Charles University in Prague

Department of Physiology

and

Institute of Physiology AS CR, Prague

Biochemistry of Membrane Receptors

Postnatal development of $GABA_B$–receptors in the frontal rat brain cortex

Postnatální vývoj $GABA_B$–receptorů v přední mozkové kůře potkana

Mgr. Dmytro Kagan

Summary of PhD Thesis

Prague 2014

PhD programs in biomedicine

Charles University in Prague
and Academy of Sciences of the Czech Republic

Comission: Animal Physiology

Chairman of the Comission: Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.
Faculty of Science, Charles University, Department of Physiology

Applicant: Mgr. Dmytro Kagan

Address: Institute of Physiology AS CR, v.v.i.
Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Supervisor: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.
Institute of Physiology AS CR, v.v.i.
Biochemistry of Membrane Receptors

Full version of the thesis can be found in dean's office, Faculty of Science, Charles University in Prague

CONTENTS/OBSAH

1. Abbreviations **4**
1. Zkratky **5**

2. Summary **6**
2. Shrnutí **7**

3. Introduction **8**
3. Úvod **9**

4. Aims of the thesis **10**
4. Cíle dizertační práce **11**

5. Materials and methods **12**
5. Materiály a metody **13**

6. Results **14**
6. Výsledky **23**

6.1. The ontogenetic development of $GABA_B$–receptor signaling cascade 14
6.1. Ontogenetický vývoj signalizační kaskády $GABA_B$–receptorů 23

6.2. The ontogenetic development of oxidative damage of the brain; generation of lipofuscin–like pigments 17
6.2. Ontogenetický vývoj oxidačního poškození mozku; vznik lipofuscinových pigmentů 26

6.2.1. Study of lipofuscin–like pigments in brain tissue homogenates. 17
6.2.1. Studie lipofuscinových pigmentů v homogenátech mozkové tkáně 26

6.2.2. Study of lipofuscin–like pigments in subcellular membrane fractions. 21
6.2.2. Studie lipofuscinových pigmentů v subcelulárních membránových frakcích. 30

7. Discussion **32**
7. Diskuse **35**

7.1. The ontogenetic development of $GABA_B$–receptor signaling cascade 32
7.1. Ontogenetický vývoj signalizační kaskády $GABA_B$–receptorů 35

7.2. Postnatal ontogenesis of oxidative damage of the brain. 33
7.2. Postnatální ontogeneze oxidačního poškození mozku 36

8. Conclusions **38**
8. Závěry **39**

9. References **40**
9. Seznam použité literatury **40**

10. List of author's publications **42**
10. Seznam publikací **42**

11. Curriculum vitae **43**
11. Životopis **43**

1. ABBREVIATIONS

AC – adenylate cyclase
BPM – bulk of plasma membranes
DRM – detergent–resistant membrane domain
cAMP – cyclic adenosine monophosphate
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
GABA– γ–aminobutyric acid
GDP – guanozine diphosphate
GPCR – G protein coupled receptor
α–GPDH – α–glycerolphosphate
GSH/GSSG – reduced glutathione/oxidised glutathione
GTP – guanozine triphosphate
IP_3 – inositol triphosphate
HEK293 – human embryonal kidney cells
HEPES – 4–(2–hydroxyethyl)–1–piperazineethanesulfonic acid
HPLC – high performance liquid chromatography
mGluR – metabotropic glutamate receptor
nAChR – nicotinic acetylcholine receptor
LPM – low density membrane fragments
LFP – lipofuscin–like pigments
MDCK – Madin–Darby canine kidney cells
PM – plasma membranes
PNS – post–nuclear supernatant
rpm – rounds per minute
ROS – reactive oxygen species
SKF – 1–[2–(4–methoxyphenyl)–2–[3–(4–methoxyphenyl)propoxy]ethyl]imidazole
SDH – succinate dehydrogenase
TM – transmembrane
Tris – tris–(hydromethyl)–aminomethan
VIP–PACAP – vasoactive intestinal peptide – pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide

1. ZKRATKY

AC – adenylátcykláza
BPM – shluk plasmatických membrán
DRM – detergentům odolné membránové domény
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
GABA– gyselina γ–aminomáselná
GDP – guanosindifosfát
GPCR – receptor spřažený s G proteinem
α–GPDH – α–glycerolfosfát
GSH/GSSG – redukovaný glutathion/oxidovaný glutathione
GTP – guanosindifosfát
IP_3 – inositoltrisfosfát
HEK293 – lidské embrionální ledvinové buňky
HEPES – kyselina 4–(2–hydroxyethyl)–1–piperazine–ethan sulfonová
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
mGluR – metabotropný glutamatový receptor
nAChR – nikotinový acetylcholinový receptor
LPM – nízkohustotní membránové fragmenty
LFP – lipofuscinové pigmenty
MDCK – Madin–Darbýho psí ledvinové buňky
PM – plasmatické membrány
PNS – post–nukleární supernatant
rpm – otáčky za minutu
ROS – reaktivní sloučeniny kyslíku
SKF – 1–[2–(4–methoxyfenyl)–2–[3–(4–methoxyfenyl)propoxy]ethyl]imidazol
SDH – sukcinátdehydrogenáza
TM – transmembránový
Tris – tris–(hydromethyl)–aminomethan
VIP–PACAP – vazoaktivní střevní peptid – hypofýzní polypeptid aktivující adenylátcyclázu

2. SUMMARY

In this work, the detailed analysis of $GABA_B$–R/G protein coupling in the course of pre– and postnatal development of rat brain cortex indicated the significant intrinsic efficacy of $GABA_B$–receptors already shortly after the birth: at postnatal day 1 and 2. Subsequently, both baclofen and SKF97541–stimulated G protein activity, measured as the high–affinity [^{35}S]GTPγS binding, was increased. The highest level of agonist–stimulated [^{35}S]GTPγS binding was detected at postnatal days 14 and 15. In older rats, the efficacy, i.e. the maximum response of baclofen– and SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding was continuously decreased so, that the level in adult, 90–days old rats was not different from that in newborn animals.

The potency of G protein response to baclofen stimulation, characterized by EC_{50} values, was also high at birth but unchanged by further development. The individual variance among the agonists was observed in this respect, as the potency of SKF97541 response was decreased when compared in 2–days old and adult rats.

The highest plasma membrane density of $GABA_B$–R, determined by saturation binding assay with specific antagonist [^{3}H]CGP54626AA, was observed in 1–day old animals. The further development was reflected in *decrease* of receptor number. The adult level was ≈3–fold lower than in new born rats.

The ontogenetic development of Na^+/K^+–ATPase, which was used as marker of the overall brain development, was completely different from that observed in the study of $GABA_B$–R–signaling cascade: plasma membrane density of Na^+/K^+–ATPase was continuously increased in the course of the whole postnatal period; the adult level was ≈3–fold higher than in new born (1–day–old) rats.

The high level of lipofuscin like pigments (LFP) was generated in rat brain cortex during the first 5 days of postnatal life. Maximum level of LFP was detected on the postnatal day 2. Starting from the postnatal day 10, LFP concentration returned down to the prenatal level. A new rise in LFP concentration was observed in 90–days old animals. This second increase of LFP may indicate the beginning of the aging process in rat brain cortex.

2. SHRNUTÍ

Byla provedena detailní analýza spřažení $GABA_B$–R s G proteinem během prenatálního a postnatálního vývoje mozkové kůry potkana, která ukázala významnou vnitřní účinnost $GABA_B$–R hned po narození (1. a 2. den). Následně byla zjištěna stimulovaná funkční aktivita G proteinů baclofenem i SKF97541 (agonisté $GABA_B$–R), která byla měřena pomocí vazby [^{35}S] GTPγS, jejíž nejvyšší hodnota byla detekována během 14. a 15. dne postnatálního vývoje. Účinnost, tj. maximální odpověď baclofenem a SKF97541 stimulované vazby [^{35}S] GTPγS, se u starších potkanů stále snižovala tak, že její hodnota měřená u devadesátidenních potkanů se nelišila od hodnot u novorezených zvířat.

Velikost odpovědi G proteinů na stimulaci baclofenem (vyjádřena jako EC_{50}) byla také zvýšena po narození a během dalšího vývoje se neměnila. Na rozdíl od baclofenu se síla odpovědi SKF97541 zmenšovala (při porovnání dvoudenních mláďat a dospělých potkanů).

Nejvyšší zastoupení $GABA_B$–R v plazmatické membráně stanovené pomocí saturačních vazebných pokusů s použitím specifického antagonisty [^{3}H] CGP54626AA bylo detekováno u jednodenních zvířat. Další vývoj byl charakterizován *snížením* počtu receptorů. Ve srovnání s novorozenými potkany byla hladina u dospělých jedinců 3x nižší.

Ontogenetický vývoj Na^+/K^+–ATPázy (která slouží jako standard celkového vývoje mozku) se zcela lišil ve srovnání s vývojem signalizační kaskády $GABA_B$–R: množství Na^+/K^+–ATPázy ve frakcích plazmatických membrán se neustále zvyšovalo v průběhu celé ontogeneze; hladina u dospělých zvířat byla až 3x vyšší než u mláďat.

V mozkové kůře se vytvářela vysoká hladina lipofuscinových pigmentů (LFP) během prvních pěti dnů od narození. Maximální množství LFP bylo detekováno u dvoudenních zvířat. Po 10 dnech se koncentrace LFP vrátila na prenatální hodnotu. Nový vzestup LFP byl zaznamenán u devadesátidenních potkanů. Toto další zvýšení obsahu LFP může představovat začátek procesu stárnutí mozkové kůry potkana.

3. INTRODUCTION

The extracellular signals such as the light, hormones, neurotransmitters, pheromones, odorants and also Ca^{2+} cations interact with and bind to the large family of the plasma membrane receptors which are functionally coupled with guanine–nucleotide binding regulatory proteins (G proteins), G protein–coupled receptors. Three main families of GPCRs were recognized by comparison of amino–acid sequences of individual receptor proteins.

The main inhibitory system in the brain uses γ–aminobutyric acid (GABA) as a transmitter. γ–aminobutyric acid binds to three types of receptors – $GABA_A$ (Olsen and Venter, 1986), $GABA_B$ (Bowery *et al.*, 1989, 1991, 1993) and $GABA_C$ (Bormann and Feigenspan, 1995). *$GABA_A$ receptor* is a part of supra–molecular complex $GABA_A$ chloride ionophore and a consequence of its activation is opening of chloride channel and hyperpolarization of membrane potential (Olsen and Venter, 1986). A subclass of ionotropic GABA receptors, insensitive to the allosteric modulators of $GABA_A$ receptor channels such as barbiturates or benzodiazepines, was designated $GABA_C$ receptor.

$GABA_B$ receptors were pharmacologically distinguished from $GABA_A$ receptors as bicuculine–insensitive sites for GABA for which specific agonist is (–)–baclofen (Hill and Bowery (1981), Bowery *et al.*, (1983, 1984, 1985, 1987), Hill (1985)). $GABA_B$–receptors modulate their effectors via the activated free Gα and Gβγ subunits released from trimeric Gαβγ complex.

Various density gradient media were developed for cell fractionation and organelle isolation. These media, if possible, should not alter the cells or particles to be separated and should provide a proper density range for separation of one type of cells (or subcellular) membrane particles from another. The difficulties which have to be overcomed when viewed from the general point of view are represented by toxicity, osmotic pressure changes and penetration of a given chemical used for preparation density gradient medium into the particles which are being isolated or separated from each other (Rickwood, 1984).

Given these circumstances and in order to understand the profile of $GABA_B$–R' development as well as formation of LFP in frontal rat brain cortex in the neonatal period and during the early postnatal period more clearly, all the actual work has been done.

LFP represent the end–products of reactions involving free radical attack on biological molecules and can be formed, for example, in reactions between lipid peroxidation products, mainly unsaturated aldehydes, with compounds containing free amino groups. Although the mechanism of their formation and chemical identity has been revealed in many *in vitro* studies, the formation of LFP were not being analyzed before in the detailed manner, i.e. on the day by day basis.

3. ÚVOD

Extracelulární signály – světlo, hormony, neurotransmitery, feromony, aromatické látky a také kationty Ca^{2+} interagují a váží se na velkou rodinu plazmatických membránových receptorů, které jsou funkčně spojené s regulačními proteiny (G proteiny), – receptory spřažené s G proteinem. Při porovnání sekvencí aminokyselin jednotlivých receptorových proteinů, byly popsány tři hlavní rodiny GPCR.

Hlavní inhibiční systém v mozku používá jako transmitter kyselinu γ–aminomáselnou (GABA). Kyselina γ–aminomáselná se váže na tři typy receptorů: $GABA_A$ (Olsen a Venter, 1986), $GABA_B$ (Bowery *et al.*, 1989, 1991, 1993) a $GABA_C$ (Bormann a Feigenspan, 1995). $GABA_A$ receptor je součástí supra–molekulárního komplexu chloridového ionoforu, důsledkem jeho aktivace je otevření chloridových kanálů a hyperpolarizace membránového potenciálu (Olsen a Venter, 1986). Podtřída ionotropních GABA receptorů, necitlivých vůči alosterickým modulátorům $GABA_A$ kanálů (např. barbiturátům nebo benzodiazepinům), byla označena jako $GABA_C$ receptory.

$GABA_B$ receptory byly farmakologicky odlišeny od $GABA_A$ receptorů jako necitlivé vůči bikukulinu místa pro GABA, pro který je specifický agonista (–)–baclofen (Hill and Bowery (1981), Bowery *et al.*, (1983, 1984, 1985, 1987), Hill (1985)). $GABA_B$ receptory modulují jejich efektory prostřednictvím aktivovaných volných Gα a Gβγ podjednotek uvolněných z trimerního Gαβγ komplexu.

Pro buněčnou frakcionaci a izolaci organel byly vyvinuty různé hustotní gradienty. Média, pokud je to možné, by neměly ovlivňovat buňky nebo částice, které mají být oddělene a měly by zajistit řádný rozsah hustoty pro separaci jednoho typu buněk (nebo subbuněčných) membránových částic od druhého. Při pohledu z obecného hlediska, potíže, které by měly být překonáne jsou následující: toxicita, osmotické změny tlaku, penetrace uvedené chemické látky (používané pro přípravu hustotního gradientu) do částic, které jsou izolovány nebo od sebe oddělováne (Rickwood, 1984).

