

Received: 2013.11.14
Accepted: 2014.03.18
Published: 2014.06.24

Relaksyna-3 i receptory rodziny peptydów relaksynowych – od struktury po funkcje nowo odkrytego układu mózgowia ssaków*

Relaxin-3 and relaxin family peptide receptors – from structure to functions of a newly discovered mammalian brain system

Alan Kania, Marian H. Lewandowski, Anna Błasiak

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii, Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie

Relaksyna-3 należąca do rodziny peptydów relaksynowych została odkryta w 2001 r. jako homolog relaksyny-1, hormonu związanego z rozrodem i okresem ciąży. Wykazano, iż głównym miejscem ekspresji nowo odkrytego hormonu jest mózgowie, a sam peptyd okazał się konserwatywny u kręgowców, zarówno pod względem budowy chemicznej, jak i miejsca jego ekspresji. Intensywne badania przyczyniły się do znaczącego poszerzenia wiedzy dotyczącej tego neuropeptydu. Zidentyfikowano swoisty dla niego receptor (RXFP3) i opisano anatomie nieznanego dotąd układu mózgowia ssaków, z głównym źródłem relaksyny-3 znajdującym się w jednym z jąder pnia mózgu, zwanym jądrem niepewnym (nucleus incertus - NI). Rozsiany charakter unerwienia relaksynergicznego wielu struktur mózgowia, wśród których znajdują się: hipokamp, przegroda, listek ciała kolankowatego bocznego wzgórza czy ciało migdałowate, pozwolił zaliczyć go do wstępujących układów nieswoistych. Uczetniczy on w bardzo ważnych procesach fizjologicznych organizmu, takich jak: pobieranie pokarmu, pamięć przestrzenna, cykl sen/czuwanie czy modulacja sekrecji hormonów przysadkowych. Charakteryzuje go także duża wrażliwość na działanie neuroprzekazników uwalnianych w sytuacjach związanych ze stresem. Wrażliwość neuronów syntetyzujących relaksynę-3 na czynniki stresowe i silne oreksygeniczne działanie tego peptydu sugeruje, że układ ten jest związany z zaburzeniami pobierania pokarmu wywołanymi stresem, zwłaszcza tym o charakterze przewlekłym. Odkrycie układu relaksyny-3 zapoczątkowało badania, które mogą się przyczynić do lepszego zrozumienia neurobiologicznych podstaw zaburzeń odżywiania.

Słowa kluczowe:

relaksyna-3 • RXFP3 • układ niespecyficzny • jądro niepewne • stres • pobieranie pokarmu • rytm theta • rytm okołodobowy

Summary

Relaxin-3, a member of the relaxin peptide family, was discovered in 2001 as a homologue of relaxin – a well-known reproductive hormone. However, it is the brain which turned out to be a major expression site of this newly discovered peptide. Both its molecular structure and expression pattern were shown to be very conserved among vertebrates. Extensive research

* Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przeznaczonych na podstawie decyzji DEC-2012/05D/NZ4/02984.

carried out since the discovery of relaxin-3 contributed to the significant progress in our knowledge regarding this neuropeptide. The endogenous relaxin-3 receptor (RXFP3) was identified and the anatomy of the yet uncharacterized mammalian brain system was described, with nucleus incertus as the main center of relaxin-3 expression. Not only its diffusive projections throughout the whole brain, which reach various brain structures such as the hippocampus, septum, intergeniculate leaflet or amygdala, but also functional studies of the relaxin-3/RXFP3 signaling system, allowed this brain network to be classified as one of the ascending nonspecific brain systems. Thus far, research depicts the connection of relaxin-3 with phenomena such as feeding behavior, spatial memory, sleep/wake cycle or modulation of pituitary gland hormone secretion. Responsiveness of relaxin-3 neurons to stress factors and the strong orexigenic effect exerted by this peptide suggest its participation in modulation of feeding by stress, in particular of the chronic type. The discovery of relaxin-3 opened a new research field which will contribute to our better understanding of the neurobiological basis of feeding disorders.

Key words: relaxin-3 • RXFP3 • nonspecific system • nucleus incertus • stress • food intake • theta rhythm • circadian rhythm

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1110163>

Word count: 6941
Tables: –
Figures: 2
References: 65

Adres autorki: dr Anna Błasiak, Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków; e-mail: anna.blasiak@uj.edu.pl

Wykaz skrótów: **CRF** – kortykoliberyna (corticotropin-releasing factor), **CRF₁** – receptor 1 kortykoliberyny (corticotropin-releasing factor receptor 1), **dSN** – obszar grzbietowy w stosunku do istoty czarnej (dorsal to substantia nigra), **ERK 1/2** – kinazy regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi (extracellular signal-regulated kinases), **H1, 2, 3** – ludzka relaksyna-1, -2, -3 (human relaxin-1, -2, -3), **INSL3, 4, 5, 6** – insulinopodobny peptyd 3, 4, 5, 6 (insuline-like peptide 3, 4, 5, 6), **M3** – mysia relaksyna-3 (mouse relaxin-3), **MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami (mitogen-activated protein kinases), **NI** – jądro niepewne (nucleus incertus), **PAG** – istota szara okołowodociągowa (periaqueductal gray), **PnR** – mostowe jądro szwu (pontine raphe nucleus), **PVN** – jądro okołokomorowe podwzgórza (paraventricular nucleus), **R3** – szczurza relaksyna-3 (rat relaxin-3), **RLX1, 2, 3** – relaksyna-1, -2, -3 (relaxin-1, -2, -3), **RXFP1, 2, 3, 4** – receptor rodziny peptydów relaksynowych 1, 2, 3, 4 (relaxin family peptide receptor 1, 2, 3, 4), **SON** – jądro nadwzrokowe (supraoptic nucleus), **vmDTg** – brzuszno-przyśrodkowe grzbietowe jądro nakrywki (ventromedial dorsal tegmental nucleus).

WSTĘP

Relaksyna-3 (relaxin-3 – RLX3) odkryta w 2001 r. została zaklasyfikowana do rodziny peptydów relaksynowych. Głównym miejscem jej ekspresji jest układ nerwowy, a właściwie jedno z jąder pnia mózgu – jądro niepewne (nucleus incertus – NI) [4]. Badania porównawcze dowiodły, że zarówno struktura peptydu, jak i jego umiejscowienie są bardzo konserwatywne wśród kręgowców – od ryb [11,12], po człowieka [4,49]. Mimo jej stosunkowo późnego odkrycia, wiele wskazuje, że to właśnie relaksyna-3 jest przodkiem rodziny peptydów, do której należy [64]. Swoistym receptorem relaksyny-3 jest jeden z receptorów sierocych sprzężonych z białkiem G – receptor rodziny peptydów relaksynowych 3 (relaxin family peptide receptor 3 – RXFP3), którego struktura także jest dobrze zachowana wśród kręgowców [10,24].

Taka zbieżność struktur między gatunkami świadczy o tym, że układ sygnalizacji relaksyna-3/RXFP3 pełni istotną rolę w fizjologii tych zwierząt.

Badania dotyczące funkcji układu relaksyny-3 u ssaków wskazują, że jest on istotny w procesach, takich jak: oscylacyjna aktywność mózgowia w paśmie częstotliwości theta [28], modulacja cyklu snu i czuwania [50] czy modulacja osi przysadka-podwzgórze-gonady [31]. Jednak to kontrola pobierania pokarmu i wrażliwość na czynniki stresowe są najszerzej badanymi i do tej pory najlepiej poznаныmi, funkcjonalnymi aspektami tego nieswoistego układu. Wykazano, że domózgowe podanie relaksyny-3 wzmacnia pobieranie pokarmu u szczurów [33], a przewlekle pobudzanie receptora RXFP3 w jądrze okołoko-

morowym podwzgórze (paraventricular nucleus – PVN) powoduje wzrost masy ciała tych zwierząt [14]. Ponadto podwyższone stężenie relaksyny-3 w osoczu krwi kobiet dodatnio koreluje z objawami zespołu metabolicznego [15]. Polimorfizm genów *RLN3* (relaxin-3 gene), *RXFP3* (relaxin family peptide receptor 3 gene) oraz *RXFP4* (relaxin family peptide receptor 4 gene) powiązано również z hipercholesterolemią, otyłością czy cukrzycą, ponownie wskazując na udział tego układu w rozwoju zespołu metabolicznego u ludzi [37]. Dodatkowo, neurony syntetyzujące relaksynę-3 wykazują ekspresję receptora 1 kortykoliberyny (CRF₁, corticotropin-releasing factor receptor 1) – głównego neuroprzekaźnika reakcji stresowej u ssaków, a ekspozycja na czynniki stresowe aktywuje komórki relaksynowe i wzmacnia syntezę tego peptydu [2,58]. Na podstawie tej zależności można przypuszczać, że badania nad układem relaksyny-3 dostarczą odpowiedzi na pytania o skomplikowane relacje między stresem a pobieraniem pokarmu, które leżą u podłoża wielu zaburzeń odżywiania, m.in. otyłości czy anoreksji.

Celem pracy jest opis układu relaksyny-3, zaczynając od molekularnej budowy samego peptydu i jego receptora, przez charakterystykę neuronów relaksynowych i anatomię tworzonego przez nie układu, po funkcje jakie pełni w organizmie.

RELAKSYNA-3 I JEJ RECEPTOR

Historia odkrycia relaksyny-3 i charakterystyka rodziny peptydów relaksynowych

Na początku XXI w., podczas przeszukiwania genomowej bazy danych (Celera Genomics), zidentyfikowano nowy gen relaksynowy. Ze względu na to, że u ludzi opisano wcześniej dwa inne geny relaksynowe (*H1* – human relaxin-1 gene, *H2* – human relaxin-2 gene), nowo odkryty gen nazwano *H3* (human relaxin-3 gene), a jego mysz analog, dla zachowania porządku, opisano jako *M3* (mouse relaxin-3 gene) [4]. Za pomocą znanej sekwencji genu *H3*, odnaleziono homologi genu relaksyny-3 u ryby danio pręgowany i szczura [5]. Inne badania potwierdziły obecność nowego peptydu także u makaka [29], szympansa [64], psa [64], kury [64] i świni [64]. Nie zidentyfikowano jednak żadnego genu podobnego do genu relaksyny u bezkręgowców czy Prokariota [64].

