucek. 2002. Quantitation of mRNAs for M(1) to M(5) subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol*. 61:1267-1272.
- Kriebel, R.M., A. Angel, and R.L. Parsons. 1991. Biogenic amine localization in cardiac ganglion intrinsic neurons: electron microscopic histochemistry of SIF cells. *Brain Res Bull*. 27:175-179.
- Krizanova, O., L. Micutkova, J. Jelokova, M. Filipenko, E. Sabban, and R. Kvetnansky. 2001. Existence of cardiac PNMT mRNA in adult rats: elevation by stress in a glucocorticoid-dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281:H1372-1379.
- Kruglikov, I., O. Gryshchenko, L. Shutov, E. Kostyuk, P. Kostyuk, and N. Voitenko. 2004. Diabetes-induced abnormalities in ER calcium mobilization in primary and secondary nociceptive neurons. *Pflugers Arch*. 448:395-401.

- Kubovcakova, L., L. Micutkova, Z. Bartosova, E.L. Sabban, O. Krizanova, and R. Kvetnansky. 2006. Identification of phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression in stellate ganglia and its modulation by stress. *J Neurochem.* 97:1419-1430.
- Kuehnel, W. 2003. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy.* Thieme, New York. 534 pp.
- Kukanova, B., and B. Mravec. 2006. Complex intracardiac nervous system. *Bratisl Lek Listy.* 107:45-51.
- Kuncová, J., J. Slavíková, and J. Reischig. 2003. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat heart: effect of guanethidine and capsaicin. *Ann Anat.* 185:153-161.
- Kuncová, J., J. Svíglerová, Z. Tonar, and J. Slavíková. 2005. Heterogenous changes in neuropeptide Y, norepinephrine and epinephrine concentrations in the hearts of diabetic rats. *Auton Neurosci.* 121:7-15.
- Kuntz, A. 1947. The autonomic nervous system. *Prog Neurol Psychiatry.* 2:164-182.
- Kuo, D.C., J.J. Oravitz, and W.C. DeGroat. 1984. Tracing of afferent and efferent pathways in the left inferior cardiac nerve of the cat using retrograde and transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 321:111-118.
- Kuo, L.E., K. Abe, and Z. Zukowska. 2007. Stress, NPY and vascular remodeling: Implications for stress-related diseases. *Peptides.* 28:435-440.
- Kuwasako, K., K. Kitamura, S. Nagata, T. Hikosaka, Y. Takei, and J. Kato. 2011. Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors. *Peptides.* 32:1540-1550.
- Kvetnansky, R., X. Lu, and M.G. Ziegler. 2013. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems. *Adv Pharmacol.* 68:359-397.
- Kvetnansky, R., L. Micutkova, N. Rychkova, L. Kubovcakova, B. Mravec, M. Filipenko, E.L. Sabban, and O. Krizanova. 2004. Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic Ganglia of stressed rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1018:356-369.
- Kvetnansky, R., and L. Mikulaj. 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology.* 87:738-743.
- Kvetnansky, R., E.L. Sabban, and M. Palkovits. 2009. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev.* 89:535-606.
- Kvetnansky, R., V.K. Weise, and I.J. Kopin. 1970. Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase by repeated immobilization of rats. *Endocrinology.* 87:744-749.
- Lai, J.P., S.D. Douglas, and W.Z. Ho. 1998. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol.* 86:80-86.
- Lands, A.M., A. Arnold, J.P. McAuliff, F.P. Luduena, and T.G. Brown. 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 214:597-598.
- Langer, S.Z. 1974. Selective metabolic pathways for noradrenaline in the peripheral and in the central nervous system. *Med Biol.* 52:372-383.
- Langley, J.N. 1892. On the origin from the spinal cord of the cervical and upper thoracic sympathetic fibers with some observations on the white and gray rami communicantes. *Philos. trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 85-124.
- Langley, J.N. 1903. The autonomic nervous system. Vol. 26. 1-26.
- Laukova, M., A. Tillinger, M. Novakova, O. Krizanova, R. Kvetnansky, and J. Myslivecek. 2014. Repeated immobilization stress increases expression of beta3 -adrenoceptor in the left ventricle and atrium of the rat heart. *Stress Health.* 30:301-309.
- Leineweber, K., T. Wangemann, C. Giessler, H. Bruck, S. Dhein, M. Kostelka, F.W. Mohr, R.E. Silber, and O.E. Brodde. 2002. Age-dependent changes of cardiac neuronal noradrenaline reuptake transporter (uptake1) in the human heart. *J Am Coll Cardiol.* 40:1459.
- Levy, M.N. 1971. Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. *Circ Res.* 29:437-445.
- Levy, M.N. 1997. Neural control of cardiac function. *Baillieres Clin Neurol.* 6:227-244.

- Levy, M.N., M.L. Ng, and H. Zieske. 1966. Functional distribution of the peripheral cardiac sympathetic pathways. *Circ Res.* 19:650-661.
- Li, D., X.J. Zhang, L. Chen, Z. Yang, H.W. Deng, J. Peng, and Y.J. Li. 2009. Calcitonin gene-related peptide mediates the cardioprotective effects of rutaecarpine against ischaemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36:662-667.
- Li, L., A.C. Jonsson-Rylander, K. Abe, and Z. Zukowska. 2005. Chronic stress induces rapid occlusion of angioplasty-injured rat carotid artery by activating neuropeptide Y and its Y1 receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:2075-2080.
- Li, L., E.W. Lee, H. Ji, and Z. Zukowska. 2003. Neuropeptide Y-induced acceleration of postangioplasty occlusion of rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1204-1210.
- Li, Y.J., Q.J. Song, and J. Xiao. 2000. Calcitonin gene-related peptide: an endogenous mediator of preconditioning. *Acta Pharmacol Sin.* 21:865-869.
- Li, Y.J., Z.S. Xiao, C.F. Peng, and H.W. Deng. 1996. Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol.* 311:163-167.
- Liu, N., L.Z. Zhang, Y. Han, and Z. Guo. 2011. Differential effects of the calcitonin gene-related peptide on cardiac performance in acute myocardial ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *Minerva Anesthesiol.* 77:789-796.
- Liu, Y., Y.H. Jing, H.L. Sun, H.L. Li, and B.F. Yang. 2004a. [Relationship between M3 receptor and myocyte apoptosis induced by acute myocardial infarction]. *Yao Xue Xue Bao.* 39:338-341.
- Liu, Y., H.L. Sun, H. Wu, Y.H. Gao, H.L. Li, and B.F. Yang. 2004b. Protective effect of M3 receptor on H₂O₂-induced apoptosis of rat myocardial cells in vitro. *Yao Xue Xue Bao.* 39:887-891.
- Liu, Y., C.Q. Xu, J.D. Jiao, H.Z. Wang, D.L. Dong, and B.F. Yang. 2005. M3-R/IK(M3)--a new target of antiarrhythmic agents. *Yao Xue Xue Bao.* 40:8-12.