S ohledem na tyto okolnosti a za účelem porozumění vývojového profilu GABAB–R, stejně jako tvorby LFP ve frontální mozkové kůry potkana v novorozeneckém období a během časného postnatálního období, byla udělána tato práce.

LFP představují koncové produkty reakcí zahrnujících útok volných radikálů na biologické molekuly a můžou být vytvořeny, například, v reakcích mezi produkty peroxidace lipidů hlavně nenasycených aldehydů), se sloučeninami, které obsahují volné aminoskupiny. I když mechanismus jejich vzniku a chemická identita byly zjištěne v mnoha *in vitro* studiích, tvorba LFP ještě nebyla analyzována detailním způsobem, tedy den po dni.

4. AIMS OF THE THESIS

1) to improve and refine the method for isolation of plasma membrane fraction (PM) from frontal brain cortex.

The main problem in the past was to find an optimum compromise between the amount of protein applied per density gradient and the purity of PM preparation. Application of the high amount of protein in post–nuclear fraction (PNS) resulted in PM contaminated to the higher or lower degree by mitochondrial fragments. Furthermore, the recovery of PM protein, when compared with the starting homogenate or post–nuclear fraction, was not always reproducible and standard. The improved method was subsequently used for studies of opioid– and $GABA_B$–receptor signaling in frontal brain cortex (Bourova *et al.*, 2010; Ujcikova *et al.*, 2011, Ujcikova *et al.*, 2014).

2) to introduce the new method for determination of the number of $GABA_B$–R in PM prepared form the frontal rat brain cortex.

This can not be done by radiolabelled GABA itself because of the low–affinity of GABA for these receptors. Therefore, I have introduced the two radioligands, agonist [^{3}H]baclofen and antagonist [^{3}H]CGP54626A, carried out the direct saturation binding assays with increasing concentrations of these specific and highly radioactive ligands and determined the maximum number (Bmax) and dissociation constant (Kd) of their binding sites in various PM preparations (Kagan *et al.*, 2012). The Bmax values of [^{3}H]baclofen– and [^{3}H]CGP54626A–binding in PM were determined in parallel with [^{3}H]ouabain binding, which was used as an estimate of PM density of prototypical PM marker, Na^+/K^+–ATPase (Dlouha *et al.*, 2013). PM content of Na^+/K^+–ATPase was also used as a general marker of forebrain cortex development and maturation of PM protein composition.

3) determination of the number of $GABA_B$–receptors at different stages of ontogenetic development is not sufficient as the primary signal represented by binding of GABA to receptor sites oriented at the extracellular side of plasma membrane is transmitted into the cell interior by trimeric G proteins. These proteins transmit the signal further down–stream but also terminate and regulate the functioning of $GABA_B$–R pathway.

For ***this third aim*** of my work I used the high–affinity [^{35}S]GTPγS binding assay adapted to analysis of the brain tissue. This methodological improvement was based on the usage of relatively high GDP concentrations (20–30 μM) which suppressed the high basal level of [^{35}S]GTPγS binding (Bourova *et al.*, 2010; Kagan *et al.*, 2012).

4) to compare the ontogenetic profile of baclofen– and SKF–stimulated [^{35}S]GTPγS binding with the aim to define even the small difference between these two agents when stimulating the cognate G proteins.

Potent $GABA_B$–R agonist SKF97541 was described as a useful agent in treatment of at least some forms of epileptic seizures. The highest level of agonist–stimulated [^{35}S]GTPγS binding was detected at postnatal days 14 and 15. But, the effect of these two agonists on functional activity of $GABA_B$–R in the course of postnatal period was not the completely same (Kagan *et al.*, 2012).

5) to study the formation of lipofuscin–like pigments (LFP) in frontal rat brain cortex in the neonatal period and during the early postnatal period.

The generation of LFP represents an important marker of oxidative damage of the brain tissue by free oxygen radicals. Analysis of LFP was made first in the whole tissue homogenates (Wilhelm *et al.*, 2011), subsequently, LFP were determined in different subcellular membrane fractions: nuclear sediment, post–nuclear supernatant, mitochondria, microsomes, crude plasma membranes and cytosol. The results indicate that the highest accumulation of oxidative products takes place immediately after the birth; our results also indicate that brain LFP constitute a complex mixture of many chemical compounds whose composition is changing during development.

4. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

1) zlepšit a zdokonalit metodu izolace frakce plasmatických membrán z přední mozkové kůry.

Hlavním problémem v minulosti bylo najít optimální kompromis mezi množstvím aplikované na hustotní gradient bílkoviny a čistotou přípravovaných PM. Aplikace vysokého množství bílkoviny v post–nukleární frakci vedlo k izolaci PM kontaminovaných do vyšší nebo nižší míry mitochondriálními fragmenty. Kromě toho, znovuzískání PM proteinu ve srovnání s výchozím homogenátem nebo post–nukleární frakci nebylo vždy reprodukovatelné a standardní. Vylepšená technika byla následně použita pro studium opioidních a $GABA_B$–receptorů ve frontální mozkové kůře (Bourova *et al.*, 2010; Ujcikova *et al.*, 2011, Ujcikova *et al.*, 2014.).

2) zavést novou metodu pro stanovení počtu $GABA_B$–R v PM připravených z přední mozkové kůry potkana.

Toto nemůže být provedeno radioaktivně značenou GABA samotnou vzhledem k nízké afinitě GABA vůči těmto receptorům. Proto jsem zavedl přímé saturační vazebné studie se zvyšujícími se koncentracemi specifických a vysoce radioaktivních ligandů (agonisty [^{3}H]baclofenu and antagonisty [^{3}H]CGP54626A) a určil jsem maximální počet (Bmax) a disociační konstantu (Kd) jejich vazebných míst v přípravených PM (Kagan *et al.*, 2012). Hodnoty Bmax pro vazbu [^{3}H]baclofenu a [^{3}H]CGP54626A v PM byly stanoveny paralelně s [3H]ouabainovou vazbou, která byla použita jako odhad hustoty PM prototypickým PM markerem, Na^+/K^+–ATPázou (Dlouhá *et al*., 2012). Obsah Na^+/K^+–ATPázy byl také použit jako obecný marker vývoje přední mozkové kůry a zrání proteinového složení PM.

3) stanovení počtu $GABA_B$–receptorů v různých fázích ontogenetického vývoje není dostačující protože primární signál (prezentovány vazbou GABA na místa, která se nachází na extracelulární straně plazmatické membrány), se přenáší do nitra buňky pomocí trimerních G proteinů. Tyto proteiny přenášejí signál dále, ale také ukončují a regulují fungování signální dráhy $GABA_B$–R.

Pro **tento třetí cíl** své práce jsem použil vysokoafinní [^{35}S]GTPγS vazebné studie přizpůsobené analýze mozkové tkáně. Toto metodické zlepšení bylo založeno na použití relativně vysokých koncentrací GDP (20–30 μM), které potlačuje vysokou bazální úroveň [^{35}S]GTPγS vazby (Bourova *et al.*, 2010; Kagan *et al.*, 2012).

4) srovnat ontogenetický profil baclofenem a SKF97541 stimulované [^{35}S]GTPγS vazby s cílem definovat i malý rozdíl mezi těmito dvěma činidly při stimulaci příbuzných G proteinů.

Potentní $GABA_B$–R agonist SKF97541 byl popsán jako užitečný prostředek při léčbě alespoň některých formem epileptických záchvatů. Maximální baclofenem a SKF97541 stimulovaná vazba [^{35}S]GTPγS byla detekována během 14. a 15. dne po narození. Avšak, účinek těchto dvou agonistů na funkční aktivitu z $GABA_B$–R v průběhu postnatálního vyvoje nebyl uplně stejný (Kagan *et al.*, 2012).

5) prozkoumat tvorbu lipofuscinových pigmentů ve přední mozkové kůře krys v novorozeneckém a v časném postnatálním období.

Generace LFP představuje významný marker oxidačního poškození mozkové tkáně volnými kyslíkovými radikály. Analýza LFP byla provedena nejprve v celých tkáňových homogenátech (Wilhelm *et al.*, 2011.), následně LFP byly stanoveny v různých subcelulárních membránových frakcích: jaderném sedimentu, post–nukleárním supernatantu, mitochondriích, mikrosomech, hrubých plazmatických membránách a cytosolu. Výsledky ukazují, že nejvyšší koncentrace oxidačních produktů se vyskytuje bezprostředně po porodu; naše výsledky také naznačují, že LFP mozku představují komplexní směs mnoha chemických sloučenin, jejichž složení během vývoje se mění.

5. MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Experimental model: Rattus norvegicus var. Wistar

$GABA_B$–receptor agonists baclofen (β–p–chlorophenyl–GABA), SKF97541 [3–aminopropyl (methyl) phosphinic acid] and antagonist [^{3}H]CGP54626A

[^{35}S]GTPγS

[^{3}H]ouabain

Complete protease inhibitor cocktail

METHODS

- Isolation of plasma membrane–enriched fraction from rat brain cortex
- Agonist–stimulated [^{35}S]GTPγS binding (dose–responce and one–point assay)
- [^{3}H]CGP54626A binding (saturation)
- Lowry method for protein determination
- Immunoblot analysis
- [^{3}H]ouabain binding
- Fluorescent measurment of lipofuscin–like pigments
- HPLC analysis

5. MATERIALY A METODY

MATERIALY

Experimentální model: Rattus norvegicus var. Wistar

Agonisté $GABA_B$ receptorů baclofen (β–p–chlorfenyl–GABA), SKF97541 [3–aminopropyl (methyl) fosfinová kyselina] a antagonista [^{3}H] CGP54626A

[^{35}S]GTPyS

[^{3}H]ouabain

Kompletní inhibitor proteáz

METODY

- Izolace frakce obohacené plasmatickými membránami z mozkové kůry potkana
- Agonisty stimulovaná vazba [^{35}S]GTPγS (dávka–odpověď a jednobodový test)
- Vazba [^{3}H]CGP54626A (saturace)
- Lowryho metoda pro stanovení proteinů
- Imunoblotová analýza
- Vazba [^{3}H]ouabainu
- Fluorescenční měření LFP
- HPLC analýza

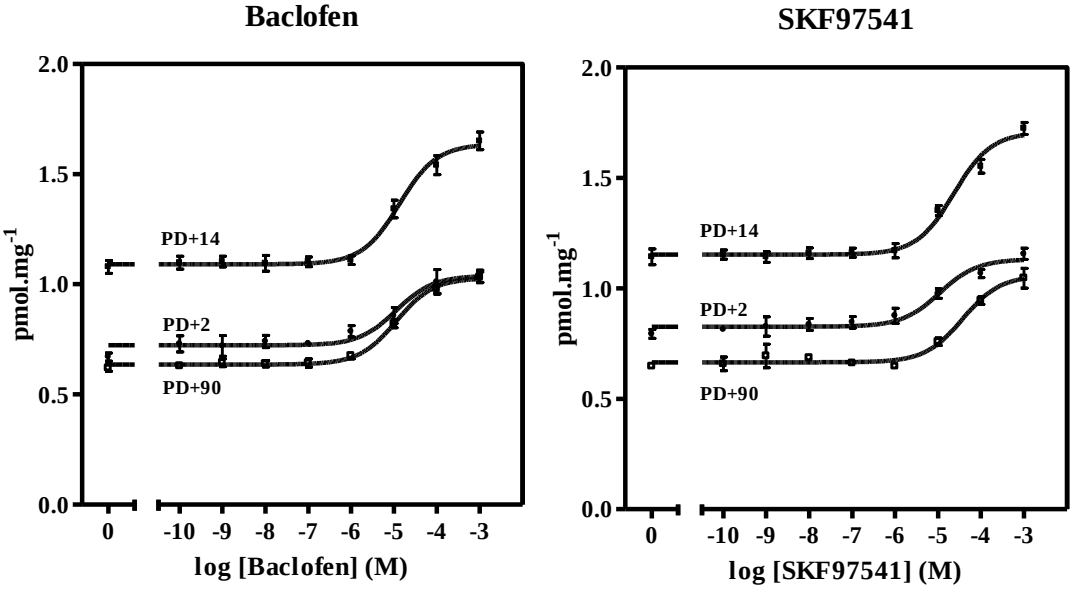
6. RESULTS

6.1. The ontogenetic development of $GABA_B$–receptor signaling cascade

Baclofen exhibited the significant ability to increase the basal level of [^{35}S]GTPγS binding measured in the absence of agonist (B_{basal}) already in 2–day–old animals (PD2). This ability was further increased in the course of the first two weeks of postnatal life (Fig. 1), but virtually unchanged when viewed over the whole period of brain development as the averaged dose–response curve measured in 2–days–old animals was not significantly different from that measured in adult rats (90–days old). The basal level of [^{35}S]GTPγS binding was also significantly increased between PD2 and PD14 and subsequently decreased to the adult level. The same result applied to the net–increment of agonist stimulation expressed as the difference between baclofen–stimulated and the basal level of [^{35}S]GTPγS binding. The % of baclofen–stimulation over the basal level of binding was unchanged.

