

Disertační práce

**ÚLOHA NEUROPEPTIDŮ PŘI STRESU
A PATOFYZIOLOGII EAE**

Mgr. Ivana Kramáriková

2022

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Disertační práce

Studijní program: Farmakologie a toxikologie



**ÚLOHA NEUROPEPTIDŮ PŘI STRESU
A PATOFYZIOLOGII EAE**

The Role of Neuropeptides in Stress and in Pathophysiology of EAE

Mgr. Ivana Kramáriková

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Danica Michaličková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 10. 02. 2022

Mgr. Ivana Kramáriková

Podpis

Identifikační záznam:

KRAMÁRIKOVÁ, Ivana. Úloha neuropeptidů při stresu a patofyziologii EAE.
[The Role of Neuropeptides in Stress and in Pathophysiology of EAE]. Praha,
2022. 114 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1.lékařská fakulta,
Farmakologický ústav. Školitel: prof. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.

Poděkování autora

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří se podíleli na tvorbě této práce a to především svému školiteli prof. MUDr. Ondřeji Slanařovi, PhD. za jeho trpělivost, ochotu a odbornou pomoc při sepisování této práce.

Veliké poděkování patří i Mgr. Danici Michaličkové, PhD., která byla konzultantkou mého postgraduálního studia a mé disertace a po celou dobu mě podporovala a pomáhala při přípravě této práce.

Dále patří poděkování všem kolegům z Farmakologického ústavu 1. LF UK a VFN za spolupráci a podporu během mého studia.

V neposlední řadě patří vřelý dík mé rodině, hlavně mému manželovi Ing. Matúši Kramárikovi za morální podporu.

Souhrn

Úvod a cíl: Neuropeptidy tvoří rozsáhlou skupinu biologicky aktivních látek a jejich účinky závisí na aktivitě a lokalizaci specifických receptorů.

Dosud není zcela objasněn mechanismus regulačních/modulačních účinků neuropeptidů a tyto mezery v našich znalostech pak ztěžují možnost jejich terapeutického ovlivnění. Naší hypotézou bylo, že podobně jako byly popsány účinky galaninergního systému na kardiovaskulární systém, může být galaninergní systém jedním z významných modulátorů hypotalamo-hypofýzo-adrenální osy a může proto modulovat stresovou odpověď či patofyziologii vybraných neurologických onemocnění.

Cílem naší práce bylo zjistit přítomnost a expresi galaninových (GalR) a CRH (CRH-R) receptorů za bazálních podmínkách a při stresu v adenohipofýze a hypofýze a za patologických podmínek v míše na myším modelu roztroušené sklerózy, experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) a určit buněčnou lokalizaci GalR1 (oligodendrocyty, mikroglie, astrocyty, ependymální buňky a endotelové buňky v kapilárách).

Výsledky: Expresе všech testovaných galaninergních peptidů byla stanovena v adenohipofýze. Bylo zjištěno, že expresе mRNA GalR2 v adenohipofýze za bazálních podmínek byla mnohem vyšší než expresе mRNA GalR1 a GalR3. Zatímco akutní stres nevyvolal v adenohipofýze žádné změny v expresi GalR2, expresе receptoru GalR1 se naopak zvýšila a expresе receptoru GalR3 se snížila. Expresе CRH receptorů byla zkoumána v hypofýze u kontrolních skupin Wild-type (WT) myší a CRH knock-out (KO) myší. Zatímco u WT a CRH-KO zvířat se relativní expresе mRNA pro CRH-R1 významně nelišila, expresе mRNA pro CRH-R2 byla významně vyšší u zvířat WT. Expresе mRNA obou receptorů CRH v intervalu akutního stresu 30 minut se nelišila od kontrolních hodnot. Stres v intervalu 120 minut vyvolal významný pokles jak CRH-R1, tak CRH-R2. Toto zjištění podpořilo stanovení expresе mRNA CREB, jejíž hladiny se rovněž snížily po aplikaci akutního stresu v intervalu 120 minut. Imunohistochemická analýza odhalila u modelu EAE expresi GalR1 v ependymálních a endoteliálních buňkách míchy, v oligodendrocytech byla zjištěna slabá imunoreaktivita. Expresе mRNA GalR1 byla v míše snížena. Distribuce GalR1 byla stanovena v gliových buňkách v modelu EAE.

Závěr: V práci jsme prokázali přítomnost galaninu, galanin like peptidu a všech tří podtypů galaninových receptorů v adenohypofýze a CRH receptorů v hypofýze za bazálních podmínek a po stresu. Prokázali jsme zapojení galaninergního a CRH systému v adenohypofýze a hypofýze do regulace stresu. Stanovili jsme také distribuci GalR1 v gliových buňkách v modelu EAE a zjistili snížení mRNA GalR1 v míše.

Abstract

Introduction and Aim: Neuropeptides are widely distributed group of biologically active substances and their effects depend on their activity and localization of specific receptors.

The mechanism of the regulatory / modulatory effects of neuropeptides has not been fully elucidated yet, and these gaps in our knowledge make it difficult for them to influence them therapeutically. Our hypothesis was that similar to the effects of the galaninergic system on the cardiovascular system, the galaninergic system may be one of the important modulators of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and may therefore modulate the stress response or pathophysiology of selected neurological diseases.

The aim of our study was to investigate presence and expression of CRH and Galanin receptors in the basal conditions and in stress in adenohypophysis and in hypophysis and in pathological conditions - in the spinal cords in the murine model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and determine GalR1 cellular localization (oligodendrocytes, microglia, astrocytes, ependymal cells, and endothelial cells in the capillaries).

Results: The expression of all tested galaninergic peptides was determined in the adenohypophysis. It was found that the expression of the GalR2 mRNA in adenohypophysis under basal conditions was much higher than the GalR1 and GalR3 mRNA expression. Acute stress did not induce any alterations in GalR2 expression in adenohypophysis, whereas GalR1 receptor expression increased on the contrary and GalR3 receptor expression decreased.

CRH receptors expression was studied in hypophysis. In control WT and CRH-KO animals, relative expressions of mRNA for CRH-R1 was not significantly different, while expression of mRNA for CRH-R2 was significantly higher in WT animals. Expression of mRNA of both CRH receptors in acute stress interval 30 min did not differ from the control values. Stress in the interval of 120 min revealed the significant decrease of both CRH-R1 and CRH-R2. This finding supported the determination of expression of CREB mRNA, which levels also decreased after 120 min interval of acute stress. In EAE model, immunohistochemical analyses revealed GalR1 expression in the ependymal and endothelial cells in the spinal cords, with a weak immunoreactivity detected in the

oligodendrocytes. GalR1 mRNA expression was decreased in the spinal cords. The distribution of GalR1 in the glial cells in the EAE model was determined. **Conclusion:** We demonstrated the presence of galanin, galanin-like peptide and all three subtypes of galanin in the adenohipophysis and CRH receptors in hypophysis under basal conditions and after stress. We have demonstrated the involvement of galaninergic and CRH system in the adenohipophysis and hypophysis in the stress regulation. We also determined the distribution of GalR1 in the glial cells in the EAE model and found decrease in mRNA of GalR1 in the spinal cords.

OBSAH

SOUHRN.....	6
OBSAH.....	10
Seznam zkratk	13
ÚVOD.....	15
1.1 Stres.....	15
1.1.1 Úloha neurohormonů u stresu.....	16
1.1.2 Úloha hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osy.....	16
1.2 Galaninergní systém	19
1.2.1 Galanin	20
1.2.2 Galanin-like peptid.....	21
1.2.3 Galaninové receptory	22
1.2.4 Galaninergní systém v adenohipofýze	23
1.3 CRH systém	25
1.3.1 Kortikotropin uvolňující hormon	25
1.3.2 CRH receptory	26
1.3.2.1 Struktura CRH receptorů.....	27
1.3.2.2 Lokalizace CRH receptorů v CNS	28
1.3.3 CRH vazebný protein.....	30
1.3.4 Ligandy CRH receptorů	31
1.3.4.1 Agonisté CRH.....	32
1.3.4.2 Antagonisté CRH	33
1.3.4.2.1 Antagonisté peptidové povahy	33
1.3.4.2.2 Antagonisté nepeptidové povahy	34
1.3.5 Současný výzkum terapeutického využití CRH ligandů.....	36
1.4 Neurobiologie neurodegenerativních onemocnění mozku ve vztahu k adenohipofýze	39
1.5 Roztroušená skleróza.....	40
1.5.1 Patogeneze	40
1.5.2 Epidemiologie a rizikové faktory	41
1.5.3 Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)	42
1.5.4 Galanin a jeho role v RS	42
1.5.5 Možnosti léčby	43
2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	44
3 METODY.....	45
3.1 Experiment s galaninergním systémem	45
3.2 Experiment s CRH systémem	45
3.3 Experimentu s EAE modelem.....	45
3.4 Statistika	46
3.4.1 Experiment s galaninergním systémem.....	46
3.4.2 Experiment s CRH systémem.....	46
3.4.3 Experiment s EAE modelem	47
3.5 Aplikace stresu	47
3.5.1 Experiment s galaninergním systémem.....	47

3.5.2	Experiment s CRH systémem.....	47
3.6	Odběr vzorků	48
3.6.1	Experiment s galaninergním systémem.....	48
3.6.2	Experiment s CRH systémem.....	49
3.7	Zpracování adenohipofýzy a míchy pro imunoflorescenci	49
3.8	Příprava homogenátů adenohipofýz a hipofýz pro Western blot a RT PCR	50
3.9	Western blot	50
3.9.1	Homogenizace tkáně u metody Western blot.....	51
3.9.2	Separace proteinů.....	51
3.9.3	Blotování.....	51
3.9.4	Identifikace proteinu pomocí protilátek.....	53
3.10	Metoda s využitím imunoflorescence	53
3.10.1	Protilátky	53
3.10.1.1	Primární protilátky.....	54
3.10.1.2	Sekundární protilátky	54
3.10.2	Imunofluorescenční postup stanovení testovaných peptidů..	55
3.11	Stanovení exprese mRNA testovaných peptidů.....	56
3.11.1	Experiment s galaninergním systémem a CRH systémem	56
3.11.1.1	Izolace RNA.....	57
3.11.1.2	Měření koncentrace a čistoty RNA	59
3.11.1.3	Reverzní transkripce	60
3.11.1.4	Real-time PCR.....	61
3.11.2	Experiment s EAE modelem	63
3.11.2.1	Histologie v experimentu s EAE modelem	63
4	VÝSLEDKY	65
4.1	Optimalizace metody Western blot	66
4.1.1	Testování homogenizátorů a homogenizačních pufrů	66
4.1.2	Testování inhibitorů protáz a nanášecích pufrů	69
4.1.3	Testování různých blotovacích membrán a gelů	71
4.1.4	Galaninergní peptidy v adenohipofýze – metoda Western blot i s ověřením specificity protilátek.....	73
4.2	Stanovení galaninergního systému v adenohipofýze.....	74
4.2.1	Imunohistochemická detekce Gal a GalLP za fyziologických podmínek v adenohipofýze.....	74
4.2.2	Stanovení exprese galaninergních receptorů v adenohipofýze	76
4.2.3	Expresa galaninergního systému po aplikaci stresu.....	79
4.2.4	Kolokalizace galaninergního systému a ACTH v adenohipofýze.....	79
4.2.4.1	Kolokalizace galaninu a galanin-like peptidu v adenohipofýze s ACTH.....	80
4.2.4.2	Kolokalizace galaninergních receptorových subtypů s ACTH v adenohipofýze.....	81
4.3	Stanovení CRH systému v hipofýze.....	83
4.3.1	Regulace genové exprese CRH receptorů a transkripčního proteinu CREB v hipofýze myši po stresu.....	83
4.4	Stanovení galaninergního systému u modelu EAE.....	85
4.4.1	Genová exprese	85

4.4.2	Imunohistochemie	87
4.4.3	Histologie	89
5	DISKUZE.....	90
6	ZÁVĚRY	97
7	SEZNAM VLASTNÍCH PREZENTACÍ.....	99
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	101

Seznam zkratk

ACTH	Adrenokortikotropní hormon (z angl. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AD	Alzheimerova choroba (z angl. <i>Alzheimer's disease</i>)
cAMP	Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CNS	Centrální nervový systém
CREB	cAMP responsabilní element (CRE) binding protein
CRF	Kortikotropin uvolňující faktor (z angl. <i>corticotropin releasing factor</i>)
CRH	Kortikotropin uvolňující hormon (z angl. <i>corticotropin releasing hormone</i>)
CRH-BP	Kortikotropin vážící protein (z angl. <i>corticotropin binding protein</i>)
CRH-R	Receptor pro kortikotropin uvolňující hormon (z angl. <i>corticotropin releasing hormone receptor</i>)
EAE	Experimentální autoimunitní encefalomyelitida
Gal	Galanin
GalLP	Galanin-like peptid
GalR1	Galaninový receptor subtyp 1
GalR2	Galaninový receptor subtyp 2
GalR3	Galaninový receptor subtyp 3
GLP-1	Peptid podobný glukagonu (z angl. <i>glukagon-like peptide-1</i>)
GR	Glukokortikoidní receptory
GREs	Glukokortikoid odpovídající elementy (z angl. <i>glucocorticoid-responsive elements</i>)
HPA-os	Hypotalamo-hypofýzo-adrenální osa
IMO	Imobilizační stres

LK	Levá komora
LS	Levá síň
MR	Mineralokortikoidní receptory
PBS	Fosfátový pufr
PK	Pravá komora
PS	Pravá síň
PVN	Paraventrikulární jádro (z angl. <i>paraventricular nucleus</i>)
RS	Roztroušená skleróza
RT PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
WB	Western blot

Úvod

Neuropeptidy tvoří velmi rozsáhlou skupinu biologicky aktivních látek, kterým je v současnosti věnována velká pozornost. Spolu s jejich receptory prezentují nejrozšířenější systém přenosu signálu v mozku. Jejich široká distribuce v centrálním nervovém systému (CNS) přitahuje pozornost vědců a v poslední době také farmaceutických společností. Tyto látky působí buď jako neurotransmitery, nebo jako samostatné molekuly zasahující do regulačních funkcí. Některé mohou být uvolněny do krve, kde působí potom jako hormony. Mezi hlavní činnosti těchto látek patří kromě jiného i zapojení endokrinní, autonomní a imunitní odpovědi na stres a modulace širokého spektra různých typů chování (Klenerová a Hynie, 2007). V souvislosti se stresem se stalo studium neuropeptidů centrem zájmu pro rozsáhlé periferní a centrální regulačně/modulační účinky a pro možné terapeutické využití. Z tohoto pohledu byla popsána celá řada peptidů, jako jsou vazopresin, oxytocin, CRH, galanin, tachykininy, neuropeptid Y, neurotensin, endorfíny, melanokortiny, angiotenzin, cytokiny a jiné. V tomto ohledu CRH a galanin zastávají průkopnickou roli, které se právě tato práce věnuje.

Tato práce vychází z výzkumu mého předchozího pracoviště Laboratoře neurofarmakologie ÚLBLD., Laboratoř byla dlouhodobě zaměřena na regulační úlohu neuropeptidů v mozku a v některých periferních orgánech, na studium stresu a různých poruch mozku u animálních modelů. Výzkum probíhal na úrovni molekulární, buňkové a behaviorální, za použití biochemických, molekulárně-biologických, imunohistochemických a behaviorálních metod, s cílem terapeutického využití neuropeptidů.

1.1 Stres

V současné době existuje nesmírně rozsáhlá literatura týkající se stresu. Pojem stres se v posledních desetiletích objevuje v různých kontextech. Hans Selye již v roce 1936 zavedl pojem stres pro nespecifické odpovědi organismu na různé škodlivé podněty (Selye, 1936; Klenerová a Hynie, 2006). Zároveň potvrdil uvolňování hormonů z dřeně nadledvin, které vyvolávají mobilizaci organismu.

1.1.1 Úloha neurohormonů u stresu

Stres se podílí na vzniku řady onemocnění: kardiovaskulárních (hypertenze, infarkt, stresem indukovaná kardiomyopatie), psychických (deprese, stavy úzkosti, degenerativní onemocnění), gastrointestinálních poruch (žaludeční vředy) a také na vývoji imunitních a onkologických nemocí (Yaribeygi et al., 2017). Přibližně dvě třetiny chorob, které se diagnostikují v ambulancích lékařů, jsou buď přímo vyvolané stresem, nebo mají úzkou souvislost se stresovými situacemi. Za stresu dochází především k aktivaci tří regulačních systémů v organismu, které se vzájemně ovlivňují: nervového, endokrinního a imunitního. Významnou částí neuroendokrinního systému je HPA osa, kde hypotalamus zastává důležitou roli. Jeho paraventriculární jádra (PVN) produkují při akutní fázi stresu hormon kortikotropin. CRH putuje dále do hypofýzy, kde spouští uvolňování ACTH s následnou aktivací kůry nadledvin a produkcí stresových hormonů, hlavně kortizolu. Z hormonů a neurotransmiterových systémů zapojených do stresu, zastává CRH důležitou úlohu. Syntetizuje se i v řadě extrahypotalamických oblastí mozku a zřejmě se podílí nejen na průběhu stresu, ale i řady dalších psychických poruch, jako jsou deprese, demence, Alzheimerova choroba, a jiné (Klenerová a Hynie, 2007; Inda et al., 2017).

Pro výzkum v této oblasti se používá řada animálních modelů různých poruch. Naše laboratoř zavedla animální modely různých typů stresu (Klenerová a Hynie, 2007) a ve spolupráci se zahraničím je využíván i model Alzheimerovy choroby. Tato disertační práce je zaměřena především na úlohu galaninergních neuropeptidů a CRH v souvislosti se stresem. Navázali jsme na poznatky zjištěné na našem pracovišti, především na to, že galanin má antistresové a anxiolytické účinky (Klenerová et al., 2011). Zajímala nás změna exprese klíčových molekul galaninergního a CRH systému a jejich receptorů, na které se vážou.

1.1.2 Úloha hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osy

Na regulaci stresu se podílí zejména dva systémy – sympatoadrenální systém (SAS) a HPA osa. HPA osa patří mezi nejdůležitější endokrinní systémy, zabezpečující homeostázu organismu při zátěži a za stresových podmínek. Při stresu dochází k její aktivaci a následně k uvolnění glukokortikoidů, které mají významné zpětnovazebné účinky na různé struktury a funkce v mozku.