- Loesch, A., and G. Burnstock. 1988. Ultrastructural localisation of serotonin and substance P in vascular endothelial cells of rat femoral and mesenteric arteries. *Anat Embryol (Berl).* 178:137-142.
- Lorenzoni, R., S.D. Rosen, and P.G. Camici. 1996. Effect of alpha 1-adrenoceptor blockade on resting and hyperemic myocardial blood flow in normal humans. *Am J Physiol.* 271:H1302-1306.
- Low, P.A., J.C. Walsh, C.Y. Huang, and J.G. McLeod. 1975. The sympathetic nervous system in diabetic neuropathy. A clinical and pathological study. *Brain.* 98:341-356.
- Lu, P., H. Luo, X. Quan, H. Fan, Q. Tang, G. Yu, W. Chen, and H. Xia. 2016. The role of substance P in the maintenance of colonic hypermotility induced by repeated stress in rats. *Neuropeptides.* 56:75-82.
- Lu, R., C.P. Hu, J. Peng, H.W. Deng, and Y.J. Li. 2001. Role of calcitonin gene-related peptide in ischaemic preconditioning in diabetic rat hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28:392-396.
- Ludwig, A., X. Zong, M. Jeglitsch, F. Hofmann, and M. Biel. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature.* 393:587-591.
- Lundberg, J.M. 1996. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev.* 48:113-178.
- Lundberg, J.M., A. Franco-Cereceda, X. Hua, T. Hökfelt, and J.A. Fischer. 1985. Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. *Eur J Pharmacol.* 108:315-319.
- Lundberg, J.M., and T. Hökfelt. 1986. Multiple co-existence of peptides and classical transmitters in peripheral autonomic and sensory neurons--functional and pharmacological implications. *Prog Brain Res.* 68:241-262.
- Lundberg, J.M., L. Terenius, T. Hökfelt, and M. Goldstein. 1983. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett.* 42:167-172.

- Luu, T.N., M.R. Dashwood, A.H. Chester, S. Tadjkarimi, and M.H. Yacoub. 1993. Action of vasoactive intestinal peptide and distribution of its binding sites in vessels used for coronary artery bypass grafts. *Am J Cardiol.* 71:1278-1282.
- Lymperopoulos, A., and A. Bathgate. 2013. Arrestins in the cardiovascular system. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 118:297-334.
- Lymperopoulos, A., G. Rengo, and W.J. Koch. 2013. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res.* 113:739-753.
- Macintosh, F.C. 1959. Formation, storage, and release of acetylcholine at nerve endings. *Can J Biochem Physiol.* 37:343-356.
- Maggi, C.A. 1995a. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol.* 45:1-98.
- Maggi, C.A. 1995b. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol.* 26:911-944.
- Mahata, S.K., and A. Ghosh. 1991. Neural influence on oxytocin-induced changes of adrenomedullary catecholamines in the pigeon. *Regul Pept.* 33:183-190.
- Mahgoub, M.A., and A.S. Abd-Elfattah. 1998. Diabetes mellitus and cardiac function. *Mol Cell Biochem.* 180:59-64.
- Malliani, A., and M. Pagani. 1983. The role of the sympathetic nervous system in congestive heart failure. *Eur Heart J.* 4 Suppl A:49-54.
- Malliani, A., M. Pagani, P. Pizzinelli, R. Furlan, and S. Guzzetti. 1983. Cardiovascular reflexes mediated by sympathetic afferent fibers. *J Auton Nerv Syst.* 7:295-301.
- Mantyh, P.W. 2002. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry.* 63 Suppl 11:6-10.
- Mantyh, P.W., R.D. Pinnock, C.P. Downes, M. Goedert, and S.P. Hunt. 1984. Correlation between inositol phospholipid hydrolysis and substance P receptors in rat CNS. *Nature.* 309:795-797.
- Marchant, B., V. Umachandran, R. Stevenson, P.G. Kopelman, and A.D. Timmis. 1993. Silent myocardial ischemia: role of subclinical neuropathy in patients with and without diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 22:1433-1437.
- Marfurt, C.F., and S.F. Echtenkamp. 1995. The effect of diabetes on neuropeptide content in the rat cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36:1100-1106.
- Maron, B.J., J.A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A.J. Moss, C.E. Seidman, J.B. Young, A.H. Association, H.a.F.a.T.C. Council on Clinical Cardiology, Q.o.C.a.O.R.a.F.G.a.T.B.I.W. Groups, and C.o.E.a. Prevention. 2006. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 113:1807-1816.
- Massoulie, J., L. Pezzementi, S. Bon, E. Krejci, and F.M. Vallette. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol.* 41:31-91.
- Matyal, R., F. Mahmood, M. Robich, H. Glazer, K. Khabbaz, P. Hess, C. Bianchi, R. Hagberg, S.X. Hu, and F.W. Sellke. 2011. Chronic type II diabetes mellitus leads to changes in neuropeptide Y receptor expression and distribution in human myocardial tissue. *Eur J Pharmacol.* 665:19-28.
- McDermott, B.J., B.C. Millar, F.M. Dolan, D. Bell, and A. Balasubramaniam. 1997. Evidence for Y1 and Y2 subtypes of neuropeptide Y receptors linked to opposing postjunctional effects observed in rat cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol.* 336:257-265.
- McGrath, M.F., M.L. de Bold, and A.J. de Bold. 2005. The endocrine function of the heart. *Trends Endocrinol Metab.* 16:469-477.
- McLatchie, L.M., N.J. Fraser, M.J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M.G. Lee, and S.M. Foord. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 393:333-339.

- Melendez, G.C., J. Li, B.A. Law, J.S. Janicki, S.C. Supowit, and S.P. Levick. 2011. Substance P induces adverse myocardial remodelling via a mechanism involving cardiac mast cells. *In Cardiovasc Res.* Vol. 92, England. 420-429.
- Meller, S.T., and G.F. Gebhart. 1992. A critical review of the afferent pathways and the potential chemical mediators involved in cardiac pain. *Neuroscience.* 48:501-524.
- Merighi, A., J.M. Polak, S.J. Gibson, S. Gulbenkian, K.L. Valentino, and S.M. Peirone. 1988. Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. *Cell Tissue Res.* 254:101-109.
- Michel, M.C., G. Hanft, and G. Gross. 1994. Radioligand binding studies of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat heart. *Br J Pharmacol.* 111:533-538.
- Milner, J.D., and R.J. Wurtman. 1986. Catecholamine synthesis: physiological coupling to precursor supply. *Biochem Pharmacol.* 35:875-881.
- Mistrova, E., S. Wiegand, J. Sviglerova, U. Pfeil, J. Kuncova, J. Slavikova, W. Kummer, and M. Chottova Dvorakova. 2014. Adrenomedullin and the calcitonin receptor-like receptor system mRNA expressions in the rat heart and sensory ganglia in experimentally-induced long-term diabetes. *Gen Physiol Biophys.* 33:215-225.