Badania ekspresji relaksyny-3 w tkankach myszy wykazują, że głównym ośrodkiem syntezy tego peptydu jest mózgowie – obszar pnia mózgu umiejscowiony w pobliżu dna komory IV, opisywany jako brzuszno-przyśrodkowe grzbietowe jądro nakrywki (ventromedial dorsal tegmental nucleus – vmDTg) [4]. Ekspresja mRNA relaksyny-3 u ryby [12], szczura [9] czy peptydu u rezusa i człowieka [29,49] również jest umiejscowiona głównie w mózgowiu, w obszarach homologicznych do DTg myszy. Obecność relaksyny-3 wykazano także w narządach obwodowych, m.in. rezusa i człowieka – w komórkach Leydiga gonad męskich [49]. Warto wspomnieć, że w mózgowiu jest obecny także inny peptyd rodziny relaksynowej – relaksyna-1,

jednak odmienny wzór ekspresji sugeruje, że jego rola jest inna niż relaksyny-3 [4].

Dotąd zidentyfikowano siedem członków rodziny peptydów relaksynowych, będącej częścią nadrodziny peptydów insulinowych. Są to: relaksyny – RLX1 (relaxin-1), RLX2 (relaxin-2), RLX3 (relaxin-3) oraz cztery peptydy insulinopodobne – INSL3 (insulin-like peptide 3), INSL4 (insulin-like peptide 4), INSL5 (insulin-like peptide 5), INSL6 (insulin-like peptide 6). Wszystkie charakteryzują się dużym podobieństwem strukturalnym przy braku wysoce konserwatywnej sekwencji aminokwasowej [3].

Przynależność rodziny peptydów relaksynowych do nadrodziny peptydów insulinowych, wynika z podobnej do insuliny budowy chemicznej. Każda cząsteczka powstaje przez potranslacyjną obróbkę preprohormonu składającego się z sekwencji sygnałowej oraz trzech kolejnych domen: B – C – A. Powstaje peptyd składający się z dwóch łańcuchów (A i B) połączonych dwoma mostkami disiarczkowymi (trzeci znajduje się w obrębie łańcucha A) [3].

Charakterystyka chemiczna relaksyny-3

Gen *RLN3* umiejscowiony jest w różnych miejscach genomu, w zależności od gatunku. U człowieka *H3* znajduje się na chromosomie 19 [4], podobnie jak *R3* (rat relaxin-3 gene) u szczura (Rat Genome Database). Gen *M3* umiejscowiony jest w obrębie chromosomu 8 [4].

Seqwencja DNA *H3* ma wszystkie elementy właściwe aktywnemu genowi: sekwencję TATA – umożliwiającą inicjację transkrypcji oraz sygnał poliadenylacji – niezbędny by dołączyć ogon poliA, chroniący powstały transkrypt przed degradacją. Elementy te są także obecne w genach *M3* i *R3* [4,9]. Sekwencja kodująca jest przedzielona pojedynczym intronem, którego pozycja jest stała między członkami rodziny peptydów relaksynowych różnych gatunków. Region kodujący jest matrycą, na bazie której powstaje polipeptyd o długości 142 aminokwasów [4].

Powstały po translacji genu *H3* peptyd, zawiera cztery charakterystyczne dla wszystkich członków rodziny obszary: sekwencję sygnałową, łańcuch B, łańcuch C, łańcuch A. Podczas obróbki potranslacyjnej sekwencja sygnałowa zostaje odcięta między alaniną a argininą, co powoduje skrócenie łańcucha o 25 aminokwasów. Rozdzielenie łańcucha B i C oraz C i A następuje najpewniej kolejno między resztami tryptofanu i argininy oraz argininy i asparagianinu. Powstają trzy peptydy: A (24 aminokwasów), B (27 aminokwasów) oraz C (66 aminokwasów), jednak dojrzała cząsteczka relaksyny-3 powstaje z połączenia tylko łańcucha A i B. W obrębie tych łańcuchów znajdują się konserwatywne reszty cysteinowe, odpowiedzialne za tworzenie mostków disiarczkowych, warunkujących strukturę peptydów [4]. Dwa takie mostki łączą łańcuchy A i B ze sobą (między cysteinami A11 – B10 i A24 – B22), a jeden tworzy się w obrębie łańcucha A (między cysteinami A10 – A15) [60]. Bardzo konserwatywne miejsca zajmują także reszty glicyny, znajdujące się

obok cystein tworzących wiązania disiarczkowe. Są one istotne dla zachowania sprężystości między powstałymi mostkami. Jak u wszystkich relaksyn, łańcuch B zawiera sekwencję odpowiedzialną za interakcje peptydu z receptorem, tzw. motyw RXXXXXXI [4]. Dane z jądrowego rezonansu magnetycznego ujawniają trójwymiarową strukturę relaksyny-3. Ma cechy charakterystyczne dla rodziny relaksyn: łańcuch A zawiera dwie α -helisy (w pozycjach A1 – A13 i A17 – A24), które dzieli fragment β -kartki (A15 – A17). Struktura β -kartki jest obecna także w łańcuchu B (B5 – B7), razem z fragmentem α -helisy (B12 – B22) [43].

Istnieją badania wskazujące, że insulina (enzym rozkładający insulinę) ma zdolność degradacji relaksyny-3 [6]. Jest to powszechna metalopeptydaza z grupy endopeptydaz cynkowych, której aktywność proteolityczna dotyczy także innych przedstawicieli nadrodziny insulinowej. Brak jednak dowodów, że jest to główny enzym odpowiedzialny za rozkład relaksyny-3.

Powinowactwo relaksyny-3 do receptorów rodziny relaksynowej

Dotychczas odkryto cztery receptory wiążące peptydy relaksynowe. Wszystkie są związane z białkiem G typu I (GPCR - G protein-coupled receptor) i tworzą grupę receptorów rodziny peptydów relaksynowych (RXFP - relaxin family peptide receptor) [19]. Nietypowe jest odległe pokrewieństwo ewolucyjne między RXFP1 i RXFP2, które ze względu na obecną domenę bogatą w leucynę, należą do bogatych w powtórzenia leucynowe receptorów związanych z białkiem G (LGR - leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor), a niemającymi tej domeny RXFP3 i RXFP4 [19,65]. Relaksyna-3 wykazuje interakcje ze wszystkimi receptorami rodziny peptydów relaksynowych, wiążąc się do nich z różnym powinowactwem.

RXFP1 jest głównym receptorem relaksyny-1, do którego z mniejszym powinowactwem wiąże się także relaksyna-3 [54]. Tylko u niektórych gatunków możliwe jest wiązanie się relaksyny-3 z receptorem RXFP2. Wykazano, że ludzką relaksynę-3 charakteryzuje większe powinowactwo do szczurzego RXFP2, niż do jego ludzkiego odpowiednika [47]. RXFP4 także jest aktywowany po związaniu z relaksyną-3 *in vitro*, za co odpowiada domena mieszcząca się w obrębie łańcucha B [23]. Ludzki RXFP4 jest bardzo podobny do RXFP3, dzieląc z nim 43% sekwencji aminokwasowej. Duże powinowactwo ludzkiej relaksyny-3 do tego receptora sugerowało, że może być jednym z jego swoistych ligandów. Jednak wykazano, że ekspresja mRNA tego receptora nie ogranicza się do miejsc występowania relaksyny-3 w organizmie, lecz jest powszechna także w innych tkankach [23]. Dodatkowo gen *RXFP4* jest pseudogenem u szczura czy psa, u których obecna jest relaksyna-3 [64]. Ponadto u myszy, u której *RXFP4* nie jest pseudogenem, wykazano brak ekspresji tego receptora w mózgowiu [55]. Wszystko to przeczy swoistości wiązania relaksyny-3 do RXFP4. Badania udowodniły, że jego swoistym ligandem jest INSL5, który podobnie jak *RXFP4*, jest pseudogenem zarówno u szczura jak i psa [25].

Obecnie przyjmuje się, że wiązanie relaksyny-3 z receptorami RXFP1, RXFP2, RXFP4 ma jedynie charakter farmakologiczny, a w warunkach fizjologicznych swoistym receptorem dla tego peptydu jest RXFP3 (znany również jako GPCR135 i receptor peptydów somatostatyno- lub angiotensynopodobnych SALPR - somatostatin and angiotensin-like peptide receptor). O ich funkcjonalnym powiązaniu świadczy wysokie powinowactwo relaksyny-3 do RXFP3 [24] oraz ich umiejscowienie w strukturach mózgowia z włóknami zawierającymi relaksynę-3 [27].

Szlaki sygnalizacji komórkowej aktywowane przez RXFP3

Receptory metabotropowe charakteryzują się wieloma mechanizmami transdukcji i transmisji sygnału, aktywując wiele kaskad sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Receptory peptydów relaksynowych, w tym RXFP3, nie są wyjątkiem od tej reguły. Do tej pory opisano dwa szlaki sygnalizacji komórkowej uruchamiane po związaniu relaksyny-3 przez RXFP3. Badania na rekombinowanych ssaczych liniach komórkowych wskazują, że receptor ten jest sprzężony z inhibitorowym białkiem $G_{ai/o}$. Białko to hamuje aktywność cykazy adenylanowej (AC - adenyl cyclase), powodując spadek poziomu cAMP w komórce [24]. Ponadto stymulacja RXFP3 aktywuje szlak kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi 1/2 (ERK1/2 - extracellular signal-regulated kinases 1/2). Udowodniono to zarówno w rekombinowanych liniach komórkowych, jak i mysich liniach neuronalnych (SN56), natywnie wykazujących ekspresję tego receptora [61]. RXFP3 aktywowany związaniem relaksyny-3, pobudza szlak kinaz ERK1/2 za pośrednictwem białka $G_{ai/o}$ i najprawdopodobniej jest internalizowany lub umiejscawiany w obrębie tratwy lipidowej. Następnie dochodzi do aktywacji kinazy białkowej C (PKC - protein kinase C) i zapoczątkowania kaskady sygnalizacji Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. Ścieżka ta może również zostać aktywowana z udziałem kinazy 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K - phosphoinositide 3-kinase) czy fosfolipazy C β (PLC β - phospholipase C β), a także obejmować transaktywację receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR - epithelial growth factor receptor). Jednakże, najistotniejszym elementem tej kaskady wydaje się aktywacja PKC [61].

Wyniki badań na różnych liniach komórkowych (CHO-RXFP3, HEK-RXFP3, SN56) świadczą o tym, że spośród szlaków kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK - mitogen-activated protein kinases), nie tylko szlak ERK1/2 jest aktywowany przez wiązanie ludzkiej relaksyny-3. Pobudzane są również takie szlaki jak: p38, MAPK i JNK (c-Jun N-terminal kinases). Udowodniono, że wszystkie te ścieżki są zaangażowane w aktywację czynników transkrypcyjnych AP-1 (activator protein 1), jednak hierarchia poszczególnych szlaków najprawdopodobniej jest zależna od typu komórki. Na tych samych liniach komórkowych wykazano, że aktywacja RXFP3 prowadzi do wzrostu transkrypcji czynnika transkrypcyjnego, jakim jest czynnik jądrowy κB (NF- κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [3].