Skládá se ze tří do série uspořádaných složek spojených prostřednictvím cévního systému (Heida et al., 2020):

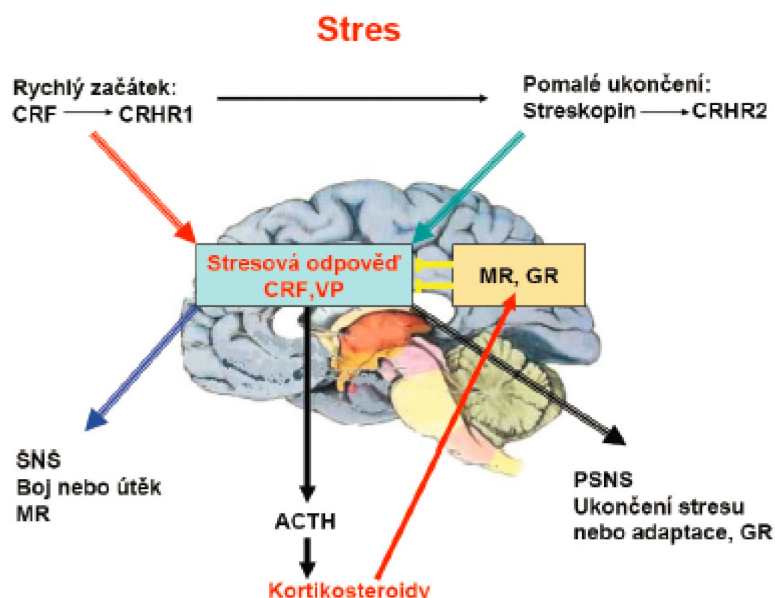
- Neuroendokrinních neuronů nucleus paraventricularis hypothalami, které syntetizují CRH a u některých živočišných druhů i vazopresin;
- Kortikotropních endokrinních buněk adenohipofýzy, které syntetizují ACTH (adrenokortikotropní hormon);
- Buněk kůry nadledvin, které syntetizují glukokortikoidy (v závislosti od živočišného druhu kortizol nebo kortikosteron).

Činnost každé z uvedených tří složek je modulována nervovými a humorálními drahami. V adenohipofýze působí ACTH, který je součástí HPA osy a ovlivňuje uvolňování CRH a expresi dalších významných neuropeptidů (Mitrofanova et al., 2017; Denga et al., 2017). Na našem pracovišti jsme prokázali a popsali ACTH v adenohipofýze (viz obrázek uvedený ve výsledcích). Rozvoj stresu a účast CRH, jeho receptorových podtypů a glukokortikoidů, jsou znázorněny na obrázku 1. Na dvojí úloze CRH ve stresových reakcích se podílejí dva podtypy receptorů, CRH-R1 a CRH-R2. Stresová odpověď je zahájena působením na CRH-R1 receptory se spoluúčastí arginin-vasopresinu (AV). CRH stimuluje kůru nadledvin k vyplavení glukokortikoidů. CRH-R2 jsou zodpovědné za vrácení se organismu k homeostáze po stresu. Selektivní agonisté tohoto receptoru jsou urokortiny (Ucn) a streskopin (Ucn II) (Klenerová a Hynie, 2006).

Uvolňování glukokortikoidů je řízeno na principu zpětné vazby. Své účinky uplatňují přes cytoplasmatické receptory, které jsou lokalizovány především v neuronech limbického systému. Po vazbě ligandu na glukokortikoidní receptory (GR) dochází k jejich translokaci do jádra, kde interagují jako homodimery se specifickými glukokortikoid-responsivními elementy (glucocorticoid – responsive elements – GREs) v DNA a tím ovlivňují určité geny. Aktivované receptory mají schopnost inhibovat přes protein – proteinové interakce různé transkripční faktory, např: c-jun/c-fos a NF-kB, které pozitivně regulují transkripci některých genů účastnících se aktivace a růstu různých typů buněk, např. imunitních (Trnečková et al., 2007).

Předpokládá se, že chronický stres může vést prostřednictvím centrálního působení glukokortikoidů k změnám v činnosti centrálního nervového systému,

kteře se mohou projevit i narušením psychických procesů. Experimentální údaje poukazují na negativní vliv glukokortikoidů na plasticitu neuronů a na jejich neurogenezu. Předpokládá se, že snížená plasticita neuronů, pozorována hlavně v hipokampu, může působit jako jeden z etiopatogenetických faktorů při vzniku psychických poruch (Månsson et al., 2016).



Obr. 1. Účast CRH a jeho receptorů na rozvoji a ukončení stresu (Klenerová a Hynie, 2006).

Stresem uvolněný kortikotropin uvolňující hormon (CRH) působí nejdříve na CRH-R1 receptory, spustí uvolnění ACTH a posléze kortikosteroidů a typickým projevům stresu, jako aktivace sympatického nervového systému (SNS) a odpovědi „boj nebo útěk“. Ukončení stresu nastává po aktivaci CRH-R2 receptorů, na které se vážou specifictí agonisté, jako jsou streskopin (urokordin). Glukokortikoidy mají po proniknutí do mozku zpětnovazebné účinky. Působí na mineralokortikoidní receptor (MR), který reaguje na nižší koncentraci hormonu a zapojuje se v počáteční fázi stresu. V další fázi je ovlivňován i glukokortikoidní receptor (GR), zodpovědný za dlouhodobé projevy stresu. Parasympatický nervový systém (PSNS) se podílí na ukončení stresové odpovědi (Klenerová a Hynie, 2006).

1.2 Galaninergní systém

Galaninergní systém je tvořen několika peptidy a jejich receptory; nejvíce se zatím sleduje galanin a galanin-like peptid a galaninergní receptory (Lang et al., 2015). Tyto neuropeptidy mají velkou budoucnost v terapeutickém využití, zejména díky dosavadnímu nálezů tří galaninergních receptorových subtypů GalR1, GalR2 a GalR3 patřících do rodiny GPCR (receptory spřažené s G-proteiny), které využívají různé messengerové systémy: GalR1 a GalR3 inhibují cyklický cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP), GalR2 je systém spřažený s fosfolipázou C s ovlivněním IP3 (inositol-1,4,5-trisfosfát). Pro galanin-like peptid (GalLP) zatím specifický receptor nalezen nebyl, má však nejvyšší afinitu ke GalR2. Všechny tři subtypy se nachází v CNS a je řada prací snažících se charakterizovat význam jednotlivých subtypů a vymezení jejich účinků. Nejmladším členem galaninové rodiny je alarin. Alarin je peptid složený z 25 aminokyselin a byl poprvé popsán ve tkáni lidského neuroblastického tumoru a kůži a izolován z myšičí mozku, tymu a kůže. Nevykazuje afinitu ani k jednomu z galaninergních receptorů (Webling et al., 2012).

Galanin má velmi rozsáhlé funkce nejen v CNS, ale také v regulaci periferních funkcí, například kardiovaskulárního systému (Diaz-Cabiale et al., 2010), diabetu (Fang et al., 2013), účast galanin-like peptidu v kontrole příjmu potravy a obezity (Fang et al., 2012), v kontrole zánětu (Lang et al., 2007) a další.

Na našem pracovišti byly prokázány protistresové a anxiolytické účinky galaninu po systémovém podání, které přetrvávaly i v době, kdy galanin nebyl již aplikován (Klenerova et al., 2011). Význam tohoto nálezů je především v tom, že systémová aplikace galaninu byla provedena až po proběhlém stresovém podnětu. Centrální, protistresové a anxiolytické účinky jsme potvrdili podáním antagonistů galaninu, které uvedené účinky zablokovaly. Získané výsledky potvrdily, že systémově aplikovaný agonista galanin a antagonist galanin M40, i námi syntetizovaný antagonist galanin peptid chiméra-galanin Y neuropeptid amid, působí na úrovni receptorů a že tento účinek po určitou dobu přetrvává (Klenerova et al., 2011).

Na tyto výsledky navázaly studie sledující zapojení HPA osy, o které je známo, že pro vlastní stresovou odpověď je nutná její aktivace. Jde o složitý

komplex otázek týkajících se dosud nevyřešeného propojení hypotalamu, neurohypofýzy (NH), intermediálního laloku (IL) a adenohypofýzy (AH) a zřejmě i některých periferních tkání. Naše laboratoř publikovala řadu prací o neuropeptidech a jejich účincích za stresu a využití geneticky odlišných potkanů s různou aktivitou HPA osy (Kaminsky et al., 2001; Klenerová et al., 2002; 2011). Řada laboratoří se zabývá lokalizací a vztahem galaninu a galanin-like peptidu s dalšími neurohormony, avšak exprese jednotlivých subtypů galaninergních receptorů v jednotlivých pododdílech hypofýzy za fyziologických podmínek se velmi liší, a dosud neexistuje komplexní studie galaninergního systému ani za bazálních podmínek, ani po působení stresu. Avšak naše pracoviště našlo v neurohypofýze expresi mRNA i expresi proteinu galaninu a jeho receptorů (Hynie et al., 2013; Škopek et al., 2013) a v tomto výzkumu by se mělo pokračovat.

Galanin-like peptid byl podle dosavadních publikací zjištěn pouze v neurohypofýze, kde byl popsán v pituicytech, což je gliální tkáň (Saito et al., 2005). V neurohypofýze popsal Kawasaki a spol. (2007) expresi mRNA GalLP po dehydrataci a solné náloži a také testoval účinek akutního a chronického stresu vyvolaném aplikací endotoxinu LPS. Žádná publikace však neodhalila skutečnou funkci GalLP v neurohypofýze.

Údaje o účasti galaninergního systému v intermediálním laloku (IL) jsou rovněž velice kusé. Fyziologické a patologické funkce u obou tkání IL a NH nejsou objasněny a z těchto důvodů jsou údaje současného stavu poznání v této práci zaměřeny především na adenohypofýzu.

1.2.1 Galanin

Molekula galaninu byla poprvé popsána před více než třiceti lety (Tatemoto et al., 1983), jako „klasický neuropeptid“ s modulačními účinky na neurotransmisi v mozku a periferním nervovém systému. Za poslední dvě dekády let byly v spojitosti s galaninergním systémem objeveny a popsány různé účinky, jako jsou např. působení na metabolismus, endokrinní funkce, imunitu, zánět (Lang et al. 2015). Poprvé byl galanin objeven v tkáni prasečího střeva, později byl nalezen v dalších různých tkáních včetně CNS (hypotalamus, locus coeruleus, amygdala) (Ash a Djouma, 2011). Přestože byl objeven v roce 1980, jeho struktura byla popsána až v roce 1983 (Tatemoto et al., 1983). Galanin je hlavní

signální molekulou takzvaného galaninergního systému (Lang et al. 2007). Působí prostřednictvím třech subtypů galaninového receptoru GalR1, GalR2 a GalR3.

Galanin je široce zastoupený neurotransmitter s pleiotropním účinkem, účastní se řady centrálních i periferních fyziologických procesů jako modulátor inhibice. Má řadu fyziologických účinků, např. je zapojen v regulaci příjmu potravy, v kognitivních funkcích, spánku, u stresových podnětů, v regulaci krevního tlaku, srdeční frekvence a j. Galanin je zapojen i do mnoha patologických stavů, jako je Alzheimerova choroba, diabetes, bolest, epilepsie, deprese a další (Fang et al., 2012).

Lidský galanin je peptid složený z 30 aminokyselin a je vytvořen z proteinu známého jako preprogalanin (129 aminokyselin). Je lokalizován na chromozomu 11q13.3–q13.5. Štěpením preprogalaninu vzniká nejenom galanin, ale i GMPK (galanin message-associated protein), galanin-like peptid a alarin (Santic et al., 2007).

Na našem pracovišti se podařilo syntetizovat antagonistu galaninu, chimerní peptid Galanin - (1-13) Neuropeptid Y - (25-36) amid, který působí na úrovni receptorů a výsledek této interakce po určitou dobu přetrvává (nepublikované údaje). Tyto výsledky potvrdily hypotézu o působení galaninu v CNS v odpovědi na stres.

1.2.2 Galanin-like peptid

Nejvíce příbuzným neuropeptidem galaninu je galanin-like peptid (GalLP), objevený poměrně nedávno v roce 1999 v hypotalamu prasete (Ohtaki et al., 1999). GalLP se váže a rovněž i aktivuje všechny tři galaninergní receptory, a podílí se na řadě biologických funkcí, včetně příjmu potravy, termoregulace a reprodukce. Nejvyšší afinitu má však k receptoru GalR2. Nejnovější publikace uvádí jeho účast na vzniku některých nemocí, jako např. na Alzheimerově nemoci a diabetu (Fang et al., 2017). Ve vysoké míře je exprimován v neuronech hypotalamického jádra *nucleus arcuate* a pituicytech neurohypofýzy. Tyto neurony jsou cílem pro leptin, hormon účastnící se příjmu potravy a kontroly tělesné hmotnosti. Více než 85 % neuronů obsahujících GalLP exprimují receptory pro leptin (Shioda et al., 2011). Dosud však není známo, přes který receptor dochází k anorektickému účinku. V současné době se pozornost obrací ke

GalLP především ve vztahu k jeho možnému terapeutickému využití v léčbě obezity.

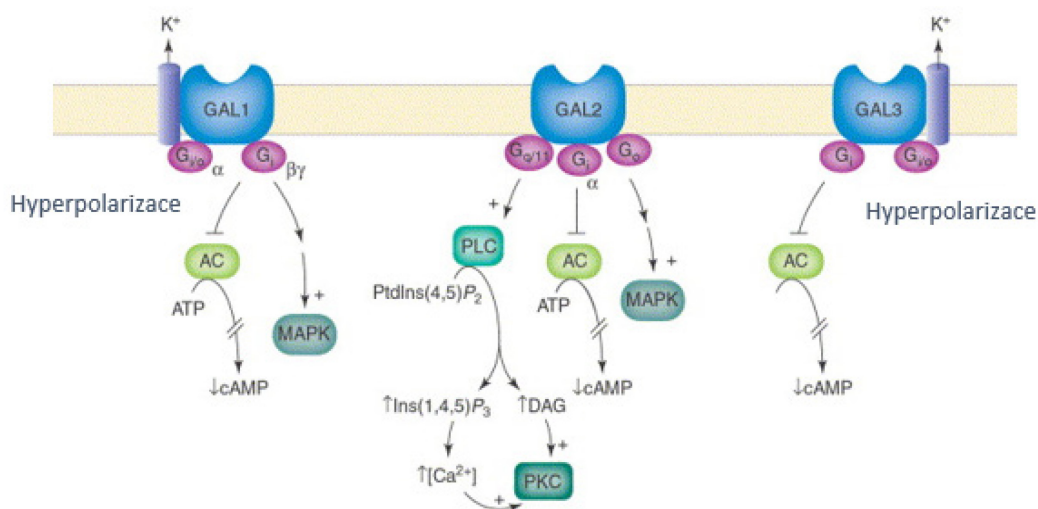
1.2.3 Galaninové receptory

Galaninové receptory využívají různé messengerové systémy, jak bylo již výše uvedeno. GalR1 a GalR3 inhibují cyklický AMP, GalR2 je systém spřažený s fosfolipázou C (PLC) s ovlivněním IP3.

Jako první byl objeven GalR1, a to v buňkách lidského melanomu (Habert-Ortoli, 1994). Jeho aktivací dochází k inhibici adenylátcyklázy (AC) přes $G\alpha_i/\alpha_o$ typy G-proteinů. Rovněž může dojít k stimulaci MAPK (mitogen associated protein kinase) aktivity, přes PKC-nezávislý mechanismus. Mediátorem této akce je $\beta\gamma$ -subjednotka proteinu $G\alpha_i$.

Druhým v pořadí byl GalR2, objeven v hypotalamu potkana, slezině myši a různých tkáních člověka (Webling et al., 2012). Rovněž stimulace receptoru GalR2 ovlivňuje různé subtypy intracelulárních G-proteinů a ovlivňuje četné dráhy transdukce signálu. Nejčastěji popisované a pravděpodobně nejdůležitější dráha zprostředkovává aktivaci fosfolipázy C, která později zvyšuje hydrolýzu inositol fosfatázy (Fathi et al., 1997).

GalR3 byl nejříve izolován z potkaní cDNA (Wang et al., 1997) a později i z lidské cDNA (Smith et al., 1998). Funkce GalR3 stimulační není dosud zcela jasná a je předmětem dalšího výzkumu. GalR3 zřejmě interaguje s G_i/o -typy G-proteinů za účelem stimulace vstupu draselných iontů dovnitř buňky (Kolakowski et al., 1998).



Obr. 2. Galaninové receptory (GalR1, GalR2, GalR3) a jejich mechanismy účinku (Liu a Hökfelt, 2002).

Obrázek 2 znázorňuje galaninové receptory typu 1, 2 a 3 v plazmatické membráně a transdukcii signálu. Jedná se o membránové receptory spřažené s G proteiny s inhibiční aktivitou, receptory prvního a třetího typu aktivují adenylylcyklázu, receptor druhého typu je funkčně propojen s fosfolipázou C (Liu a Hökfelt, 2002).

1.2.4 Galaninergní systém v adenohipofýze

Údaje o výskytu, denzitě a lokalizaci těchto galaninergních neuropeptidů a jejich receptorech se v literatuře velmi liší a často jsou kontroverzní (Lang et al., 2007; Merchenthaler, 2010; Tortorella et al., 2007; Waters a Krause, 2000; Hökfelt a Tatemoto, 2010). Vzhledem ke kontroverzním výsledkům o lokalizaci a účincích galaninergních receptorů v adenohipofýze se někteří autoři domnívají, že v adenohipofýze může být přítomen zatím neidentifikovaný nový subtyp galaninergního receptoru.

V posledním desetiletí byly popsány zajímavé nálezy o významné regulační úloze galaninu v adenohipofýze savců při sekreci adenohipofyzárních hormonů, ale tyto nálezy jsou rovněž rozporuplné, a dokonce často i protichůdné. Vysoké koncentrace galaninu byly prokázány v lidské AH i hypotalamu, a v obou tkáních byly prokázány galaninergní receptory. Tyto nálezy svědčí o důležité úloze galaninergního systému v regulaci uvolňování hypofyzárních hormonů

(Bennet et al., 1991). Zatím však není znám mechanismus působení peptidů, které jsou kolokalizovány s buňkami produkujícími některý z hypofyzárních hormonů. Existuje i řada nálezů, které svědčí o účasti galaninu jako růstového faktoru, který se uplatňuje při proliferaci buněk AH a vzniku adenomů (Berger, 2005; Tortorella et al., 2007). Touto problematikou se zabývá řada prací, které však používají rozdílné metody, i díky tomu se jejich závěry mohou lišit, jak rozebírá ve svém přehledu Liu (2002).