- Miyauchi, T., T. Ishikawa, Y. Sugishita, A. Saito, and K. Goto. 1987. Effects of capsaicin on nonadrenergic noncholinergic nerves in the guinea pig atria: role of calcitonin gene-related peptide as cardiac neurotransmitter. *J Cardiovasc Pharmacol.* 10:675-682.
- Miyauchi, T., T. Ishikawa, Y. Sugishita, A. Saito, and K. Goto. 1988. Effects of piperine on calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerves in the isolated rat atria. *Neurosci Lett.* 91:222-227.
- Moaddel, R., and I.W. Wainer. 2003. Immobilized nicotinic receptor stationary phases: going with the flow in high-throughput screening and pharmacological studies. *J Pharm Biomed Anal.* 30:1715-1724.
- Moens, A.L., R. Yang, V.L. Watts, and L.A. Barouch. 2010. Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* 48:1088-1095.
- Monopoli, A., A. Conti, A. Forlani, and E. Ongini. 1993. Beta 1 and beta 2 adrenoceptors are involved in mediating vasodilation in the human coronary artery. *In Pharmacol Res.* Vol. 27, England. 273-279.
- Monstein, H.J., N. Grahn, M. Truedsson, and B. Ohlsson. 2004. Oxytocin and oxytocin-receptor mRNA expression in the human gastrointestinal tract: a polymerase chain reaction study. *Regul Pept.* 119:39-44.
- Morales-Medina, J.C., Y. Dumont, and R. Quirion. 2010. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Res.* 1314:194-205.
- Morris, H.R., M. Panico, T. Etienne, J. Tippins, S.I. Girgis, and I. MacIntyre. 1984. Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature.* 308:746-748.
- Morris, J.L. 1999. Cotransmission from sympathetic vasoconstrictor neurons to small cutaneous arteries in vivo. *Am J Physiol.* 277:H58-64.
- Moss, S.E., R. Klein, and B.E. Klein. 1991. Cause-specific mortality in a population-based study of diabetes. *Am J Public Health.* 81:1158-1162.
- Muff, R., W. Born, and J.A. Fischer. 1995. Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. *Eur J Endocrinol.* 133:17-20.
- Mukaddam-Daher, S., Y.L. Yin, J. Roy, J. Gutkowska, and R. Cardinal. 2001. Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. *Hypertension.* 38:292-296.
- Mulderry, P.K., M.A. Ghatei, J. Rodrigo, J.M. Allen, M.G. Rosenfeld, J.M. Polak, and S.R. Bloom. 1985. Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat. *Neuroscience.* 14:947-954.

- Mulderry, P.K., M.A. Ghatei, R.A. Spokes, P.M. Jones, A.M. Pierson, Q.A. Hamid, S. Kanse, S.G. Amara, J.M. Burrin, and S. Legon. 1988. Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience*. 25:195-205.
- Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 74:1124-1136.
- Myslivecek, J., E.G. Duysen, and O. Lockridge. 2007. Adaptation to excess acetylcholine by downregulation of adrenoceptors and muscarinic receptors in lungs of acetylcholinesterase knockout mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 376:83-92.
- Myslivecek, J., M. Novakova, M. Palkovits, O. Krizanova, and R. Kvetnansky. 2006. Distribution of mRNA and binding sites of adrenoceptors and muscarinic receptors in the rat heart. *Life Sci*. 79:112-120.
- Myslivecek, J., J. Ricny, M. Palkovits, and R. Kvetnansky. 2004. The effects of short-term immobilization stress on muscarinic receptors, beta-adrenoceptors, and adenylyl cyclase in different heart regions. *Ann N Y Acad Sci*. 1018:315-322.
- Myslivecek, J., A. Tillinger, M. Novakova, and R. Kvetnansky. 2008. Regulation of adrenoceptor and muscarinic receptor gene expression after single and repeated stress. *Ann N Y Acad Sci*. 1148:367-376.
- Myslivecek, J., S. Trojan, and S. Tucek. 1996. Biphasic changes in the density of muscarinic and beta-adrenergic receptors in cardiac atria of rats treated with diisopropylfluorophosphate. *Life Sci*. 58:2423-2430.
- Nankova, B., R. Kvetnansky, B. Hiremagalur, B. Sabban, M. Rusnak, and E.L. Sabban. 1996. Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinology*. 137:5597-5604.
- Navaratnam, V. 1965. Development of the nerve supply to the human heart. *Br Heart J*. 27:640-650.
- Nicholls, M.G., H. Ikram, I.G. Crozier, E.A. Espiner, and T.G. Yandle. 1987. Atrial natriuretic peptides in man. *Can J Physiol Pharmacol*. 65:1697-1700.
- Nishikimi, T., F. Yoshihara, Y. Mori, K. Kangawa, and H. Matsuoka. 2003. Cardioprotective effect of adrenomedullin in heart failure. *Hypertens Res*. 26 Suppl:S121-127.
- Nishioka, T., J.A. Anselmo-Franci, P. Li, M.F. Callahan, and M. Morris. 1998. Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*. 781:57-61.
- Nosaka, S., T. Yamamoto, and K. Yasunaga. 1979. Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic neurons with rat brain stem. *J Comp Neurol*. 186:79-92.
- O'Connell, T.D., S. Ishizaka, A. Nakamura, P.M. Swigart, M.C. Rodrigo, G.L. Simpson, S. Cotecchia, D.G. Rokosh, W. Grossman, E. Foster, and P.C. Simpson. 2003. The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest*. 111:1783-1791.
- Obrosova, I.G. 2009. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics*. 6:638-647.
- Ogawa, Y., H. Itoh, and K. Nakao. 1995. Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide family. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 22:49-53.
- Oie, E., L.E. Vinge, G.O. Andersen, A. Yndestad, K.A. Krobert, C. Sandberg, M.S. Ahmed, T. Haug, F.O. Levy, T. Skomedal, and H. Attramadal. 2005. RAMP2 and RAMP3 mRNA levels are increased in failing rat cardiomyocytes and associated with increased responsiveness to adrenomedullin. *J Mol Cell Cardiol*. 38:145-151.
- Oie, E., L.E. Vinge, A. Yndestad, C. Sandberg, H.K. Grøgaard, and H. Attramadal. 2000. Induction of a myocardial adrenomedullin signaling system during ischemic heart failure in rats. *Circulation*. 101:415-422.

- Ondrejčáková, M., J. Bakos, A. Garafova, L. Kovacs, R. Kvetnansky, and D. Jezova. 2010. Neuroendocrine and cardiovascular parameters during simulation of stress-induced rise in circulating oxytocin in the rat. *Stress*. 13:314-322.
- Ondrejčáková, M., T. Ravingerova, J. Bakos, D. Pancza, and D. Jezova. 2009. Oxytocin exerts protective effects on in vitro myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol*. 87:137-142.
- Onuoha, G.N., E.K. Alpar, R. Chukwulobelu, and D.P. Nicholls. 1999. Distributions of VIP, substance P, neurokinin A and neurotensin in rat heart: an immunocytochemical study. *Neuropeptides*. 33:19-25.
- Otsuka, M., and K. Yoshioka. 1993. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev*. 73:229-308.