Aktywacja kinaz MAP jest istotna pod względem fizjologicznym. Udowodniono bowiem, że wymuszone pływanie, któremu poddawane są szczury, powoduje natychmiastowy wzrost fosforylacji MEK1/2, ERK1/2 i JNK 1/2/3, co sugeruje ich udział w odpowiedzi stresowej [48]. Jest to o tyle istotne, że w wyniku tego samego rodzaju stresu wzrasta stężenie relaksyny-3 [2]. Podobnie szlak kinaz ERK1/2 w mózgowiu jest ważną ścieżką sygnalizacji związaną z przekazywaniem informacji o odżywianiu [36]. Można więc spekulować, iż aktywacja właśnie tych ścieżek jest związana z pełnionymi przez relaksynę-3 funkcjami. Szlak ERK1/2 jest także obecny w takich strukturach jak hipokamp, w którym jest niezbędny do wywołania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP - long-term potentiation), a tym samym tworzenia śladów pamięciowych [13]. Odgrywa także rolę w przekazywaniu informacji związanych z percepcją bólu czy stymulacją świetlną, odpowiednio w ciele migdałowatym i korze wzrokowej [17]. Jednak procesy, z jakimi jest powiązany w wyniku aktywacji receptora RXFP3 przez wiązanie relaksyny-3, nie są jeszcze poznane.

Konserwatywność pary ligand-receptor

Istotną cechą relaksyny-3 jest duże podobieństwo struktury pierwszorzędowej nawet u bardzo odległe spokrewnionych ze sobą grup kręgowców. Sekwencja aminokwasów tego peptydu u człowieka, myszy i ryby danio pręgowany wynosi 71 i 80% odpowiednio dla łańcucha A i B [5]. Łańcuchy A i B szczurzego homologu R3 wykazują natomiast 100% zgodności sekwencji aminokwasowej z jego mysią wersją M3. Homolog relaksyny-3 makaka rezusa, podobnego pod względem genetycznym, fizjologicznym, czy anatomii układu nerwowego do człowieka, wykazuje 91,5% zgodności sekwencji aminokwasów z ludzką postacią peptydu i zgodność ta rośnie do 93%, gdy pod uwagę weźmie się substytucje synonimowe [49]. Podobnie jak relaksyna-3, RXFP3 wykazuje wysoką homologię zarówno między gatunkami ssaków, jak i niższymi kręgowcami (np. rybą fugu) [10]. Taka konserwatywność pary ligand - receptor oraz jej powszechność wśród wielu gatunków, dowodzi istotności pełnionej przez nią roli fizjologicznej.

NEURONY SYNTETYZUJĄCE RELAKSYNĘ-3

Ultrastruktura neuronów relaksynowych

Głównym miejscem syntezy relaksyny-3 w organizmie licznych kręgowców jest jądro niepewne mózgowia [45]. Dzięki mikroskopii elektronowej i immunohistochemii, scharakteryzowano morfologię neuronów relaksynowych. U szczura są to wielokształtne komórki, w których relaksyna-3 upakowana jest w strukturach podobnych do pęcherzyków, rozproszonych po całej cytoplazmie neuronu [58]. Odnaleźć można ją także w błonie szorstkiej siateczki śródplazmatycznej czy na wolnych rybosomach. Zakończenia aksonalne neuronów relaksynowych tworzą różne synapsy, zależnie od ich umiejscowienia w mózgowiu. Zakończenia neuronalne

zawierające relaksynę-3 w pęcherzykach o elektronowo gęstych rdzeniach (dense-core vesicles), które znajdują się w obszarze bocznego podwzgórza (LH-lateral hypothalamus), tworzą asymetryczne synapsy z neuronami obszaru mózgowia [58]. W przypadku neuronów NI unerwiających jądro przysiódkowe przegrody (MS - medial septum), zakończenia aksonalne zawierają gęsto upakowane pęcherzyki synaptyczne i duże pęcherzyki o elektronowo gęstych rdzeniach, a synapsy tworzone z sąsiednimi neuronami mają symetryczną morfologię, która wskazuje na ich hamujący charakter. Wykonane barwienia immunohistochemiczne potwierdzają, że neurony NI unerwiające ten obszar także wykazują ekspresję relaksyny-3 [28]. Te przesłanki pozwalają stwierdzić, że Relaksyna-3, syntetyzowana w ciele komórkowym, jest transportowana do zakończeń aksonalnych i tam uwalniana do przestrzeni synaptycznej w sposób analogiczny dla wszystkich neuropeptydów.

Charakterystyka neurochemiczna neuronów relaksynowych

Neurony NI syntetyzujące relaksynę-3 są neuronami GABA-ergicznymi, zawierającymi enzym odpowiedzialny za syntezę kwasu γ -aminomasłowego (GABA) - dekarboksylazę glutaminianową (GAD - glutamate decarboxylase) [27]. Komórki należące do tej struktury syntetyzują wiele innych związków o charakterze modulatorów czy peptydów, których współwystępowanie z relaksyną-3 nie zostało jeszcze potwierdzone [45]. Ze względu na dużą gęstość neuronów relaksynowych w obrębie NI, prawdopodobieństwo współwystępowania relaksyny-3 z innymi związkami wydaje się bardzo duże. Podobna sytuacja dotyczy obecnych w obrębie NI genów receptorów dla wielu substancji, np.: acetylocholin (M2, M3), oreksyny (OX1, OX2), oksytocyny (OTR), hormonu koncentrującego melanine (MCH1) i wielu innych [21]. Ich ekspresja w komórkach syntetyzujących relaksynę-3 została potwierdzona tylko w przypadku receptorów kortykoliberyny (CFR - corticotropin-releasing factor) - CRF₁ [58] i serotoniny - 5HT_{1A} [35]. Podwójne barwienia immunohistochemiczne pozwoliły stwierdzić, że około 52% neuronów NI wykazuje ekspresję CRF₁, z czego około 52% (28% neuronów NI) to neurony syntetyzujące relaksynę-3. Badania te sugerują, iż w NI brak jest komórek relaksynowych niemających receptorów CRF₁ [26]. Charakterystyka neurochemiczna neuronów syntetyzujących relaksynę-3, znajdujących się w strukturach innych od NI, nie jest jeszcze znana. Udowodniono jedynie, że neurony relaksynowe znajdujące się w istocie szarej okołowodociągowej (PAG - periaqueductal gray), z których część wysyła swe wypustki do listka ciała kolankowatego bocznego wzgórza (IGL - intergeniculate leaflet of thalamus), także wykazują ekspresję CRF₁ [7]. Obecność tych receptorów w neuronach relaksynowych, zarówno NI jak i PAG, może świadczyć o istotnej funkcji i zaangażowaniu układu w fizjologię reakcji stresowej. Ekspresja w neuronach relaksynowych receptorów serotoniny (5HT_{1A}) wskazuje na możliwy wpływ układu serotonergicznego na fizjologię układu relaksyny-3,

co zostało potwierdzone eksperymentalnie. Wykazano bowiem, że serotonina wpływa hamująco na syntezę relaksyny-3 [35]. Potencjalne działanie innych mediatorów układów nieswoistych, takich jak oreksyna czy acetylocholina, nie zostało jeszcze potwierdzone. Jest ono jednak prawdopodobne, ze względu na obecność receptorów tych związków na neuronach w NI [45].

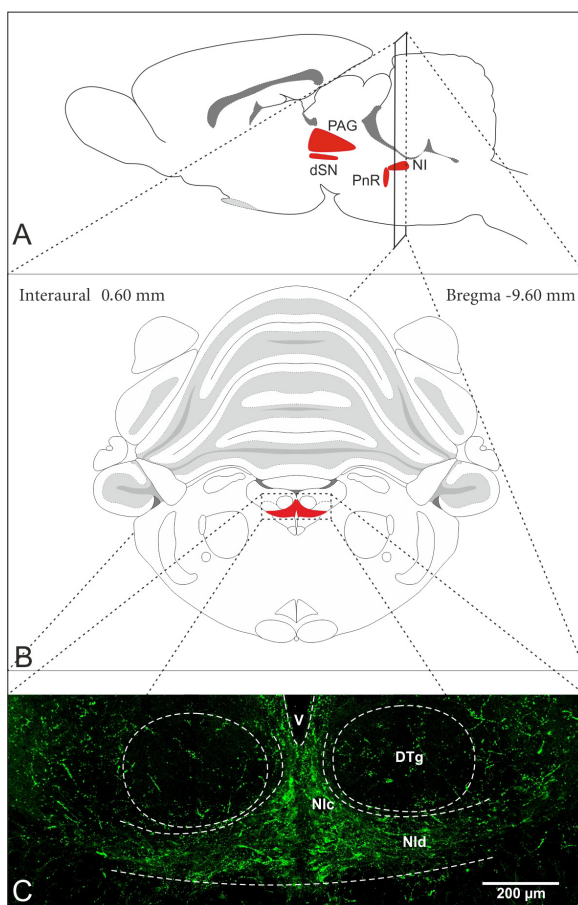
ANATOMIA UKŁADU RELAKSYNY-3

Umiejscowienie neuronów syntetyzujących relaksynę-3

Histochemiczna metoda radioizotopowej hybrydizacji *in situ* pozwoliła scharakteryzować wzór ekspresji relaksyny-3 w mózgowiu myszy. Skupisko neuronów syntetyzujących nowo odkryty peptyd z rodziny relaksynowej zlokalizowano w części brzuszno-przyśrodkowej grzbietowego jądra nakrywki (vmDTg). Podobnie u szczura vmDTg jest obszarem, w którym obecne jest mRNA relaksyny-3 [9]. Jądro to, znane także jako nucleus incertus czy nucleus O, jest głównym miejscem syntezy relaksyny-3 w mózgowiu. U szczura jest ono grupą neuronów, rozwijającą się z rombomery 2, umiejscowioną w dnie komory IV. W mózgu dorosłego zwierzęcia rozciąga się na długości około 0,7 mm (od -9,12 mm do -9,84 mm w stosunku do punktu Bregma) [45]. Jądro to podzielić można na dwa, odmienne pod względem histologicznym obszary: część zbitą (pars compacta), leżącą tuż przy linii pośrodkowej oraz część rozproszoną (pars dissipata), zawierającą luźniej upakowane komórki, a rozchodzącą się bocznie w stosunku do części zbitej [45] (ryc. 1). Neurony tworzące NI to średniego rozmiaru wielobiegunkowe komórki, z których około 2000 wykazuje ekspresję mRNA relaksyny-3 [58]. Podobne wyniki uzyskano dzięki zastosowaniu barwień immunohistochemicznych, według których neurony syntetyzujące relaksynę-3 stanowią około 28% wszystkich neuronów NI szczura [26], których liczbę szacuje się na około 7,5 tysiąca.