Galanin byl nalezen kolokalizován se somatotrofními, tyrotrofními a laktotrofními buňkami; byl popsán v kortikotropních buňkách u člověka a rovněž v kortikotropním adenomu. Nás zajímala především sekrece ACTH (adrenokortikotropní hormon, kortikotropin, kortikotrofín), který je součástí HPA osy a má důležitou úlohu při stresu. Studium koexprese galaninu a ACTH byla jedna z prvních studií u člověka s cílem využití nových údajů v terapii adenomů, akromegalie a dalších poruch (Hsu et al., 1991). Dnes je již zcela evidentní, že se galanin podílí na sekreci adenohipofyzárních hormonů ACTH, GH, PRL a TSH. Není však zcela jasné, zda galanin je secernován z galaninergních buněk v AH nebo z hypotalamických galaninergních neuronů nebo z vezikul nervových terminálů v AH. Waters a Krause (2000) našli imunoreaktivitu na všech těchto místech a předpokládají, že galaninergní působení v AH je komplexní pochod, kde galanin může mít původ v portálním systému, v galaninergních buňkách, nebo v neuronálních terminálech AH (Liu a Hökfelt, 2002).

Pro potvrzení naší hypotézy, že galaninergní systém je zapojen v modulaci uvolňování adenohipofyzárních hormonů za stresu, především sekrece ACTH, jsme provedli řadu kolokalizačních studií, které však vyžadují další podrobnou analýzu. V souladu s našimi výsledky jsou publikace, které uvádějí, že aplikace galaninu působí zvýšení aktivity HPA osy s následným zvýšeným uvolněním CRH a ACTH, zatímco u stresu působí galanin snížení stresové odpovědi (Picciotto et al., 2010). Vzhledem k tomu, že byla vyslovena hypotéza, že komponenty galaninergního systému mohou sloužit jako cílové struktury pro léčebný zákrok, představuje galaninergní systém v adenohipofýze velmi aktuální téma, které intenzivně zkoumá (přehledy Rauch a Kofler, 2010; Merchenthaler, 2010).

1.3 CRH systém

1.3.1 Kortikotropin uvolňující hormon

Kortikotropin uvolňující hormon (CRH), tzv. kortikoliberin, nazývaný také faktor, neboť byl původně objeven jako hypotalamický faktor (CRF) kontrolující sekreci hypofyzárních proopiomelanokortinových peptidů. V roce 1981 izoloval Vale (Vale et al., 1981) CRF jako ovčí hypotalamický peptid skládající se ze 41 aminokyselin se sekvencí H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala- Asp-Glu-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂. U člověka se CRH liší od ovčího pouze 7 aminokyselinami. Následovalo intenzivní studium purifikovaných hypotalamických extraktů u různých živočišných druhů. Po odhalení struktury CRF se dává přednost označení hormon stimuluje sekreci kortikotropinu. Někteří autoři doporučují používat i nadále označení faktor s tím, že lépe vystihuje funkci tohoto peptidu (Taché a Bonaz, 2007).

CRH je syntetizován CRH genem se zakódovanou oblastí pro translaci prekursoru CRH. Pro-peptid CRH vznikne po odštěpení 24 aminokyselin od prepro-CRH a po dalším odštěpení dvou aminokyselin (lysinu a argininu) vznikne plně funkční CRH peptid. Prepro-CRH peptidem nejsou kódovány další bioaktivní peptidy, na rozdíl od prekurzorů ostatních neuropeptidů. Promotor CRH obsahuje místo pro signální elementy odpovědi, jakými jsou glukokortikoidy, cyklický AMP a místo pro transkripci vazebného místa. Jak již bylo uvedeno, hlavní funkcí CRH v CNS je aktivace sekrece některých mediátorů a hormonů, především ACTH. Syntéza a sekrece CRH a ACTH jsou zpětně regulovány glukokortikoidy kůry nadledvin s následnou produkcí stresových hormonů, hlavně kortisolu, u hlodavců kortikosteronu, na principu negativní zpětné vazby (Aguilera et al., 2001).

Tyto regulační mechanismy jsou v organismu řízeny aktivitou hypotalamo-hypofýzo-nadledvinové osy nejen za fyziologických podmínek, ale i za působení stresu a dalších patologických stavů, např. u behaviorálních a kognitivních poruch funkcí mozku. Tato aktivace HPA osy má pro stresové účinky. Po syntéze CRH v hypotalamu putuje tento peptid do hypofýzy, kde stimuluje CRH-R1 receptory a vyvolá rychlou akutní stresovou odpověď.

Následuje uvolnění ACTH do krevního řečiště a stimulace kůry nadledvin s vyplavením glukokortikoidů, které připraví organismus na akutní stresovou reakci a inhibují další aktivitu HPA osy. Druhý podtyp CRH receptoru CRH-R2 má protistresovou funkci, je aktivován po skončení akutní stresové odpovědi, a vrací HPA osu do rovnováhy. CRH-R2 receptory primárně ovlivňují procesy nezbytné pro přežití, jako jsou příjem potravy, reprodukce a obranné reakce (Aguilera et al., 2004).

Z farmakologického hlediska je důležité určit, které neuropeptidy a jejich receptory jsou lokalizovány v adenohipofýze. Přítomnost galaninergních receptorů a CRH receptorů může umožnit terapeutické ovlivnění regulačních mechanismů aktivovaných v průběhu stresu i dalších podnětů vnějšího okolí. Toto studium také vede k syntéze ligandů, agonistů i antagonistů, ovlivňujících regulační mechanismy v adenohipofýze, jak je popsáno v další části práce.

1.3.2 CRH receptory

W. Vale se spolupracovníky ze Salk Institutu Californské University v San Diegu pokračovali v intenzivním studiu CRH a dalších hormonů a do výzkumu se zapojily rovněž pracovní skupiny z NIH (National Institute of Health) v Bethesdě. Následoval objev CRH receptoru a jeho identifikace v hypofýze potkanů v r. 1983, pomocí vazebných studií s radioligandy (Wynn et al., 1983; De Souza et al., 1986). Další pokrok v poznání struktury a fyziologie CRH receptoru se naskytl až po naklonování lidského CRH receptoru (Chen et al., 1993) s následným objasněním jeho molekulární struktury. Tento výzkum vedl k identifikaci druhého typu CRH receptoru (CRH-R2). CRH receptory jsou kódovány dvěma různými geny lokalizovanými na 17 chromosomu. Bližší údaje o CRH genech jsou mimo rámec této práce, v literatuře je však řada prací, z nichž za zmínku stojí přehled pracovní skupiny Z. Liu z r. 2013 (Liu et al., 2013).

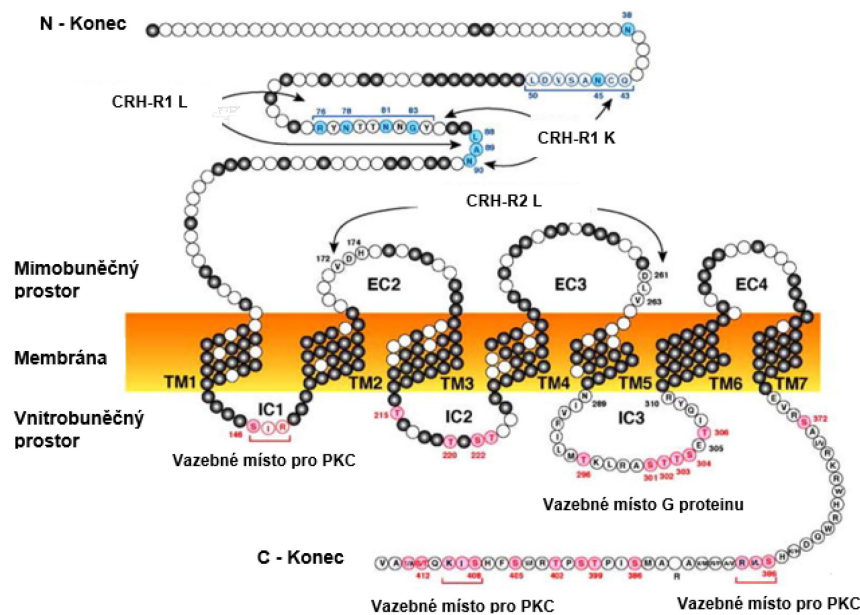
CRH receptory jsou proteiny, u nichž se peptidový řetězec u humánního CRH-R1 skládá ze 415 aminokyselinových zbytků (reziduí) a u různých živočišných druhů je homologní z 98 %. CRH-R2 se vyskytuje u savců ve třech isoformách - α , β , γ (přejmenované na 2a, 2b a 2c, a také označované jako 2₁, 2₂, 2₃), které se liší lokalizací, funkcí a strukturou. α forma se vyskytuje centrálně v nervovém systému, β forma v periférii a γ forma byla charakterizována zatím jen

částečně. CRH-R2 alfa forma je tvořena 411 aminokyselinami a má 71 % homologii s CRH-R1 (Hauger et al., 2006).

1.3.2.1 Struktura CRH receptorů

Struktura lidského CRH receptoru je zobrazena na obrázku 3. Patří do rodiny transmembránových receptorů spřažených s G-proteiny, jejichž jediným strukturálním znakem, společným pro všechny GPCR, je přítomnost sedmi transmembránových šroubovicových segmentů (helixů) spojených střídajícími se intracelulárními (IC) a extracelulárními (EC) smyčkami s aminokoncem umístěným na extracelulární straně a karboxylovým koncem na intracelulární straně. Tyto úseky peptidového řetězce (tzv. domény TM) jsou číslovány TM I-VII od N-konce. N-koncová oblast receptoru je na vnější straně membrány lokalizována spolu se třemi EC, které slouží jako vazebná místa pro ligandy. Na intracelulární straně tři IC smyčky umožňují spolu s karboxylovým koncem vazbu alfa-podjednotky G proteinu. Přirozené, tzv. ortosterické ligandy, se váží v oblasti transmembránové domény mezi sedmi transmembránovými helixy receptorové molekuly s nejvýraznější změnou na pozici TM VI, nebo na N-konci peptidu (Hauger et al., 2006).

Receptory spřažené s G proteiny se vyskytují jak v mozku, tak ve střevě, tzv. „brain-gut receptors“. Při interakci CRH s receptorem dojde k aktivaci transdukce signálu pomocí druhých messengerů a následně k buněčné odpovědi, kdy je receptor spřažen přímo s efektoem, kterým je adenylylcykláza aktivující cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP). Aktivovaný cAMP může mít také dlouhodobé účinky přestupem z cytosolu do jádra, kde aktivuje transkripci s tvorbou transkripčního faktoru označovaného jako CREB (cAMP responsabilní element /CRE/ binding protein). Následnou translací vznikne nový protein vedoucí k buněčné odpovědi (Klenerová a Hynie, 2016).



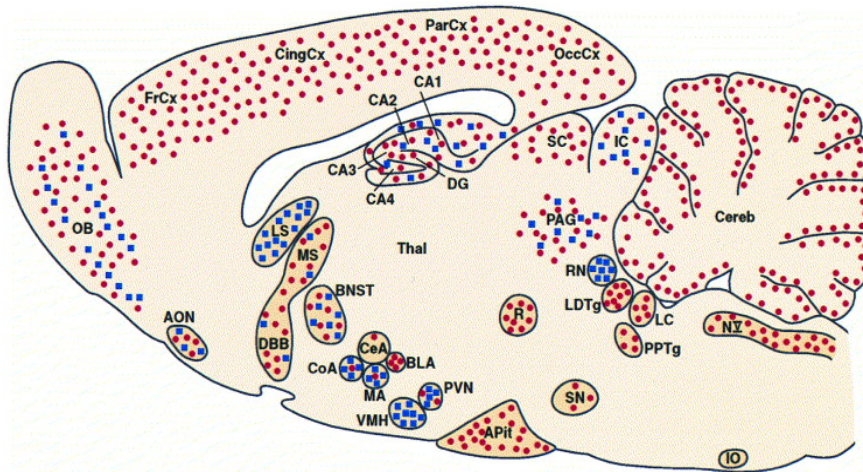
Obr. 3. Struktura CRH receptoru (Hauger et al., 2006).

CRH receptorová molekula je rozdělena cytoplazmatickou membránou (žlutá barva) na tři domény: extracelulární (EC), transmembránovou (TM) a intra-cytoplazmatickou (IC). Peptid prochází 7x touto membránou a procházející úseky peptidového řetězce, tzv. α -helixy (šroubovice), jsou označeny TM a číslovány TM 1-TM7 od N-konce. N-konec receptoru je lokalizován na vnější straně plazmatické membrány a označené sekvence aminokyselin zahrnují vazebná místa a vazebné selektivní domény pro ligandy (CRH-R1 L) a vazebná místa (CRH-R1 K) v kapsovitě prohlubni, tzv. vazebné kapse. Další vazebná místa pro ligandy (CRH-R2 L) jsou lokalizována na třech extra-buněčných smyčkách (EC2, EC3, EC4), které jsou spojeny s C koncem peptidu pomocí tří intracelulárních IC smyček (IC1, IC2, IC3). Aminokyseliny serin a treonin jsou zobrazeny červenými kruhy na C doméně, jako potenciální místa pro fosforylaci protein kináz pro G protein a protein kinázu C (Hauger et al., 2006).

1.3.2.2 Lokalizace CRH receptorů v CNS

Řada studií ukázala odlišnou lokalizaci a odlišnou genovou expresi CRH obou receptorových podtypů, které svou expresi alterují: tam, kde se vyskytuje jeden, není téměř detekovatelný ten druhý (Steckler a Holsboer, 1999). Nejvyšší denzita CRH-R1 je v hypofýze. V naší výzkumné práci jsme určili expresi mRNA

obou receptorů CRH-R1 a CRH-R2 v adenohipofýze za fyziologických podmínek a po působení různých typů stresů (Klenerová et al., 2008) a expresi obou CRH receptorů u zvířat s vyřazeným genem pro CRH u kontrol a po aplikaci stresu (Klenerová et al., 2018). Dále jsou CRH-R1 lokalizovány v cerebrálních kortikálních oblastech, amygdale, hipokampu a také v septu a mozečku. Moduluje kognitivní funkce jako pozornost, výkonnost, anxieta, učení a paměť. Receptory CRH-R2 mají odlišnou distribuci v CNS než uvedená distribuce u CRH-R1 a jsou nejvíce lokalizovány v subkortikálních oblastech, včetně laterální septální oblasti. Septum hraje významnou úlohu v klasickém limbickém okruhu, který je důležitý pro emoce, strach i agresi. Vzhledem k tomu, že se oba receptory liší i afinitou k ligandům (CRH-R1 stejně silně váže CRH i příbuzný peptid urokortin, zatímco CRH-R2 má vyšší afinitu k urokortinu než CRH, viz dále), má tato rozdílná distribuce fyziologický význam. Znalost lokalizace CRH receptorů je především velmi důležitá pro syntézu ligandů k specifickému ovlivnění funkce dané oblasti CNS a tím pro terapeutické využití. Na obrázku 4 je znázorněna lokalizace CRH receptorů v jednotlivých oblastech mozku primátů.



Obr. 4. Lokalizace CRH-R1 a CRH-R2 receptorů v CNS (Petrovický, 2008).

Lokalizaci CRH-R1 receptorů v odlišných oblastech mozku primátů představují červené kroužky, lokalizaci CRH-R2 receptorů modré kroužky. Menší část receptorových subtypů je přítomná společně.

Expres CRH-R1 se vyskytuje výhradně ve frontálním kortexu, v přední hypofýze, v mozečku a v cholinergních jádrech mozkového kmene a bazálních oblastech hemisfér. Výskyt CRH-R2 je nejvíce lokalizován v subkortikální oblasti a v septu, které hraje významnou úlohu v klasickém limbickém okruhu, důležitém pro emoce, strach i agresi.

Směšaná receptorová populace se vyskytuje v olfaktorickém bulbu, hipokampu, entorinálním kortexu a části amygdaly. U primátů jsou CRH-R2 rozmístěny disperzně a vyskytují se s větší densitou v kortikálních oblastech (Steckler a Holsboer, 1999). Popis jednotlivých oblastí mozku (včetně vysvětlení zkratk) lze nalézt v učebnici neuroanatomie CNS (Petrovický, 2008).

1.3.3 CRH vazebný protein

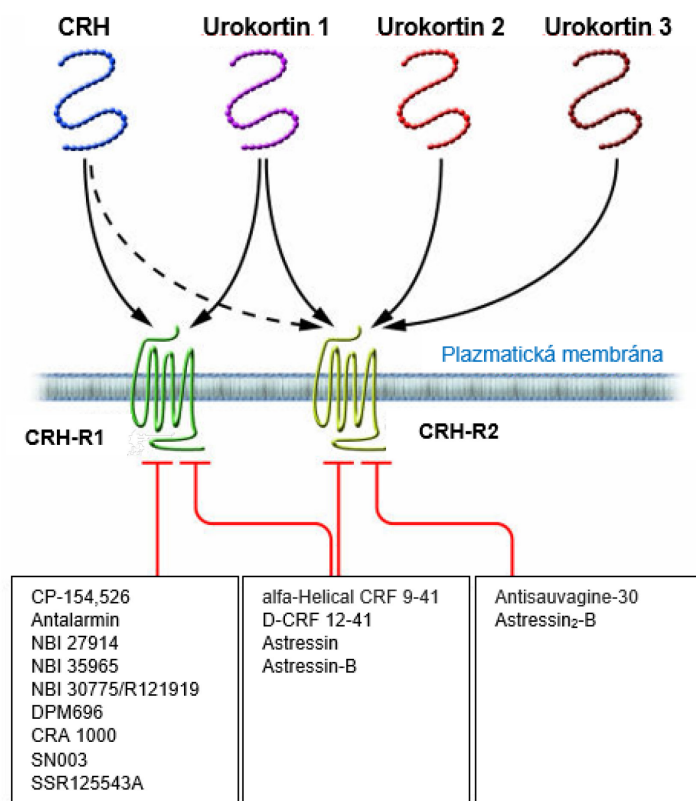
Biologická funkce CRH je také dána jeho interakcí s nereceptorovým vazebným proteinem (CRH binding protein, CRH-BP), který je v mozku a hypofýze přítomen ve velkém množství. CRH-BP je rozpustný protein o velikosti 37 kD a skládá se ze 322 aminokyselin. Má odlišnou strukturu od CRH receptoru, s mnohonásobně vyšší afinitou k CRH. Vazbou na CRH ovlivňuje hladinu CRH v oběhu a působí tak jako CRH antagonist (Ketchesin et al., 2017).