- Pacak, K., M. Palkovits, I.J. Kopin, D.S. Goldstein. 1995. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol*. 16(2):89-150.
- Paillole, C., M. Dahan, F. Paycha, A.C. Solal, P. Passa, and R. Gourgon. 1989. Prevalence and significance of left ventricular filling abnormalities determined by Doppler echocardiography in young type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Am J Cardiol*. 64:1010-1016.
- Paivarinta, H., V.M. Pickel, L. Eranko, and T.H. Joh. 1989. Glucocorticoid-induced PNMT-immunoreactive sympathetic cells in the superior cervical ganglion of the rat. *J Electron Microscop Tech*. 12:389-396.
- Pan, C.S., W. Jiang, S.Y. Wu, J. Zhao, Y.Z. Pang, C.S. Tang, and Y.F. Qi. 2006. Potentiated response to adrenomedullin in myocardia and aortas in spontaneously hypertensive rat. *Basic Res Cardiol*. 101:193-203.
- Pannese, E. 1981. The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 65:1-111.
- Pardini, B.J., D.D. Lund, and P.G. Schmid. 1989. Organization of the sympathetic postganglionic innervation of the rat heart. *J Auton Nerv Syst*. 28:193-201.
- Pardini, B.J., K.P. Patel, P.G. Schmid, and D.D. Lund. 1987. Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat. *J Auton Nerv Syst*. 20:91-101.
- Pauza, D.H., G. Skripiene, V. Skripka, N. Pauziene, and R. Stropus. 1997. Morphological study of neurons in the nerve plexus on heart base of rats and guinea pigs. *J Auton Nerv Syst*. 62:1-12.
- Pedrazzini, T., F. Pralong, and E. Grouzmann. 2003. Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cell Mol Life Sci*. 60:350-377.
- Pernow, B. 1983. Substance P. *Pharmacol Rev*. 35:85-141.
- Petersson, M., and K. Uvnas-Moberg. 2007. Effects of an acute stressor on blood pressure and heart rate in rats pretreated with intracerebroventricular oxytocin injections. *Psychoneuroendocrinology*. 32:959-965.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29:e45.
- Pfeil, U., J. Kuncova, D. Bruggmann, R. Paddenberg, A. Rafiq, M. Henrich, M.A. Weigand, K.D. Schluter, M. Mewe, R. Middendorff, J. Slavikova, and W. Kummer. 2014. Intrinsic vascular dopamine - a key modulator of hypoxia-induced vasodilatation in splanchnic vessels. *J Physiol*. 592:1745-1756.
- Pierpont, G.L., E.G. DeMaster, S. Reynolds, J. Pederson, and J.N. Cohn. 1985. Ventricular myocardial catecholamines in primates. *J Lab Clin Med*. 106:205-210.
- Pittenger, G.L., R.A. Malik, N. Burcus, A.J. Boulton, and A.I. Vinik. 1999. Specific fiber deficits in sensorimotor diabetic polyneuropathy correspond to cytotoxicity against neuroblastoma cells of sera from patients with diabetes. *Diabetes Care*. 22:1839-1844.
- Plecha, D.M., W.C. Randall, G.S. Geis, and R.D. Wurster. 1988. Localization of vagal preganglionic somata controlling sinoatrial and atrioventricular nodes. *Am J Physiol*. 255:R703-708.
- Plenderleith, M.B., C.J. Haller, and P.J. Snow. 1990. Peptide coexistence in axon terminals within the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Synapse*. 6:344-350.

- Pons, J., E.W. Lee, L. Li, and J. Kitlinska. 2004. Neuropeptide Y: multiple receptors and multiple roles in cardiovascular diseases. *Curr Opin Investig Drugs*. 5:957-962.
- Popma, J.J., T.C. Smitherman, J.B. Bedotto, E.J. Eichhorn, S.I. Said, and G.J. Dehmer. 1990. Direct coronary vasodilation induced by intracoronary vasoactive intestinal peptide. *J Cardiovasc Pharmacol*. 16:1000-1006.
- Porter, K.E., and N.A. Turner. 2009. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther*. 123:255-278.
- Potter, E.K., and M.J. McCloskey. 1992. [Leu31, Pro34] NPY, a selective functional postjunctional agonist at neuropeptide-Y receptors in anaesthetised rats. *Neurosci Lett*. 134:183-186.
- Poyner, D. 1995. Pharmacology of receptors for calcitonin gene-related peptide and amylin. *Trends Pharmacol Sci*. 16:424-428.
- Pozo, D., E. Gonzalez-Rey, A. Chorny, P. Anderson, N. Varela, and M. Delgado. 2007. Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: a new therapeutic approach for immune disorders. *Peptides*. 28:1833-1846.
- Preibisz, J.J. 1993. Calcitonin gene-related peptide and regulation of human cardiovascular homeostasis. *Am J Hypertens*. 6:434-450.
- Priola, D.V. 1980. Intrinsic innervation of the canine heart. Effects on conduction in the atrium, atrioventricular node, and proximal bundle branch. *Circ Res*. 47:74-79.
- Protas, L., A. Barbuti, J. Qu, V.O. Rybin, R.D. Palmiter, S.F. Steinberg, and R.B. Robinson. 2003. Neuropeptide Y is an essential in vivo developmental regulator of cardiac I_{Ca,L}. *Circ Res*. 93:972-979.
- Randall, D.C. 2000. Towards an understanding of the function of the intrinsic cardiac ganglia. *J Physiol*. 528:406.
- Randall, D.C., D.R. Brown, A.S. McGuirt, G.W. Thompson, J.A. Armour, and J.L. Ardell. 2003. Interactions within the intrinsic cardiac nervous system contribute to chronotropic regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285:R1066-1075.
- Randall, W.C., J.A. Armour, W.P. Geis, and D.B. Lippincott. 1972. Regional cardiac distribution of the sympathetic nerves. *Fed Proc*. 31:1199-1208.
- Raybould, H.E., and Y. Tache. 1988. Cholecystokinin inhibits gastric motility and emptying via a capsaicin-sensitive vagal pathway in rats. *Am J Physiol*. 255:G242-246.
- Reeves, T.J., and L.L. Hefner. 1961. The effect of vagal stimulation on ventricular contractility. *Trans Assoc Am Physicians*. 74:260-270.
- Regalia, J., F. Cai, and C. Helke. 2002. Streptozotocin-induced diabetes and the neurochemistry of vagal afferent neurons. *Brain Res*. 938:7-14.
- Regoli, D., A. Boudon, and J.L. Fauchere. 1994. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*. 46:551-599.
- Richardson, R.J., I. Grkovic, and C.R. Anderson. 2003. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res*. 314:337-350.
- Rittenhouse, P.A., J.E. Marchand, J. Chen, R.M. Kream, and S.E. Leeman. 1996. Streptozotocin-induced diabetes is associated with altered expression of peptide-encoding mRNAs in rat sensory neurons. *Peptides*. 17:1017-1022.