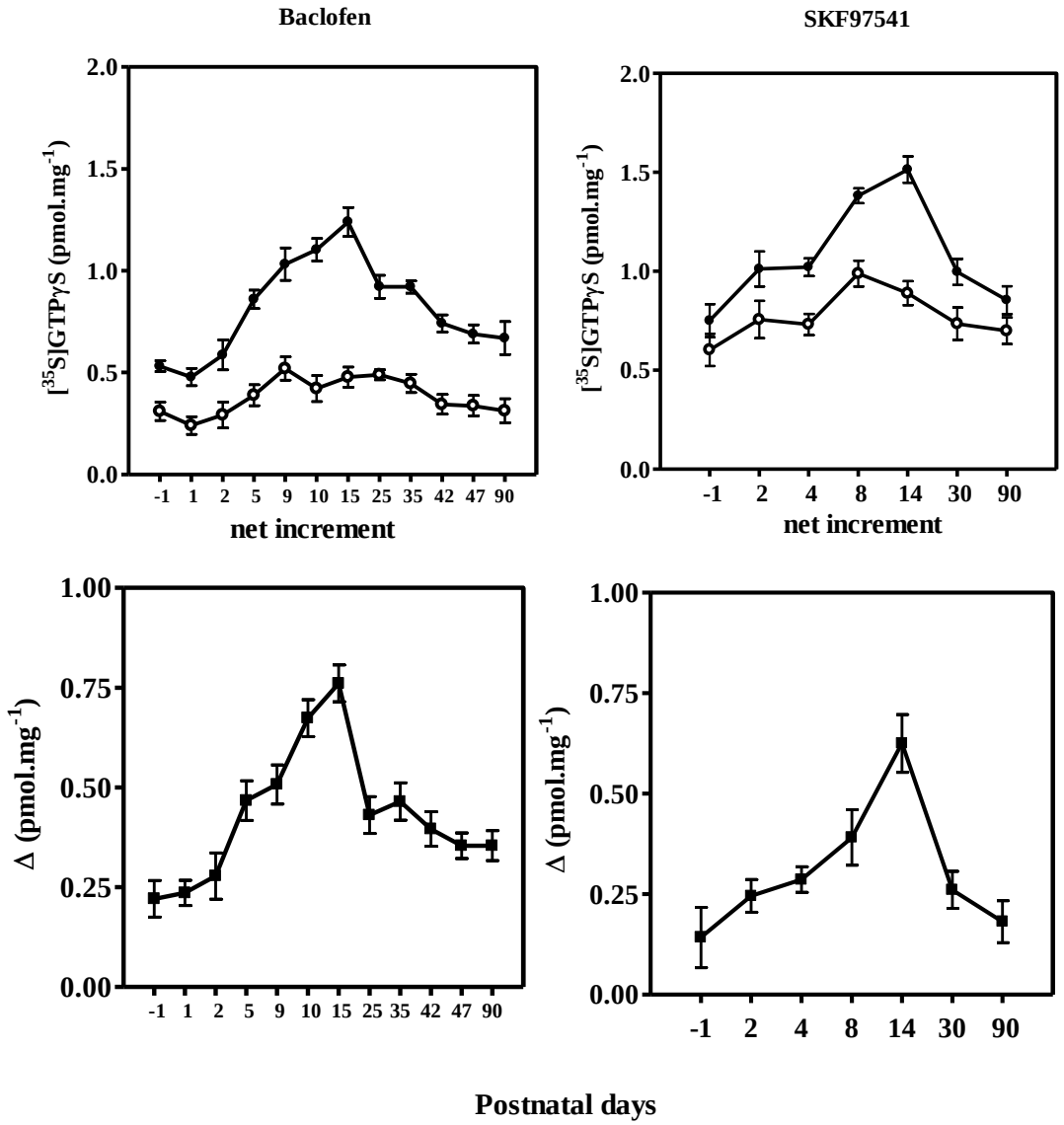
The developmental alteration of dose–response curves of SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding, analyzed in an independent set of PM preparations, was similar to that of baclofen, however, a substantial difference between the two agonists was also noticed. SKF97541 exhibited the significant ability to increase the basal level of [^{35}S]GTPγS binding already in 2–day–old animals. The maximum response of SKF97541 was increased between PD2 (B_{max} = 1.13 pmol x mg^{-1}) and PD14 (B_{max} = 1.71 pmol x mg^{-1}) and further development was reflected in decrease of SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding to the level in 90–days–old animals (B_{max} = 1.08 pmol x mg^{-1}), which was not significantly different from that in 2–days–old animals.

Fig. 1 Dose–response curves of baclofen and SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding in PM isolated from 2–, 14– and 90–day–old rats



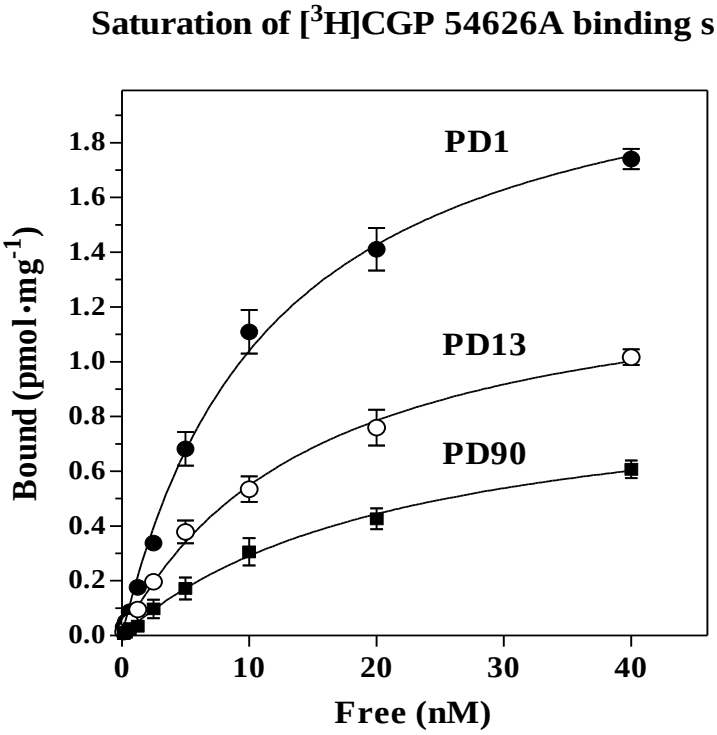
Determination of the dose–response curves of baclofen– and SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding in 1–, 15– and 90–days old rats was followed by the detailed analysis of ontogenetic profile of agonist–stimulated G protein activity in fetuses (–1) and in PM prepared from 1–, 2–, 4–, 5–, 9–, 10–, 14–, 15–, 25–, 30–, 35–, 42–, 47– and 90–days old rats. Data presented in Fig. 2 indicated clearly the existence of maximum of baclofen– and SKF97541–stimulated G protein activity at PD14 and PD15. Baclofen–stimulated, SKF97541–stimulated and the basal level of [^{35}S]GTPγS binding in adult animals were not significantly different from those detected in 2–days–old animals (PD2). Accordingly, the peak value of [^{3}H]GABA binding was detected at PD14 in rat brain cortical slices by quantitative autoradiography and this high level of [^{3}H]GABA binding subsequently declined to the adult level (Turgeon and Albin, 1994).

Fig. 2 Baclofen– and SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding; *one–point assay*



Plasma membrane density of $GABA_B$–R at different age intervals was determined by saturation binding study with specific antagonist [^{3}H]CGP54626A. Data presented in Fig. 3 indicated clearly that the highest PM density of $GABA_B$–R, estimated as the maximum binding capacity (B_{max}) of [^{3}H]CGP54626A binding sites, was detected in PM samples prepared from 1–day–old rats (2.27±0.08 pmol · mg^{-1}). The further development was reflected in a marked decrease of [^{3}H]CGP54626A binding as the B_{max} values of 1.38±0.05 and 0.93±0.04 pmol · mg^{-1} were determined in PM isolated from 13– and 90–days old rats, respectively. The dissociation constant (K_d) was increased from 11.8 nM (PD1) to 15.3 nM (PD13) and 22.1 nM (PD90), indicating the decreased affinity and qualitative change of $GABA_B$–R binding sites towards this antagonist in the course of rat brain cortex maturation. The decrease in affinity of [^{3}H]CGP54626A binding (expressed as 1 / K_d), observed together with the decrease in affinity of SKF97541–response of G proteins (Fig. 1), suggests a partial agonistic nature of [^{3}H]CGP54626A interaction with $GABA_B$–R which would be altered in the course of brain cortex ontogenesis.

Fig. 3 Saturation of [^{3}H]CGP54626A binding sites in PM isolated from 1–, 13– and 90–day–old rats



6.2. The ontogenetic development of oxidative damage of the brain; *generation of lipofuscin–like pigments (LFP)*

6.2.1. Study of lipofuscin–like pigments in brain tissue homogenates.

The aim of our first study of LFP production in rat brain (Wilhelm at al., 2011) was to get information about free oxygen radical damage proceeding in rat brain cortex before and shortly after the birth. We have also analyzed the whole postnatal period up to the postnatal–day–90 (PD90). Our studies were performed with the tissue homogenates prepared from animals of different ages: *group A*, 7 days before birth; *group B*, 1 day before birth; *group C*, postnatal day 1; *group D*, postnatal day 2; *group E*, postnatal day 5; *group F*, postnatal day 10; *group G*, postnatal day 15; *group H*, postnatal day 25; *group I*, postnatal day 35; *group J*, 90–days–old animals. For a detailed characterization of fluorescent properties of LFP, we used the fluorescence spectroscopy methods comprising the 3–dimensional spectral arrays with synchronous screening of the fluorescence spectra. Furthermore, the total LFP were resolved into several fractions by means of chloroform–metanol 3 : 1 extraction followed by HPLC with fluorescence detection.

We have shown that the brain LFP constitute a complex mixture of very many different chemical compounds (fluorophores) whose composition is changing in the course of brain development, Figs. 4, 5 and 6**).** Our results also indicated that the *highest accumulation of oxidative products in the forebrain, when tested by detection of LFP, occurred immediately after the birth, at PD2 and PD4* (Fig. 5). This result may be interpreted as indication of the high oxidative damage proceeding in rat brain shortly after the birth.

Fig. 4 Examples of 3D–fluorescence excitation spectra determined in brain chloroform extracts. (A) 7 days before birth, (D) 2 days after the birth, (J) 90 days after the birth

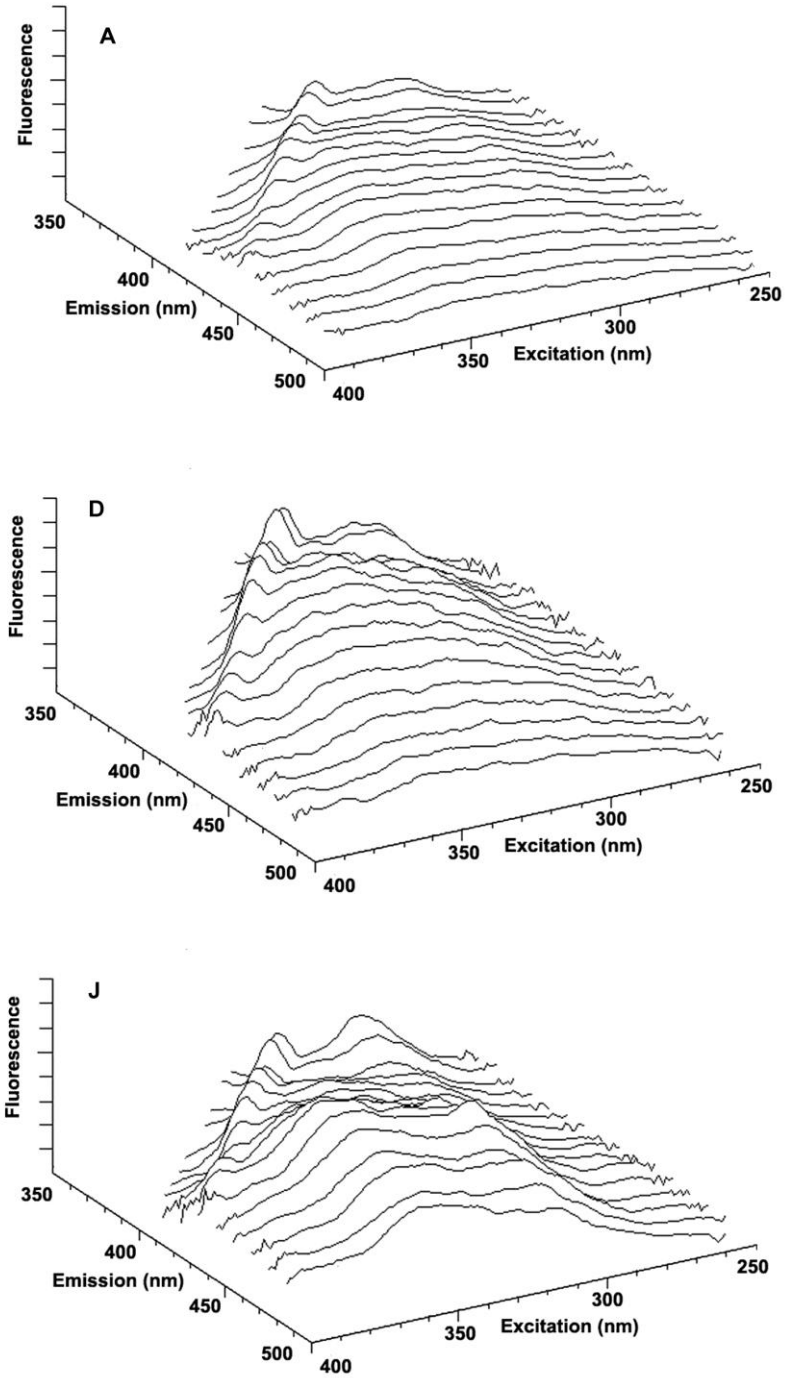


Fig. 5 Quantitative determination of three major LFP fluorophores found in 3D spectra.