CRH-BP se nachází v CNS mezi oblastmi exprimujícími CRH a CRH-receptor, jako je neokortex, hipokampus, hypofýza, amygdala a mozkový kmen. Odlišné stresory mohou ovlivňovat různé oblasti tohoto složitěho systému a tím vyvolat rozdílnou odpověď na stres. Vazba CRH-BP na CRH blokuje jeho primární funkci sekrece ACTH z hypofýzy a působí tedy jako negativní regulátor CRH aktivity. CRH-BP také moduluje funkci CRH během těhotenství. Testování na zvířecích modelech prokázalo, že velká exprese CRH-BP nebo naopak jeho deficit vede ke změně aktivity HPA osy a energetické rovnováhy. Nedostatek CRH-BP vede ke zvýšení volného CRH a toto zvýšení způsobí změny v CNS vedoucí k aktivaci HPA osy a tím zvýšení účinku stresu a snížením energetického příjmu. Jakákoliv modulace funkce CRH pomocí CRH-BP nezpůsobí anxiogenní efekt, který je typický pro modulaci agonisty CRH receptorů. CRH-BP může sloužit pro terapeutické účinky, jakými je léčba kognitivních deficitů s neurodegenerativní demencí. V současnosti je sledována přítomnost CRH-BP v neuronálních propojeních s dalšími neuropeptidy (Ketchesin et al., 2017).

1.3.4 Ligandy CRH receptorů

Po objasnění struktury CRH receptorů a získání nových poznatků o regulaci signalizace G proteiny a s nimi spřaženými receptory (Zhang et al., 2015), pracoviště W. Valeho pokračovalo v syntéze nových CRH ligandů (Perrin et al., 1999). Přehled autorů našeho ústavu z r. 2016 uvádí mechanismus vazby různých typů ligandů na GPCR receptory a přehled metod zabývajících se interakcí receptoru s ligandy, molekulárním dokíngem a virtuálním screeningem (Klenerová a Hynie, 2016).

Agonisté i antagonisté hrají důležitou roli v řadě fyziologických funkcí a v koordinaci stresových odpovědí organismu, jak bude uvedeno dále. Syntéza nových ligandů pro CRH-R receptory je vysoce aktuální, neboť doposud existuje pouze velmi malé množství látek specifických pro terapii stresu a poruch spojených se stresem. Po této fázi výzkumu se v současnosti věnuje řada pracovišť ověřování preklinických a klinických účinků jednotlivých CRH ligandů.



Obr. 5. Přehled CRH receptorových agonistů a antagonistů (Taché a Bonaz, 2007).

Na schématu jsou uvedeny CRH receptory R1 a R2 lokalizované v plazmatické membráně, jejich agonisté (CRH a urokortiny) a vybrané antagonisté obou CRH receptorů. Přehled CRH-R1-selektivních nepeptidových antagonistů je uveden v levém sloupci. Neselektivní CRH-R1 antagonisté (prostřední sloupec) a CRH-R2 antagonisté (prostřední a pravý sloupec) jsou peptidy (Taché a Bonaz, 2007).

1.3.4.1 Agonisté CRH

Wylie Vale se spolupracovníky popsal i další peptidy vázající se na CRH receptor. Na prvním místě je nutné jmenovat urokortin, který po naklonování nazval urokortin 1 (UCN1) (Martinez et al., 2002). Urokortin 1 je peptid složený ze 40 aminokyselin a má 5-20 krát větší afinitu k CRH receptorům ve srovnání s CRH. Kromě agonistů CRH a UCN byly popsány další dva ligandy CRH receptoru, se sekvencí obou peptidů vysoce homologní s UCN 1, a proto byly označeny jako urokortin UCN 2 (také známý jako peptid příbuzný streskopinu) a urokortin UCN 3 (označovaný jako streskopin) (Taché a Bonaz, 2007). Jsou

vysoce selektivní pouze pro typ receptoru CRH-R2 a mají nejvyšší afinitu k isoformě alfa přítomné v CNS. Urokortin 2 je tvořen 43 aminokyselinami a urokortin 3 se skládá z 38 aminokyselin. Geny pro UCN 2 a UCN 3 mají obdobnou strukturu jako gen pro UCN 1. UCN 1 je hlavní ligand pro CRH-R2 v zadním mozku, zatímco UCN 3 v předním mozku. UCN 2 působí v oblastech mozku bez UCN 1 a UCN 3 (např. hipokampus a některé části mozkové kůry) a váže se kompetitivně na oba CRH receptory a na CRH-BP. V periférii se s vyšší densitou váže v srdci a jeho účinek na zvýšení kontrakce srdečního svalu se terapeuticky využívá v léčbě městnavé srdeční slabosti (Martinez et al., 2002).

Agonisté CRH a UCN 1 jsou vysoce důležité peptidy u většiny druhů savců a během evoluce prokazují 45% homologii také s nesavčími CRH-příbuznými peptidy sauvaginem a urotensinem I (Taché a Bonaz, 2007; Lovejoy a de Lannoy, 2013). Tyto neselektivní agonisté CRH receptorů se na oba typy CRH receptorů váží v jeho extracelulární oblasti. Řada laboratoří sledovala fyziologický účinek a význam obou peptidů u patologických stavů s cílem využití těchto poznatků k syntéze specifických antagonistů. Urotensin ovlivňuje řadu periférních funkcí, ale údaje o syntéze nového antagonisty nebyly doposud publikovány. U sauvaginu byly syntetizovány nové analogy, např. [125 I]-PD-sauvagine, který slouží ke studiu přesnější distribuce vazebných míst CRH receptoru v mozku myši (Tan et al., 2017). Po změně v peptidovém řetězci sauvaginu byly syntetizovány analogy s antagonistickými účinky, jak bude uvedeno dále. Řada výsledků o účinku nových ligandů čeká na zveřejnění.

1.3.4.2 Antagonisté CRH

Antagonisté jsou látky, které po navázání na CRH-R1 receptor blokují navázání agonistů a tím dochází k zabránění aktivace signální cesty, která by vedla exprese genů ke konečné buněčné odpovědi. Při interakci antagonisty s CRH receptorem se tak neindukuje žádný vlastní účinek. Tuto inhibici lze překonat vysokými dávkami agonistů (Hynie, 2008). Kromě interakce s receptory mohou antagonisté reagovat s efektorovým systémem. Podle mechanismu účinku lze antagonisty rozdělit na látky peptidové a nepeptidové povahy.

1.3.4.2.1 Antagonisté peptidové povahy

Antagonisté peptidové povahy jsou odvozené od přírodních ligandů, které hrají roli ve studiu GPCR, a toto studium přispělo především k porozumění fyziologie CRH systému a objasnění stresových odpovědí. Vývoj kompetitivních CRH-R antagonistů byl důležitý pro určení funkcí CRH receptorů za bazálních a stresových podmínek. Vývoj peptidových antagonistů předpokládal, že C-terminální oblast ligandu není zapojena do signální transdukce, ale vazbou na receptor blokuje vazbu agonisty a následnou signální transdukci.

Prvním syntetizovaným kompetitivním antagonistou byl alfa-helical-CRH9-41, analog CRH vzniklý po odebrání 8 aminokyselin na karboxylovém konci CRH (Rivier et al., 1984). Byl použit k účinné inhibici CRH systému v odpovědi na různé stresové podněty. Ke zvýšení účinnosti CRH antagonistů byly syntetizovány analogy se změněnou sekundární strukturou CRH: skupina analogů odvozená od vysoce účinného D-Phe-CRH12-41 ([d-Phe¹², Nle^{21,38}, CαMe Leu³⁷] CRF12–41) a skupina odvozená od astresinu (cyclo(30–33) [d-Phe12, Nle21, 38, Glu30, Lys33] Ac-CRF9–41). Tyto antagonisté se váží na oba CRH-R1 a CRH-R2 receptory.

Průlomem byla syntéza selektivních antagonistů CRH-R2 receptorů s malou nebo žádnou afinitou pro CRH-R1 receptory. Prvně byl syntetizován specifický peptidový CRH-R2 antagonist antisauvagine-30 [d-Phe11, His12] sauvagine 1140, K41498 [dPhe11, His12, Nle17] sauvagine1140 a pro další neurochemické, funkční a radiografické studie CRH-R2 receptorů analog antisauvagine-30 K 41498 značený radiojodem (Lawrence et al., 2002). Další analog je dlouhodobě působící antagonist s dalšími konformačními změnami, stressin2-B cyclo(31-34)[dPhe11, His12, Nle12, CαMeLeu13, 39, Nle17, Glu31, Lys34] Ac-sauvagine8–40 (Contoreggi et al., 2013). Byla syntetizována i řada dalších látek (viz přehledy níže).

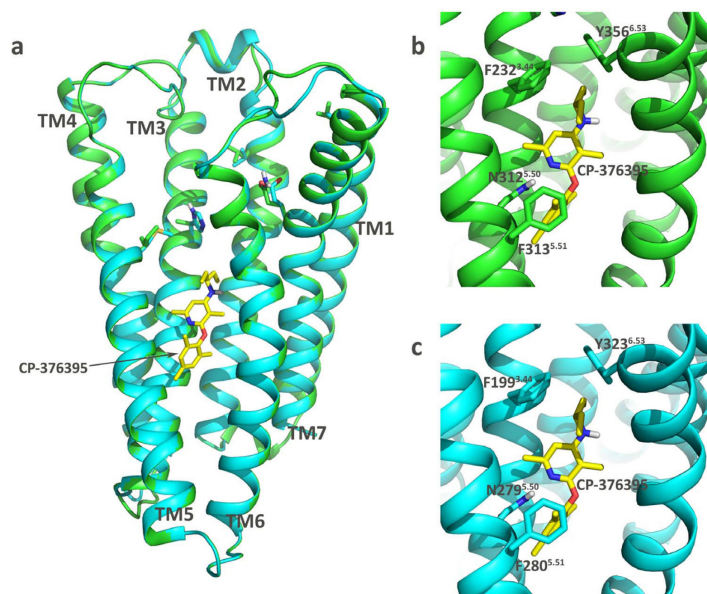
1.3.4.2.2 Antagonisté nepeptidové povahy

Řada laboratoří se zaměřila na syntézu selektivních antagonistů pro receptor CRH-R1 jejichž průnik membránami je ovlivněn fyzikálně-chemickými vlastnostmi, zejména jejich lipofilním charakterem, a procházejí mozko-míšň bariérou. Tyto požadavky splňují nepeptidové antagonisté o malé molekulové hmotnosti, které byly identifikovány v r. 1995 a jsou od této doby nejčastěji

užívanými syntetickými látkami při studiu psychických poruch. Základem těchto molekul je mono-, bi- nebo tricyklická struktura, která se dále spojuje s pyridinem nebo pyrrolo-, pyrazolo- pyrimidinem a aminem. Vazebnými místy antagonistů jsou dva hydrofobní zbytky Met a Ile nebo amidová skupina Asn a amid na C-konci. Tato vazebná místa mohou být použita pro rozvoj nepeptidových antagonistů, jejichž cílem je interakce s extracelulární doménou (ECD) těchto receptorů (obr.5) (Taché a Bonaz, 2007). Tato interakce antagonistů s ECD receptoru může být předmětem zkoumání rozvoje terapie stresu a příbuzných nemocí.

Mezi nejznámější a nejčastěji používané selektivní nepeptidové CRH-R1 antagonisty patří látka NBI 27914, látka CP-154,526 a antalarmin (Zaretsky et al., 2017). Antalarmin inhibuje soubor chování spojený se strachem a úzkostí, který je řízen CRH nebo iniciován vnějšími sociálními stresory, a může tedy sloužit v léčbě úzkosti. Řada dalších syntetických antagonistů, např. DPM696, NBI30775 (známý jako R121919) a NBI35965 jsou uvedeny v řadě přehledů (Chen a Grigoriadis, 2005; Schreiber et al., 2017; Zorrilla a Koob, 2010).

Pokrok v syntéze nepeptidových antagonistů umožnilo využití nových technik pro zobrazení krystalické struktury. Na obr. 6 uvádíme příklad krystalické struktury lidského CRH-R1 receptoru v komplexu s antagonistou CP-376395, se zobrazením reziduí klíčových aminokyselin pro vazbu resp. disociaci ligandu. To poskytuje informace o původu selektivity daného antagonisty. Tato generace antagonistů byla syntetizována především na základě analýzy primární struktury aminokyselinových zbytků v CRH-R, což však není postačující k objasnění funkce a vlastností syntetizovaných látek (Bai et al., 2014). Tyto látky bylo nutné v CNS aplikovat ve vysokých dávkách, které neměly na sekreci ACTH předpokládaný a dlouhodobý účinek, a rovněž účinek in vitro a in vivo se značně lišil, stejně tak jako výsledky s různých pracovišť.



Obr. 6. Krystalická struktura CRH-R receptoru s navázaným antagonistou CP-376395 (Bai et al., 2014).

Na schématu a) je zobrazena krystalická struktura vazebné šterbiny tvořené transmembránovými helixy (TM1-TM7) u CRH-R1 s antagonistou CP-376395.

V další části schématu jsou detailně znázorněna místa vazby CP-376395: b) v zelené barvě CRH-R1, c) v azurové barvě CRH-R2. Je uvedena poloha klíčových aminokyselin této interakce. Tento postup umožňuje určit residua aminokyselin klíčových pro vazbu, resp. disociaci ligandu a tím i původ selektivity antagonisty (Bai et al., 2014).

1.3.5 Současný výzkum terapeutického využití CRH ligandů

Následovala další etapa vývoje antagonistů, zasahující do současnosti, sledující prostorové struktury CRH receptoru s navázaným antagonistou. Cílem bylo a je nalezení takových antagonistů, které mají terapeutický potenciál v léčbě psychiatrických poruch spojených se stresem. V literatuře je velké množství preklinických a klinických studií podporujících hypotézu, že CRH byl nejenom klíčový fyziologický mediátor neuroendokrinních odpovědí, ale také behaviorálních odpovědí na psychosociální stres - etiologický faktor v depresi, anxiety a látkové závislosti (Dedic et al., 2018; Grimm et al., 2017). Bohužel tyto studie nepřinesly jednoznačné výsledky. Preklinické a klinické studie opakovaně nepotvrdily terapeutické účinky antagonistů, výsledky jsou často protichůdné nebo žádné. Průkopnicí v preklinickém výzkumu byla dr. Athina Markou

(+2016), pracovnice The Scripps Research Institute a profesorka University of California, San Diego (UCSD). Je nutné uvést její Mezinárodní program spolupráce akademických a firemních laboratoří umožňující zavést vědecké výsledky do klinické praxe. Publikovala práce o účinku selektivních CRH-R1 antagonistů u emočních poruch v závislosti na jejich struktuře (Winsky a Brady, 2017). Popsala anxiolytickou aktivitu antalarminu a látek R121919, BMS-562,086 (dnes známý pod názvem Pexacerfont), GSK-561,679 (dnes známý pod názvem Verucerfont). Významné jsou i její práce o vztahu stresu a návykových látkách a publikace o využití animálních modelů u mentálních poruch (Markou et al., 2009).

Výzkumná práce v laboratořích “Scripps Research Institute” a na UCSD je v současnosti pod vedením Erica Zorrilly zaměřena na studium příčin “selhání CRH-R1 antagonistů” a na vyhodnocení nedávných zjištění týkajících se CRH-CRH-R1 systému v psychopatologii. Ve vynikající přehledové práci "Nebojte se o CRF: posouzení selhání translace antagonistů CRF1" Zorrilla se spolupracovníky vyhodnotili 174 publikací, kde podání CRH-R1 antagonisty nevyvolalo předpokládanou odpověď (Spierling a Zorrilla, 2017). Hodnocení výsledků studií nových ligandů v průběhu cca 15ti let se zaměřilo také na přezkoumání studií (od 2014 k dnešnímu dni), které nejsou dosud dokončeny. Tyto publikace navazují na předchozí studie účinků CRH systému a analýzu nových ligandů in vitro a u laboratorních zvířat (Spierling a Zorrilla, 2017). V navazující etapě byly testovány účinky CRH ligandů u zdravých osob a u pacientů. Jedná se o klinický výzkum, tzv. “klinické hodnocení”, které probíhá ve 4 fázích (anglicky označované jako clinical trials Phase I-IV). Cílem tohoto výzkumu je určit, prokázat a ověřit léčivé účinky daného CRH ligandu, zjištění jeho nežádoucích a dalších účinků u zdravých dobrovolníků – fáze 1, následně ve fázi 2 u malé skupiny pacientů s poruchou, pro kterou byl ligand syntetizován, a ve fázi 3 klinické stadium na několika velkých skupinách pacientů. Čtvrtá fáze je otázkou budoucího výzkumu látek určených ke schválení jako léčiva, kdy se hodnotí účinky dlouhodobě podávané látky a informace o možných interakcích s dalšími léky. Projde-li navrhovaný nový lék úspěšně všemi fázemi klinických hodnocení, lze výsledky testování předložit k registraci nového léku. Zorrilla uzavírá hodnocení dosavadního výzkumu, že je třeba pokračovat ve studiu sdílené molekulární úlohy

CRH receptorů u neurobiologie stresu, dysforie a návykového chování u lidí. S rozšířením těchto poznatků bude dostupnější najít nové ligandy se specifickou individuální úlohou.

Některé možné terapeutické indikace pro použití CRH antagonistů jsou uvedeny na obrázku 7. Mezi indikace patří především poruchy CNS, deprese, anxieta, migréna, cévní mozková příhoda (tzv. iktus), ale také některé projevy látkové závislosti.

U této kapitoly je však nutné také zdůraznit, že ligandy CRH jsou zapojeny nejen v CNS a hypofýze, ale také na periférii, kde se váží na periferní CRH receptory. Zde se dnes již využívají jak agonisté, tak antagonisté CRH-R u terapie řady nemocí, jak je uvedeno v přehledu laboratoře G. P. Chrousos a v dalších přehledech (Zoumakis et al., 2006; Koob a Zorrilla, 2012).

Nové pokroky ve znalostech mechanismů účinků CRH a jeho receptorů a nové poznatky o účasti CRH u stresu a u dalších psychických a fyzických poruchách, otevírají nové možnosti klinického využití těchto poznatků. Cílem současného výzkumu je nalezení ligandů nepeptidové povahy, které pronikají mozkomíšní bariérou, a vazbou na příslušný CRH receptor budou mít cílený protistresový a antidepressivní účinek. Díky lokalizaci CRH receptorů nejen v CNS, ale i na periférii, lze očekávat použití antagonistů CRH u řady celkových onemocnění.