- Rokosh, D.G., B.A. Bailey, A.F. Stewart, L.R. Karns, C.S. Long, and P.C. Simpson. 1994. Distribution of alpha 1C-adrenergic receptor mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with alpha 1B and alpha 1D. *Biochem Biophys Res Commun*. 200:1177-1184.
- Rokosh, D.G., A.F. Stewart, K.C. Chang, B.A. Bailey, J.S. Karliner, S.A. Camacho, C.S. Long, and P.C. Simpson. 1996. Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and in vivo. Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. *J Biol Chem*. 271:5839-5843.
- Rosenbaum, T., A. Gordon-Shaag, M. Munari, and S.E. Gordon. 2004. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol*. 123:53-62.

- Roy, T.M., H.R. Peterson, H.L. Snider, J. Cyrus, V.L. Broadstone, R.D. Fell, A.H. Rothchild, E. Samols, and M.A. Pfeifer. 1989. Autonomic influence on cardiovascular performance in diabetic subjects. *Am J Med.* 87:382-388.
- Rozec, B., M. Erfanian, K. Laurent, J.N. Trochu, and C. Gauthier. 2009. Nebivolol, a vasodilating selective beta(1)-blocker, is a beta(3)-adrenoceptor agonist in the nonfailing transplanted human heart. *J Am Coll Cardiol.* 53:1532-1538.
- Ruskoaho, H. 2003. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr Rev.* 24:341-356.
- Saetrum Opgaard, O., P. Hasbak, R. de Vries, P.R. Saxena, and L. Edvinsson. 2000. Positive inotropy mediated via CGRP receptors in isolated human myocardial trabeculae. *Eur J Pharmacol.* 397:373-382.
- Saetrum Opgaard, O., M. Knutsson, R. de Vries, B. Tom, P.R. Saxena, and L. Edvinsson. 2001. Vasoactive intestinal peptide has a direct positive inotropic effect on isolated human myocardial trabeculae. *Clin Sci (Lond).* 101:637-643.
- Said, S.I., and V. Mutt. 1970. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science.* 169:1217-1218.
- Saito, A., T. Ishikawa, T. Masaki, S. Kimura, and K. Goto. 1986. Pharmacological analysis of autonomic innervation of the right atria of rats and guinea pigs: demonstration of nonadrenergic noncholinergic nerves. *J Pharmacol Exp Ther.* 238:713-719.
- Sakata, J., T. Shimokubo, K. Kitamura, M. Nishizono, Y. Iehiki, K. Kangawa, H. Matsuo, and T. Eto. 1994. Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. *FEBS Lett.* 352:105-108.
- Sanlioglu, A.D., B. Karacay, M.K. Balci, T.S. Griffith, and S. Sanlioglu. 2012. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 49:R157-167.
- Sano, H., A. Miyata, T. Horio, T. Nishikimi, H. Matsuo, and K. Kangawa. 2002. The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regul Pept.* 109:107-113.
- Satoh, C., F. Satoh, K. Takahashi, O. Murakami, M. Sone, K. Totsune, T. Yabe, M. Ohneda, M. Fukuda, K. Sugimura, S. Ogawa, H. Nagakubo, T. Sato, and T. Mouri. 1999. Elevated plasma immunoreactive neuropeptide Y concentrations and its increased urinary excretion in patients with advanced diabetic nephropathy. *Endocr J.* 46:139-146.
- Saygili, E., C. Gunzel, F. Noor-Ebad, R.H. Schwinger, K. Mischke, N. Marx, P. Schauerte, and O.R. Rana. 2011. Irregular electrical activation of intrinsic cardiac adrenergic cells increases catecholamine-synthesizing enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 413:432-435.
- Schindler, M., P.P. Humphrey, and P.C. Emson. 1996. Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 50:9-47.
- Schoeffter, P., and J.C. Stoclet. 1985. Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur J Pharmacol.* 109:275-279.
- Schultz, H.D. 2001. Cardiac vagal chemosensory afferents. Function in pathophysiological states. *Ann N Y Acad Sci.* 940:59-73.
- Schulz, R., T. Rassaf, P.B. Massion, M. Kelm, and J.L. Balligand. 2005. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther.* 108:225-256.
- Schutzberg, M., T. Hokfelt, J.M. Lundberg, K. Fuxe, V. Mutt, and S. Said. 1980. Distribution of VIP neurons in the peripheral and central nervous system. *Endocrinol Jpn.* 27 Suppl 1:23-30.
- Selye, H. 1998. A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 10:230-231.
- Sexton, P.M. 1991. Central nervous system binding sites for calcitonin and calcitonin gene-related peptide. *Mol Neurobiol.* 5:251-273.
- Shannon, R., and M. Chaudhry. 2006. Effect of alpha1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology. *Am Heart J.* 152:842-850.

- Shimekake, Y., K. Nagata, S. Ohta, Y. Kambayashi, H. Teraoka, K. Kitamura, T. Eto, K. Kangawa, and H. Matsuo. 1995. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 270:4412-4417.
- Shvaley, V.N., and A.A. Sosunov. 1985. A light and electron microscopic study of cardiac ganglia in mammals. *Z Mikrosk Anat Forsch.* 99:676-694.
- Shvaley, V.N., and A.A. Sosunov. 1989. Electron microscopic study of cardiac ganglia in human fetuses. *J Auton Nerv Syst.* 26:1-9.
- Shvilkin, A., P. Danilo, P. Chevalier, F. Chang, I.S. Cohen, and M.R. Rosen. 1994. Vagal release of vasoactive intestinal peptide can promote vagotonic tachycardia in the isolated innervated rat heart. *Cardiovasc Res.* 28:1769-1773.
- Silva, A.P., C. Cavadas, and E. Grouzmann. 2002. Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta.* 326:3-25.
- Singh, S., P.I. Johnson, A. Javed, T.S. Gray, V.A. Lonchyna, and R.D. Wurster. 1999. Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. *Circulation.* 99:411-419.
- Singh, S., P.I. Johnson, R.E. Lee, E. Orfei, V.A. Lonchyna, H.J. Sullivan, A. Montoya, H. Tran, W.H. Wehrmacher, and R.D. Wurster. 1996. Topography of cardiac ganglia in the adult human heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 112:943-953.
- Skeberdis, V.A., V. Gendviliene, D. Zablockaitė, R. Treinys, R. Macianskiene, A. Bogdelis, J. Jurevicius, and R. Fischmeister. 2008. beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca²⁺ current. *J Clin Invest.* 118:3219-3227.
- Slavíková, J., J. Kuncová, M. Chottová-Dvořáková, and J. Reischig. 2005. Neadrenergní necholinergní nervová regulace srdeční činnosti: morfologie a funkce peptidergí inervace srdce savců. Vol. 54. *Českosl. Fyziol.* 70-77.
- Slavíková, J., J. Kuncová, J. Reischig, and M. Dvořáková. 2003. Catecholaminergic neurons in the rat intrinsic cardiac nervous system. *Neurochem Res.* 28:593-598.