Zidentyfikowano także inne, mniej liczne skupiska neuronów relaksynowych. W układzie nerwowym szczura znajdują się w brzusznej i bocznej istocie szarej okółowodociągowej – około 550 neuronów, mostowym jądrze szwu (PnR - pontine raphe nucleus) – około 340 neuronów oraz obszarze położonym grzbietowo do substancji czarnej (dSN - dorsal to substantia nigra) – około 360 neuronów [58]. W przypadku mózgowia myszy wzór ekspresji jest zbliżony [53].

Matrycowe RNA relaksyny-3 jest obecne w homologicznych rejonach mózgowia zarówno u danio pręgowanego [12], makaka jawańskiego (*Macaca fascicularis*) [29], rezusa (*Macaca mulata*) [49], jak i człowieka [49]. U rezusa i człowieka odkryto nieopisane do tej pory obszary, w których obecna jest relaksyna-3. Są to: kora mózdzku (*cerebellar cortex*), obszary grzbietowego i bocznego jądra nakrywki (DTg - dorsal tegmental nucleus; LTg - lateral tegmental nucleus) i brzuszne jądro ślimakowe (VCN - ventral cochlear nucleus), u rezusa obszar grzbietowego jądra szwu (DR - dorsal raphe nucleus), jądra siatkowatego mostu (Pn



Ryc. 1. Lokalizacja i morfologia jądra niepewnego (nucleus incertus) szczura; A – schemat przekroju strzałkowego mózgu szczura, wskazujący umiejscowienie ciał neuronów syntetyzujących relaksynę-3, B – schemat przekroju czołowego szczurzego mózgu na wysokości jądra niepewnego, C – jądro niepewne szczura – zdjęcie preparatu immunohistochemicznego pokazujące neurony syntetyzujące relaksynę-3 (kolor zielony); dSN – obszar położony grzbietowo w stosunku do istoty czarnej (area dorsal to the substantia nigra), DTg – grzbietowe jądro nakrywki (dorsal tegmental nucleus), NI – jądro niepewne (nucleus incertus), Nic/d – część zbita/rozproszona jądra niepewnego (nucleus incertus pars compacta/dissipata), PAG – istota szara okółowodociągowa (periaqueductal gray), PnR – mostowe jądro szwu (pontine raphe nucleus), V – komora czwarta (fourth ventricle)

- pontine reticular nucleus) oraz obszarach grzbietowego i brzuszego jądra nakrywki (DTg - dorsal tegmental nucleus; VTg - ventral tegmental nucleus) u człowieka [49].

Rozmieszczenie włókien relaksynowych w mózgowiu ssaków

Szlaki nerwowe tworzone przez aksony komórek syntetyzujących relaksynę-3, jak i struktury, które unerwiają, opisano zarówno u gryzoni, jak i naczelnych. Wyniki dwóch niezależnych zespołów badawczych opisują unerwienie relaksynergiczne u szczura, jako unerwienie o bardzo szerokim zasięgu i rozproszonym charakterze [27,58]. Są to głównie aksony wstępujące dochodzące do miejsc

Pojawia się ono w neuronach znajdujących się w pobliżu komory czwartej (w miejscu odpowiadającym lokalizacji NI u dorosłego zwierzęcia). W przypadku PAG mRNA relaksyny-3 można wykryć w E21. Następnie ilość transkryptu rośnie aż do siódmego dnia po porodzie (P7), w którym osiąga wartość odpowiadającą dorosłemu zwierzęciu. Sam peptyd wykrywalny jest dzięki barwieniom immunohistochemicznym dopiero w dniu porodu (P0), a immunoreaktywne włókna unerwiające podwzgórze można zaobserwować już w P1. Opóźnienie istniejące między procesem transkrypcji i translacji może być przyczyną różnicy w pojawieniu się transkryptu w E18, a obecnością peptydu wykrywalną w P0. Możliwe także, że jest artefaktem powstałym na skutek niejednokwowej czułości metod służących do wykrywania mRNA i immunohistochemii.

Pojawienie się mRNA receptora relaksyny-3 podczas rozwoju embrionalnego zbadano u myszy [8]. Wyniki badań techniką Northern blot, wskazują, że mRNA RXFP3 wykrywalne jest w jedenastym dniu życia płodowego (E11). Jednak, hybrydyzacja *in situ*, pozwalająca stwierdzić obecność RNA w konkretnych obszarach embrionu, ujawnia obecność mRNA tego receptora w kresomózgowiu (oraz somitach poza mózgowiem) już w E10,5. W E12 ekspresja obejmuje także neurony dopaminergiczne bocznego podwzgórza i zwoje korzeni grzbietowych (dorsal root ganglia). W E16 i E18 mRNA jest wykrywalne w wielu strukturach mózgowia, takich jak: hipokamp, wzgórze, boczno-grzbietowe jądro wzgórze (laterodorsal thalamic nucleus), boczny przedwzrokowy obszar podwzgórza (lateral preoptic hypothalamic area), w presumywnym mózdzku (cerebellar primordium), splocie naczyńwłokowym (choroid plexus), moście (pons), gałce bladej (globus pallidus), płacie węchowym (olfactory lobe), ciele prążkowanym (corpus striatum), korze mózgowej (cerebral cortex), jak i czuciowych i ruchowych jądrach rdzenia (sensory and motor nuclei of the medulla) czy rdzeniu kręgowym (spinal cord).

FUNKCJE UKŁADU RELAKSYNY-3

Układ relaksyny-3 – nowy nieswoisty układ wstępujący

Dyfuzyjny charakter unerwienia relaksynowego, które obejmuje całe mózgowie, sięgając struktur związanych z regulacją rytmiki okołodobowej (IGL), pamięcią przestrzenną i uczeniem się (przegroda, hipokamp) czy reakcją stresową (ciało migdałowe) [16,27,53,58], był podstawą do sklasyfikowania tego nowo odkrytego unerwienia jako wstępującego nieswoisty układ mózgowia. Potwierdzono także modulujący wpływ tego neuropeptydu na wymienione procesy, stawiając układ relaksyny-3 obok innych nieswoistych układów mózgowia, takich jak: serotoninowy, noradrenalinowy, histaminowy, acetylocholinowy, dopaminowy czy oreksynowy [52].

Neuroanatomia układu relaksyny-3 w mózgowiu wykazuje podobieństwo do innych opisanych wstępujących

układów nieswoistych. NI, główne źródło relaksyny-3, leży w pobliżu trzech skupisk neuronów, dających początek trzem innym układom nieswoistym: przyśrodkowego jądra szwu (MR - median raphe, serotoninina), miejsca sinawego (LC - locus coeruleus, noradrenalina), czy grzbietowo-bocznego jądra nakrywki (LDT - laterodorsal tegmental nucleus, acetylocholina). Także docelowe unerwienie neuronów relaksynowych w dużym stopniu odpowiada projekcom pozostałych układów nieswoistych, wskazując, że relaksyna-3 wpływa na te same struktury co inne tego typu układy. Ponadto system sygnalizacji relaksyna-3/RXFP3 jest obecny w obszarach dających początek wszystkim innym układom nieswoistym, z wyjątkiem miejsca sinawego [16,27,53,58]. Neurony relaksynowe w NI wykazują ekspresję receptorów oreksyny: OX1 i OX2 [21] czy serotoniny: 5HT_{1A} [45], która wyraźnie hamuje wytwarzanie relaksyny-3 [35]. To także dowód wzajemnych oddziaływań układu relaksyny-3 z pozostałymi układami nieswoistymi.

Wielu badaczy skupia się na wyjaśnieniu roli, jaką układ relaksyny-3 odgrywa w procesach związanych ze wzburzeniem. Do głównych nurtów badawczych należą: udział w odpowiedzi na bodźce stresowe, kontrola pobierania pokarmu i metabolizmu, procesy związane z hipokampalnymi rytmami theta czy kontrola rytmiki okołodobowej [52]. Istnieją także przesłanki pozwalające przypuszczać, iż relaksyna-3 związana jest z innymi aspektami funkcjonowania mózgowia: motywacją i nagrodą, modulacją osi podwzgórze-przysadka-gonady czy podwzgórze-przysadka-tarczycy [52].

Układ relaksyny-3 a bodźce stresowe

Jeszcze przed odkryciem relaksyny-3 zauważono, że neurony NI ulegają aktywacji pod wpływem różnych czynników stresowych, wykazując zwiększoną ekspresję białek wczesnej odpowiedzi komórkowej c-Fos. Wysoka ekspresja CRF₁ w tym obszarze wskazuje na zaangażowanie tego jądra w procesy mózgowe związane z reakcją stresową [45]. Źródłem unerwienia uwalniającego CRF w NI są neurony bocznego pola przedwzrokowego (LPO - lateral preoptic area), uznawanego za jedno z „centrów stresu” w układzie nerwowym. Istnieje również hipoteza, iż także CRF dyfundujący w płynie mózgowo-rdzeniowym wpływa na aktywność neuronów NI leżących na dnie komory [26]. Jak wspomniano wcześniej, neurony relaksynowe zarówno w NI, jak i PAG mają receptory CRF₁ [7,26]. Koekspresja relaksyny-3 i CRF₁ zachowana między różnymi ośrodkami świadczy o ścisłym powiązaniu układu relaksyny-3 z reakcją stresową.

Badając wpływ CRF na aktywność neuronów NI, udowodniono, że podanie CRF do komory bocznej mózgu szczura powoduje wzrost ekspresji genu *c-fos* w 66% neuronów NI wytwarzających relaksynę-3 [58]. Poddawanie szczurów stresowi fizycznemu (unieruchomienie zwierząt w wodzie) także potwierdziło te obserwacje. Ekspresja genu *c-fos* w komórkach NI (z czego 40% stanowiły neurony relaksynowe) wzrosła po ekspozycji na stresor, a ekspresja

mRNA relaksyny-3 utrzymywała się na poziomie o 74% wyższym po 6 godzinach działania stresora. Pokazano także jak działanie stresora fizycznego wpływa na ekspresję relaksyny-3 [2]. Pod wpływem hybrydyzacji *in situ*, przeprowadzonej na skrawkach mózgowi stresowanych zwierząt z wykorzystaniem sondy radioaktywnej, udało się prześledzić zmiany ilości mRNA i hnRNA relaksyny-3 wywołane stresem powtórnego wymuszonego pływania. Heterogeny RNA (hnRNA) jest bezpośrednim produktem transkrypcji, który wymaga wielu modyfikacji, by stać się informacyjnym RNA (mRNA) i ulec procesowi translacji. Obserwacja zmian ilości obu tych kwasów rybonukleinowych pozwala dokładniej scharakteryzować dynamikę ekspresji genu. Wyniki eksperymentu wskazują, że aktywacja neuronów pod wpływem stresu zmniejsza pulę hnRNA relaksyny-3 znajdującej się w jądrze, w wyniku czego powstaje znaczna ilość mRNA służącego jako matryca do syntezy peptydu. Jest to zgodne z obserwacjami zmian względnej immunoreaktywności relaksyny-3 po zadziałaniu stresora, które wskazują na wzrost stężenia peptydu w neuronach NI. Wyniki te najprawdopodobniej są skutkiem działania kortykoliberyny uwalnianej pod wpływem stresu, ponieważ podanie antalarminy – antagonisty receptorów CRF₁ blokuje wyżej opisane zmiany poziomu mRNA i hnRNA.