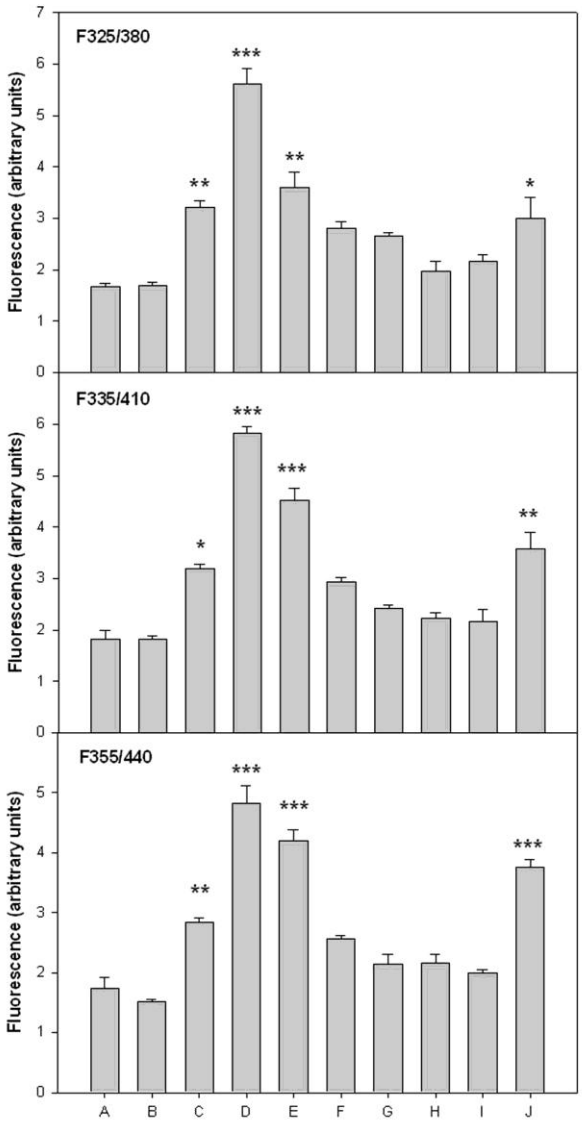
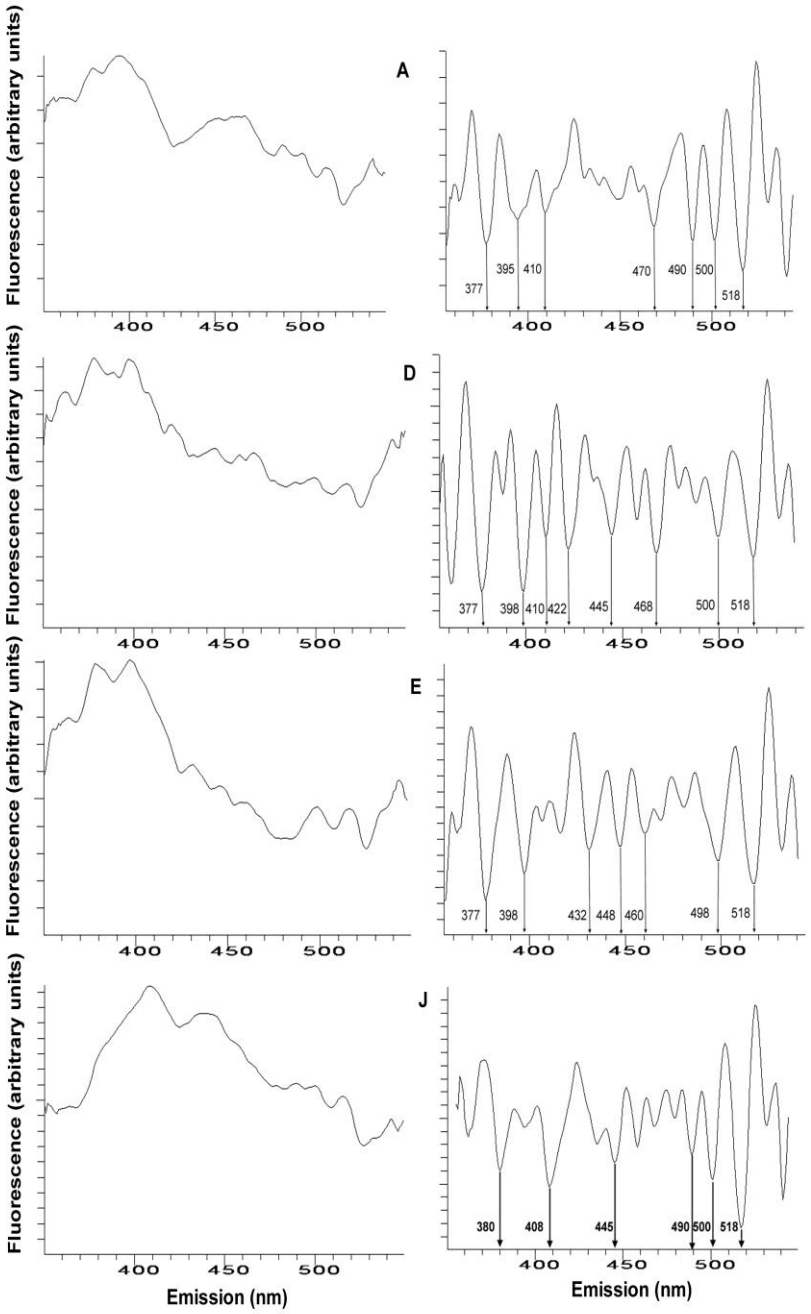


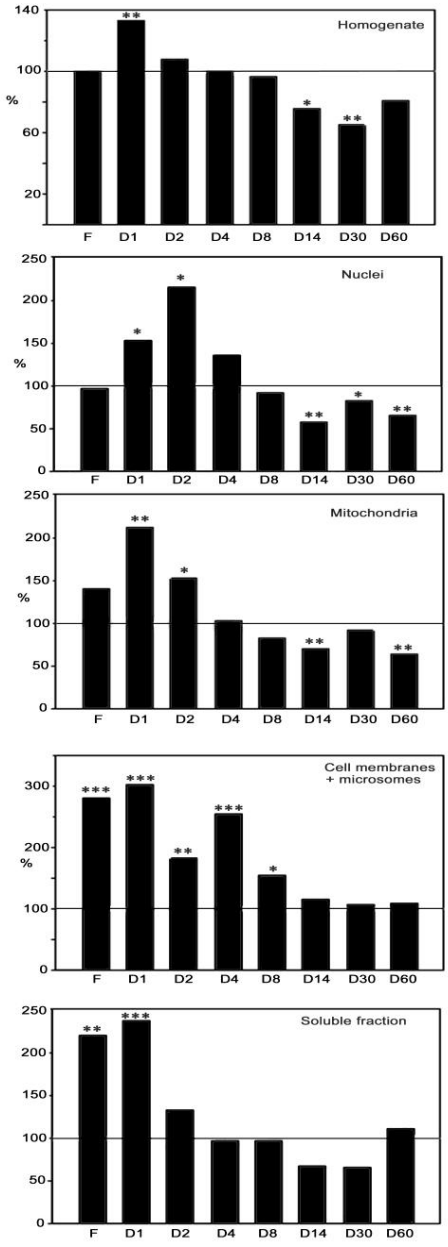
Fig. 6 Examples of synchronous fluorescence spectra (left–hand panels) and their 2nd derivatives (right–hand panels). (A) 7 days before the birth; (D) postnatal day 2; (E) postnatal day 5; (J) 3 month old animals.



6.2.2. Study of lipofuscin–like pigments in subcellular membrane fractions.

The aim of our second study of LFP in the brain (Wilhelm *et al*., 2014; manuscript in preparation) was to determine the ontogenetic development of LFP production in different subcellular membrane fractions (post–nuclear fraction, mitochondria, miscrosomes, crude plasma membranes, cytosol) and to compare the ontogenetic patterns observed in these membranes with data obtained by analysis of the whole tissue homogenates. The LFP level in fetuses was taken as a reference value corresponding to 100%. The LFP content in different membrane fractions collected at different time intervals of brain development were expressed as percentage of this value. The results are presented in Fig. 7.

Fig. 7 LFP levels in brain homogenate and subcellular fractions during development. Foetal homogenate level was taken as 100%. Statistical significance: * P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001



Judged from an overall point of view, the results were in full accordance with our previous study of tissue homogenates (Wilhelm *et al*. 2011). However, analysis of LFP in 5 subcellular fractions has also brought some unexpected observations. First, it was found that the high LFP levels were detected already in the foetal brain in ***soluble*** *fraction* (220%) and in ***crude*** *plasma membrane* fraction (CM) representing the mixture of vesicles derived from plasma membrane and microsomes (282%), whilst the LFP level in other fractions was not increased. The soluble fraction was still increased on PD1 (236%) and then returned to the control level and stayed unchanged throughout the whole time scale of experiment. *In the soluble fraction, we might expect lipoproteins containing the oxidized lipids with characteristics of LFP. Apparently, these lipoproteins are quickly decomposed after birth.*

In "crude plasma membranes" containing the small vesicular fragments derived from plasma membrane, endoplasmic reticulum and Golgi, the increased LFP level stayed until PD8. This was a unique observation when compared with other membrane types, as the LFP levels in other fractions were increased only up to PD2. Detection of this prolonged LFP increase in CM might indicate a change of this cell structure proceeding well beyond the birth.

LFPs in mitochondria were increased on PD1 (212%) and PD2 (152%). Afterwards, they returned to normal levels and were further decreased on PD14 (70%) and PD60 (64%). Thus, and as already noticed in our previous analysis of brain tissue homogenates (Wilhelm *et al.*, 2011), the increase of LFPs immediately after birth (PD1 and PD2) may be interpreted as an indication of an intensive aerobic metabolism accompanied by free radical production and consequent damage of membrane structures. The decrease of mitochondrial and nuclear LFP in samples collected from older rats (PD8–PD14) might be an indication of the high mitochondrial turnover proceeding in this period. The newly formed mitochondria, containing the low amount of LFP appear and dilute the concentration of these substances in the whole MITO fraction.

In nuclei, LFP was increased at PD1 (152%) and PD2 (215%). This increase was followed by decrease below the control value observed at PD14 (58%), PD30 (82%) and PD60 (65%). Nuclear membrane contains the electron transfer system analogical to that of endoplasmic reticulum which can be the source of free radicals and LFP. In similarity to mitochondria, the decrease of LFP level at PD8 and PD14 might be caused by an intensive cell proliferation, when the newly formed nuclei, containing less LFP, are merged into the overall pool detected in nuclear fraction.

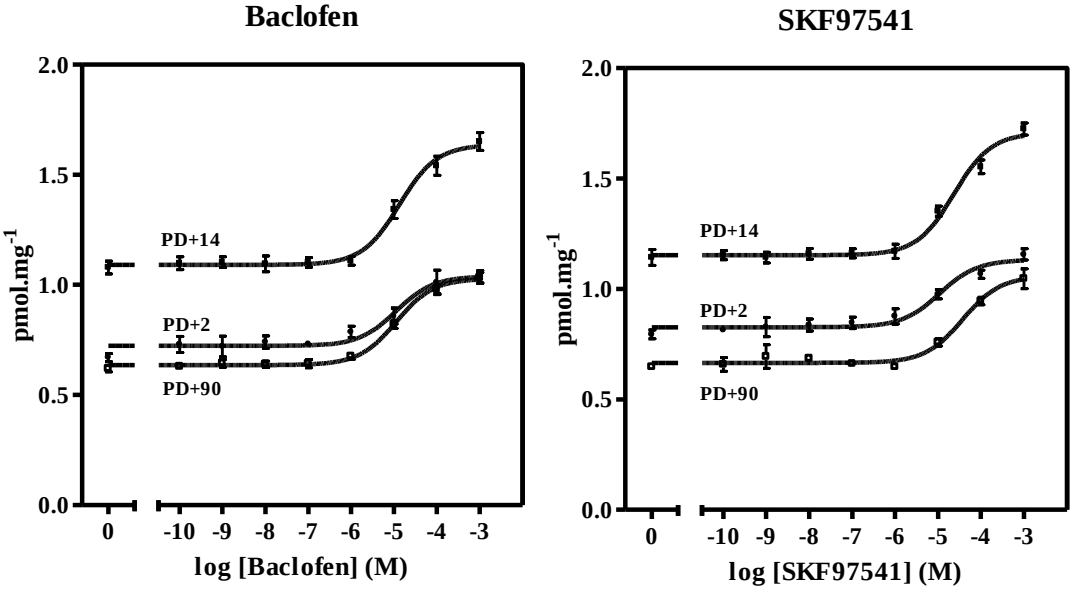
6. VÝSLEDKY

6.1. Ontogenetický vývoj signalizační kaskády $GABA_B$–receptorů

Baclofen vykazoval významnou schopnost zvyšovat bazální úroveň vazby [^{35}S]GTPγS (měřene v nepřítomnosti agonisty (B_{basal})) již u dvoudenních zvířat (PD2). Tato schopnost se v průběhu prvních dvou týdnů postnatálního života dále zvýšovala (Obr. 1), ale v podstatě se neměnila při pohledu na celou dobu vývoje mozku, protože zprůměrovaná křivka dávka–odpověď, změřená u dvoudenních zvířat se významně nelišíla od změřené u dospělých potkanů (PD90). Bazální úroveň vazby [^{35}S]GTPγS byla také významně zvýšena mezi PD2 a PD14 a následně se snižovala během vyvoje. Stejný výsledek vztahuje na přírůstek (net–increment) stimulace agonistou, vyjádřený jako rozdíl mezi baclofenem stimulovanou [^{35}S]GTPγS vazbou a jeji bazální úrovní. % stimulace baclofenem nad bazální úrovni se neměnily.

Vývojová změna křivek dávka–odpověď pro SKF97541 stimulovanou [^{35}S]GTPγS vazbu, analyzováná v samostatně přípravené sadě PM, byla podobná baclofenu, avšak podstatný rozdíl mezi těmito dvěma agonisty byl také zaznamenán. SKF97541 vykazoval významnou schopnost zvyšovat bazální úroveň [^{35}S]GTPγS vazby již během 2. dne po narození. Maximální odezva SKF97541 byla zvýšena mezi PD2 (Bmax = 1,13 pmol x mg^{-1}) a PD14 (Bmax = 1,71 pmol x mg^{-1}) a další vývoj se odráží ve snížení SKF97541–stimulované [^{35}S]GTPγS vazby (Bmax = 1,08 pmol x mg^{-1}), což se významně neliší od dvoudenních zvířat.