- Slavíková, J., and S. Tucek. 1982. Choline acetyltransferase in the heart of adult rats. *Pflugers Arch.* 392:225-229.
- Smith, R.B. 1971. Intrinsic innervation of the avian heart. *Acta Anat (Basel).* 79:112-119.
- Smith-White, M.A., T.P. Iismaa, and E.K. Potter. 2003. Galanin and neuropeptide Y reduce cholinergic transmission in the heart of the anaesthetised mouse. *Br J Pharmacol.* 140:170-178.
- Song, J.X., L.H. Wang, L. Yao, C. Xu, Z.H. Wei, and L.R. Zheng. 2009. Impaired transient receptor potential vanilloid 1 in streptozotocin-induced diabetic hearts. *In Int J Cardiol.* Vol. 134, Netherlands. 290-292.
- Song, Q.J., Y.J. Li, and H.W. Deng. 1999. Early and delayed cardioprotection by heat stress is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 359:477-483.
- Sorriento, D., G. Santulli, C. Del Giudice, A. Anastasio, B. Trimarco, and G. Iaccarino. 2012. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension.* 60:129-136.
- Sosulina, L., C. Strippel, H. Romo-Parra, A.L. Walter, T. Kanyshkova, S.B. Sartori, M.D. Lange, N. Singewald, and H.C. Pape. 2015. Substance P excites GABAergic neurons in the mouse central amygdala through neurokinin 1 receptor activation. *J Neurophysiol.* 114:2500-2508.
- Spyer, K.M. 1994. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol.* 474:1-19.
- Sreedharan, S.P., D.R. Patel, J.X. Huang, and E.J. Goetzel. 1993. Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:546-553.
- Staszewska-Woolley, J., and G. Woolley. 1990. Cardiac nociceptive reflexes: role of kinins, prostanoids and capsaicin-sensitive afferents. *Pol J Pharmacol Pharm.* 42:237-247.

- Stavrakis, S., D.C. Kem, E. Patterson, P. Lozano, S. Huang, B. Szabo, M.W. Cunningham, R. Lazzara, and X. Yu. 2011. Opposing cardiac effects of autoantibody activation of beta-adrenergic and M2 muscarinic receptors in cardiac-related diseases. *Int J Cardiol.* 148:331-336.
- Steinfath, M., Y.Y. Chen, J. Lavicky, O. Magnussen, M. Nose, S. Rosswag, W. Schmitz, and H. Scholz. 1992. Cardiac alpha 1-adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br J Pharmacol.* 107:185-188.
- Sternberg, E.M., J.R. Glowa, M.A. Smith, A.E. Calogero, S.J. Listwak, S. Aksentijevich, G.P. Chrousos, R.L. Wilder, and P.W. Gold. 1992. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Res.* 570:54-60.
- Sternini, C. 1991. Tachykinin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities and mRNAs in the mammalian enteric nervous system and sensory ganglia. *Adv Exp Med Biol.* 298:39-51.
- Stewart, A.F., D.G. Rokosh, B.A. Bailey, L.R. Karns, K.C. Chang, C.S. Long, K. Kariya, and P.C. Simpson. 1994. Cloning of the rat alpha 1C-adrenergic receptor from cardiac myocytes. alpha 1C, alpha 1B, and alpha 1D mRNAs are present in cardiac myocytes but not in cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 75:796-802.
- Sulakhe, P.V., and X.T. Vo. 1995. Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem.* 149-150:103-126.
- Sun, L.S., V.O. Rybin, S.F. Steinberg, and R.B. Robinson. 1998. Characterization of the alpha1-adrenergic chronotropic response in neuropeptide Y-treated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol.* 349:377-381.
- Surtees, P.G., N.W. Wainwright, R.N. Luben, N.J. Wareham, S.A. Bingham, and K.T. Khaw. 2008. Depression and ischemic heart disease mortality: evidence from the EPIC-Norfolk United Kingdom prospective cohort study. *Am J Psychiatry.* 165:515-523.
- Tadevosyan, A., G. Vaniotis, B.G. Allen, T.E. Hebert, and S. Nattel. 2012. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *J Physiol.* 590:1313-1330.
- Tang, F., I.S. Hwang, M.P. Wong, and Y.Y. Li. 2007. Adrenomedullin gene expression and peptide levels in the heart and blood vessels of streptozotocin-diabetic rats. *Horm Metab Res.* 39:3-8.
- Tatemoto, K. 1982. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:5485-5489.
- Taton, G., P. Chatelain, M. Delhay, J.C. Camus, P. De Neef, M. Waelbroeck, K. Tatemoto, P. Robberecht, and J. Christophe. 1982. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and peptide having N-terminal histidine and C-terminal isoleucine amide (PHI) stimulate adenylate cyclase activity in human heart membranes. *Peptides.* 3:897-900.
- Tavernier, G., G. Toumaniantz, M. Erfanian, M.F. Heymann, K. Laurent, D. Langin, and C. Gauthier. 2003. beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovasc Res.* 59:288-296.
- Taylor, E.W., D. Jordan, and J.H. Coote. 1999. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol Rev.* 79:855-916.
- Tesfaye, S., A.J. Boulton, P.J. Dyck, R. Freeman, M. Horowitz, P. Kempler, G. Lauria, R.A. Malik, V. Spallone, A. Vinik, L. Bernardi, and P. Valensi. 2010. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care.* 33:2285-2293.
- Tillinger, A., M. Novakova, O. Krizanova, R. Kvetnansky, and J. Myslivecek. 2014. Heart ventricles specific stress-induced changes in beta-adrenoceptors and muscarinic receptors. *Gen Physiol Biophys.* 33:357-364.
- Tippins, J.R. 1986. CGRP: a novel neuropeptide from the calcitonin gene is the most potent vasodilator known. *J Hypertens Suppl.* 4:S102-105.

- Torda, T., R. Kvetnansky, and M. Petrikova. 1985. Effect of repeated immobilization stress on central and peripheral adrenoceptors in rats. *Endocrinol Exp.* 19:157-163.
- Torda, T., I. Yamaguchi, F. Hirata, I.J. Kopin, and J. Axelrod. 1981. Quinacrine-blocked desensitization of adrenoceptors after immobilization stress or repeated injection of isoproterenol in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 216:334-338.
- Totsune, K., K. Takahashi, H.S. Mackenzie, O. Murakami, Z. Arihara, M. Sone, T. Mouri, B.M. Brenner, and S. Ito. 2000. Increased gene expression of adrenomedullin and adrenomedullin-receptor complexes, receptor-activity modifying protein (RAMP)2 and calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) in the hearts of rats with congestive heart failure. *Clin Sci (Lond).* 99:541-546.
- Triposkiadis, F., G. Karayannis, G. Giamouzis, J. Skoularigis, G. Louridas, and J. Butler. 2009. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol.* 54:1747-1762.
- Tsuruda, T., J. Kato, K. Kitamura, K. Kuwasako, T. Imamura, Y. Koiwaya, T. Tsuji, K. Kangawa, and T. Eto. 1998. Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension.* 31:505-510.