Některé terapeutické indikace CRF-R antagonistů	
Deprese	Hypersekrece CRF u velké deprese i PTSD (posttraumatická stresová porucha); klinický efekt u deprese.
Strach	Hypersekrece CRF; účinní antagonisté CRF-R1 a CRF-R2.
Iktus	Zvýšení CRF v oblastech s neurodegenerací; antiischemický efekt antagonistů CRF-R1.
Látkové závislosti	Zvýšené hladiny CRF u alkoholiků; antagonisté CRF-R1 blokují stresem indukované obnovení užívání kokainu.
Dráždivý tračník	Vyskytuje se u řady psychiatrických poruch; antagonisté CRF-R1 blokují hyperalgézi.
Zánět, artritís	CRF zprostředkovává prozánětlivé procesy; nález v synoviální tekutině.

Obr. 7. Souhrn možných terapeutických indikací pro použití nepeptidových antagonistů CRF-R1 receptorů (Hynie a Klenerová, 2004).

Na schématu jsou uvedeny některé možné terapeutické indikace, ve kterých došlo ke zlepšení daného onemocnění po aplikaci antagonistů CRH (CRF) receptorů.

Použité zkratky: CRF (CRH) – kortikotropin uvolňující faktor (hormon), CRF – R – CRF (CRH) receptor, PTSD – posttraumatická stresová porucha (Hynie a Klenerová, 2004).

1.4 Neurobiologie neurodegenerativních onemocnění mozku ve vztahu k adenohipofýze

Adenohipofýza se účastní při stresu, a jak již bylo výše popsáno, uplatňuje se při patogenezi různých psychických poruch, z nichž nejčastější jsou různé typy deprese, a nejznámější je Alzheimerova choroba (AD). Existuje řada rizikových faktorů, které zvyšují pravděpodobnost vzniku tohoto onemocnění, například genetické, vaskulární a behaviorální. Pacienti trpící Alzheimerovou chorobou mají kognitivní deficity a psychologické symptomy související s deregulací hypotalamo-hipofýzo-adrenální osy. Neurotransmitery a neuropeptidy, které jsou zapojeny do drah hypotalamo-hipofýzo-adrenální osy, hrají klíčovou roli ve vzniku Alzheimerovy choroby. Jedním z významných neuropeptidů zapojených do neurobiologie deprese a AD je CRH. Tím, že CRH má primární úlohu v

stresové reakci, může chronický stres představovat jeden z hlavních faktorů podmiňujících vznik AD. Na negativním působení stresu se tak může podílet i porucha v signalizaci zprostředkované CRH.

1.5 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je autoimunitní onemocnění charakterizované zánětlivým postižením centrálního nervového systému vedoucí k demyelinizaci a poškození axonů, což má za následek řadu fyzických, duševních nebo dokonce psychiatrických příznaků. Znaky a příznaky roztroušené sklerózy závisejí na postižených částech CNS. Pacienti mají různé úrovně trvalého postižení v závislosti na stupni zánětu. Klinicky může RS způsobit řadu neurologických problémů, především v závislosti na umístění plaků a závažnosti RS. Mnoho symptomů RS, jako je únava, kognitivní poruchy a citlivost na teplo, však nejsou anatomicky snadno.

1.5.1 Patogeneze

RS je autoimunitní onemocnění zprostředkované autoagresivními bílými krvinkami (lymfocyty), které rozpoznávají vlastní obaly nervových vláken jako nepřítel a útočí na ně. Co je podnětem k tomu, aby tento útok zahájily, není jasné. Tyto buňky se množí a vstupují do cílového orgánu – mozku a míchy (CNS), kde vytvářejí ložiska zánětu, v nichž dochází k rozpadu myelinu (obalu nervových vláken) a k ničení nervových vláken.

Hlavní roli hraje autoimunitní imunopatologická reaktivita. Uplatňuje se jak genetická predispozice, tak environmentální faktory. U postiženého jedince dochází v centrálním nervovém systému k uvolnění autoantigenů. Ty jsou po zpracování a vazbě na molekuly HLA (Human Leucocyte Antigen) prezentovány T-lymfocytům, které rozeznávají epitopy molekul, jež jsou součástí struktur myelinových pochev nervových vláken. Antigen prezentující buňky identifikují škodlivé antigeny, produkují prozánětlivé cytokiny a poskytují nezbytné kostimulační signály T-lymfocytům. K jejich aktivaci dochází již v periferních lymfatických orgánech. Po prostupu hematoencefalickou bariérou se podílejí na aktivaci mikroglie a makrofágů, zejména v oblasti postkapilárních venul nebo choroidálních plexů (Nytrová et al., 2019). Hematoencefalická bariéra se stává propustná pro lymfocyty a mononukleární fagocyty, které migrují do CNS, kde

vzniká demyelinizační léze. Poškozující zánět u nemocných s RS je už od samého počátku provázen i neurodegenerativními změnami. Zánět poškozuje zejména imunodominantní epitopy strukturních molekul myelinu (Krejsek et al., 2002).

1.5.2 Epidemiologie a rizikové faktory

Prevalence onemocnění RS celosvětově stoupá. V globálním měřítku postihuje 2,5 miliona lidí (Garcia-Rosa et al., 2019), (Lane a Yadav, 2020). RS obvykle začíná ve věku mezi 20.- 40. rokem života, ale může se objevit v jakémkoli věku. Ženy jsou častěji postiženy než muži, přičemž asi 60 % případů tvoří ženy. Ne vždy tomu tak bylo. Na počátku 20. století byl poměr pohlaví téměř stejný. Nyní se ve většině vyspělých zemí blíží 3: 1 (ženy: muži). Kouření, které zvyšuje riziko RS přibližně o 50 %, může vysvětlit až 40% zvýšeného výskytu RS u žen. Před druhou světovou válkou kouřilo jen málo žen, ale v poválečném období se počet žen kouřaček rychle zvýšil, což odráží rostoucí výskyt RS u žen (Palacios et al., 2011).

Existuje silný vliv rasy na riziko rozvoje RS. Nejčastější výskyt byl zaznamenán u jedinců bělošského původu, zejména u osob severoevropského původu. Typická RS je vzácná u Asiatů a černých Afričanů, ale je poměrně častá u černých Američanů. Kromě rasových vlivů je také zajímavé geografické rozložení nemoci. Výskyt onemocnění se zvyšuje se vzdáleností od rovníku. Oblasti s nejvyšší prevalencí se nacházejí ve vyšších zeměpisných šířkách, a to na severní i jižní polokouli. Mezi tyto vysoce rizikové oblasti patří severní USA, Kanada, Velká Británie, Skandinávie, severní Evropa, Nový Zéland a Tasmánie (Love, 2006), (Ellison et al., 1984).

Dalším významným faktorem je koncentrace vitamínu D v krvi a expozice slunečnému záření. Ačkoli to není konzistentní se všemi zeměpisnými oblastmi, existuje několik evropských epidemiologických studií, které ukazují souvislost mezi ročním obdobím narození a rizikem rozvoje RS. Tyto práce naznačují, že existuje nižší riziko RS u jedinců narozených v létě a vyšší riziko RS u narozených dětí po zimě. Autoři uvádějí, že hladiny vitamínu D u matek během třetího trimestru těhotenství mohou ovlivňovat riziko RS. Celkově lze říci, že vystavení slunečnímu světlu a hladiny vitamínu D v mladém věku mohou mít vliv na riziko vzniku RS (Fernandes et al., 2009).

Ačkoli příčina RS zůstává neznámá, předpokládá se, že více než 100 genů ovlivňuje riziko vzniku RS. Předpokládá se, že geny HLA mají největší souvislost s rizikem RS, zejména asociace s haplotypem HLA-DRB1 (Lane a Yadav, 2020).

1.5.3 Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)

Experimentální autoimunitní encefalomyelitida je myší model patogeneze lidské demyelinizační choroby – roztroušené sklerózy. EAE lze vyvolat mnoha antigeny, nejčastěji jsou však používány MBP (myelinový bazický protein), PLP (proteolipid protein) a MOG (s myelinem asociovaný glykoprotein). Onemocnění je zprostředkováno Th1 CD4⁺ lymfocyty, které rozpoznávají encefalitogenní epitopy těchto proteinů. V mozkové tkáni pokusných zvířat nacházíme tak jako u RS perivaskulární infiltráty odpovídající gadolinium-enhancujícím lézím na T1 vážených obrazech pacientů s RS.

1.5.4 Galanin a jeho role v RS

Předchozí studie zjistily neuroprotektivní roli galaninu u myších modelů RS, u EAE a u kuprizonem indukované demyelinizace (Zhang et al., 2012). Tyto studie byly většinou zaměřeny na vliv galaninu na oligodendrocyty a jeho schopnost podporovat remyelinizaci; postrádají však údaje o distribuci galaninových receptorů na jiných gliových buňkách. Konkrétně uvádí, že galanin je faktorem přežití pro oligodendrocyty *in vitro*. Publikace uvádí, že v kulturách oligodendrocytových buněk byly hladiny mRNA GalR2 100krát vyšší než GalR3 a 1000krát vyšší než GalR1 (Gresle et al., 2015). V modelu RS indukované kuprizonem bylo zjištěno, že GalR1 a GalR2 jsou upregulovány v oligodendrocytech během demyelinizace a remyelinizace, v daném pořadí. Ukázalo se, že transgenní myši s chronicky zvýšenými hladinami galaninu (10krát vyšší než u myši divokého typu (wild type, WT)) jsou relativně odolné vůči demyelinizaci indukované kuprizonem. Autoři pozorovali 2,5násobný nárůst počtu kalosálních zralých oligodendrocytů v době maximální demyelinizace.

S ohledem na nové poznatky o neuroprotektivních a imunomodulačních účincích galaninu v CNS, bylo cílem této práce prozkoumat expresi galaninových receptorů v míše v EAE a určit lokalizaci GalR1 na různých buňkách (oligodendrocytech, mikroglíích, astrocytech ependymálních buňkách a endoteliálních buňkách v kapilárách) imunohistochemicky.

1.5.5 Možnosti léčby

I přes pozoruhodný pokrok ve vývoji léčby RS v posledních letech jsme ještě daleko od toho, abychom našli vysoce efektivní lék na RS s příznivým bezpečnostním profilem.

Zatímco v současnosti schválené možnosti léčby RS jsou zaměřeny na modulaci imunitní odpovědi vedoucí ke snížení rychlosti tvorby a progresu lézí, některé práce diskutují o remyelinizačních terapiích, což představuje vzájemnou souhru a časovou souslednost celé řady dějů, jejichž dysregulace má za následek narušení celkového procesu remyelinizace. Remyelinizace vede k aktivaci neuroregenerativních drah, kdy dochází k obnovování izolace myelinu a proto nedochází k následnému neurologickému poškození. V tomto kontextu je velmi zajímavý neuropeptid galanin a jeho signální dráhy.

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Dosud není zcela objasněn mechanismus regulačních/modulačních účinků neuropeptidů a tyto mezery v našich znalostech pak ztěžují možnost jejich terapeutického ovlivnění. Naší hypotézou bylo, že podobně jako byly popsány účinky galaninergního systému na kardiovaskulární systém, může být galaninergní systém jedním z významných modulátorů hypotalamo-hypofýzo-adrenální osy a může proto modulovat stresovou odpověď či patofyziologii vybraných neurologických onemocnění.

Cílem práce proto bylo:

1. objektivizovat expresi galaninergních peptidů - galaninu a galanin-like peptidu společně s galaninergními receptory v adenohipofýze laboratorních potkanů za bazálních podmínek a po vystavení zvířat akutnímu a chronickému stresu
2. popsat roli CRH a zapojení jeho receptorů CRH-R1 a CRH-R2 za bazálních podmínek a za působení stresu v hypofýze u CRH knock-outovaných myší
3. prozkoumat expresi galaninergních receptorů v míše u myšího modelu roztroušené sklerózy a stanovit lokalizaci GalR1 na různých buňkách (oligodendrocyty, mikroglie, astrocyty ependymální buňky a endoteliální buňky v kapilárách)

3 METODY

3.1 Experiment s galaninergním systémem

Na pokus byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar (VELAZ, Česká republika) o počáteční tělesné hmotnosti 220g. Zvířata měla volný přístup k potravě (ve formě pelet) a vodě. Chování byli v počtu 4-5 na jeden zvěřinec s 12hodinovým denním režimem (12h světlo/12h tma) při konstantní teplotě (21 ± 1 °C). Zvířata byla chována a využívána v souladu s Helsinskou deklarací pro chování a využití zvířat v biomedicině (DHEW Publication, NHI 80-23). Studie byla schválena Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

3.2 Experiment s CRH systémem

V další části pokusu jsme použili mutantní samce laboratorní myši kmene C57BL/6, tzv. CRH knock-out (CRH-KO -/-) s vyřazeným genem pro CRH. Jako kontrolní zvířata sloužili samce laboratorní myši kmene C57BL/6, tzv. wild type (wt +/+). Myši s deficiencí CRH, původem z Bostnu, USA (Harvard Medical School Department of Endocrinology), byly chovány v zařízení Institutu experimentální endokrinologie Slovenské akademie věd (Bratislava, Slovenská republika) ve zvěřinci při konstantní teplotě (22 ± 1 °C) a 12hodinovém denním režimu (12 hodin světlo/12 hodin tma) se začátkem denní fáze v 6:00 ráno. Voda a potrava byla poskytována v libovolném množství.

Studie byla povolena Státním veterinárním a potravinovým ústavem Slovenské republiky (RO-2804/07-221/3) a Etickou komisí Institutu experimentální endokrinologie Slovenské akademie věd (Bratislava, Slovenská republika). V průběhu pokusů bylo vynaloženo úsilí minimalizovat počet použitých zvířat a omezit jejich diskomfort, bolest nebo jiné utrpení

3.3 Experimentu s EAE modelem

Experiment s EAE byl prováděn u konvenčních myší C57Bl / 6 (ve věku 9-13 týdnů), EAE u myší byla indukována aktivní imunizací peptidem MOG35-55 (Prospec, Rehovot, Izrael) e směsi s kompletním Freundovým adjuvans (CFA) obsahujícím Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Sigma-Aldrich, Praha, Česká

republika). Emulze MOG/CFA byla podávána subkutánně ve dvou 50 μ l dávkách. Celkem bylo myším podáno 100 μ g MOG peptidu. Pro usnadnění přenosu lymfocytů do CNS bylo intraperitoneálně podáno 300 ng pertusového toxinu (List Biologicals, Campbell, USA) dvě hodiny a dva dny po indukci EAE (Contarini et al., 2018). Znamky EAE byly hodnoceny následujícím způsobem: 0 - žádné známky klinického onemocnění; 1 - ochablý ocas; 2 - slabost zadních nohou; 3 - úplné ochrnutí zadních nohou; 4 ochrnutí zadních a předních končetin; 5 - smrt. Pátý den po indukci (vrchol závažnosti onemocnění) byly myši usmrceny rychlou dekapitací a míchy byly vyjmuty. Do experimentu jsme vybrali míchu z toho důvodu, že se jedná o nejvíce postiženou část CNS v modelu EAE, kde je zánět omezen především na míchu (Lassmann a Bradl, 2017).

Bylo analyzováno 12 vzorků z EAE skupiny a 14 vzorků z kontrolní skupiny. Všechny experimenty byly schváleny Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky pod číslem MSMT-9445 / 2018-8. Myším byla dodávána standardní granulovaná strava a voda ad libitum a byly chovány za standardních podmínek prostředí: světlo (tj. 12 hodin světlo a 12 hodin tma); teplota ($22 \pm 2^\circ\text{C}$); relativní vlhkost ($50 \pm 10 \%$).

3.4 Statistika

3.4.1 Experiment s galaninergním systémem

Statistické rozdíly byly počítány t-testem nebo jednocestnou ANOVA pro analýzu významnosti více vzorků s post hoc testem (Neuman-Keuls multiple comparison test). Všechny statistické testy byly provedeny použitím softvéru Systat 10 (SPSS Inc. Chicago, USA). Hodnota $p < 0,05$ byla považována za významnou.

3.4.2 Experiment s CRH systémem

Data byla analyzována pomocí Kruskal-Wallisovy jednosměrné ANOVY a neparametrického t-testu (GraphPad Prism 5.0; La Jolla, CA, USA). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM a představují průměr 5-8 zvířat, všechny vzorky byly testovány ve třech opakováních. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za významnou.

3.4.3 Experiment s EAE modelem

V pokusu s EAE byly všechny statistické analýzy provedeny pomocí softwaru GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Inc., La Jolla, USA). Normalita dat byla ověřena pomocí Shapiro-Wilkova testu. Protože data byla normálně distribuována, byl použit nepárový t-test k testování rozdílů mezi hladinami mRNA galaninových receptorů v EAE a kontrolní skupině. Síla korelace mezi dvěma zkoumanými parametry (skóre závažnosti onemocnění a exprese mRNA) je vyjádřena Pearsonovými korelačními koeficienty. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za významnou.

3.5 Aplikace stresu

3.5.1 Experiment s galaninergním systémem

Potkanům byl aplikován akutní (imobilizační) stres o délce 60 minut, po ukončení stresu následovala hodinová pauza (Klenerová et al., 2002). Imobilizační stres (IMO) byl způsoben svázáním a fixací předních a zadních končetin pomocí adhezivní fólie, přičemž po celou dobu působení stresu byla zvířata svázána přiléhavou plastickou fólií. Síťovina byla přizpůsobena individuální velikosti těla zvířete. Po ukončení expozice stresu byla zvířata vrácena do klecí. Kontrolní skupina zvířat (CO) žádnému stresu vystavena nebyla a byla použita ihned po vyjmutí z klece.

3.5.2 Experiment s CRH systémem

Myši byly vystaveny imobilizačnímu stresu (IMO) (Kvetnansky a Mikulaj 1970; Filipčík et al., 2012) akutním (jednorázovým) nebo chronickým (opakovaným) způsobem. Jednorázový IMO a opakovaný IMO byly aplikovány po dobu 30 nebo 120 minut ve ventilovaných konických trubkách o objemu 50 ml. Opakovaný stres zahrnoval 7 po sobě se opakujících expozic stresu. Počet zvířat ve skupině byl 6-8. Zvířata byla dekapitována ihned po ukončení stresu a kontrolní skupina zvířat byla usmrcena ihned po vyjmutí z klece. Hypofýzy byly ihned po vyjmutí zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do zpracování v experimentu. Na stanovení kortikosteronu byla odebrána krev z trupu.

3.6 Odběr vzorků

Odběr vzorků se lišil podle následně použité metody.