Wpływ CRF na neurony relaksynowe zbadano także za pomocą technik elektrofizjologicznych [26]. Rejestracje techniką juxtacellular labeling-recording wykazały, że neurony wytwarzające relaksynę-3 w NI są pobudzane przez CRF. Komórki, których aktywność była hamowana lub niezmienną przez CRF, nie były neuronami relaksynowymi. Dopełnieniem tych wyników są badania techniką patch clamp oraz barwienia immunohistochemiczne, które potwierdziły postsynaptyczny charakter aktywującego wpływu CRF. Tu także opisano populację neuronów depolaryzowaną w wyniku działania CRF, z których tylko połowa wykazywała ekspresję relaksyny-3. Potwierdzono, że komórki, których aktywność została niezmienną po podaniu CRF nie syntetyzują relaksyny-3. Co ważne nie odnaleziono neuronów, które jak w przypadku badań *in vivo*, były hamowane przez CRF. Sugeruje to, że kortykoliberyna hamuje neurony NI za pośrednictwem innej, odległej populacji komórek, utraconej w wyniku przygotowania tkanki do rejestracji techniką patch clamp.

Udział układu relaksyny-3 w fizjologii reakcji stresowej okazuje się złożony. Udowodniono bowiem, że nie tylko CRF pobudza wytwarzanie relaksyny-3, ale także, że ta ostatnia powoduje uwolnienie CFR przez neurony PVN [62]. U szczura dokomorowe podanie ludzkiej relaksyny-3 powodowało wzrost ekspresji *c-fos* w neuronach PVN syntetyzujących CRF oraz podniesienie stężenia adrenokortykotropiny (ACTH - adrenocorticotrophic hormone) w osoczu krwi.

CRF oraz receptor CRF₁ to ważne elementy reakcji stresowej, tym samym patofizjologii stanów lękowych i depresji. Układ relaksyny-3, którego działanie nie tylko jest modulowane przez CRF, ale również wpływa na poziom wydzie-

lania tego hormonu, może być zaangażowany w procesy leżące u podstaw tych zaburzeń. Wyniki badań nad tym zagadnieniem nie dają jednak spójnej odpowiedzi. Dane uzyskane przez grupę japońską wskazują, że samce myszy pozbawione genu relaksyny-3 (knock-out) wykazują obniżony poziom lęku w niektórych testach behawioralnych, w porównaniu ze zwierzętami dzikimi [63]. Sugeruje to, iż neuropeptyd ten w warunkach fizjologicznych wywołuje zachowania lękowe. Inne wnioski wyciągnięto z wyników podobnych badań, przeprowadzonych w laboratorium w Australii, w których samce myszy pozbawione relaksyny-3 wykazywały większą wrażliwość na sytuację stresową w porównaniu z kontrolą [51]. Biorąc pod uwagę, iż ekspresja relaksyny-3 jest pobudzana przez CRF, może to świadczyć o braku u nich zwrotnej, wyciszającej regulacji odpowiedzi stresowej. Wrażliwość zależna jest od płci, gdyż u samic jej nie zaobserwowano. Najnowsze badania na samcach szczurów szczepu Sprague-Dawley przechylają szalę na korzyść hipotezy, iż relaksyna-3 działa przeciwłękowo. Dokomorowe podawanie agonisty receptora RXFP3 (związku o nazwie RXFP3-A2 (R3A(11-24,C15→A)B)) powodowało u tych zwierząt spadek zachowań będących oznaką lęku w testach podniesionego labiryntu krzyżowego i light-dark box [44]. Zwierzęta te pozostawały również krócej w stanach bezruchu, charakteryzowanych jako objaw depresji, podczas powtórnego wymuszonego pływania. Wyniki te sugerują, że układ relaksyny-3 odgrywa rolę zarówno w przypadku działania stresorów o charakterze ostrym (związanym ze stanami lękowymi), jak i przewlekłym (sprzyjającym rozwinięciu objawów depresyjnych). Jest to obiecujące pole badań nad zastosowaniem agonistów RXFP3 jako leków przeciwłękowych czy przeciwdepresyjnych w przyszłości.

Układ relaksyny-3 a kontrola pobierania pokarmu

Zagadnieniem najintensywniej badanym, jeśli chodzi o funkcje relaksyny-3 w fizjologii układu nerwowego, jest jej udział w kontroli pobierania pokarmu. Pierwsze przeprowadzone badania wykazały, że dokomorowe podanie ludzkiej relaksyny-3 (H3), zarówno na początku fazy jasnej (nieaktywnej), jak i ciemnej (aktywnej), istotnie zwiększyło ilość pobieranego pokarmu u samców szczurów rasy Wistar, które miały nieograniczony dostęp do jedzenia [33]. W oparciu o dane anatomiczne, wskazujące na wysoką ekspresję receptorów RXFP3 na neuronach jądra okołokomorowego podwzgórza, przeprowadzono analogiczne badania z podaniem ludzkiej relaksyny-3 bezpośrednio do tego jądra. Wyniki okazały się podobne – ilość pobieranego przez szczury pokarmu w pierwszej godzinie od podania, zarówno na początku fazy jasnej, jak i ciemnej, istotnie wzrosła. Wiadomo, że efekt zwiększonego pobierania pokarmu wywołany jest przez relaksynę-3 za pośrednictwem receptora RXFP3, gdyż podanie swoistego agonisty tego receptora (R3/I5) także powoduje hiperfagię u szczura. Co więcej podanie antagonisty tego receptora (R3(BΔ23-27)R/I5) znosi działanie jego agonisty, co świadczy o swoistości obu peptydów [20]. To, iż stężenie mRNA żadnego z hormonów podwzgórza, znane ze swego udziału w kontroli pobierania pokarmu:

neuropeptydu Y (NPY – neuropeptide Y), białka Agouti (AgRP – aguti-related protein) czy proopiomelanokortyny (POMC – proopiomelanocortin), nie uległo zmianie po podaniu ludzkiej relaksyny-3 do PVN, może świadczyć o tym, że relaksyna-3 wpływa oreksygenicznym w wyniku odmiennej od klasycznej kontroli pobierania pokarmu [33]. Co ciekawe, wymagane do wywołania oreksygenicznego efektu stężenie relaksyny-3 (18 pmoli), podawanej do PVN, jest niższe od stężeń wymaganych, aby osiągnąć ten sam skutek w przypadku innych substancji – greliny (30 pmoli), czy NPY (24 pmole). Zlokalizowano także inne centra oreksygenicznego działania relaksyny-3: jądro nadwzrokowe (SON), jądro łukowate (ARC, arcuate nucleus) czy przednie pole przedwzrokowe (APOA, anterior preoptic area) [34]. Zarówno RXFP1, jaki i RXFP3 są obecne w SON, jednak wykazano, że stymulacja RXFP1 za pomocą relaksyny-1 nie przyczyniała się do zmian ilości pobieranego pokarmu, co wskazuje, że najważniejszy był RXFP3. APOA jest pozbawione receptorów RXFP1 i RXFP3, a w ARC są obecne jedynie RXFP1. Może to zatem świadczyć o istnieniu innego, do tej pory nieopisanego, receptora relaksyny-3 w układzie nerwowym.

Relaksyna-3 może być także zaangażowana w mechanizm kontroli pobierania płynów. Dokomorowe podanie ludzkiego peptydu, oprócz wywołania ekspresji białek c-Fos w komórkach podwzgórza szczura, jak i narządów okołokomorowych – ważnych ośrodkach osmoregulacji, istotnie wpłynęło na zwiększenie, zależnej od dawki podanego peptydu, ilości pobieranej przez szczury wody. Może to być jednak wynikiem aktywacji RXFP1 – receptora wrażliwego przede wszystkim na relaksynę-1, której rola w kontroli gospodarki płynami jest dobrze znana [41].

Oprócz wpływu relaksyny-3 na zwiększone pobieranie pokarmu, sprawdzono także jej działanie na procesy metaboliczne i wzrost masy ciała. Stwierdzono, że stężenie ludzkiej relaksyny-3 podawane do PVN, najbardziej stymulujące pobieranie pokarmu (540 pmoli), istotnie obniża stężenie tyreotropiny (TSH, thyreotropin) w osoczu badanych zwierząt (samce szczurów Wistar) [32]. TSH jako hormon tropowy tarczycy jest jednym z wyznaczników zmian tempa metabolizmu w organizmie, kontrolowanego przez hormony tarczycy (T3 i T4). Jednak aktywność fizyczna zwierząt, którym podawano ludzką relaksynę-3 do PVN (180 pmoli), jak i wyniki pomiarów wydatkowania energii, nie różniły się od wyników zwierząt kontrolnych. Biorąc pod uwagę to, że na całkowity wydatek energii składa się kilka elementów, m.in.: aktywność hormonów tarczycy, aktywność brunatnej tkanki tłuszczowej, aktywacja sympatycznego układu nerwowego czy aktywność mięśni szkieletowych i gładkich, możliwa jest kompensacja spadku aktywności osi podwzgórze-przysadka-tarczyca przez inne układy wpływające na gospodarkę energetyczną organizmu, która może tłumaczyć obserwowany brak zmian w wydatkowaniu energii pod wpływem działania relaksyny-3.

W kilku badaniach sprawdzono długoterminowy wpływ działania ludzkiej relaksyny-3 na metabolizm szczurów.