- Tucek, S. 1983. Acetylcoenzyme A and the synthesis of acetylcholine in neurones: review of recent progress. *Gen Physiol Biophys.* 2:313-324.
- Usdin, T.B., T.I. Bonner, and E. Mezey. 1994. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology.* 135:2662-2680.
- Vahatalo, L.H., S.T. Ruohonen, L. Ailanen, and E. Savontaus. 2016. Neuropeptide Y in noradrenergic neurons induces obesity in transgenic mouse models. *Neuropeptides.* 55:31-37.
- Valensi, P., C. Giroux, B. Seeboth-Ghalayini, and J.R. Attali. 1997. Diabetic peripheral neuropathy: effects of age, duration of diabetes, glycemic control, and vascular factors. *J Diabetes Complications.* 11:27-34.
- van Rossum, D., U.K. Hanisch, and R. Quirion. 1997. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 21:649-678.
- Vance, W.H., and R.C. Bowker. 1983. Spinal origins of cardiac afferents from the region of the left anterior descending artery. *Brain Res.* 258:96-100.
- Vatner, S.F. 1988. Reduced subendocardial myocardial perfusion as one mechanism for congestive heart failure. *In Am J Cardiol.* Vol. 62, United States. 94E-98E.
- Vesely, D.L. 2002. Atrial natriuretic peptide prohormone gene expression: hormones and diseases that upregulate its expression. *IUBMB Life.* 53:153-159.
- Vesely, D.L., G.I. San Miguel, I. Hassan, and D.D. Schocken. 2001. Atrial natriuretic hormone, vessel dilator, long-acting natriuretic hormone, and kaliuretic hormone decrease the circulating concentrations of CRH, corticotropin, and cortisol. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:4244-4249.
- Veves, A., and G.L. King. 2001. Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects? *J Clin Invest.* 107:1215-1218.
- Večeřová-Procházková, A. 2004. Psychoneuroimmunologie. Galén, Acta psychiatrica postgradualia bohémica. 164-175.
- Vinik, A.I., and T. Erbas. 2001. Recognizing and treating diabetic autonomic neuropathy. *Cleve Clin J Med.* 68:928-930, 932, 934-944.
- Vinik, A.I., and T. Erbas. 2006. Cardiovascular autonomic neuropathy: diagnosis and management. *Curr Diab Rep.* 6:424-430.
- Vinik, A.I., R. Freeman, and T. Erbas. 2003. Diabetic autonomic neuropathy. *Semin Neurol.* 23:365-372.
- Von Euler, U.S., and J.H. Gaddum. 1931. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol.* 72:74-87.
- Von Euler, U.S., and N.A. Hillarp. 1956. Evidence for the presence of noradrenaline in submicroscopic structures of adrenergic axons. *Nature.* 177:44-45.

- Voulgari, C., D. Papadogiannis, and N. Tentolouris. 2010. Diabetic cardiomyopathy: from the pathophysiology of the cardiac myocytes to current diagnosis and management strategies. *Vasc Health Risk Manag.* 6:883-903.
- Walsh, R.J., W.B. Weglicki, and R. Correa-de-Araujo. 1996. Distribution of specific substance P binding sites in the heart and adjacent great vessels of the Wistar white rat. *Cell Tissue Res.* 284:495-500.
- Wang, H., H. Han, L. Zhang, H. Shi, G. Schram, S. Nattel, and Z. Wang. 2001. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol Pharmacol.* 59:1029-1036.
- Wang, L.H., S.X. Zhou, R.C. Li, L.R. Zheng, J.H. Zhu, S.J. Hu, and Y.L. Sun. 2012. Serum levels of calcitonin gene-related peptide and substance P are decreased in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Int Med Res.* 40:134-140.
- Wang, X., and R.R. Fiscus. 1989. Calcitonin gene-related peptide increases cAMP, tension, and rate in rat atria. *Am J Physiol.* 256:R421-428.
- Wang, Y., W. Feng, W. Xue, Y. Tan, D.W. Hein, X.K. Li, and L. Cai. 2009. Inactivation of GSK-3 β by metallothionein prevents diabetes-related changes in cardiac energy metabolism, inflammation, nitrosative damage, and remodeling. *Diabetes.* 58:1391-1402.
- Wang, Z., H. Shi, and H. Wang. 2004. Functional M3 muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. *Br J Pharmacol.* 142:395-408.
- Ward, J.P.T., and R.W.A. Linden. 2010. Základy fyziologie. Galén.
- Wei, Z., L. Wang, J. Han, J. Song, L. Yao, L. Shao, Z. Sun, and L. Zheng. 2009. Decreased expression of transient receptor potential vanilloid 1 impairs the postischemic recovery of diabetic mouse hearts. *Circ J.* 73:1127-1132.
- Weihe, E., and M. Reinecke. 1981. Peptidergic innervation of the mammalian sinus nodes: vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, substance P. *Neurosci Lett.* 26:283-288.
- Weihe, E., M. Reinecke, and W.G. Forssmann. 1984. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart. Interrelation with neurotensin- and substance P-like immunoreactive nerves. *Cell Tissue Res.* 236:527-540.
- Weihe, E., M. Reinecke, D. Opherk, and W.G. Forssmann. 1981. Peptidergic innervation (substance P) in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 13:331-333.
- Weihe, E., B. Schutz, W. Hartschuh, M. Anlauf, M.K. Schafer, and L.E. Eiden. 2005. Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. *J Comp Neurol.* 492:370-379.
- Weimer, L.H. 2010. Autonomic testing: common techniques and clinical applications. *Neurologist.* 16:215-222.
- Weiner, N. 1970. Regulation of norepinephrine biosynthesis. *Annu Rev Pharmacol.* 10:273-290.
- Wess, J. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:423-450.
- Westermann, D., S. Van Linthout, S. Dhayat, N. Dhayat, F. Escher, C. Bucker-Gartner, F. Spillmann, M. Noutsias, A. Riad, H.P. Schultheiss, and C. Tschope. 2007. Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 56:1834-1841.
- Wharton, J., and S. Gulbenkian. 1987. Peptides in the mammalian cardiovascular system. *Experientia.* 43:821-832.
- Wiggin, T.D., K.A. Sullivan, R. Pop-Busui, A. Amato, A.A. Sima, and E.L. Feldman. 2009. Elevated triglycerides correlate with progression of diabetic neuropathy. *Diabetes.* 58:1634-1640.
- Wimalawansa, S.J. 1996. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* 17:533-585.
- Wimalawansa, S.J. 1997. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol.* 11:167-239.

- Winkler, G., and P. Kempler. 2010. [Pathomechanism of diabetic neuropathy: background of the pathogenesis-oriented therapy]. *Orv Hetil.* 151:971-981.
- Wittling, W., A. Block, S. Genzel, and E. Schweiger. 1998a. Hemisphere asymmetry in parasympathetic control of the heart. *Neuropsychologia.* 36:461-468.
- Wittling, W., A. Block, E. Schweiger, and S. Genzel. 1998b. Hemisphere asymmetry in sympathetic control of the human myocardium. *Brain Cogn.* 38:17-35.