3.6.1 Experiment s galaninergním systémem

Inhed po dekapitaci potkanů a po vyjmutí adenohipofýzy byla pro imunohistichemické zpracování adenohipofýza zalitá kryolepidlem Cryomount (Histolab, Sweden) v alobalové mističce a poté byly skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do zpracování. Adenohipofýzy potkanů z bločků tkání zamražených v kryolepidle byly krájeny na tloušťku $5\text{ }\mu\text{m}$ v kryostatu Leica CM1850 (Leica Microsystems, Germany). Řezy se pokládají na sklíčka potaženy Poly-l-lysinem (Aldrich, Germany), který zvyšuje přilnavost řezů na podložné sklíčko. Po ukončení krájení byly řezy ohraničeny na sklech fixem Super PAP PEN (Beckmann Coulter), po jeho zaschnutí byly uloženy na 15 min do roztoku PBS (fosfátový pufr, z angl. *phosphate buffer saline*). Před samotnou aplikací specifických primárních protilátek byly řezy inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě v blokujícím roztoku (1% BSA, 0,1% TritonX-100 a 2% normální kozí sérum) (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Delaware Bay, NJ; Normal Goat Serum, Gibco, Waltham, MA) - cca 100-150 μL na sklíčko. Blokování výrazně snižuje navazování nespecifických protilátek a detergent (TritonX-100) zvyšuje permeabilitu membrány, co umožňuje snadný průnik protilátek membránou buňky.

Na určení exprese galaninergních peptidů pomocí metod real time RT PCR a Western blot byly použity homogenáty adenohipofýz, které byly po dekapitaci zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího zpracování. Přesný postup homogenizace se odvíjí od použité metody. Zatímco pro RT PCR probíhala homogenizace v přístroji MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Germany), pro metodu Western blot jsme museli vybrat vhodný homogenizátor. Následně byl homogenát vystaven působení ultrazvuku a dále centrifugován za účelem získání čistého supernatantu pro analýzu proteinů.

3.6.2 Experiment s CRH systémem

Na určení exprese CRH receptorů pomocí metod RT PCR byly použity homogenáty hypofýz myši, které byly po dekapitaci zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího zpracování pro RT PCR. Experiment s EAE modelem

Vzorky míchy myši byly po vyjmutí z těla okamžitě fixovány ve 4% paraformaldehydu, následně proběhla kryoprotekce sacharózou, poté byly vloženy do sloučeniny s optimální teplotou pro krájení řezů, zmrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a skladovány až do dalšího použití. Pro metodu nepřímé imunofluorescence byly použity kryosekce o tloušťce $7\text{ }\mu\text{m}$.

Míchy a mozky z myši byly uloženy ve stabilizačním roztoku RNAlater™ při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro pozdější analýzu RT PCR.

3.7 Zpracování adenohipofýzy a míchy pro imunoflorescenci

Míchy myši byly po rozmrazení a promytí v PBS. Nespecifická vazebná místa byla blokována 5 %-ním kozím sérem v 0,1 % fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem Triton X-100 (TPBS). Řezy byly inkubovány s králičím anti-human GalR1 zředěným 1: 500 (Alomone Labs, Jeruzalém, Izrael) v TPBS + 1,5 % normálního kozího séra přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro vizualizaci byla na řezy po dobu 30 minut při pokojové teplotě aplikována sekundární kozí protilátka anti-rabbit Cy3 (Jackson Immunoresearch, Cambridge, Velká Británie) zředěná v poměru 1: 500 v TPBS + 5 % normálního kozího séra. Jádra byla obarvena DAPI. Zobrazování bylo prováděno na LSCM Olympus FluoView 1000 (Olympus, Tokio, Japonsko). Pro histologické zpracování byly použity řezy silné $7\text{ }\mu\text{m}$ a obarveny barvením hematoxylin-eosin. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Leica DMLB pomocí kamery MC170 HD (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo). Z každého zvířete bylo hodnoceno 12 řezů. Rozsah zánětu byl zaznamenán následovně: 0 = žádný zjevný zánět; 1 = malý počet zánětlivých buněk; 2 = četné infiltrující buňky; 3 = rozšíření perivaskulární manžety do sousedních tkání (rozšířená infiltrace).

3.8 Příprava homogenátů adenohipofýz a hipofýz pro Western blot a RT PCR

U obou metod – jak u Western blotu, tak u RT PCR se pracuje s tkáňovým homogenátem. Protože se jednalo o malé množství tkáně adenohipofýzy potkana nebo hipofýzy myši, museli jsme tento krok optimalizovat. Při stanovení proteinů a jejich kvantifikaci existuje několik kritických momentů, které mohou negativně ovlivnit konečný výsledek. Ten závisí zejména na homogenizaci vzorků a použitých pufrů. To nás vedlo k optimalizaci experimentálních podmínek metody Western blot, včetně homogenizace. Testovali jsme různé homogenizátory (MagNA Lyser-Roche, Bio Vortexer, Ultra-Turrax T8 IKA) a homogenizační pufrů (RIPA, PBS, urea), viz výsledky.

3.9 Western blot

Westernový blotting (angl. western blotting, zkráceně western blot) je technikou, která pro detekci proteinů využívá jejich vazbu na pevný povrch. Proteiny se při western blotu analyzují imunologicky, proto se tato metoda nazývá i imunoblotting. Metoda Western blot se používá pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci daného proteinu ve vzorku za pomoci specifických protilátek.

V prvním kroku se tkáň homogenizuje a proteiny se elektroforeticky rozdělí za pomoci denaturující polyakrylamidové elektroforézy (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE).

Následným krokem je přenos proteinů z gelu na blotovací membránu. Na porézní podložku se umístí několik vrstev filtračního papíru, elektroforetický gel, nitrocelulósová membrána, opět několik vrstev filtračního papíru a znova porézní podložka. Tento tzv. sendvič se umístí do vhodného pufru a zapojí se do elektrického pole (strana s membránou směřuje k anodě, strana s gelem ke katodě). Proteiny obalené v SDS (z angl. sodium dodecyl sulfate) migrují kvůli elektrickému náboji z gelu na membránu, kde se pevně zachytí. Následuje zablokování membrány pro nespecifické vazby detekčního činidla: membrána se obmývá roztokem nespecifického proteinu (např. hovězího sérového albuminu, angl. bovine serum albumin, BSA).

Následuje několikanásobné promývání membrány v pufru Tris-HCl (pH = 7,4) a nakonec promývání roztokem značených primárních protilátek. Specifická detekce proteinů se provádí použitím primárních protilátek; vzniklý imunokomplex se vizualizuje vazbou značené sekundární protilátky nebo značeného proteinu (značení nejčastěji vazbou enzymu - např. alkalické fosfatázy a peroxidázy, ale i koloidním zlatem, radioaktivně, luminiscenčně nebo fluorescenčně).

Přítomnost signálu svědčí o přítomnosti studovaného proteinu (kvalitativní rozměr), množství tohoto signálu o množství vázaných protilátek, tj. množství studovaného proteinu (kvantitativní rozměr).

3.9.1 Homogenizace tkáně u metody Western blot

Vzorek tkáně se homogenizuje ihned po odběru, nebo je po odběru zmražen v tekutém dusíku a až do zpracování uložen při teplotě -80 °C. Homogenát se smíchá s nanášecím roztokem a inhibitorem proteáz a následně se vaří po dobu 5 minut na vodní lázni, čímž dojde k denaturaci proteinů.

3.9.2 Separace proteinů

Pro separaci proteinů se nejčastěji využívá gelová elektroforéza, na kterou používáme v naší laboratoři polyakrylamidové gradientní gely Mini-PROTEAN TGX 4-20 % (Biorad, USA), s nimiž lze rozdělit proteiny o molekulové hmotnosti 10-200 kDa. Denaturující podmínky jsou vytvořeny přidáním SDS, který rozruší proteinové struktury (denaturuje je) a zhruba v konstantních odstupech se váže na denaturované polypeptidové řetězce a dodává jim negativní náboj. Při zapojení elektrického pole se tak proteiny pohybují směrem ke kladnému pólu a rychlostí závislou pouze na jejich molekulové hmotnosti. Při optimalizaci experimentálních podmínek jsme srovnávali vliv nového gelu a gelu po expiraci.

3.9.3 Blotování

Elektroforeticky rozdělené proteiny jsou následně přeneseny na membránu. Na našem pracovišti používáme komerčně dodávaný sendvič Trans-Blot Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Packs (Biorad, USA). Tento proces se označuje jako tzv. blotování a vzniká „otisk“ v gelu separovaných proteinů na

membráně, „blot“. Blotování probíhá na přístroji Trans-Blot Turbo (BioRad, USA) (obr. 8).

Po vlastním přenosu proteinů je nutné blokovat zbývající vazebná místa na membráně, aby zde nedocházelo k nespecifické vazbě těchto bílkovin. Membrána se přenesse do roztoku s albuminem z hovězího séra (BSA) (Ústav sér a očkovacích látek, ČR), ve kterém se inkubuje dvě hodiny při pokojové teplotě. Tento proces se nazývá blokování (viz dále).



Obr. 8. Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad, USA).

Tento přístroj je blotující systém, který umožňuje přenést elektroforeticky rozdělený vzorek z gelu na membránu (tzv. blotování). Celý proces trvá 3 minuty. (zdroj: www.biorad.com)

3.9.4 Identifikace proteinu pomocí protilátek

Přítomnost cílového proteinu je na membráně detekována pomocí protilátky, tzv. primární, specifická tomuto proteinu. Primární protilátka se navazuje na protein a v dalším kroku se na ni navazuje sekundární protilátka.

Přítomnost sekundární protilátky je detekována fluorescenčně, a to v závislosti na značení, které sekundární protilátka nese. V naší laboratoři používáme kity založené na použití sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Velikost signálu (bandu) je vyhodnocována srovnáním s naneseným proteinovým markerem, což je komerčně dostupná směs proteinů o známé velikosti.

Specificita primárních protilátek byla v našem pokusu na adenohipofýzách testována pomocí metody Western blot. Homogenáty adenohipofýz se nanášely na 4-20 % Mini-Protean TGX gel (BioRad, CA, USA). Po separaci proteinů elektroforézou byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu s využitím kitů Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, CA, USA) a Trans – Blot Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Pack (BioRad, CA, USA). Membrány byly dále inkubovány s primární protilátkou detekovanou kitem Vectastain ABC (Vector Lab, CA, USA).

3.10 Metoda s využitím imunoflorescence

V naší práci byly použity imunohistochemické stanovení jednotlivých peptidů na řezech z adenohipofýzy a také metodu western blot. Použili jsme komerčně dostupné protilátky používané v naší laboratoři, které jsou uvedeny níže.

3.10.1 Protilátky

Byly použity komerčně vyráběné primární protilátky (PP) proti sledovaným neuropeptidům a jejich receptorům a rovněž komerčně vyráběné sekundární protilátky (SP). Pro značení některých proteinů jsou komerčně vyráběny primární protilátky, které jsou přímo konjugovány s fluorescenční značkou. Tyto primární protilátky pak není nutné značit sekundární protilátkou. Protože se značené primární protilátky vyrábí pouze pro omezený počet proteinů, v naší laboratoři je nepoužíváme.

3.10.1.1 Primární protilátky

- Anti-Galanin (Lifespan, USA)
- GalLP Rabbit anti-Rat Polyclonal antibody (Lifespan, USA)
- Anti Glial Fibrillary Acidic Protein (Millipore, USA)
- Mouse monoclonal to Neuron specific beta III Tubulin – Neuronal Marker (Abcam, UK)
- Anti-GFAP Ab (Chemicon)
- Rat anti-mouse monoclonal antiCD11b-Ab (BD PharMingen).
- Anti-Galanin Receptor type 1 (Alomone Labs, Israel)
- Anti-Galanin Receptor type 2 (Alomone Labs, Israel)
- Anti-Galanin Receptor type 3 (Alomone Labs, Israel)

3.10.1.2 Sekundární protilátky

Sekundární protilátky (SP) použité v reakci musí specificky reagovat s antigeny zvířat, ze kterých byly získány primární protilátky. Zároveň musí být SP používané současně označeny jinou fluorescenční barvou, aby bylo možné je na preparátu odlišit. SP se získávají z různých zvířecích druhů, což umožňuje kombinaci stanovení různých proteinů zároveň. Pro detekci se značí konjugací s různými značkami, nejčastěji používanými jsou fluorescenční značky pro sledování imunofluorescenčním mikroskopem. Různé barvy fluorescenčních značek umožňují sledovat na jednom vzorku zároveň více cílových struktur.

V našich experimentech byly použity sekundární protilátky firmy Invitrogen, USA:

- AlexaFluor 488 Goat anti Rabbit
- AlexaFluor 488 Goat anti Mouse
- AlexaFluor 546 Goat anti Mouse
- Alexa Fluor 546 Goat anti Guinea Pig
- AlexaFluor 633 Goat anti Chicken
- FITC Goat anti-rabbit
- TRITC Goat anti-mouse
- TRITC Goat anti-rat

3.10.2 Imunofluorescenční postup stanovení testovaných peptidů

Pro imunofluorescenční stanovení galaninergních peptidů (galaninu, galanin-like peptidu a galaninergních receptorů) byly použity tkáňové řezy z bločků tkání zamražených v kryolepidle. Zmražené adenohipofýzy byly krájeny na tloušťku 5 μm v kryostatu Leica CM1850 (Leica Microsystems, Germany). Řezy se pokládají na sklíčka potaženy Poly-L-lysinem (Aldrich, Germany), který zvyšuje přilnavost řezů na podložné sklíčko. Po ukončení krájení byly řezy ohraničeny na sklech fixem Super PAP PEN (Beckmann Coulter). Tento krok snižuje riziko odplavení řezů při přeplachování roztoky a inkubacích. Po zaschnutí pera byly uloženy na 15 min do roztoku PBS (fosfátový pufr, z angl. phosphate buffer saline).

Před samotnou aplikací specifických primárních protilátek byly řezy inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě v tzv. blokujícím roztoku (1 % BSA, 0.1% TritonX-100 a 2% normální kozí sérum) (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Delaware Bay, NJ; Normal Goat Serum, Gibco, Waltham, MA) - cca 100-150 μL na sklíčko. Blokování výrazně snižuje navazování nespecifických protilátek a detergent (TritonX-100) zvyšuje permeabilitu membrány, co umožňuje snadný průnik protilátek membránou buňky. Blokovací roztok byl připraven do 10 mL PBS. Zbylé množství se využilo v dalších krocích (např. na ředění protilátek).

1 % BSA (Sigma)	0,1 g
2 % Normal Goat Serum (Gibco)	200 μL
0,01 % Triton X-100 (Pierce), 10 % vodný roztok	100 μL

Blokovací roztok byl z řezů odstraněn lehkým otřesením podložného sklíčka. Následně byly řezy inkubovány s králičí primární protilátkou (Alomone Labs, Jerusalem, Israel): Anti-Galanin Receptor Type 1 antibody (#AGR-011), Anti-Galanin Receptor Type 2 (#AGR-012) a Anti-Galanin Receptor Type 3 (extracelulární) (#AGR-013). Protilátky byly naředěny do blokovacího roztoku v poměru 1:500 (1 μL protilátky: 500 μL blokovacího roztoku). Inkubace s primární protilátkou probíhá při 4 °C přes noc. Poté následují tři oplachy v PBS po dobu 5, 10 a 15 minut.

Sekundární protilátky se rovněž ředí do blokovacího roztoku, kterého se dává 1 díl a k němu 2 díly PBS. V experimentu jsme použili Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA) v poměru 1:600 (Šípková et al., 2017). Na každé sklíčko bylo aplikováno přibližně 100-150 μL . Inkubace probíhá ve tmě po dobu 2 hodin při pokojové teplotě v barvicí komoře.

Následoval zase oplach 3 x 5 minut v PBS roztoku a poté v destilované vodě. Po opláchnutí se nechaly sklíčka vyschnout a na řezy byl nanesen Vectashield s DAPI 20-50 μL (podle počtu řezů) na každé sklíčko.

Na hodnocení vzorků byl využit fluorescenční mikroskop Leica DM5000 B s digitální kamerou Leica DFC420 C a zpracováním obrazu Peltier Cooling System (Leica Microsystems).

Získaná data byla hodnocena softwarem NIS Elements Viewer (Laboratory Imaging 2015, Nikon Instruments, Tokyo, Japan) a ImageJ (freeware, <http://rsb.info.nih.gov>). Hodnotili jsme dva hlavní parametry: počet buněk reagujících s primární protilátkou a intenzita jejich fluorescenčního signálu. Počet buněk a jejich intenzita signálu byly hodnoceny softwarem NIS Elements. Statistická analýza byla provedena za pomoci t-testu nebo jednocestné ANOVA a hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

3.11 Stanovení exprese mRNA testovaných peptidů

3.11.1 Experiment s galaninergním systémem a CRH systémem

Exprese mRNA testovaných peptidů byla stanovena pomocí metody Real-Time PCR (real-time qPCR) (Kozera and Rapacz, 2013) z homogenátů adenohipofýz. Samotné reakci předcházejí dílčí kroky:

- odběr adenohipofýz
- homogenizace adenohipofýz
- izolace RNA
- měření koncentrace RNA
- reverzní transkripce

Real Time qPCR proběhla za použití přístroje CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, CA, USA), specifických primerů a markru SYBR Green Supermix (Biorad, USA). Po amplifikaci byly určeny melting křivky jako indikátory

specificity PCR. Reakce všech vzorků byla stanovena v triplicátech. Kvantifikace dat byla provedena softwarem Optical System Software (Bio-Rad, USA). Stanovili jsme mRNA jednotlivých genů vztažením jejich CT hodnoty k CT hodnotě referenčního genu beta aktinu (Genbank Accession No. NM_031144). Specificita primerů byla ověřena klasickou PCR reakcí (Bio-Rad, Prague, Czech Republic). Relativní exprese byla počítána pomocí $2^{-\Delta\Delta CT}$ metody (Livak and Schmittgen, 2001). Výsledky jsou prezentovány jako mean + SEM pro n= 6-8 zvířat a následně jsou výsledky relativní exprese individuálních genů vyjádřeny jako procento kontrol.

Statistické rozdíly mezi skupinami zvířat byly počítány jednocestnou ANOVA s Benferroniho *post hoc* testem. Jako signifikantní je považována významnost pro $p < 0.05$. Jako alternativní metoda kalkulace byl použit software (REST-MCS© - version 2), který je určen na počítání relativní exprese (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test, Pfaffl et al., 2002).