Podawanie tego peptydu do PVN, dwa razy na dobę przez siedem dni, powodowało wzrost ilości pobranego przez zwierzęta pokarmu [32]. Masa ciała tych zwierząt także wzrosła w porównaniu z kontrolą, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie. Inne eksperymenty wykazały jednak, że przewlekłe działanie relaksyny-3 może powodować istotny wzrost masy ciała. Dzięki zastosowaniu minipomp osmotycznych możliwe było ciągle (trwające czternaście dni) doprowadzanie ludzkiej relaksyny-3 do komór mózgowia [18]. U zwierząt grupy eksperymentalnej obserwowano zwiększone pobieranie pokarmu i co ciekawe, brak spadku apetytu w pierwszych dniach po implantacji pomp, w porównaniu do grupy kontrolnej, której nie podawano peptydu. Dodatkowo grupa eksperymentalna wykazywała istotny wzrost masy ciała od początku eksperymentu, a po jego zakończeniu masa tkanki tłuszczowej tych zwierząt była znacząco wyższa w porównaniu z kontrolą. Potwierdzono także, że aktywność lokomotoryczna zwierząt nie różniła się między grupami, zarówno w fazie jasnej, jak i ciemnej cyklu dobowego. Świadczy to o braku wpływu relaksyny-3 na wydatkowanie energii, a obserwowany przyrost masy ciała był związany wyłącznie ze wzrostem ilości pobieranego pokarmu. Niezgodność istotności między uzyskanymi wynikami w dwóch przytoczonych eksperymentach, może być wynikiem różnicy w czasie ekspozycji na działanie relaksyny-3 (siedem i czternaście dni) oraz metody podawania peptydu. Wzrost masy ciała obserwowano także u szczurów, których neurony PVN były transdukiowane za pomocą wektorów wirusowych rAAV (recombinant adeno-associated viruses) tak, by stale syntetyzowały i wydzielały agonistę receptora RXFP3 [14]. Tak zmodyfikowane zwierzęta badano pod kątem ilości pobranego pokarmu, masy i budowy ciała, zachowania oraz ekspresji genów w podwzgórze. Ze wspomnianym wzrostem masy ciała był związany także wzrost ilości pobieranego przez zwierzęta pokarmu. Także te badania wykazały brak wpływu relaksyny-3 na aktywność lokomotoryczną. Przy zastosowaniu Analizatora Budowy Ciała Echo-MRI nie wykazano różnic w masie tłuszczu, beztłuszczowej masie ciała czy całkowitej ilości wody w organizmach zwierząt eksperymentalnych i kontrolnych, a wyrażonych w wartościach procentowych ogólnej masy. Analiza ekspresji podwzgórzowych hormonów zaangażowanych w kontrolę pobierania pokarmu wykazała, że ilość mRNA, takich peptydów jak: POMC, NPY, AgRP, gonadoliberyna (GnRH, gonadotropin-releasing hormone), nie różniła się w sposób istotny między grupą szczurów eksperymentalnych i kontrolnych. Jednak ekspresja oksytocyny okazała się zależna od aktywacji RXFP3, gdyż stężenie jej mRNA było istotnie niższe u zwierząt, których neurony PVN wydzielały R3/15. Także stężenie innego hormonu – wazopresyny, było obniżone pod wpływem R3/15, jednak różnica nie była istotna statystycznie.

Przytoczone wyniki jednoznacznie wskazują, że relaksyna-3 zmagą apetyt, co jest widoczne na poziomie behawioralnym. Wskazówką w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie, jakimi drogami relaksyna-3 kontroluje pobieranie pokarmu, są przytoczone wyżej wyniki dotyczące

wpływu R3/15 na stężenie mRNA hormonów wytwarzanych w podwzgórze. Zmienione stężenie mRNA oksyocyny spowodowane przewlekłą aktywacją receptora RXFP3 sugeruje, że to właśnie zmniejszenie jej ekspresji jest związane z oreksygenicznym działaniem relaksyny-3 [14]. W kontekście badań nad układem relaksyny-3 istotne jest, że oksyocyna podana centralnie wykazuje działanie anoreksygeniczne [39], a dokomorowe podanie jej antagonistów działa odwrotnie – wzmacnia pobieranie pokarmu [40]. Biorąc pod uwagę, że aktywacja receptora RXFP3 może wpłynąć na ekspresję genów za pośrednictwem szlaków kinaz MAP (zob. wyżej), opisywany spadek poziomu ekspresji mRNA oksyocyny może być konsekwencją związania R3/15 z tym receptorem. Ponadto rejestracje elektrofizjologiczne techniką patch clamp wskazują na możliwy hamujący wpływ aktywacji RXFP3 na aktywność komórek nerwowych, który może być skutkiem zmniejszenia ilości cAMP w komórce, prowadząc do spadku wartości potencjału błonowego neuronu [7]. Spadek aktywności elektrycznej neuronów wytwarzających oksyocynę może prowadzić do zmniejszenia ilości wydzielanego hormonu. Przytoczone wyżej wyniki pozwalają postawić hipotezę, że jednym z mechanizmów, leżących u podłoża oreksygenicznego działania relaksyny-3, jest jej hamujący wpływ na ekspresję i wydzielanie oksyocyny przez neurony PVN i SON.

Badania nad funkcją i mechanizmem działania relaksyny-3 w kontekście pobierania pokarmu niosą ze sobą duże nadzieje na zastosowanie zdobytej wiedzy w praktyce klinicznej. Z jednej strony ten nieswoisty układ wydaje się obiecującym celem w terapii zaburzeń odżywiania, takich jak *anorexia nervosa*, ze względu na wpływ na pobieranie pokarmu, bez przyczyniania się do zaburzeń aktywności czy metabolizmu. Z drugiej strony badacze postulują, że aktywacja neuronów wytwarzających relaksynę-3 pod wpływem czynników stresowych i jej wpływ na wzrost apetytu, świadczy o tym, że układ ten jest podstawowy w patologii odżywiania wywołanej działaniem stresorów, zwłaszcza przewlekłych. Badania wpływu stresu na pobieranie pokarmu są prowadzone zarówno na modelach zwierzęcych, jak i na ludziach. Jest to ważny problem badawczy, bo współczesny styl życia jest generatorem niezliczonej liczby stresorów o szerokim zakresie nasilenia i czasie działania, przy czym charakter stresora ma duże znaczenie w modulacji pobierania pokarmu [59]. Ostry i nagły bodziec stresowy – np. zagrożenie życia, powoduje szybką aktywację sympatycznego układu nerwowego i uwolnienie hormonów rdzenia nadnerczy – adrenaliny i noradrenaliny, mobilizując organizm do odpowiedzi – walka lub ucieczka (fight or flight), tym samym hamując apetyt. Jednak stresor o charakterze przewlekłym, niekoniecznie silny, działający na organizm, powoduje gromadzenie się w nim kortyzolu, co może doprowadzić do sytuacji odwrotnej – wzmożonego poszukiwania i konsumpcji pokarmu, zwłaszcza o wysokiej wartości energetycznej (bogatego w cukry i tłuszcze). Taki właśnie stresor może za pośrednictwem CRF aktywować układ relaksyny-3, powodując jej przewlekłe wydzielanie, które jak opisano wcześniej, może doprowadzić do wzrostu masy

ciała. Ostatnie doniesienia opisują wpływ przewlekłego stresu, restrykcji pokarmowej i okresowego dostępu do smacznego pożywienia na regulację pobierania pokarmu samic i samców szczurów szczepu Sprague-Dawley, przy jednoczesnym zbadaniu ekspresji relaksyny-3 w NI [22]. Wyniki tego eksperymentu wskazują, że powtarzający się stres unieruchomienia, z okresowym dostępem do smacznego, wysokoenergetycznego napoju Ensure, przy jednoczesnej okresowej restrykcji dostępu do zwyczajnej paszy, powodował znaczący wzrost masy ciała samic, któremu towarzyszyła podwyższona ekspresja mRNA relaksyny-3 w NI. Obserwacje te wzmacniają hipotezę, że w specyficznych warunkach stresowych aktywacja układu relaksyny-3 skutkuje przyrostem masy ciała. U samic także stężenie kortykosteronu w osoczu krwi było znacząco podniesione na skutek działania przewlekłego stresu. Warto zaznaczyć, że przyrost masy ciała charakteryzowały tylko samice, samce wykazywały przeciwną tendencję, co najprawdopodobniej jest związane z zależną od płci fizjologią reakcji stresowej. Dodatkowo poziom mRNA CRF i *c-fos* w neuronach drobnokomórkowych PVN samic był znacząco obniżony w stosunku do samców, co wskazuje, że relaksyna-3 hamuje syntezę i uwalnianie CRF w PVN, przez co działa oreksygenicznym. Podobnie poziom mRNA białka *c-Fos* był obniżony w PVN zawierającym neurony wielkokomórkowe tych samic, co sugeruje zmniejszenie wydzielania i syntezy oksyocyny. Wyżej opisane badanie jako pierwsze bezpośrednio łączy przyrost masy ciała z podniesionym poziomem mRNA relaksyny-3 w sytuacji stresowej. Może to świadczyć o udziale układu relaksyny-3 w wykształceniu otyłości w wyniku przedłużającego się stresu.

Badania z udziałem pacjentów rzucają światło na rolę układu relaksyny-3 w kontroli metabolizmu u ludzi. Wykazano, że podwyższone stężenie relaksyny-3 w osoczu krwi dodatnio koreluje z objawami tzw. zespołu metabolicznego u kobiet [15]. Zespół ten jest zbiorem wzajemnie zależnych i współwystępujących czynników ryzyka, takich jak: dysglikemia, nadciśnienie, podwyższone stężenie trójglicerydów czy otyłość, prowadzących do chorób układu krążenia i cukrzycy. Również polimorfizm genów *RLN3*, *RXFP3* oraz *RXFP4* został powiązany z objawami, takimi jak: hipercholesterolemia, otyłość czy cukrzyca, wskazując na udział tego układu w rozwoju zespołu metabolicznego u ludzi [37]. Wykazano także, że wzrost masy ciała ludzi, będący działaniem niepożądanym przyjmowania pewnych leków przeciwpsychotycznych, jest związany z nasileniem ekspresji *c-fos* w rejonie mózgu będącym odpowiednikiem NI u szczurów [42].