- Wrete, M. 1959. The anatomy of the sympathetic trunks in Man. *J Anat.* 93:448-459.
- Wright, C.D., Q. Chen, N.L. Baye, Y. Huang, C.L. Healy, S. Kasinathan, and T.D. O'Connell. 2008. Nuclear alpha1-adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes. *Circ Res.* 103:992-1000.
- Wright, C.D., S.C. Wu, E.F. Dahl, A.J. Sazama, and T.D. O'Connell. 2012. Nuclear localization drives alpha1-adrenergic receptor oligomerization and signaling in cardiac myocytes. *Cell Signal.* 24:794-802.
- Xiao, R.P., H. Cheng, Y.Y. Zhou, M. Kuschel, and E.G. Lakatta. 1999. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res.* 85:1092-1100.
- Xiao, R.P., W. Zhu, M. Zheng, C. Cao, Y. Zhang, E.G. Lakatta, and Q. Han. 2006. Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci.* 27:330-337.
- Xie, Q., M. Itoh, K. Miyamoto, L. Li, and Y. Takeuchi. 1999. Cardiac afferents to the nucleus of the tractus solitarius: A WGA-HRP study in the rat. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 5:370-375.
- Yamamoto, M., A. Kudoh, K. Arishima, and Y. Eguchi. 1997. Immunocytochemical changes in the fetal pancreatic islet following fetal administration of streptozotocin in the rat. *Anat Rec.* 247:248-252.
- Yamamura, H.I., and S.H. Snyder. 1973. High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. *J Neurochem.* 21:1355-1374.
- Yaoita, H., E. Sato, M. Kawaguchi, T. Saito, K. Maehara, and Y. Maruyama. 1994. Nonadrenergic noncholinergic nerves regulate basal coronary flow via release of capsaicin-sensitive neuropeptides in the rat heart. *Circ Res.* 75:780-788.
- Ye, V.Z., G. Hodge, J.L. Yong, and K.A. Duggan. 2002. Early myocardial fibrosis is associated with depletion of vasoactive intestinal peptide in rat heart. *Exp Physiol.* 87:539-546.
- Yellon, D.M., G.F. Baxter, D. Garcia-Dorado, G. Heusch, and M.S. Sumeray. 1998. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res.* 37:21-33.
- Yoshizawa, T., T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, Y. Iesato, T. Koyama, R. Uetake, L. Yang, A. Yamauchi, M. Tanaka, Y. Toriyama, K. Igarashi, T. Nakada, T. Kashihara, M. Yamada, H. Kawakami, H. Nakanishi, R. Taguchi, T. Nakanishi, H. Akazawa, and T. Shindo. 2013. Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system. *Hypertension.* 61:341-351.
- Yue, P., Y. Zhang, Z. Du, J. Xiao, Z. Pan, N. Wang, H. Yu, W. Ma, H. Qin, W.H. Wang, D.H. Lin, and B. Yang. 2006. Ischemia impairs the association between connexin 43 and M3 subtype of acetylcholine muscarinic receptor (M3-mAChR) in ventricular myocytes. *Cell Physiol Biochem.* 17:129-136.
- Zahner, M.R., D.P. Li, S.R. Chen, and H.L. Pan. 2003. Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats. *J Physiol.* 551:515-523.
- Zhang, L., J.D. Tompkins, J.C. Hancock, and D.B. Hoover. 2001. Substance P modulates nicotinic responses of intracardiac neurons to acetylcholine in the guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281:R1792-1800.
- Zhao, Y., D. Bell, L.R. Smith, L. Zhao, A.B. Devine, E.M. McHenry, D.P. Nicholls, and B.J. McDermott. 2006. Differential expression of components of the cardiomyocyte adrenomedullin/intermedin receptor system following blood pressure reduction in nitric oxide-deficient hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 316:1269-1281.

- Zheng, L.R., J. Han, L. Yao, Y.L. Sun, D.M. Jiang, S.J. Hu, L. Shao, Z.H. Sun, and L.H. Wang. 2012. Up-regulation of calcitonin gene-related peptide protects streptozotocin-induced diabetic hearts from ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 156:192-198.
- Zholos, A.V., A.A. Zholos, and T.B. Bolton. 2004. G-protein-gated TRP-like cationic channel activated by muscarinic receptors: effect of potential on single-channel gating. *J Gen Physiol.* 123:581-598.
- Zhuo, H., H. Ichikawa, and C.J. Helke. 1997. Neurochemistry of the nodose ganglion. *Prog Neurobiol.* 52:79-107.
- Ziegler, D. 1994. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: prognosis, diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Rev.* 10:339-383.
- Zipes, D.P. 2008. Heart-brain interactions in cardiac arrhythmias: role of the autonomic nervous system. *Cleve Clin J Med.* 75 Suppl 2:S94-96.
- Zochodne, D.W., V.M. Verge, C. Cheng, H. Sun, and J. Johnston. 2001. Does diabetes target ganglion neurones? Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes. *Brain.* 124:2319-2334.
- Zukowska, Z., J. Pons, E.W. Lee, and L. Li. 2003. Neuropeptide Y: a new mediator linking sympathetic nerves, blood vessels and immune system? *Can J Physiol Pharmacol.* 81:89-94.
- Zukowska-Grojec, Z. 1995. Neuropeptide Y. A novel sympathetic stress hormone and more. *Ann N Y Acad Sci.* 771:219-233.
- Zukowska-Grojec, Z., E.K. Dayao, E. Karwatowska-Prokopczuk, G.J. Hauser, and H.N. Doods. 1996. Stress-induced mesenteric vasoconstriction in rats is mediated by neuropeptide Y Y1 receptors. *Am J Physiol.* 270:H796-800.
- Zukowska-Grojec, Z., E. Karwatowska-Prokopczuk, T.A. Fisher, and H. Ji. 1998a. Mechanisms of vascular growth-promoting effects of neuropeptide Y: role of its inducible receptors. *Regul Pept.* 75-76:231-238.
- Zukowska-Grojec, Z., E. Karwatowska-Prokopczuk, W. Rose, J. Rone, S. Movafagh, H. Ji, Y. Yeh, W.T. Chen, H.K. Kleinman, E. Grouzmann, and D.S. Grant. 1998b. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res.* 83:187-195.
- Zukowska-Grojec, Z., G.H. Shen, P.A. Capraro, and C.A. Vaz. 1991. Cardiovascular, neuropeptide Y, and adrenergic responses in stress are sexually differentiated. *Physiol Behav.* 49:771-777.
- Zukowska-Grojec, Z., and A.C. Vaz. 1988. Role of neuropeptide Y (NPY) in cardiovascular responses to stress. *Synapse.* 2:293-298.
- ÚZIS. 2015. Činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky v roce 2013. M.M. Zvolský, editor. 1-7.
- Čihák. 2004. Anatomie 3. Grada. 692 pp.
- Klener, P. et al. 2011. Vnitřní lékařství. Galén. 1174 pp.