3.11.1.1 Izolace RNA

Na izolaci jsme použili komerční kit od společnosti Roche (Cat.No: 12 033 674 001), který obsahuje:

- Lysis/Binding buffer
- DNase I (rozpuští se v 550 μ l Elution buffer), uchovat při -15 až -25°C
- DNase I Incubation buffer
- Wash buffer I (přidat 20 ml EtOH), uchovat při 15 - 25°C
- Wash buffer II (přidat 40 ml EtOH), uchovat při 15 - 25°C
- Elution Buffer
- Zkumavky s filtrem, super čisté
- Sběrné zkumavky

Postup izolace:

Vzorek tkáně (tkáň s maximální hmotností 20 – 25 mg) byl před vlastní izolací homogenizován v 400 μ l Lysis buffer. Získat RNA z tkáně, v našem

případě se jednalo o adenohypofýzu, v dostatečném množství a kvalitě je však spojeno s různými technickými problémy, které souvisí s její malou hmotností a objemem. K homogenizaci adenohypofýzy byl použit automatický homogenizační systém MagNA Lyser od Roche. Homogenizace probíhala 30s a rychlosti 4000 otáček za minutu (viz obrázek 11) za použití zkumavky s 3-6 keramickými kuličkami. Poté se přenese vzorek do nové, čisté centrifugační zkumavky a stočí ve stolní mikrocetrfuze: 2 minuty na maximě. Někdy lze vidět usazenou peletu. Odsaje se pouze supernatant a přenese do nové zkumavky. Přidá se 200 μ l (0.5 objemu) absolutního ethanolu a dobře zamíchá (5s vortexem).



Obr. 9. Tkáňový homogenizátor MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo, Product No. 03358976001).

Přístroj automaticky narušuje buňky nebo jiný biologický materiál a umožňuje tak uvolnění nukleových kyselin (DNA, RNA, mRNA) a proteinů. Zabraňuje degradaci nukleových kyselin pomocí chladičoho bloku. Velkou výhodou je homogenizace až 16 vzorků najednou.

Naskládají se zkumavky s filtrem se sběrnými zkumavkami (speciálními kolonkovými zkumavkami s filtrem s obsahem SiO₂, uzpůsobeným k zachytu RNA produktu) a celý vzorek se nanese na filtr (maximálně 700 µl).

Centrifugace v centrifuze Hettich (chlazená 4 °C) 30s na maximě (13000xg). Proteklá tekutina se vylije ze sběrné zkumavky a znovu spojí se zkumavkou s filtrem.

Na každý jeden vzorek se nanese 90 µl DNase Incubation Buffer s 10 µl DNaseI. Směs (100 µl/vzorek) se přenesse na filtr. Následuje inkubace 15 minut při pokojové teplotě.

K vzorku se přidá 500 µl Wash Buffer I (nanese se na filtr) a centrifuguje se v centrifuze Hettich (chlazená 4 °C) 15s při 8000xg. Proteklá tekutina se vylije ze sběrné zkumavky a znovu spojí se zkumavkou s filtrem. Přidá se 500 µl Wash Buffer II (nanese se na filtr). Centrifugace v centrifuze Hettich (chlazená 4°C) 15s při 8000xg. Proteklá tekutina se opět vylije ze sběrné zkumavky a znovu spojí se zkumavkou s filtrem.

Přidá se 300 µl Wash Buffer II (nanese se na filtr). Centrifugace v centrifuze Hettich (chlazená 4 °C) 2 min při 13000xg. Opatrně se odstraní sběrná zkumavka, abychom se vyhnuli kontaktu s naneseným vzorkem a danou zkumavkou. Zkumavka se vzorkem se vloží do nové, čisté sběrné zkumavky (original Eppendorf).

Nanese se 40 µl Elution Buffer na filter. Centrifugace v centrifuze Hettich (chlazená 4 °C) 1 min při 8000xg. Sběrná zkumavka obsahuje vyizolovanou RNA.

3.11.1.2 Měření koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometrickým měřením absorbance při 260 nm na spektrofotometru proti RNase-free vodě. Optická hustota $A_{260}=1$ odpovídá 40 µg RNA/ml. Poměr $R_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ byl použit k posouzení čistoty vzorků. RNA je možné uchovat při teplotě -80 °C, dokud ji nepoužijeme pro reverzní transkripci do cDNA.

3.11.1.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při níž se přepisuje genetická informace z molekuly RNA do DNA, označována jako cDNA (z angl. *complementary DNA*). Jako katalyzátor této reakce slouží enzym reverzní transkriptáza. Buňky obsahují celkem tři druhy RNA (tRNA, rRNA a mRNA) a výše popsanými postupy obdržíme jejich směs. Většinou je pro účely reverzní transkripce žádoucí pouze mRNA, která kóduje dané geny.

Dnes jsou dostupné komerčně dodávány různé typy rekombinantních reverzních transkriptáz. V pokusech byly použity následující chemikálie:

- SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)
(složení: SuperScript™ III RT, 5X First-Strand Buffer *[250 mM Tris-HCl (pH 8,3 při pokojové teplotě), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 0,1 M DTT (dithiothreitol na aktivaci enzymů))
- Random Primers (Invitrogen)
- 10 mM dNTP (Invitrogen)

Tato reakce má celkový objem 20 µl. K tomuto objemu se přidává celkově 1 µg total RNA (tj. 11 µl RNA již ošetřeno DNasou, připraveno v předešlém kroku). Zásobní roztok random primeru se ředí 10x.

Postup: rozmrazí se 11 µl vyizolované RNA (o celkovém množství 1 µg RNA na 11 µl). Na jednu reakci se přidá 1 µl random primeru. Vzorky se vloží do cycleru (obecné nastavení: inkubace 10 min při 70 °C (denaturace RNA), chlazení 4 min při 40 °C (renaturace RNA – rychle, aby se netvořily vlásenky).

Po renaturaci se program v cycleru zastaví, do zkumavek se přidá MIX 8 µl na reakci. Složení je uvedeno níže v tabulce 1. Takto připravena směs se inkubuje v cycleru 1 hodinu při 37 °C, potom se chladí 10 minut při 70 °C.

Po skončení reakce nedokážeme přesně změřit koncentraci nasyntetizované cDNA (kvůli zbytkům reakce dNTP, nezreagované RNA atd.), vycházíme však z předpokladu, že za ideálních podmínek je množství nasyntetizované cDNA stejné, jako bylo původní množství RNA v reakci, teda:

Koncentrace, ze které se vychází, je 1 µg/20 µl, tj. 50 ng/µl. 5-25 ng cDNA se pak použije do naší real-time PCR.

Tab. 1. Složení mixu na reakci reverzní transkripce.

Počty µl jednotlivých komponent potřebných na přípravu mixu v závislosti na počtu reakcí. K finálnímu objemu je připočítán objem ztrát.

Použité zkratky: FSB - First strand buffer, DTT – dithiothreitol, dNTP – set čtyř deoxynukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), SuperScript - SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)

µl na 1 vzorek	počet reakcí: 30	se ztrátami	komponenty
4	112	138	5xFSB
2	56	69	DTT
1	28	34,5	dNTP (10mM)
1	28	34,5	SuperScript

3.11.1.4 Real-time PCR

Real-time PCR je obdoba PCR, která umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktu (cDNA) během reakce, odtud název real-time PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Kvantifikace množství molekul nukleových kyselin je důležitá při studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů. Narozdíl od PCR, kde se detekuje až finální produkt, v průběhu real-time PCR lze kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. K detekci vznikajícího produktu se používají různé systémy založené na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace.

Tato reakce se provádí v cyklorech s optikou, které umožňují jak teplotní cyklování, tak excitaci substrátů s následnou detekcí fluorescence v každé jamce. V amplifikační fázi dochází k cílené amplifikaci vzorku cDNA, vytvořeného dřívějším přepisem z RNA, za použití primeru. Primery (oligonukleotidy) jsou sekvenčně specifické fragmenty DNA o 20 – 25 nukleotidech, které si díky své

komplementaritě přisedají právě ke koncům amplifikovaného úseku. Primer slouží jako počáteční místo replikace DNA.

Níže v tabulce 2 je uveden poměr ředění primerů. Takto naředěný primer se použije na přípravu reakčního mixu (přesné složení mixu viz tabulka 3). Další důležitou komponentou je iQTM SYBR[®] Green Supermix (BioRad, USA), který obsahuje dNTPs, iTaqTM DNA polymerasu, MgCl₂, SYBR[®] Green I, stabilizátory, fluorescein.

Kvantitativní PCR reakce sestávala z následujících kroků: denaturace 10 min při teplotě 95 °C a dále 45 cyklů amplifikace (95 °C/30s, 60 °C/25s a 72 °C/20s). Po ukončení amplifikace byly vzorky zvolna ohřáty z 65 °C na 95 °C při kontinuálním měření fluorescence pro získání křivky tání. Data byla vyjádřena jako prahové hodnoty (Ct), tzn. jako změna fluorescence v reálném čase.

Tab. 2. Ředění primerů (20 nM).

Pracovní roztok primeru se ředí tak, aby jeho výslední koncentrace byla 20 nM.

Primer-Left (100 nM)	10 µl	Výslední koncentrace primeru je 20 nM
Primer-Right (100 nM)	10 µl	
H ₂ O	80 µl	

Tab. 3. Složení MIX-u na real-time PCR.

Mix obsahuje iQ™ SYBR[®] Green Supermix, který je složen z dNTPs (set čtyř deoxynukleotidů – dATP, dCTP, dGTP, dTTP), iTaq™ DNA polymerasy, MgCl₂, SYBR® Green I, stabilizátorů, fluoresceinu. Dále obsahuje vodu, primery (levý a pravý) a komplementární DNA.

Komponenty	Objem sa 1 reakci
iQ™ SYBR [®] Green Supermix	12,5 µl
Primer Right + Primer Left	5 µl
H ₂ O	7,5 µl
cDNA	1 µl
Celkový objem	26 µl

3.11.2 Experiment s EAE modelem

Celková RNA byla extrahována za použití činidla TRI (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika). cDNA byla syntetizována z RNA pomocí reverzní transkriptázy M – MLV (Top Bio, Praha, Česká republika). cDNA sloužila jako templát pro amplifikaci cílových genů, stejně jako udržovacího genu β-aktinu (gen Actb) RT PCR s SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad, Praha, Česká republika). cDNA byla analyzována pomocí CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad, Praha, Česká republika). Cílovými geny byly GalR1, GalR2 a GalR3. Cyklický program PCR byl následující: 95 ° C po dobu 30 s a 40 cyklů 95 ° C po dobu 15 s a 60 ° C po dobu 30 s. Program křivky tání byl následující: 65 ° C až 95 ° C při 0,5 ° C / 5 s. Expresí cílových genů byla vypočtena porovnáním relativních hladin po normalizaci s expresí β-aktinu (Yamashita et al., 2017).

3.11.2.1 Histologie v experimentu s EAE modelem

Vzorky páteře s míchami byly fixovány 4% formaldehydem a míchy byly opatrně odstraněny z obratlového kanálu. Materiál byl vložen do parafínového vosku. Sekce (tloušťka 7 µm) byly obarveny barvením hematoxylin-eosin. Snímky byly zachyceny na mikroskop Leica DMLB s kamerou MC170 HD

(Leica Microsystems, Wetzlar, Německo). Zánět byl hodnocen na 12 řezech od každého zvířete. Rozsah zánětu byl vyhodnocen následovně: 0 = není patrný zánět; 1 = malý počet zánětlivých buněk; 2 = mnoho infiltrujících buněk; 3 = rozšíření perivaskulární manžety do sousedních tkání (rozšířená infiltrace).

4 VÝSLEDKY

V našich experimentech jsme studovali komponenty galaninergního systému, u kterých předpokládáme možné modulační/regulační propojení. Publikace uvádí údaje, že galanin má kardiovaskulární účinky, ale další studie o přítomnosti jednotlivých komponent galaninergního systému jsou ojedinělé. V této disertační práci jsme sledovali galaninergní systém v adenohipofýze za fyziologických podmínek a za stresu pomocí stanovení exprese mRNA a pomocí imunofluorescenční detekce nově syntetizovaných genů. Rovněž jsme popsali jeho zapojení u myšího modelu roztroušené sklerózy, EAE, pomocí analýzy RT PCR a stanovení jeho buněčné lokalizace (v oligodendrocytech, mikroglíích, astrocytech, ependymálních buňkách a endotelových buňkách v kapilárách) imunohistochemicky.

Přítomnost galaninergních receptorových subtypů v adenohipofýze jsme potvrdili metodou Western blot, kterou jsme vzhledem k malému množství adenohipofyzární tkáně museli optimalizovat. Citlivost experimentálních podmínek jsme testovali nejdřív na srdečních komorách potkana, které mají ve srovnání s adenohipofýzou větší objem.

Výsledky této práce jsou rozděleny na čtyři části. V první části jsou uvedeny výsledky testování různých homogenizátorů, lyzačních pufrů, blotovacích membrán, nanášecích pufrů a inhibitorů proteáz, které byly důležité pro optimalizaci metody Western blot.

V druhé části jsou výsledky stanovení galaninergního systému v samotné adenohipofýze za bazálních podmínek a po aplikaci imobilizačního stresu.

V třetí části jsou výsledky stanovení CRH systému v hypofýze za bazálních podmínek a po aplikaci různých druhů imobilizačního stresu u kontrolních myší a u CRH knock-outovaných myší.

V čtvrté části je popsáno zapojení galaninergního systému u myšího modelu roztroušené sklerózy, EAE, pomocí analýzy RT PCR a stanovení jeho buněčné lokalizace (v oligodendrocytech, mikroglíích, astrocytech, ependymálních buňkách a endotelových buňkách v kapilárách) imunohistochemicky.

4.1 Optimalizace metody Western blot

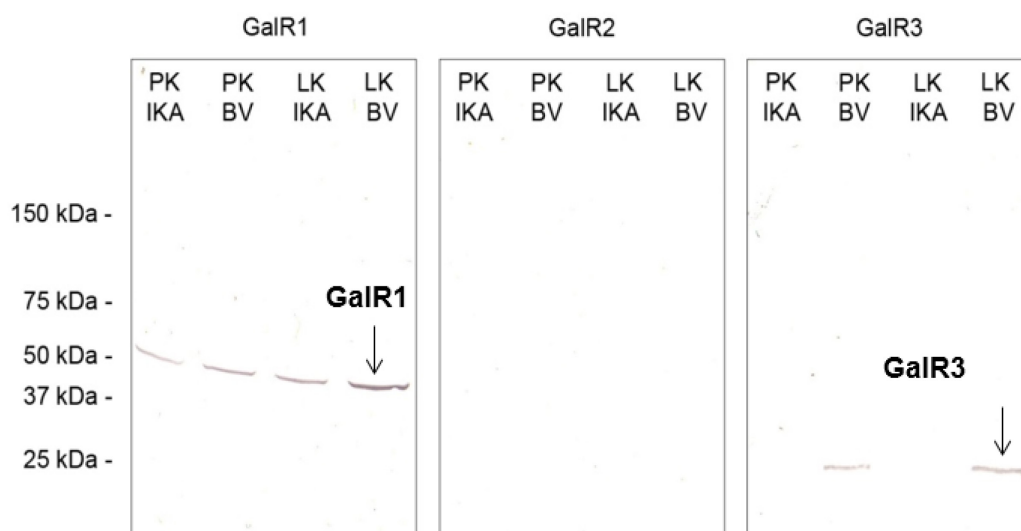
4.1.1 Testování homogenizátorů a homogenizačních pufků

Při optimalizaci homogenizace jsme testovali 2 různé přístroje: Bio Vortexer a Ultra – Turrax T8 IKA na galaninových receptorech GalR1, GalR2 a GalR3 u levých a pravých komor srdce potkana.

Dále jsme testovali lyzační pufky – fosfátový pufk, radioimunoprecipitační pufk a močovinu, které uvolní a rozpustí proteiny obsažené v testovaných buňkách a tkáních. Při výběru vhodného lyzačního pufku se především řídíme požadavky použité protilátky a lokalizací testovaného proteinu.

Ověřovali jsme i použití dvou různých nanášecích roztoků – Laemmli Buffer (BioRad) a PLB (Protein loading buffer) a dvou různých inhibitorů proteáz – bakteriálního a savčího.

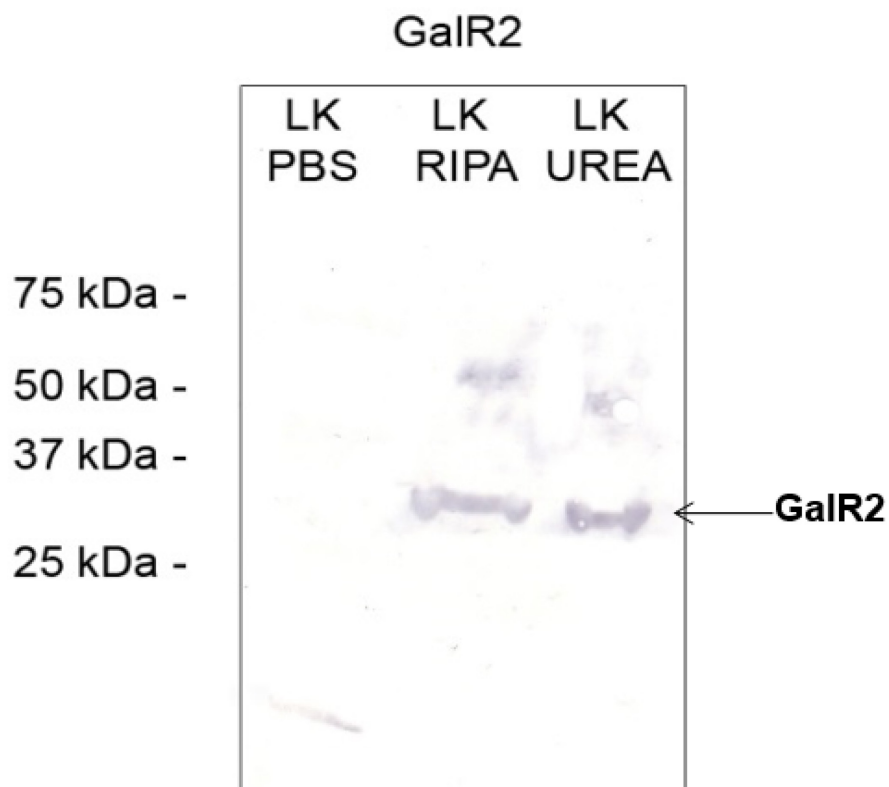
Z obrázku 9 je patrné, že na GalR1 použití homogenizátoru vliv nemá. U GalR3 byl vyšší výtěžek z homogenizace pomocí Bio Vortexeru. U GalR2 byla homogenizace nedostačující, proto jsme následně testovali vliv homogenizačních pufků – fosfátového pufku (PBS), radioimunoprecipitačního pufku (RIPA) a močoviny (UREA) (viz obr. 10, 11).



Obr. 10. Výsledek Western blotu GalR1, GalR2, GalR3 levých komor a pravých komor srdce potkana za použití různých homogenizátorů.