UKŁAD RELAKSYNY-3 A HIPOKAMPALNY RYTM THETA

Rytm theta jest przejawem synchronicznej aktywności elektrycznej (o częstotliwości 4-8 Hz u ludzi i 5-10 Hz u gryzoni), która jest związana ze zjawiskami, takimi jak: sen paradoksalny, pamięć przestrzenna czy zachowania eksploracyjne. Rejony zaangażowane w generowanie rytmu theta tworzą tzw. układ przegrodowo-hipokampalny, w strukturach którego są obecne zarówno receptory relaksyny-3, jak

i zakończenia nerwowe zawierające ten peptyd. Badania elektrofizjologiczne w warunkach *in vivo* dowodzą, że aktywacja NI moduluje hipokampalny rytm theta i stanowi ważny element w sieci odpowiedzialnej za generowanie tego rytmu w hipokampie szczura [38], a sama stymulacja *nucleus incertus* wywołuje oscylującą aktywność neuronów obszaru hipokampa o częstotliwości theta. Ponadto leżna NI lub podanie do tej struktury agonisty receptorów GABA_A – muscimolu, prowadzi do zaniku odpowiedzi hipokampa na elektryczną stymulację przedniego siatkowatego jądra mostu (RPO - nucleus reticularis pontis oralis), istotnego regulatora rytmu theta w hipokampie. Także iniekcje agonisty receptorów RXFP3 – R3/I5 do obszaru przegrody zwiększają moc oscylacji o częstotliwości theta, zarówno u szczurów w stanie narkozy, jak i przytomnych w ich codziennym środowisku [28]. Podanie antagonisty tych receptorów do tego obszaru redukuje natomiast opisywaną aktywność podczas eksplorowania nowego, bogatego w bodźce środowiska oraz powoduje pogorszenie wyników w testach pamięci przestrzennej.

Układ relaksyny-3 a rytmy okołodobowe

Rozmieszczenie włókien relaksynowych i receptorów RXFP3 w strukturach ośrodkowego układu nerwowego, sugeruje udział tego peptydu w modulacji cyklu sen/czuwanie i rytmiki okołodobowej. W szczególności unerwienie bocznego podwzgórza świadczy o interakcji relaksyny-3 z neuronami syntetyzującymi oreksyny czy hormon koncentrujący melaninę (MCH), które są ważne w stabilizacji stanów sen/czuwanie [46]. Ponadto neurony wytwarzające relaksynę-3 unerwiają takie struktury jak: jądro nadskrzyżowaniowe (SCN, suprachiasmatic nucleus, nadrzędny oscylator zegara biologicznego) czy listek ciała kolankowatego bocznego wzgórza (IGL) [27]. IGL jest odpowiedzialny za integrację informacji świetlnych, pochodzących z siatkówki, z nieświetlnymi informacjami przekazywanymi przez różne układy nieswoiste mózgowia. Wiadomo, że IGL otrzymuje unerwienie z populacji komórek PAG wytwarzających relaksynę-3, a neurony w nim umiejscowione mogą być zarówno aktywowane, jak i hamowane przez agonistę RXFP3 [7]. Dodatkowo obecność receptora CRF₁ na neuronach wytwa-

rzających relaksynę-3 w PAG sugeruje, że ten nieswoisty układ moduluje rytmikę okołodobową w odpowiedzi na bodźce stresowe. Wykazano także, że ekspresja relaksyny-3 zmienia się w 24-godzinnym cyklu okołodobowym, osiągając najwyższy poziom o godzinie 20:00 (fazy ciemnej/aktywnej) i najniższy o 08:00 (fazy jasnej/nieaktywnej) [1]. Koreluje to z dobrze znaną rytmiką wydzielania CRF, który, jak wiadomo, stymuluje ekspresję relaksyny-3. Do tej pory wyniki tylko jednego badania wskazują, że dokomorowe podanie agonisty RXFP3 powoduje wzrost aktywności lokomotorycznej na początku fazy jasnej, jednak nie w fazie ciemnej [57]. Pozostałe doniesienia wskazują, że podanie ludzkiej relaksyny-3 lub agonisty RXFP3 nie powoduje wzrostu aktywności lokomotorycznej [14,18,32,33]. W tym miejscu należy wspomnieć, że mysie mutanty pozbawione relaksyny-3 charakteryzują się spadkiem aktywności lokomotorycznej i wydłużeniem okresów snu podczas fazy ciemnej/aktywnej [57]. Niemniej jednak, interpretując wyniki badań nad zmienionymi genetycznie zwierzętami, pamiętać należy o mechanizmach kompensacyjnych, które mogą wpływać na ich zachowanie i fizjologię.

PODSUMOWANIE

Zebrane wyniki badań podsumowują obecny stan wiedzy o układzie relaksyny-3 i jej receptorze RXFP3, na różnych poziomach złożoności: od molekularnego po funkcjonalny. Opisane dane dotyczą roli tego nieswoistego układu w fizjologii ssaków, z naciskiem na udział w reakcji stresowej i kontroli pobierania pokarmu, ukazując układ relaksyny-3 jako istotny element wielotorowego procesu kontroli pobierania pokarmu. Wydaje się on jednak odmienny od lepiej poznanych, klasycznych dróg modulujących tę potrzebę organizmu. Wpływa na wzrost ilości przyjmowanego pożywienia, bez wpływania na aktywność czy wypadkowy metabolizm organizmu. Jednak wzmożone pobieranie pokarmu, wywołane przewlekłym pobudzeniem systemu sygnalizacji relaksyna-3/RXFP3, prowadzi do wzrostu masy ciała, co może mieć szczególne znaczenie w sytuacjach stresowych. Kontynuacja badań nad układem relaksynowym, może się przyczynić do lepszego zrozumienia mechanizmów zaburzeń takich jak anoreksja czy otyłość.

PIŚMIENICTWO

- [1] Banerjee A., Shen P.J., Gundlach A.L.: Relaxin-3 neurons in nucleus incertus of the rat: effect on activity of psychological stress and the light-dark cycle. *FENS Abstr.* 3, A117.2., 2006
- [2] Banerjee A., Shen P.J., Ma S., Bathgate R.A., Gundlach A.L.: Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of relaxin-3 expression via CRF1 activation. *Neuropharmacology*, 2010; 58: 145-155
- [3] Bathgate R.A., Halls M.L., van der Westhuizen E.T., Callander G.E., Kocan M., Summers R.J.: Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol. Rev.*, 2013; 93: 40-80
- [4] Bathgate R.A., Samuel C.S., Burazin T.C., Layfield S., Claasz A.A., Reytomas I.G., Dawson N.F., Zhao C., Bond C., Summers R.J., Parry L.J., Wade J.D., Tregear G.W.: Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 1148-1157
- [5] Bathgate R.A., Scott D.J., Chung S.: Searching the human genome database for novel relaxin- and insulin-like peptides. *Lett. Pept. Sci.*, 2001; 129-132
- [6] Bennett R.G., Heimann D.G., Hamel F.G.: Degradation of relaxin family peptides by insulin-degrading enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009; 1160: 38-41
- [7] Blasiak A., Blasiak T., Lewandowski M.H., Hossain M.A., Wade J.D., Gundlach A.L.: Relaxin-3 innervation of the intergeniculate leaflet of the rat thalamus - neuronal tract-tracing and in vitro electrophysiological studies. *Eur. J. Neurosci.*, 2013; 37: 1284-1294
- [8] Boels K., Hermans-Borgmeyer I., Schaller H.C.: Identification of a mouse orthologue of the G-protein-coupled receptor SALPR and its expression in adult mouse brain and during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 2004; 152: 265-268