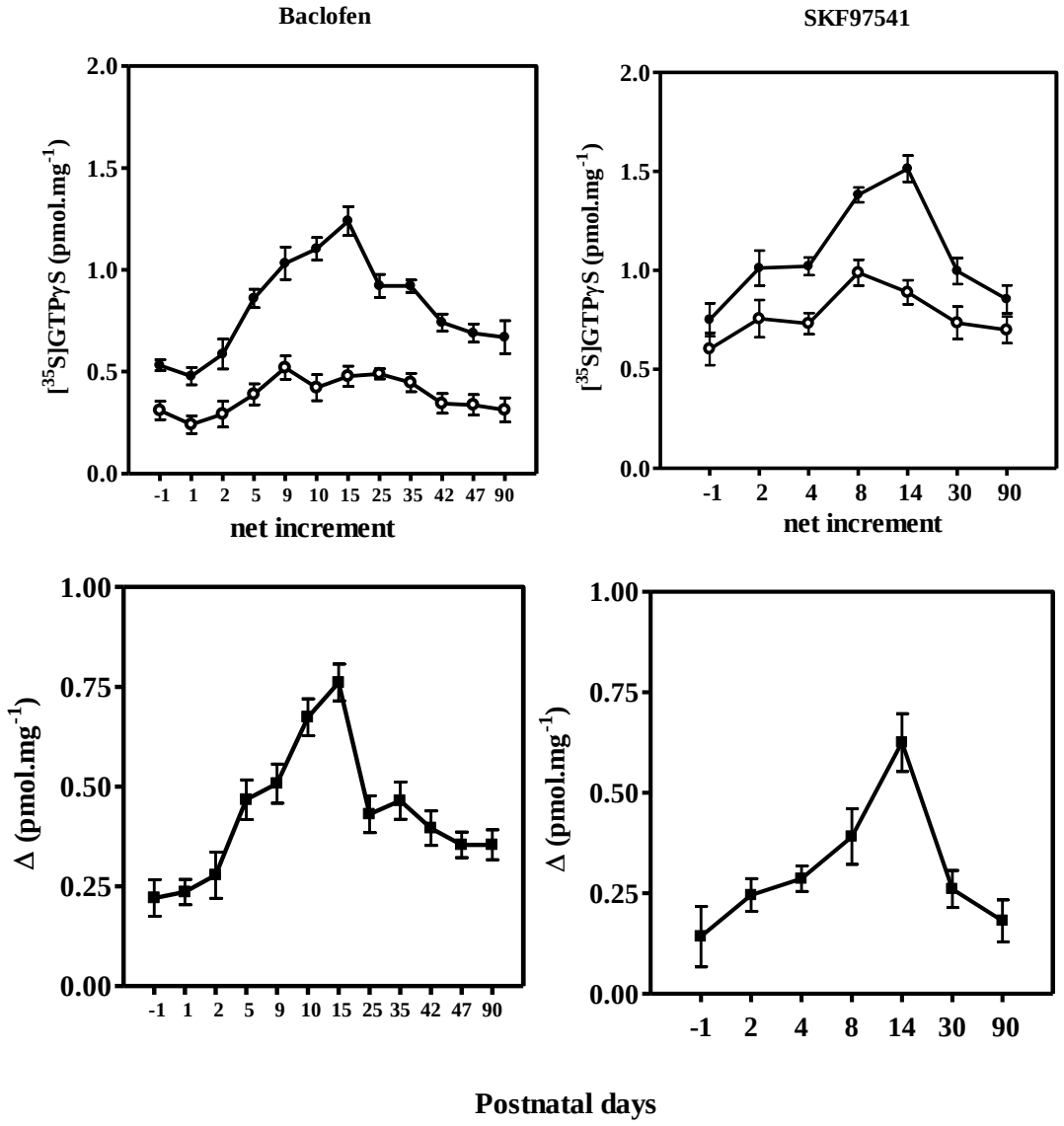
Obr. 1 Křivky dávka–odpověď pro baclofenem a SKF97541 stimulovanou [^{35}S]GTPγS vazbu v PM isolovaných z 2–, 14– a 90–denních krys



Po stanovení křivek dávka–odpověď pro baclofenem a SKF97541 stimulovanou vazbu [^{35}S]GTPγS u 1–, 15– a 90–denních krys, následovala podrobná analýza ontogenetického profilu agonisty stimulované aktivity G proteinu u plodů (–1) a v PM, připravných z 1–, 2–, 4–, 5–, 9–, 10–, 14–, 15–, 25–, 30–, 35–, 42–, 47– a 90–dennich zvířat. Údaje uvedené na Obr. 2 jasně ukazují existenci maximální baclofenem a SKF97541 stimulované aktivity G

proteinu během PD14 a PD15. Baclofenem stimulovaná, SKF97541 stimulovaná a bazální úroveň vazby [^{35}S]GTPγS u dospělých zvířat se významně nelišila od 2–denních zvířat (PD2). V souladu s tímto výsledkem, maximální hodnota vazby [^{3}H]GABA (měřena pomocí kvantitativní autoradiografií v kortikálních řezech) byla detekována během 14. dne po narození a tato vysoká úroveň vazby [^{3}H]GABA se následně snížila na úroveň dospělých krys (Turgeon and Albin, 1994).

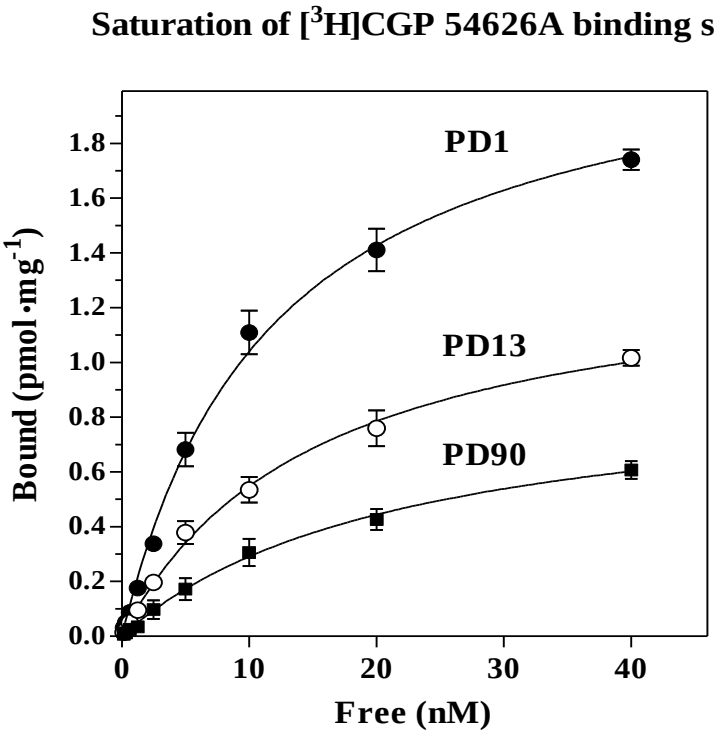
Obr. 2 Baclofenem a SKF97541 stimulována vazba [^{35}S]GTPγS; *one–point assay*



Hustota $GABA_B$–R v plasmatických membránach v různých věkových intervalech byla stanovena pomocí saturační vazebné studie s využitím specifického antagonisty [^{3}H]CGP54626A. Údaje uvedené na Obr. 3 jasně ukazují, že největší hustota $GABA_B$–R v plasmatických membránach (stanovena jako maximální vazebná kapacita (Bmax) vazebných míst pro [^{3}H]CGP54626A) se vyskytuje ve vzorcích připravených z 1–denních

krys (2.27±0.08 pmol · mg^{-1}). Další vývoj se odrazil ve výrazném poklesu vazby [^{3}H]CGP54626A (viz hodnoty B_{max} 1.38±0.05 a 0.93±0.04 pmol · mg^{-1} stanovene v PM izolovaných z 13– a 90–dennich zvířat). Disociační konstanta (Kd) se zvýšila z 11,8 nM (PD1) na 15,3 nM (PD13) a 22,1 nM (PD90), což naznačuje snížení afinity a kvalitativní změny $GABA_B$–R vůči [^{3}H]CGP54626A v průběhu zrání krysí mozkové kůry. Pokles afinity vazby [^{3}H]CGP54626A (vyjádřeno jako 1 / Kd), pozorovany spolu se snížením afinity odpovědi G proteinů vůči SKF97541 (Obr. 1), naznačuje částečnou agonistickou přírodu interakci [^{3}H]CGP54626A s $GABA_B$–R, která se mění v průběhu vývoje mozkové kůry.

Obr. 3 Saturace vazebných míst pro [^{3}H]CGP54626AA v PM izolovaných z 1–, 13– a 90– denních krys



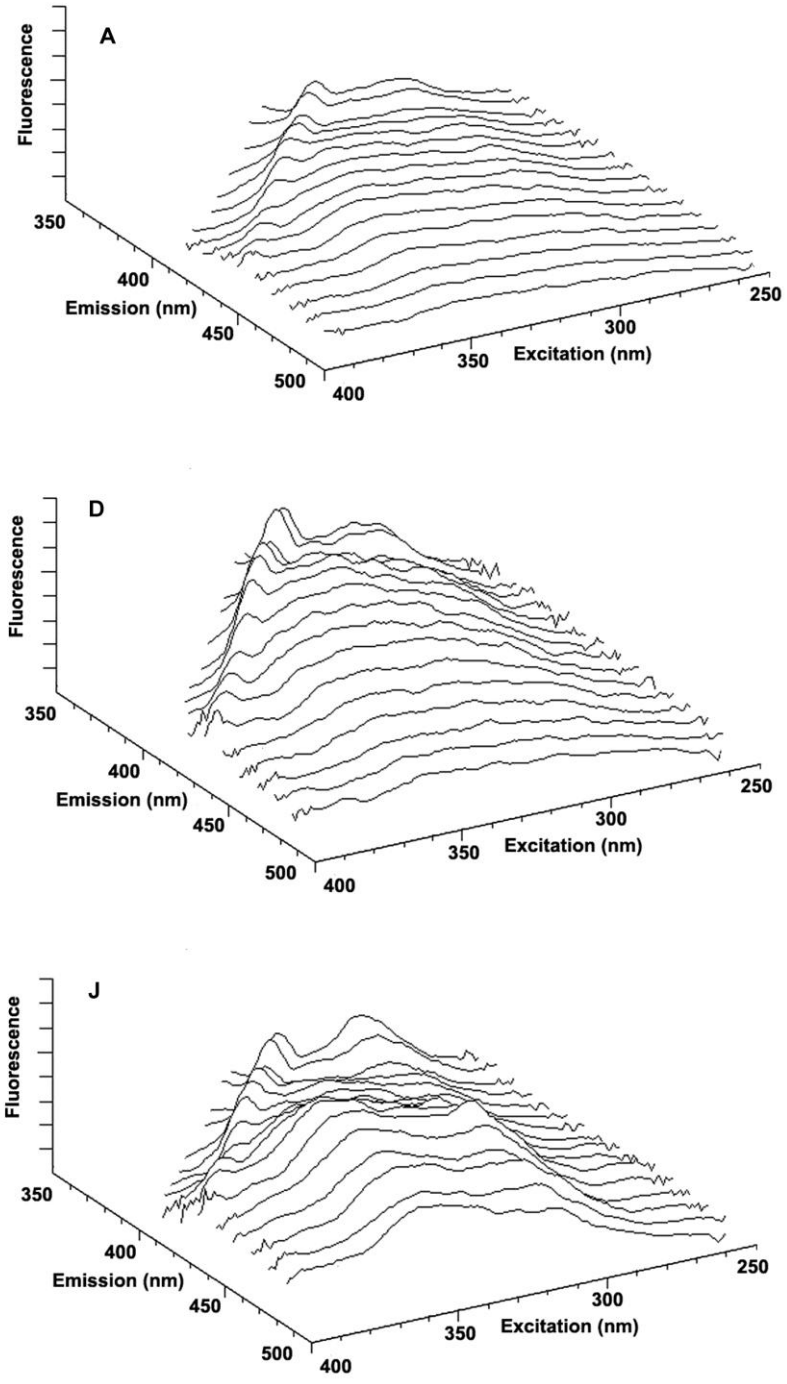
6.2. Ontogenetický vývoj oxidačního poškození mozku; generace lipofuscinových pigmentů

6.2.1. Studium lipofuscinových pigmentů v homogenátech mozkové tkáni

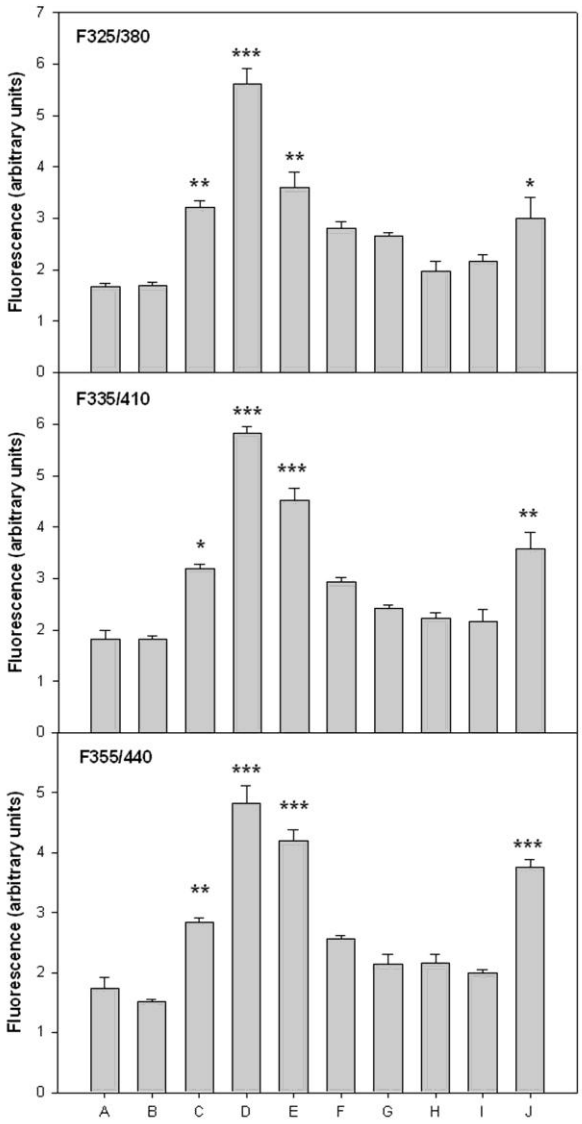
Cílem první studie vytváření LFP v krysím mozku (Wilhelm *et al*., 2011) bylo získání informace o poškození volnými kyslíkovými radikály které vzniká v přední mozkové kůře krys před a krátce po narození. Dále jsme analyzovali celé postnatální období až do 90. dne po narození (PD90). Naše studie byly provedeny ve tkáňových homogenátech připravených ze zvířat různého věku: A, 7 dnů před porodem; skupina B, 1 den před porodem; skupina C, postnatální den 1; skupina D, postnatální den 2; skupina E, postnatální den 5; skupina F, postnatální den 10; skupina G, postnatální den 15; skupina H, postnatální den 25; skupina I, postnatální den 35; skupina J, 90–denní zvířata. Pro detailní charakterizaci fluorescenčních vlastností LFP, jsme použili metody fluorescenční spektroskopie, zahrnující 3–dimenzionální spektrální pole s synchronní projekci fluorescenčního spektra. Kromě toho, celkové LFP byly rozpuštěny do několika frakcí pomocí extrakcí chloroform–metanol 3: 1 s následnou HPLC s fluorescenční detekcí.

Ukázali jsme, že LFP mozku představují komplexní směs velmi mnoha různých chemických sloučenin (fluoroforů), jejíž složení se mění v průběhu vývoje mozku (Obr. 4, 5 a 6). Naše výsledky také ukázaly, že k nejvyššímu hromadění oxidačních produktů v předním mozku (při detekci LFP) dochází bezprostředně po porodu (mezi PD2 a PD4, Obr. 5). Tento výsledek lze interpretovat jako důkaz vysokého oxidačního poškození které probíhá v mozku potkana krátce po narození.