- [9] Burazin T.C., Bathgate R.A., Macris M., Layfield S., Gundlach A.L., Tregear G.W.: Restricted, but abundant, expression of the novel rat gene-3 (R3) relaxin in the dorsal tegmental region of brain. *J. Neurochem.*, 2002; 82: 1553-1557
- [10] Chen J., Kuei C., Sutton S.W., Bonaventure P., Nepomuceno D., Eriste E., Sillard R., Lovenberg T.W., Liu C.: Pharmacological characterization of relaxin-3/INSL7 receptors GPCR135 and GPCR142 from different mammalian species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005; 312: 83-95
- [11] Donizetti A., Fiengo M., Minucci S., Aniello F.: Duplicated zebrafish relaxin-3 gene shows a different expression pattern from that of the co-orthologue gene. *Dev. Growth Differ.*, 2009; 51: 715-722
- [12] Donizetti A., Grossi M., Pariante P., D'Aniello E., Izzo G., Minucci S., Aniello F.: Two neuron clusters in the stem of postembryonic zebrafish brain specifically express relaxin-3 gene: first evidence of nucleus incertus in fish. *Dev. Dyn.*, 2008; 237: 3864-3869
- [13] English J.D., Sweatt J.D.: Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 24329-24332
- [14] Ganella D.E., Callander G.E., Ma S., Bye C.R., Gundlach A.L., Bathgate R.A.: Modulation of feeding by chronic rAAV expression of a relaxin-3 peptide agonist in rat hypothalamus. *Gene Ther.*, 2013; 20: 703-716
- [15] Ghattas M.H., Mehanna E.T., Mesbah N.M., Abo-Elmatty D.M.: Relaxin-3 is associated with metabolic syndrome and its component traits in women. *Clin. Biochem.*, 2013; 46: 45-48
- [16] Goto M., Swanson L.W., Canteras N.S.: Connections of the nucleus incertus. *J. Comp. Neurol.*, 2001; 438: 86-122
- [17] Halls M.L., van der Westhuizen E.T., Bathgate R.A., Summers R.J.: Relaxin family peptide receptors--former orphans reunite with their parent ligands to activate multiple signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.*, 2007; 150: 677-691
- [18] Hida T., Takahashi E., Shikata K., Hirohashi T., Sawai T., Seiki T., Tanaka H., Kawai T., Ito O., Arai T., Yokoi A., Hirakawa T., Ogura H., Nagasu T., Miyamoto N., Kuromitsu J.: Chronic intracerebroventricular administration of relaxin-3 increases body weight in rats. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 2006; 26: 147-158
- [19] Kong R.C., Shilling P.J., Lobb D.K., Gooley P.R., Bathgate R.A.: Membrane receptors: structure and function of the relaxin family peptide receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2010; 320: 1-15
- [20] Kuei C., Sutton S.W., Bonaventure P., Pudiak C., Shelton J., Zhu J., Nepomuceno D., Wu J., Chen J., Kamme F., Seierstad M., Hack M.D., Bathgate R.A., Hossain M.A., Wade J.D., Atack J., Lovenberg T.W., Liu C.: R3(BA23-27)R/15 chimeric peptide, a selective antagonist for GPCR135 and GPCR142 over relaxin receptor LGR7: in vitro and in vivo characterization. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 25425-25435
- [21] Lein E.S., Hawrylycz M.J., Ao N., Ayres M., Bensinger A., Bernard A., Boe A.F., Boguski M.S., Brockway K.S., Byrnes E.J., Chen L., Chen L., Chen T.M., Chin M.C., Chong J. i wsp.: Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 2007; 445: 168-176
- [22] Lenglos C., Mitra A., Guèvremont G., Timofeeva E.: Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. *Genes Brain Behav.*, 2013; 12: 370-387
- [23] Liu C., Chen J., Sutton S. W., Roland B., Kuei C., Farmer N., Sillard R., Lovenberg T. W.: Identification of relaxin-3/INSL7 as a ligand for GPCR142. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 50765-50770
- [24] Liu C., Eriste E., Sutton S.W., Chen J., Roland B., Kuei C., Farmer N., Jörnvall H., Sillard R., Lovenberg T.W.: Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPCR135. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 50754-50764
- [25] Liu C., Kuei C., Sutton S., Chen J., Bonaventure P., Wu J., Nepomuceno D., Kamme F., Tran D.T., Zhu J., Wilkinson T., Bathgate R., Eriste E., Sillard R., Lovenberg T.W.: INSL5 is a high affinity specific agonist for GPCR142 (GPR100). *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 292-300
- [26] Ma S., Blasiak A., Olucha-Bordonau F.E., Verberne A.J., Gundlach A.L.: Heterogeneous responses of nucleus incertus neurons to corticotrophin-releasing factor and coherent activity with hippocampal theta rhythm in the rat. *J. Physiol.*, 2013; 591: 3981-4001
- [27] Ma S., Bonaventure P., Ferraro T., Shen P.J., Burazin T.C., Bathgate R.A., Liu C., Tregear G.W., Sutton S.W., Gundlach A.L.: Relaxin-3 in GABA projection neurons of nucleus incertus suggests widespread influence on forebrain circuits via G-protein-coupled receptor-135 in the rat. *Neuroscience*, 2007; 144: 165-190
- [28] Ma S., Olucha-Bordonau F.E., Hossain M.A., Lin F., Kuei C., Liu C., Wade J.D., Sutton S.W., Núñez A., Gundlach A.L.: Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory by relaxin-3 neurons of the nucleus incertus. *Learn. Mem.*, 2009; 16: 730-742
- [29] Ma S., Sang Q., Lanciego J.L., Gundlach A.L.: Localization of relaxin-3 in brain of Macaca fascicularis: identification of a nucleus incertus in primate. *J. Comp. Neurol.*, 2009; 517: 856-872
- [30] Ma S., Shen P.J., Sang Q., Lanciego J.L., Gundlach A.L.: Distribution of relaxin-3 mRNA and immunoreactivity and RXFP3-binding sites in the brain of the macaque, Macaca fascicularis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009; 1160: 256-258
- [31] McGowan B.M., Stanley S.A., Donovan J., Thompson E.L., Patterson M., Semjonous N.M., Gardiner J.V., Murphy K.G., Ghatei M.A., Bloom S.R.: Relaxin-3 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008; 295: E278-E286
- [32] McGowan B.M., Stanley S.A., Smith K.L., Minnion J.S., Donovan J., Thompson E.L., Patterson M., Connolly M.M., Abbott C.R., Small C.J., Gardiner J.V., Ghatei M.A., Bloom S.R.: Effects of acute and chronic relaxin-3 on food intake and energy expenditure in rats. *Regul. Pept.*, 2006; 136: 72-77
- [33] McGowan B.M., Stanley S.A., Smith K.L., White N.E., Connolly M.M., Thompson E.L., Gardiner J.V., Murphy K.G., Ghatei M.A., Bloom S.R.: Central relaxin-3 administration causes hyperphagia in male Wistar rats. *Endocrinology*, 2005; 146: 3295-3300
- [34] McGowan B.M., Stanley S.A., White N.E., Spangeus A., Patterson M., Thompson E.L., Smith K.L., Donovan J., Gardiner J.V., Ghatei M.A., Bloom S.R.: Hypothalamic mapping of orexigenic action and Fos-like immunoreactivity following relaxin-3 administration in male Wistar rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 292: E913-E919
- [35] Miyamoto Y., Watanabe Y., Tanaka M.: Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain. *Regul. Pept.*, 2008; 145: 54-59
- [36] Morikawa Y., Ueyama E., Senba E.: Fasting-induced activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.*, 2004; 16: 105-112
- [37] Munro J., Skrobot O., Sanyoura M., Kay V., Susce M.T., Glaser P.E., de Leon J., Blakemore A.I., Arranz M.J.: Relaxin polymorphisms associated with metabolic disturbance in patients treated with antipsychotics. *J. Psychopharmacol.*, 2012; 26: 374-379
- [38] Núñez A., Cervera-Ferri A., Olucha-Bordonau F., Ruiz-Torner A., Teruel V.: Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *Eur. J. Neurosci.*, 2006; 23: 2731-2738
- [39] Olson B.R., Drutarosky M.D., Chow M.S., Hruby V.J., Stricker E.M., Verbalis J.G.: Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides*, 1991; 12: 113-118
- [40] Olson B.R., Drutarosky M.D., Stricker E.M., Verbalis J.G.: Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: evidence for central oxytocin inhibition of food intake. *Endocrinology*, 1991; 129: 785-791
- [41] Otsubo H., Onaka T., Suzuki H., Katoh A., Ohbuchi T., Todoroki M., Kobayashi M., Fujihara H., Yokoyama T., Matsumoto T., Ueta Y.: Centrally administered relaxin-3 induces Fos expression in the

osmosensitive areas in rat brain and facilitates water intake. *Peptides*, 2010; 31: 1124-1130

[42] Rajkumar R., See L.K., Dawe G.S.: Acute antipsychotic treatments induce distinct c-Fos expression patterns in appetite-related neuronal structures of the rat brain. *Brain Res.*, 2013; 1508: 34-43

[43] Rosengren K.J., Lin F., Bathgate R.A., Tregear G.W., Daly N.L., Wade J.D., Craik D.J.: Solution structure and novel insights into the determinants of the receptor specificity of human relaxin-3. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 5845-5851

[44] Ryan P.J., Büchler E., Shabanpoor F., Hossain M.A., Wade J.D., Lawrence A.J., Gundlach A.L.: Central relaxin-3 receptor (RXFP3) activation decreases anxiety- and depressive-like behaviours in the rat. *Behav. Brain Res.*, 2013; 244: 142-151

[45] Ryan P.J., Ma S., Olucha-Bordonau F.E., Gundlach A.L.: Nucleus incertus - an emerging modulatory role in arousal, stress and memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2011; 35: 1326-1341

[46] Saper C.B., Scammell T.E., Lu J.: Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 2005; 437: 1257-1263

[47] Scott D.J., Fu P., Shen P.J., Gundlach A., Layfield S., Riesewijk A., Tomiyama H., Hutson J.M., Tregear G.W., Bathgate R.A.: Characterization of the rat INSL3 receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005; 1041: 13-16

[48] Shen C., Tsimberg Y., Salvatore C., Meller E.: Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci.*, 2004; 5: 36

[49] Silvertown J.D., Neschadim A., Liu H.N., Shannon P., Walia J.S., Kao J.C., Robertson J., Summerlee A.J., Medin J.A.: Relaxin-3 and receptors in the human and rhesus brain and reproductive tissues. *Regul. Pept.*, 2010; 159: 44-53

[50] Smith C.M., Hosken I.T., Sutton S.W., Lawrence A.J., Gundlach A.L.: Relaxin-3 null mutation mice display a circadian hypoactivity phenotype. *Genes Brain Behav.*, 2012; 11: 94-104

[51] Smith C.M., Lawrence A.J., Sutton S.W., Gundlach A.L.: Behavioral phenotyping of mixed background (129Sv:B6) relaxin-3 knockout mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009; 1160: 236-241

[52] Smith C.M., Ryan P.J., Hosken I.T., Ma S., Gundlach A.L.: Relaxin-3 systems in the brain - the first 10 years. *J. Chem. Neuroanat.*, 2011; 42: 262-275

[53] Smith C.M., Shen P.J., Banerjee A., Bonaventure P., Ma S., Bathgate R.A., Sutton S.W., Gundlach A.L.: Distribution of relaxin-3 and RXFP3 within arousal, stress, affective, and cognitive circuits of mouse brain. *J. Comp. Neurol.*, 2010; 518: 4016-4045

[54] Sudo S., Kumagai J., Nishi S., Layfield S.L., Ferraro T., Bathgate R.A., Hsueh A.J.: H3 relaxin is a specific ligand for LGR7 and activa-

tes the receptor by interacting with both the ectodomain and the exoloop 2. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 7855-7862

[55] Sutton S.W., Bonaventure P., Kuei C., Nepomuceno D., Wu J., Zhu J., Lovenberg T.W., Liu C.: G-protein-coupled receptor (GPCR)-142 does not contribute to relaxin-3 binding in the mouse brain: further support that relaxin-3 is the physiological ligand for GPCR135. *Neuroendocrinology*, 2005; 82: 139-150

[56] Sutton S.W., Bonaventure P., Kuei C., Roland B., Chen J., Nepomuceno D., Lovenberg T.W., Liu C.: Distribution of G-protein-coupled receptor (GPCR)135 binding sites and receptor mRNA in the rat brain suggests a role for relaxin-3 in neuroendocrine and sensory processing. *Neuroendocrinology*, 2004; 80: 298-307

[57] Sutton S.W., Shelton J., Smith C., Williams J., Yun S., Motley T., Kuei C., Bonaventure P., Gundlach A., Liu C., Lovenberg T.W.: Metabolic and neuroendocrine responses to RXFP3 modulation in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009; 1160: 242-249

[58] Tanaka M., Iijima N., Miyamoto Y., Fukusumi S., Itoh Y., Ozawa H., Iyata Y.: Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *Eur. J. Neurosci.*, 2005; 21: 1659-1670

[59] Torres S.J., Nowson C.A.: Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*, 2007; 23: 887-894

[60] Tregear G.W., Bathgate R.A., Layfield S., Ferraro T., Gundlach A., Ma S., Lin F., Hanson N.F., Summers R.J., Rosengren J., Craik D.J., Wade J.D.: The chemistry and biology of human relaxin-3. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005; 1041: 40-46

[61] Van der Westhuizen E.T., Werry T.D., Sexton P.M., Summers R.J.: The relaxin family peptide receptor 3 activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 through a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.*, 2007; 71: 1618-1629

[62] Watanabe Y., Miyamoto Y., Matsuda T., Tanaka M.: Relaxin-3/INSL7 regulates the stress-response system in the rat hypothalamus. *J. Mol. Neurosci.*, 2011; 43: 169-174

[63] Watanabe Y., Tsujimura A., Takao K., Nishi K., Ito Y., Yasuhara Y., Nakatomi Y., Yokoyama C., Fukui K., Miyakawa T., Tanaka M.: Relaxin-3-deficient mice showed slight alteration in anxiety-related behavior. *Front. Behav. Neurosci.*, 2011; 5: 50

[64] Wilkinson T.N., Speed T.P., Tregear G.W., Bathgate R.A.: Evolution of the relaxin-like peptide family. *BMC Evol. Biol.*, 2005; 5: 14

[65] Wilkinson T.N., Speed T.P., Tregear G.W., Bathgate R.A.: Coevolution of the relaxin-like peptides and their receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005; 1041: 534-539

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.