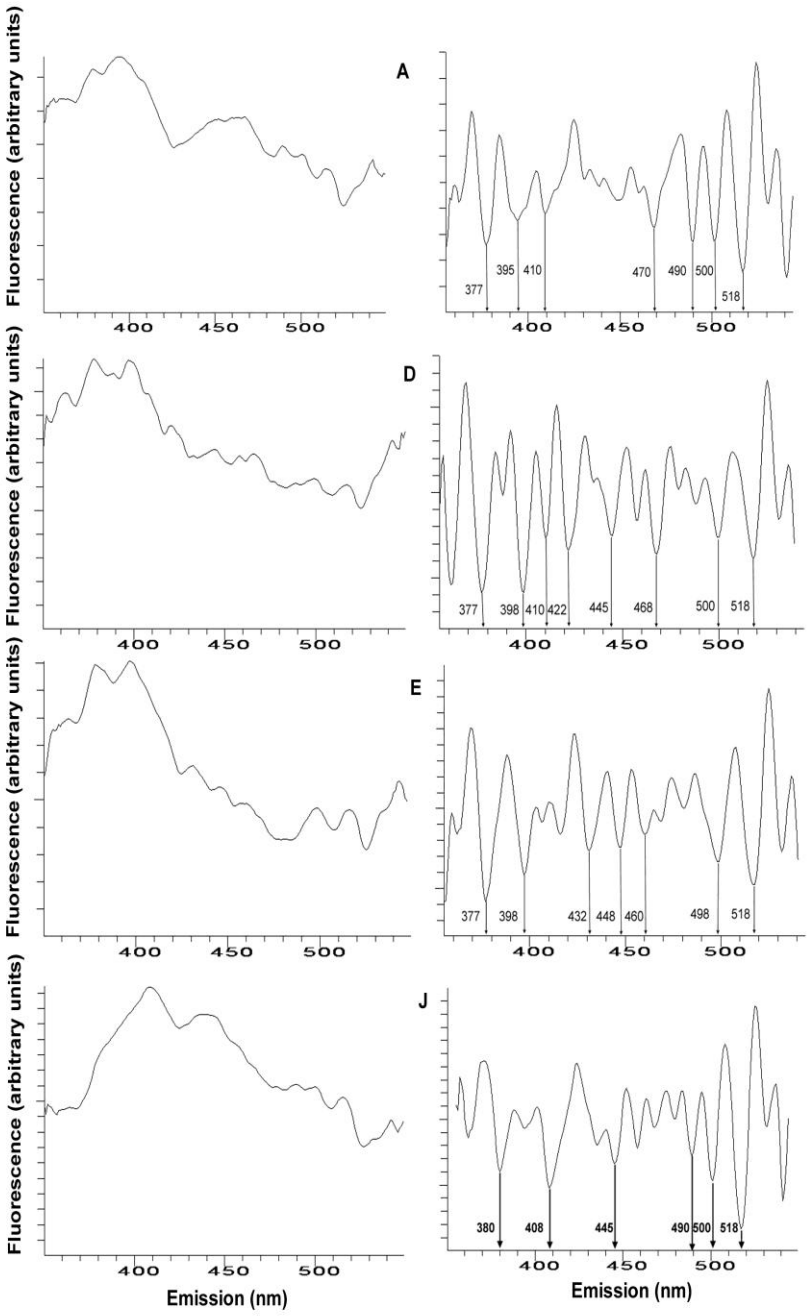
Obr. 4 Příklady 3D–fluorescenčních excitačních spekter stanovených v chloroformových extraktech mozku. (A) 7 dní před narozením, (D) 2 dny po narození, (J) 90 dní po narození



Obr. 5 Kvantitativní stanovení třech hlavních fluoroforů LFP, nalezených v 3D spektru



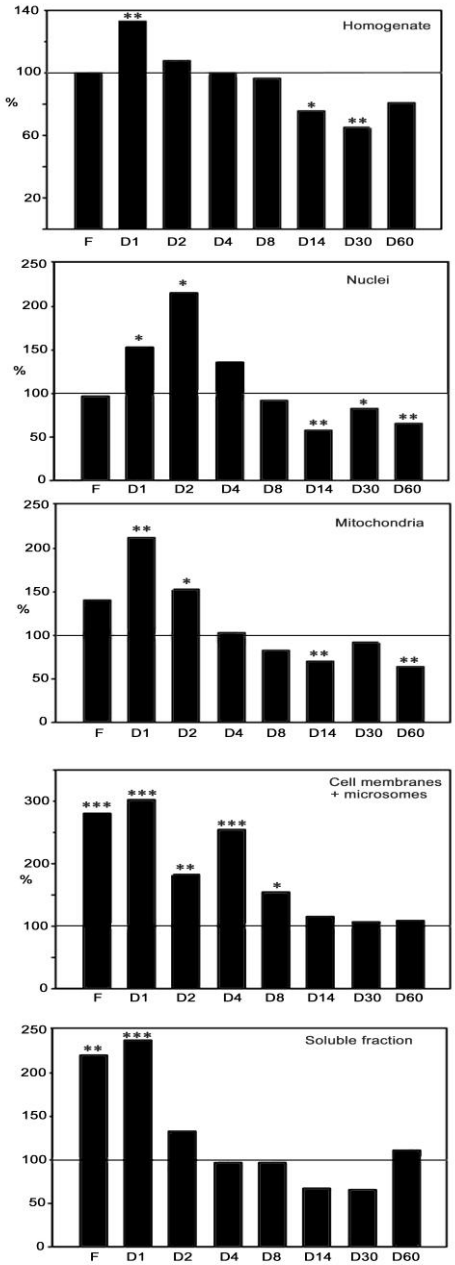
Obr. 6 Příklady synchronních fluorescenčních spekter (levý panel) a jejich druhých derivátů (pravý panel). (A) 7 dnů před porodem; (D) postnatální den 2; (E) postnatální den 5; (J) 3–měsíční zvířata.



6.2.2. Studium lipofuscinových pigmentů v subcelulární membránové frakci

Cílem naší druhé studie LFP v mozku (Wilhelm *et al.*, 2014; článek se připravuje) bylo zjistit ontogenetický vývoj tvorby LFP v různých subcelulárních membránových frakcích (v post–nukleární frakci, mitochondriích, miscrosomech, hrubých plazmatických membránach, cytosolu) a porovnat ontogenetické patterny pozorované v těchto membránách s údaji získanými analýzou celých tkáňových homogenátů. Hladina LFP u plodů byla přijata jako referenční hodnota, která odpovídá 100%. Obsah LFP v různých membránových frakcích odebraných v různých časových intervalech mozkového vývoje byl vyjádřen jako procento této hodnoty. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 7.

Obr. 7 Obsah LFP v mozkovém homogenátu a subcelulárních frakcích během vývoje. Fetální úroveň homogenátu vzata jako 100%. Statistická významnost: * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001



Z celkového hlediska, výsledky jsou plně v souladu s naší předchozí studii tkáňových homogenátu (Wilhelm *et al.,* 2011). Nicméně, analýza LFP v pěti subcelulárních frakcích přinesla nečekané výsledky. Za prvé bylo zjištěno, že vysoké hladiny LFP byly objeveny již v fetálním mozku, v rozpustné frakci (220%) a hrubých plazmatických membránach (což je směs váčků odvozených z plazmatické membrány a mikrosomů; 282%), zatímco hladina LFP v dalších frakcích nebyla zvýšena. Hladina LFP v rozpustné frakci byla zvýšena i během prvního dne po narození (236%), a pak se vrátila k kontrolní úrovni a zůstala beze změny v celém časovém měřítku experimentu. Mohli bychom očekávat, že lipoproteiny rozpustné frakci obsahují oxidované lipidy s vlastnostmi LFP. Zdá se, že se tyto lipoproteiny rychle rozkládají po narození.

Ve frakci hrubých plazmatických membrán (která obsahuje malé váčky odvozené z plazmatické membrány, endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu) zvýšená hladina LFP přetrvávala až do 8. postnatálního dne. Toto je unikátní pozorování ve srovnání s jinými typy membrán, protože hladina LFP v jiných frakcích byla zvýšená jenom do PD2. Detekce tohoto zvýšení LFP v hrubých membránách může znamenat změnu této buněčné struktury, která pokračuje i po porodu.

Úroveň LFP v mitochondriích byla zvýšena během PD1 (212%) a PD2 (152%), pak se vrátila na normální úroveň a dál se snižovala – 70% (PD14) a 64% (PD60). Jak již bylo uvedeno v předchozí analýze homogenátu mozkové tkáně (Wilhelm *et al.,* 2011), zvýšení LFPs ihned po porodu (PD1 a PD2) může být interpretováno jako svědectví intenzivního aerobního metabolismu doprovázeného výrobou volných radikálů a následném poškozením membránových struktur. Pokles mitochondriálních a jaderných LFP ve vzorcích odebraných ze starších potkanů (PD8–PD14) může svědčit o vysokém mitochondriálním obratu v tomto období. Nově vytvořená mitochondrie, která obsahuje malé množství LFP, objeví se a zředí koncentrace těchto látek v celé mitochondriální frakci.

V jádrech, úroveň LFP byla zvýšena během PD1 (152%) a PD2 (215%). Toto zvýšení bylo následováno poklesem pod kontrolní hodnoty – PD14 (58%), PD30 (82%) a PD60 (65%). Jaderná membrána obsahuje obdobný jako u endoplazmatického retikula systém přenašečů elektronů, který může být zdrojem volných radikálů a LFP. V podobnosti s mitochondrií, snížená hladina LFP během PD8 a PD14 může být způsobena intenzivní buněčnou proliferací, kdy se nově vzniklé jádra (obsahující méně LFP) jsou sloučeny do celkové nukleární frakci.

7. DISCUSSION

7.1. The ontogenetic development of $GABA_B$–receptor signaling cascade

The highest maximum response (efficacy) of baclofen– and SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding was measured at postnatal day 14 and 15 and afterward, the ability of these two $GABA_B$–R agonists to increase activity of G proteins decreased continuously towards the adult level (Fig. 2). Accordingly, the peak value of [^{3}H]GABA binding was detected at PD14 in rat brain cortical slices by quantitative autoradiography and this high level of [^{3}H]GABA binding subsequently declined to the adult level (Turgeon and Albin, 1994).

The existence of the maximum of coupling efficacy between $GABA_B$–R and G proteins, which was observed in "opening of eyes period" at PD14 and PD15, may be interpreted as an overlap between the two opposite regulatory effects: the stimulation which is stronger at age intervals before this period and inhibition, which prevails in older rats.

Data presented in my work (Figs 1 and 2) indicated a noticeable extent of compatibility of our present results with experimental data obtained before by functional assays of adenylyl cyclase (AC) activity in the presence or absence of $GABA_B$–R agonists, (Ihnatovych *et al.*, 2002). Maximum activation of baclofen– and SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding at PD14 and PD15 coincided with the developmental profile of AC activity. The maximum of agonist–stimulated G protein activity (Fig. 2) as well as basal, fluoride–, GTP– and forskoline–stimulated AC was found in the same period of brain development, i.e. between PD10 and PD15. However, a marked difference between the two sets of data was noticed as well. Maturation of functional coupling of $GABA_B$–R with G proteins preceded maturation of AC system because AC activity was very low at birth while both baclofen and SKF97541 exhibited significant efficacy already at PD2 (Fig. 1).

The highest plasma membrane density of $GABA_B$–R determined by saturation binding study with specific antagonist [^{3}H]CGP54626AA was observed shortly after the birth (at PD1) and subsequently decreased in 13– and 90–day–old rats (Fig. 3). It may be therefore suggested that the physiological significance of the high receptor number and significant efficacy of coupling of $GABA_B$–R with G proteins shortly after the birth (at PD1 and PD2) is related to some other effectors but AC–cAMP system. Ionic channels regulated by the free $G_o\alpha$ and Gβ subunits represent the primary candidates for such effectors (Newberry *et al.*, 1984a,b, Gähwiler *et al.*, 1985, Bormann 1988, Bowery *et al.*, 1989).

Comparison of EC_{50} values of baclofen–stimulated [^{35}S]GTPγS binding indicated no significant difference in PM samples isolated from 2–, 14– and 90–day–old rats. Contrarily, the EC_{50} values of G protein stimulation by SKF97541 were clearly increased from the birth to adulthood. This result suggests a developmental decrease in affinity of $GABA_B$–R response for the latter agonist and it is compatible with electrophysiological studies of brain function indicating the differences in sensitivity of $GABA_B$–R to different agonists (Bernasconi *et al.*, 1992, Hosford *et al.*, 1992, Lin *et al.*, 1993, Marescaux *et al.*, 1992). Furthermore, epileptological studies of brain function indicated that anticonvulsant action of baclofen was unchanged during postnatal period (Kubová *et al.*, 1996); simultaneously, the ontogenetic profile of anticonvulsant action of SKF97541 was not identical with that of baclofen (Mareš 2008). Thus, the time–span between PD12 and PD18 represented the most critical period from this point of view.

7.2. Postnatal ontogenesis of oxidative damage of the brain

LFP were used as a tool to assess the extent of ROS formation in brain cortex of rats during early postnatal development. The highest accumulation of these compounds was found immediately after birth and the level of these compounds was subsequently falling down to the three months of age, which is believed to represent a period when ageing starts in rats. Although the increased free radical production shortly after the birth is to be expected because of the rapid increase in oxygen concentration in the brain of new born animals and absence of fully functional mitochondria at this age interval, the detection of the final products of peroxidative damage (LFP) has not been analyzed before in the detailed manner, i.e. on the day by day basis.

When considering the up–to–date literature data from the broader scope of view, ROS–mediated oxidative damage of DNA was demonstrated in rat brain, liver, kidney and skin during the first few hours after the birth (Randerath *et al.,* 1997). Lungs were not affected. The brain lesions were considered as substantial and were similar to or even greater than the lesions in senescent, 24–month old rats. The concept of oxidative stress generated after the normal birth was also supported by the finding of a pronounced neonatal decreases in the hepatic GSH/GSSG ratio in rats (Sastre *et al.,* 1994, Pellardo *et al.,* 1991). Also the product of membrane lipid peroxidation, malonaldehyde, exhibited a transient rise after the birth in rat liver and kidney (Gunther *et al.,* 1993). The tissue specificity of manifestation of oxidative damage may be easily explained by differences in balance between the intensity of oxidative metabolism and antioxidant protection existing in a given tissue. *Up to now, no such studies were undertaken in the brain.*

Our results indicated a transient accumulation of LFP in neonatal rat brain: LFP, were increased on the day 1 after the birth (PD1), reached the maximum level on the day 2 (PD2) and decreased to the prenatal level already on postnatal day 5 (PD5) (Fig. 7**;** Wilhelm *et al.,* 2011). A new rise of LFP production was found in 2–month–old animals (PD60). As already mentioned, those results correlated with the demonstration of oxidative damage of DNA (Randerath *et al.,* 1997). The fact that all fluorophores had similar ontogenetic pattern supported the physiological relevance of our results as this finding may be interpreted to mean that LFPs are generated by the same process or are localized in the same subcellular membrane compartment.

Wihelm and Ostadalova (2012) investigated the ontogenetic profile of generation of LFP in neonatal rat heart and found that the observed changes were similar to those obtained in frontal brain cortex. Mitochondria are the first suspected source for ROS production when considering the brain. This interpretation is supported by the previously published data (Svoboda and Lodin, 1972, 1973) indicating the low activity of α–glycerolphosphate and succinate dehydrogenases in immature brain: the activity of both enzymes was very low before and shortly after the birth. The temporary activation of α–GPDH (maximum at PD4–8) faded away before PD10. The major increase of these mitochondrial enzyme activities proceeded between PD10 and PD20 and was not completed before PD30. Thus, the presence of immature respiratory chain of mitochondria in brain cortex of newborn animals may explain the increase of LFP immediately after the birth.

Besides mitochondria, the high LFP production in brain of new–born animals may be also interpreted as an indication for the presence of the high amount of microglia phagocytosing the apoptosed brain cells. In mice, the maximum phagocytosis associated with significant ROS production, occurred on postnatal day 3 (Marı´n–Teva *et al.,* 2004). This time period corresponds well with the maximum of LFP production measured in our experiments: between PD1 and PD5. Thus, at least some part of the early production of LFP in the brain may be cell specific and functionally related to activity of microglia. Transition

from hypoxia to normoxia and increase of oxygen partial pressure was also shown to increase production of free radicals (Wilhelm *et al.,* 1999). It is therefore possible that the hypoxic/ normoxic transition proceeding in the newly born rats contributes to the process of LFP formation.

The pattern of 3D–spectral arrays, synchronous spectra and their derivatives (all together) indicate the presence of many fluorescent species belonging to the category of LFP. Each of these spectrally characterized species can be further resolved into several chromatographically distinct compounds (Fig. 4, 5, 6; Wilhelm *et al.,* 2011). Taken together, LFP may originate from hundreds, may be thousands, of unknown compounds which are functionally related to or produced by the brain oxidative damage after the birth. We assume that a formation of LFPs in 3–month–old animals, when aging starts in rats, is based primarily on ROS generated by mitochondria (Kann and Kova´cs, 2007). Since that time, these products only accumulate (Brunk and Terman, 2002).

7. DISKUSE

7.1. Ontogenetický vývoj signalizační kaskády $GABA_B$–receptorů

Nejvyšší maximální odezva (účinnost) baclofenem– a SKF97541–stimulované vazby [^{35}S]GTPγS byla měřena během 14. a 15. postnatálního dne; potom, schopnost těchto dvou agonistů $GABA_B$–receptorů zvyšovat aktivitu G–proteinů se kontinuálně snižovala (Obr. 2). Podobně, maximální hodnota vazby [^{3}H]GABA, detekována během 14. dne po narození v kortikálních řezech mozku potkana pomocí kvantitativní autoradiografií, se následně snížila (Turgeon a Albin, 1994).

Údaje, uvedené v mé práci (Obr. 1. a 2.) vykazují značnou míru kompatibility našich dosavadních výsledků s experimentálními daty získanými pomocí funkční analýzy činnosti adenylátcyklázy v přítomnosti nebo nepřítomnosti agonisty $GABA_B$–R (Ihnatovych *et al.*, 2002). Maximální aktivace baclofenem– a SKF97541–stimulované vazby [^{35}S]GTPγS během PD14 a PD15 se shodovala s vývojovým profilem činnosti AC. Maximální agonisty stimulovaná aktivita G proteinu (viz Obr. 2), stejně jako bazální, fluoridem, GTP, a forskolinem stimulovaná aktivita AC, byla zjištěna ve stejném období vývoje mozku, tedy mezi PD10 a PD15. Avšak výrazný rozdíl mezi těmito dvěma soubory údajů byl zaznamenán také. Zrání funkční vazby $GABA_B$–R s G proteiny předchází zrání AC systému, protože aktivita AC byla velmi nízká při narození, zatímco baclofen i SKF97541 vykazovaly významnou účinnost již během PD2 (Obr. 1).

Nejvyšší hustota $GABA_B$–R v plazmatických membránách (určena pomocí saturační vazebné studie se specifickým antagonistou [^{3}H]CGP54626AA) byla pozorována krátce po narození (PD1); následně tato hodnota u 13– a 90–denních krys poklesla (Obr. 3). Proto můžeme navrhnout, že fyziologický význam vysokého počtu receptorů a významné účinnosti spřažení $GABA_B$–R s G proteiny krátce po narození (během PD1 a PD2) je spojen s některými dalšími efektory, než systémem AC–cAMP. Iontové kanály regulované volnými $G_o\alpha$ a Gβ podjednotkami představují primární kandidáty pro dané efektory (Newberry *et al.*, 1984a, b; Gähwiler *et al.*, 1985; Bormann 1988; Bowery *et al.*, 1989).

Při porovnání hodnot EC50 pro baclofenem stimulovanou vazbu [^{35}S]GTPγS nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl mezi vzorky PM izolovaných od 2–,14– a 90–denních krys. Protikladně, hodnoty EC50 pro SKF97541 stimulovanou vazbu byly jasně zvýšene od narození až do dospělosti. Tento výsledek naznačuje vývojový pokles afinity reakci $GABA_B$–R na uvedené agonisty a je kompatibilní s elektrofyziologickými studií funkce mozku, které svědčí o rozdílech v citlivosti $GABA_B$–R na různé agonisty (Bernasconi *et al.*, 1992; Hosford *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1992; Marescaux *et al.*, 1992). Dále, epileptologické studie mozkové funkce naznačují, že antikonvulzivní účinek baclofenu zůstává nezměněný v poporodním období (Kubová *et al.*, 1996).; současně, ontogenetický profil antikonvulzivního působení SKF97541 není totožný s baclofenem (Mareš 2008). To znamená, že časové rozpětí mezi PD12 a PD18 představuje nejkritičtější období z tohoto hlediska.

7.2. Postnatální ontogeneze oxidačního poškození mozku

LFP byly použity jako nástroj pro posouzení rozsahu formace ROS v mozkové kůře potkana během časného postnatálního vývoje. Bylo zjištěno, že k nejvyšší akumulaci těchto látek dochází ihned po narození, pak během tří měsíců hladina těchto sloučenin následně klesá (začíná období stárnutí krys). Ačkoli zvýšenou tvorbu volných radikálů krátce po narození lze očekávat, a to v důsledku rychlého nárůstu koncentrace kyslíku v mozku novorozených zvířat a absenci plně funkčních mitochondrií v tomto věkovém intervalu, detekce konečných produktů peroxidačního poškození (LFP) ještě nebyla analyzována podrobným způsobem, tedy den po dni.

Při zvažování současných literárních údajů ze širšího hlediska, zprostředkované reaktivními sloučeninami kyslíku oxidační poškození DNA bylo prokázáno v mozku potkana, játrech, ledvinách a kůži během několika hodin po porodu (Randerath *et al.,* 1997). Plíce nebyly ovlivněny. Mozkové léze byly považovány za podstatné a byly podobné nebo dokonce vyšší než léze u zestárlých, 24–měsíčních potkanů. Koncept oxidačního stresu vytvořeného po normálním porodu byl také podpořen nálezem výrazného poklesu jaterního poměru GSH/GSSG u novorozených potkanů (Sastre *et al.,* 1994; Pellardo *et al.,* 1991). Také, produkt peroxidace membránových lipidů, malonaldehyde, vykazoval po narození v játrech a ledvinách potkana přechodný vzestup (Gunther *et al.,* 1993). Tkáňová specifičnost projevu oxidačního poškození lze snadno vysvětlit rozdíly ve vyvážení mezi intenzitou oxidativního metabolismu a antioxidační ochranou existující v dané tkáni. Až do teď, žádné takové studie v mozku nebyly provedeny.

Naše výsledky ukázaly přechodné hromadění LFP v mozku novorozených potkanů: hladina LFP byla zvýšena během 1. dne po porodu, dosáhla maximální úrovně na 2. den, a klesla na prenatální úroveň již během 5. postnatálního dne (Obr. 7, Wilhelm *et al.,* 2011). Nový vzestup tvorby LFP byl zaznamenán u 2–měsíčních zvířat (PD60). Jak již bylo řečeno, uvedene výsledky jsou souvztažne s ukázkou oxidačního poškození DNA (Randerath *et al.,* 1997). Skutečnost, že všechny fluorofory měly podobný ontogenetický vzor podporuje fyziologickou relevanci našich výsledků, protože toto zjištění může být vykládáno v tom smyslu, že LFPs jsou generovány stejným způsobem, nebo jsou lokalizovány ve stejném subcelulárním membránovém prostoru.

Wihelm a Ošťádalová (2012) zkoumali ontogenetický profil generace LFP v srdci novorozených potkanů a zjistili, že pozorované změny byly podobné výsledkům získaným při analýze frontální mozkové kůry. Vzhledem k mozku, mitochondrie jsou prvním možným kandidátem při posuzováni zdrojů produkce ROS. Tento výklad je potvrzen dříve publikovanými údaji (Svoboda and Lodin 1972, 1973), což ukazuje na nízkou aktivitu α–glycerolphosfátu a sukcinátdehydrogenázy v nezralém mozku: aktivita obou enzymů byla velmi nízká před a krátce po narození. Dočasná aktivace α–GPDH (maximum mezi 4. a 8. dnem po porodu) mizela před PD10. Největší nárůst aktivity mitochondriálních enzymů probíhal mezi PD10 a PD20 a nebyl dokončen před PD30. To znamená, že přítomnost nezralého dýchacího řetězce mitochondrií v mozkové kůře nově narozených zvířat může vysvětlit zvýšení hladiny LFP bezprostředně po porodu.

Kromě mitochondrií, vysoká produkce LFP v mozku novorozených zvířat může být také interpretována jako známka přítomnosti vysokého množství mikroglie která fagocytuje apoptované mozkové buňky. U myší, k maximální fagocytóze spojené s významnou výrobou ROS dochází během 3. postnatálního dne (Marı´n–Teva *et al.,* 2004). Tato doba plně odpovídá maximální produkce LFP měřené v našich experimentech: mezi PD1 a PD5. To znamená, že alespoň nějaká část časné výroby LFP v mozku může být buněčně specifická a funkčně souvisí s aktivitou mikroglie. Bylo také prokázáno, že přechod z hypoxie k normoxie a zvýšení parciálního tlaku kyslíku zvyšuje produkci volných radikálů (Wilhelm *et al.,* 1999).

Je tedy možné, že hypoxický/normoxický přechod u nově narozených krys se podílí na procesu tvorby LFP.

3D–model spektrálních polí, synchronní spektra a jejich deriváty (všechny dohromady) ukazují na přítomnost mnoha fluorescenčních druhů patřících do kategorie LFP. Každý z těchto spektrálně charakterizováných druhů může být dále rozděleny na několik chromatograficky odlišných sloučenin (Obr. 4, 5, 6; Wilhelm *et al.,* 2011). Celkem vzato, LFP můžou pocházet ze stovek (i tisíc) neznámých sloučenin, které funkčně souvisí s (nebo jsou vyroben0) oxidačním poškozením mozku po porodu. Domníváme se, že tvorba LFP u 3–měsíčních zvířat (doba, kdy u potkanů začíná stárnutí) je založena především na ROS generovaných mitochondrií (Kann a Kova´cs, 2007). Od té doby, tyto látky se pouze hromadí (Brunk a Terman, 2002).

8. CONCLUSIONS

1) the significant intrinsic efficacy of $GABA_B$–receptors was detected in rat brain cortex already shortly after the birth: at postnatal day 1 and 2. Subsequently, both baclofen and SKF97541–stimulated G protein activity, measured as the high–affinity [^{35}S]GTPγS binding, was increased. The highest level of agonist–stimulated [^{35}S]GTPγS binding was detected at postnatal days 14 and 15. In older rats, the efficacy, i.e. the maximum response of baclofen– and SKF97541–stimulated [^{35}S]GTPγS binding was continuously decreased so, that the level in adult, 90–days old rats was not different from that in newborn animals. This profile of ontogenetic development of functional coupling between $GABA_B$–R and the cognate G proteins was similar to the maturation of adenylyl cyclase activity (Ihnatovych *et al.*, 2002).

The existence of maximum of coupling efficacy between $GABA_B$–R and G proteins, observed in "opening of eyes period" at PD14 and PD15, may be interpreted as an overlap between the two counter–acting regulatory effects: stimulatory which is stronger at age intervals before this period and inhibitory effect, which prevails in older rats.

2) the potency of G protein response to baclofen stimulation, characterized by EC_{50} values, was also high at birth but unchanged by further development. The individual variance among different agonists was observed in this respect as the potency of SKF97541 response was decreased when compared in 2– and 90–days old rats.

3) plasma membrane density of $GABA_B$–R, determined by saturation binding assay as maximum binding capacity (B_{max}) of specific antagonist [^{3}H]CGP54626AA, was highest in 1–day old animals. The further maturation of rat brain cortex was reflected in decrease of PM density of $GABA_B$–R observed in 13– and 90–days old animals.

4) the ontogenetic development of Na^+/K^+–ATPase was completely different from that obtained in studies of $GABA_B$–R–signaling cascade. In contrast to the number of $GABA_B$–R, plasma membrane density of Na^+/K^+–ATPase molecules was increased ≈ 3–fold when compared in new born (1–day–old) and 90–days–old rats.

5) the high level of lipofuscin like pigments (LFP) was generated in rat brain cortex during the first 5 days of postnatal life. Maximum level of LFP was detected on the postnatal day 2. Starting from the postnatal day 10, LFP concentration returned down to the prenatal level. A new rise in LFP concentration was observed in 90–days old animals. This second increase of LFP may indicate the beginning of the aging process in rat brain cortex.

8. ZÁVĚRY

1) významná vnitřní účinnost $GABA_B$–receptorů byla zjištěna v mozkové kůře potkana již krátce po narození: během 1. a 2. postnatálního dne. Následně, baclofenem a SKF97541 stimulovaná aktivita G proteinu (měřená jako vysokoafinní vazba [^{35}S]GTPγS) byla zvýšena. Maximální agonisty stimulovaná vazba [^{35}S]GTPγS byla zjištěna během postnatálního dne 14. a 15. U starších krys, účinnost (maximální odezva baclofenem a SKF97541 stimulované vazby [^{35}S]GTPγS) se stále snižovala tak, že tato hodnota u dospělých 90–denních potkanů se nelišila od novorozených zvířat. Tento profil ontogenetického vývoje funkčního spojení mezi $GABA_B$–R a příbuznými G proteiny byl podobný zrání aktivity adenylátcyklázy (Ihnatovych *et al.*, 2002).

Existence maxima vazební účinnosti mezi $GABA_B$–R a G proteiny v období "otevření očí" (mezi PD14 a PD15) lze interpretovat jako překrytí proti–působících regulačních účinků: stimulačních, které jsou silnější před tímto obdobím a inhibičních, které převládájí u starších potkanů.

2) účinnost odpovědi G proteinu na stimulaci baclofenem (charakterizováno pomocí hodnot EC50) byla také zvýšená při narození, ale pak zůstala beze změny během dalšího vývoje. V tomto ohledu byl pozorován individuální rozptyl mezi různými agonisty – účinnost odpovědi na SKF97541 byla snížena při srovnání 2– a 90–dennich krys.

3) nejvyšší hustota $GABA_B$–R v plazmatické membráně (určena pomocí saturačních vazebných studií jako maximální vazebná kapacita (Bmax) specifického antagonisty [^{3}H]CGP54626AA), byla zjištena u 1–denních zvířat. Další zrání mozkové kůry potkanů se odráží v poklesu hustoty $GABA_B$–R (pozorováno u 13– a 90–denních zvířat).

4) ontogenetický vývoj Na^+/K^+–ATPázy byla zcela odlišný od vývoje signální kaskády $GABA_B$–R. Na rozdíl od počtu $GABA_B$–R, hustota molekul Na^+/K^+–ATPázy v plasmatické membráně byla při srovnání jednodenních a 90–dennich krys trikrát větší.

5) vysoká hladina LFP se v mozkové kůře potkana vytvářela během prvních 5 dnů postnatálního života. Maximální hladina LFP byla zjištěna na 2. postnatální den. Počínaje postnatálním dnem 10., koncentrace LFP se vrátila zpět na prenatální úroveň. Nový vzestup koncentrace LFP byla pozorován u 90–denních zvířat. Toto druhé zvýšení hladiny LFP může znamenat počátek procesu stárnutí v mozkové kůře potkana.

9. REFERENCES/SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BERNASCONI, R., LAUBER, J., MARESCAUX, C., VERGNES, M., MARTIN, P., RUBIO, V., LEONHARDT, T., REYMANN, N. and BITTIGER, H. (1992) Experimental absence seizures: potential role of gamma–hydroxybutyric acid and $GABA_B$ receptors. *J. Neural. Transm. 35*, 155–177

BORMANN, J. (1988) Electrophysiology of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor subtypes. *Trends Neurosci. 11*, 112–116

BORMANN, J. and FEIGENSPAN, A. (1995) $GABA_C$ receptors. *TiNS 18*, 515–519

BOUROVA, L., VOSAHLIKOVA, M., KAGAN, D., DLOUHA, K., NOVOTNY, J. and SVOBODA, P. (2010) Long–term adaptation to high doses of morphine causes desensitization of mu–OR– and delta–OR–stimulated G protein response in forebrain cortex but does not decrease the amount of G protein alpha subunits. *Med. Sci. Monit. 16 (8)*, 260–270

BOWERY, N. G., HILL, D. R. and HUDSON, A. L. (1983) Characterization of $GABA_B$ receptor binding sites on rat whole brain synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* 78, 191–206

BOWERY, N. G., PRICE, G. W., HUDSON, A. L., HILL, D. R. and WILKIN, G. P., TURNBULL, M. J. (1984) GABA receptor multiplicity. *Neuropharmacology 23*, 219–231, 1984

BOWERY, N. G. (1989) $GABA_B$ receptors and their significance in mammalian pharmacology. *TiPS 10*, 401–407

BOWERY, N. G., HILL, D. R. and HUDSON, A. L. (1985) [^{3}H](–)Baclofen: an improved ligand for $GABA_B$ sites. *Neuropharmacology 24*, 207–210

BOWERY, N. G., HUDSON, A. L. and PRICE, G. W. (1987) $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience 20*, 365–383

BOWERY, N.G., MAGUIRE, J.J. and PRATT, G.D. (1991) Aspects of molecular pharmacology of GABA receptors. *Semin. Neurosci. 3*, 241–249

BOWERY, N. G. (1993) $GABA_B$ receptor pharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 33*, 109–147

BRUNK, U.T. and TERMAN, A. (2002) Lipofuscin: mechanisms of age–related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med 33*, 611–619

DLOUHA, K., KAGAN, D., ROUBALOVA, L., UJCIKOVA, H. and SVOBODA, P. (2013) Plasma membrane density of GABA(B)–R1a, GABA(B)–R1b, GABA–R2 and trimeric G proteins in the course of postnatal development of rat brain cortex. *Physiol. Res. 62 (5)*, 547–559

GÄHWILER B. H. and BROWN, D.A. (1985) $GABA_B$–receptor–activated K^+ current in voltage–clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 82*, 1558–1562

GUNTHER, T., HOLLRIEGL, V. and VORMANN, J. (1993) Perinatal development of iron and antioxidant defense systems. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis*. *7*, 47–52

HILL, D. R. and BOWERY, N. G. (1981) ^{3}H–Baclofen and ^{3}H–GABA bind to bicuculine–insensitive $GABA_B$ sites in rat brain. *Nature 290*, 149–152

HILL, D. R. (1985) $GABA_B$ receptor modulation of adenylate cyclase activity in brain slices. *Br. J. Pharmacol. 84*, 249–257

HOSFORD, D. A., CLARK, S., CAO, Z., WILSON, W. A. jr, LIN, F. H., MORRISETT, R. A. and HUIN, A. (1992) The role of $GABA_B$ receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice. *Science 257*, 398–401

IHNATOVYCH, I., NOVOTNY, J., HAUGVICOVA, R., BOUROVA, L., MARES, P., and SVOBODA P. (2002) Ontogenetic development of the G protein-mediated adenylyl cyclase signalling in rat brain. *Brain. Res. Dev. Brain. Res. 133(1)*, 69-75

KAGAN, D., DLOUHA, K., ROUBALOVA, L. and SVOBODA, P. (2012) Ontogenetic development of GABA(B)–receptor signaling cascade in plasma membranes isolated from rat brain cortex; the number of GABA(B)–receptors is high already shortly after the birth. *Physiol. Res. 61 (6)*, 629–635

KANN, O. and KOVA´CS, R. (2007) Mitochondria and neuronal activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol 292*, C641–C657

KUBOVÁ, H., HAUGVICOVÁ, R. and MAREŠ, P. (1996) Moderate anticonvulsant action of baclofen does not change during development. *Biol. Neonate 69*, 405–412

LIN, F. H., CAO, Z., and HOSFORD, D. A. (1993) Increased number of $GABA_B$ receptors in lethargic (lh/lh) mouse model of absence epilepsy. *Brain Res. 608*, 101–106

MAREŠ, P. (2008) Anticonvulsant action of GABA–$_B$ receptor agonist SKF97541 differs from that of baclofen. *Physiol. Res. 57*, 789–792

MARESCAUX, C., VERGNES, M., BERNASCONI, R. (1992) $GABA_B$ receptor antagonists: potential new anti–absence drugs. *J. Neural. Transm. Suppl. 35*, 179–188

MARI´N–TEVA, J.L., DUSART, I., COLLIN, C. et al (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron 41*, 535–547

NEWBERRY, N. R. and NICOLL, R. A. (1984a) Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature 308*, 450–452

NEWBERRY, N. R. and NICOLL, R. A. (1984b) A bicuculline–resistant inhibitory post–synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Physiol., 348*, 239–254

OLSEN, R.W. and VENTER, C.J. (eds): Benzodiazepine/GABA Receptors and Chloride Channels: Structural and Functional Properties. Alan R. Liss, New York (1986)

PELLARDO, F.V., SASTRE, J., ASENSI, M. et al (1991) Physiological changes in glutathione metabolism in fetal and newborn liver. *Biochem J. 274*, 891–893

RANDERATH, E., ZHOU, G. D. and RANDERATH, K. (1997) Organ–specific oxidative DNA damage associated with normal birth in rats. *Carcinogenesis 18*, 859–866

RICKWOOD, D. (1984) Centrifugation, a practical approach. Oxford, IRL Press

SASTRE, J., ASENSI, M., RODRIGO, F. et al (1994) Antioxidant admin–istration to the mother prevents oxidative stress associated with birth in the neonatal rat. *Life Sci 54*, 2055–2059

SVOBODA, P. and LODIN, Z. (1972) Postnatal development of some mitochondrial enzyme activities of cortical neurons and glial cells. *Physiol. Bohemoslov. 21*, 457–465

SVOBODA, P. and LODIN, Z. (1973) Ontogenic development of oxidative capacity of the brain. *Physiol. Bohemoslov. 23*, 434

TURGEON, S.M. and ALBIN, R.L. (1994) GABAB binding sites in early adult and aging rat brain. *Neurobiol Aging 15 (6)*, 705-711

UJCIKOVA, H., DLOUHA, K., ROUBALOVA, L., VOSAHLIKOVA, M., KAGAN, D. and SVOBODA, P. (2011) Up–regulation of adenylylcyclases I and II induced by long–term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. *BBA 1810 (12)*, 1220–1229

UJCIKOVA, H., BREJCHOVA, J., VOSAHLIKOVA, M., KAGAN, D. *et al.*, (2014) Opioid–receptor (OR) signaling cascades in rat cerebral cortex and model cell lines: the role of plasma membrane structure. *Phys. Res. 63 (Suppl. 1)*, 165–176

WILHELM, J. and HERGET, J. (1999) Hypoxia induces free radical damage to rat erythrocytes and spleen: analysis of the fluorescent end–products of lipid peroxidation. *Int. J. Biochem. Cell Biol. 31*, 671–681

WILHELM, J., IVICA, J., KAGAN, D. and SVOBODA, P. (2011) Early postnatal development of rat brain is accompanied by generation of lipofuscin–like pigments. *Mol. Cell. Biochem. 347*, 157–162

WILHELM, J. and OSTADALOVA, I. (2012) Ontogenetic changes of lipofuscin–like pigments in the rat heart. *Phys. Res. 61*, 173–179

10. LIST OF AUTHOR'S PUBLICATIONS/SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Bourova, L., Vosahlikova, M., **Kagan, D.**, Dlouha, K., Novotny, J. and Svoboda, P. (2010): Long–term adaptation to high doses of morphine causes desensitization of mu–OR– and delta–OR–stimulated G protein response in forebrain cortex but does not decrease the amount of G protein alpha subunits. Medical Science Monitor 16, BR260–270 (IF = 1.543).

2. Ujcikova, H., Dlouha, K., Roubalova, L., Vosahlikova, M., **Kagan, D.** and Svoboda P. (2011): Up–regulation of adenylylcyclases I and II induced by long–term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. Biochimica et Biophysica Acta 1810, 1220–1229 (IF = 3.990).

3. Wilhelm, J., Ivica, J., **Kagan, D.** and Svoboda P. (2011) Early postnatal development of rat brain is accompanied by generation of lipofuscin–like pigments. Molecular and Cellular Biochemistry 347, 157–162 (IF = 2.168).

4. **Kagan, D.**, Dlouhá, K., Roubalová, L. and Svoboda, P. (2012): Ontogenetic development of GABA(B)–receptor signaling cascade in plasma membranes isolated from rat brain cortex; the number of GABA(B)–receptors is high already shortly after the birth. Physiological Research 61, 629–635 (IF = 1.531).

5. Dlouhá, K., **Kagan, D.**, Roubalová, L., Ujčíková, H. and Svoboda, P. (2013) Plasma membrane density of GABAB–R1a, GABAB–R1b, GABA–R2 and trimeric G proteins in the course of postnatal development of rat brain cortex. Physiological Research 62, 547–559 (IF = 1.555).

6. Ujčíková H., Brejchová J., Vošahlíková M., **Kagan D.**, Dlouhá K., Sýkora J., Merta L., Drastichová Z., Novotný J., Ostašov P., Roubalová L., Hof M. and Svoboda P. (2014): Opioid–Receptor (OR) Signaling Cascades in Rat Cerebral Cortex and Model Cell Lines: the Role of Plasma Membrane Structure. Physiological Research, 63, Suppl. 1, 165–176 (IF = 1.555).

7. Ujcikova, H., Eckhardt, A., **Kagan, D.**, Roubalova, L. and Svoboda, P. (2014): Proteomic analysis of post–nuclear supernatant fraction and Percoll–purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. Proteome Science, 12:11 (IF = 1.88).

CURRICULUM VITAE – Mgr. DMYTRO KAGAN

E–mail: kagan@biomed.cas.cz

Education and Qualifications:

2008–present	Postgraduate Study in Animal Physiology, Charles University in Prague. Thesis Title: Postnatal Development of $GABA_B$–receptors in the Plasma Membranes Isolated from Frontal Rat Brain Cortex. Expected date of PhD Thesis defence: October 2014.
2007	Master's Degree in Animal Physiology, V.N. Karazin Kharkiv National University (Ukraine).
2006	Bachelor's Degree in Biology, V.N. Karazin Kharkiv National University (Ukraine).

Work Experience

2008–present	Institute of Physiology AS CR in Prague, Biochemistry of Membrane Receptors Department. Main responsibilities: isolation of purified plasma membranes from the rat brain, measurment of G–protein activity by radioligand binding assays, analysis of different agonists due to their ability to activate trimeric G–proteins into ontogenity, routine cell culture maintenance including freezing, feeding and passaging of multiple cell types.
2007	Bogomoletz Institute of Physiology in Kiev (Ukraine), Department of Neuronal Networks. Acquainted with patch–clamp technique for studying ion channels in cell membranes.
2004	Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine in Kharkiv (Ukraine), Department of Cryophysiology. Lab assistant.

Skills

Languages	Ukrainian, Russian – mother tongues; English – upper–intermediate (FCE passed in 2012); Czech – fluently.
IT skills	Good knowledge of standard office software, including graphing and statistics software.