Na homogenizaci tkáně jsme použili homogenizátor Bio Vortexer a Ultra-Turrax T8 IKA. Z výsledku je patrné, že na GalR1 použití homogenizátoru vliv nemá. U GalR3 byl vyšší výtěžek z homogenizace pomocí Bio Vortexeru. U GalR2 byla homogenizace nedostačující, proto jsme následně testovali vliv homogenizačních pufrů.

Použité zkratky: GalR1, 2, 3 - Galaninový receptor 1, 2, 3, BV - Bio Vortexer, IKA - Ultra-Turrax T8 IKA, LK – levá komora srdce potkana, PK – pravá komora srdce potkana



Obr. 11. Výsledek z Western blotu GalR2 u levých komor potkana.

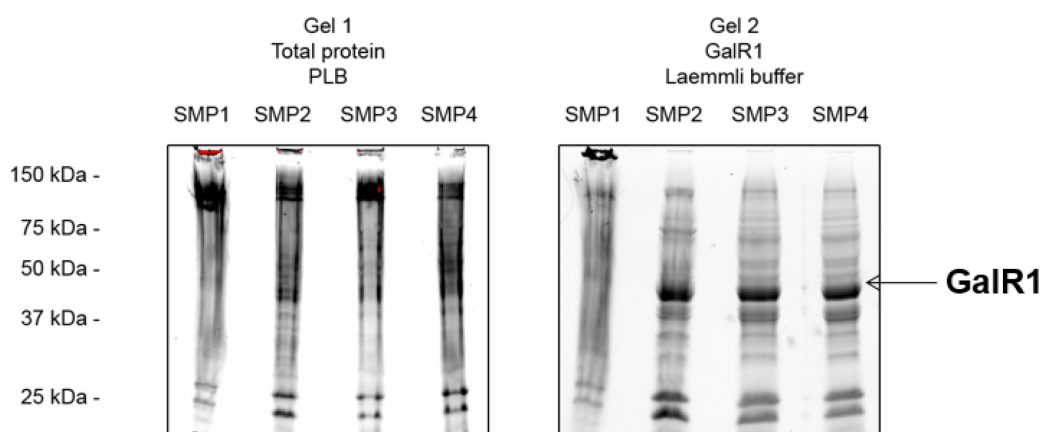
Použili jsme fosfátový pufr, radioimunoprecipitační pufr a močovinu. U GalR2 vykazovala RIPA a UREA lepší solubilizaci proteinu s vyšším výtěžkem.

Použité zkratky: GalR2 – Galaninová receptor 2, LK – levá komora potkana, PBS - fosfátový pufr, RIPA - radioimunoprecipitační pufr, UREA – močovina

4.1.2 Testování inhibitorů proteáz a nanášecích pufřů

V další fázi jsme testovali inhibitory proteáz – bakteriální a savčí a rozdíl mezi nanášecími roztoky – Laemmli Buffer a PLB (protein loading buffer). Na pokus jsme použili Stain-free technologii. Jedná se o detekční metodu Stain-free využívající speciální gel, který emituje pod ÚV zářením fluorescenční signál, který lze kvantifikovat za použití dokumentačního systému ChemiDoc MP a softwaru Image Lab.

Vliv inhibitoru proteáz nebyl zaznamenán (viz obr. 12). Na druhé straně použití komerčně vyráběného nanášecího roztoku Laemmli Buffer vykazoval kvalitnější výsledek (viz obr. 12).



Obr. 12. Výsledky získané metodou Western blot Stain-free technologií.

Gel 1: zobrazení celkového proteinu, gel 2: zobrazení GalR1. Jednotlivé vzorky byly tkáňové homogenáty levé komory srdce potkana. Byly použity dva homogenizační pufrы: radioimunoprecipitační pufr a fosfátový pufr a byly použity dva nanášecí pufrы: Protein loading buffer a Laemmli Buffer (BioRad).

SMP1: 1 LK + RIPA + PIC - bakteriální

SMP2: 1 LK + RIPA + PIC – savčí

SMP3: 1 LK + PBS + PIC – bakteriální

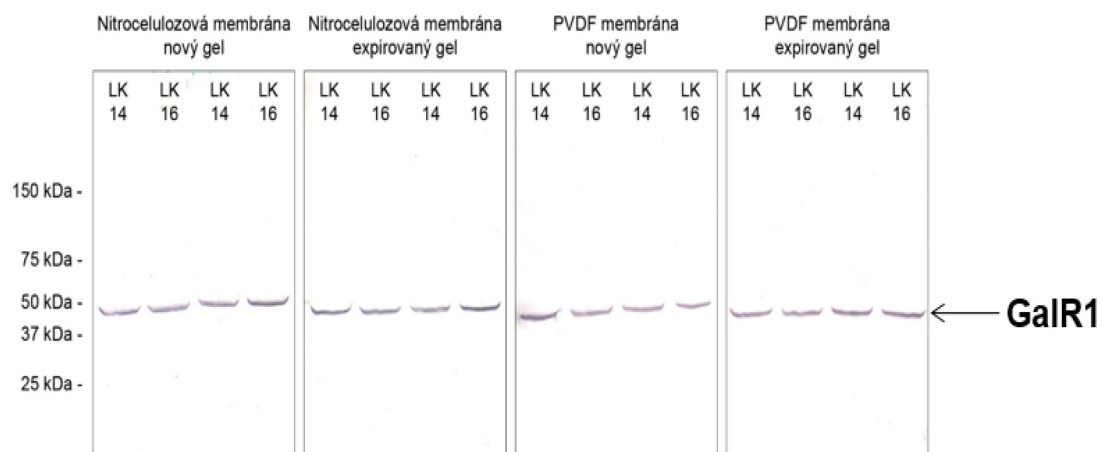
SMP4: 1 LK + PBS + PIC – savčí

Použité zkratky: GalR1 – Galaninový receptor 1, LK – levá komora potkana, PLB - Protein loading buffer.

4.1.3 Testování různých blotovacích membrán a gelů

V dalším kroku jsme sledovali vliv membrán – porovnávali jsme nitrocelulózovou membránu a PVDF (polyvinylidenfluoridová). PVDF membrána má větší schopnost vázat proteiny (170 až 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), zatímco nitrocelulózová má nižší kapacitu (80 až 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Z toho plyne, že PVDF má výhodu ve vyšší senzitivě, na druhé straně má i větší schopnost tvořit vyšší pozadí při detekci.

Z finančního hlediska jsme testovali rovněž vliv gelu nového a expirovaného. Tyto faktory však neměly vliv na kvalitu výsledku (viz obr. 13).



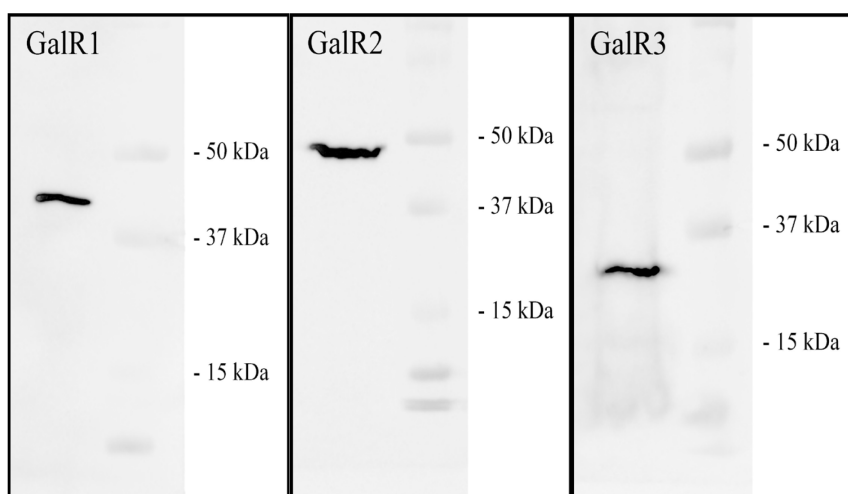
Obr. 13. Výsledek z Western blotu GalR1 u levých komor srdce potkana.

V levé komoře je přítomen GalR1, band se nachází kolem hmotnosti 50 kDa odpovídající údajům výrobce protilátky. Na pokus byly použity dva druhy membrán – PVDF (polyvinylidenfluoridová) a nitrocelulózová a dva druhy gelů – nový a proexpirovaný. Vliv druhu membrány, ani expirace gelu nebyl zaznamenán.

Použité zkratky: LK – levá komora potkana, GalR1 - Galaninový receptor 1, PVDF – polyvinylidenfluoridová membrána

4.1.4 Galaninergní peptidy v adenohipofýze – metoda Western blot i s ověřením specificity protilátek

Expresi galaninergních peptidů v adenohipofýze se nám podařilo dokumentovat i metodou Western blot se současným průkazem specificity použitých protilátek uvedených v metodách. Jako příklad uvádíme na obrázku 16 expresi galaninergních receptorů. Výsledky na obr. 16 prezentují přítomnost všech galaninergních subtypů GalR1, GalR2 a GalR3 v adenohipofýze potkana s uvedením jejich molekulové hmotnosti. Současně byla určena specificita protilátky (pravý proužek bez bandy).



Obr. 14. Stanovení galaninergních receptorů v adenohipofýze – WB.

Metodou Western blot byly určeny receptorové subtypy galaninergních receptorů v homogenátu adenohipofýz potkana. Přítomné bloty prokazují expresi všech galaninergních receptorových subtypů GalR1, GalR2 a GalR3 a jejich specificitu.

Použité zkratky: GalR1, GalR2, GalR3: galaninergní receptor 1, 2, 3

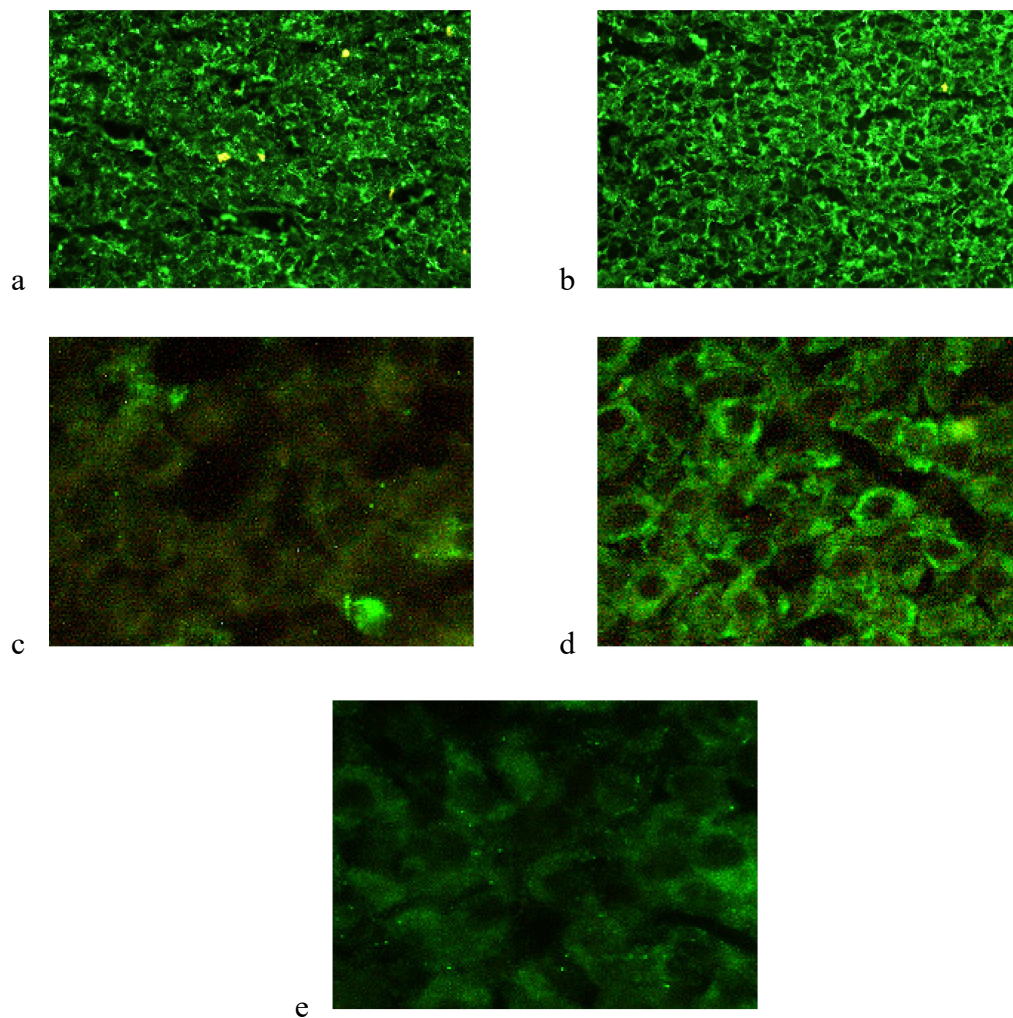
4.2 Stanovení galaninergního systému v adenohipofýze

Jak bylo uvedeno v metodické části disertace, průkaz přítomnosti komponent galaninergního systému jsme testovali imunofluorescenční metodou a určením mRNA genů sledovaných peptidů.

4.2.1 Imunohistochemická detekce Gal a GalLP za fyziologických podmínek v adenohipofýze

V první části experimentu jsme testovali přítomnost galaninergních peptidů v adenohipofýze. S využitím imunohistochemie jsme stanovili nejprve imunofluorescenčně značený galanin (Gal) (a), galanin-like peptide (Gal-LP) (b) a všechny tři podtypy galaninových receptorů: GalR1 (c), GalR2 (d) a GalR3 (e) v řezech adenohipofýzy za fyziologických podmínek.

Pro vyhodnocení imunofluorescenčních studií byly využity dva hlavní parametry: počet buněk reagujících s primární protilátkou a intenzita jejich fluorescenčního signálu. Tyto parametry byly automaticky generovány softvérem optické analýzy NIS Elements (viz metoda) včetně statistiky a dalších údajů. Zjistili jsme přítomnost všech testovaných galaninových peptidů jak je znázorněno na obrázku 15.

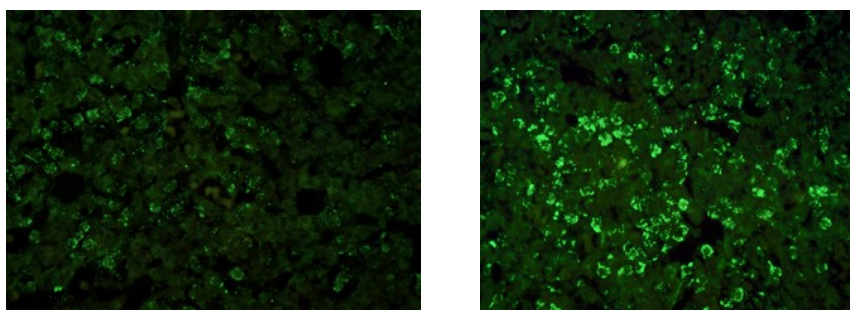


Obr. 15. Imunofluorescenčně značený galanin (Gal) (a), galanin like peptid (Gal-LP) (b) a všechny tři podtypy galaninových receptorů - GalR1 (c), GalR2 (d) a GalR3 (e) v řezech adenohipofýzy potkana za fyziologických podmínek (zvětšení 40x).

4.2.2 Stanovení exprese galaninergních receptorů v adenohipofýze

V další části pokusů jsme určovali expresi mRNA obou neuropeptidů galaninu a galanin-like peptidu a všech tří receptorových galaninových subtypů za fyziologických podmínek a po aplikaci stresu (viz metody).

Expresi jsme testovali imunofluorescenční metodou i stanovením exprese mRNA. Na obrázku je uveden příklad změn v expresi Gal R1 po aplikaci akutního stresu.



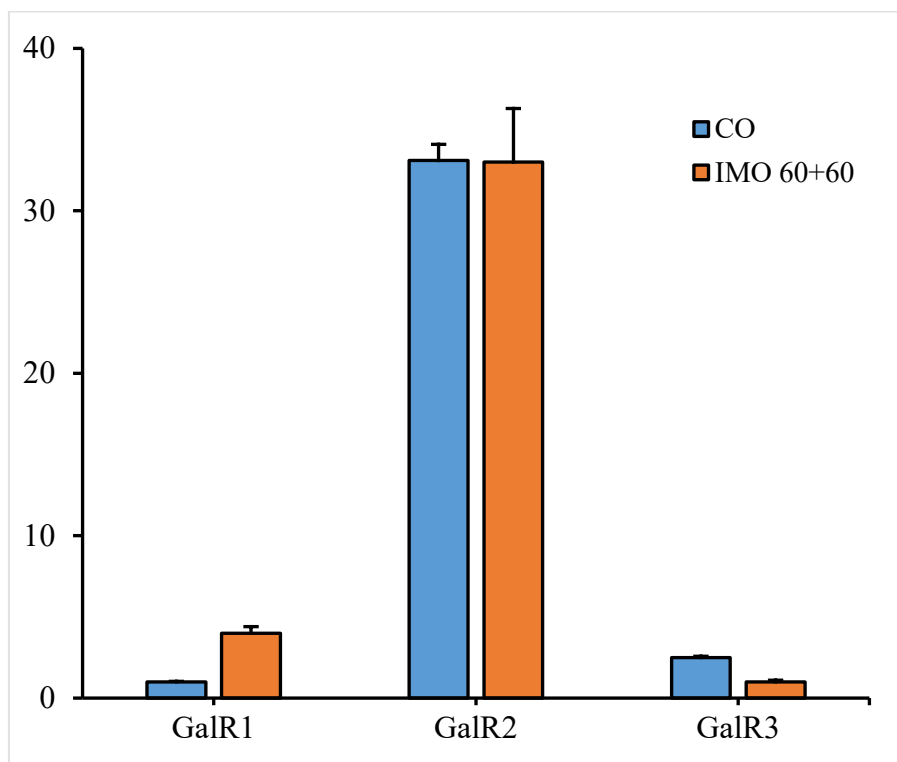
Obr. 16. Exprese GalR1 v adenohipofýze za fyziologických podmínek (vlevo) a po působení stresu (vpravo) stanovená na imunofluorescenčním snímku.

V adenohipofýze jsme prokázali expresi mRNA pro všechny tři receptorové subtypy také metodou real time qPCR. Exprese GalR2 mnohonásobně převyšuje expresi GalR1 a GalR3, viz obrázek 17, což je v souladu i s výsledky exprese peptidů de novo.

U exprese mRNA GalR2, která mnohonásobně převyšuje expresi mRNA GalR1 a mRNA GalR3 (Obr. 18), po aplikaci stresu nedochází k signifikantní změně na rozdíl od GalR1 a GalR3, kde byla relativní exprese stresem ovlivněna.

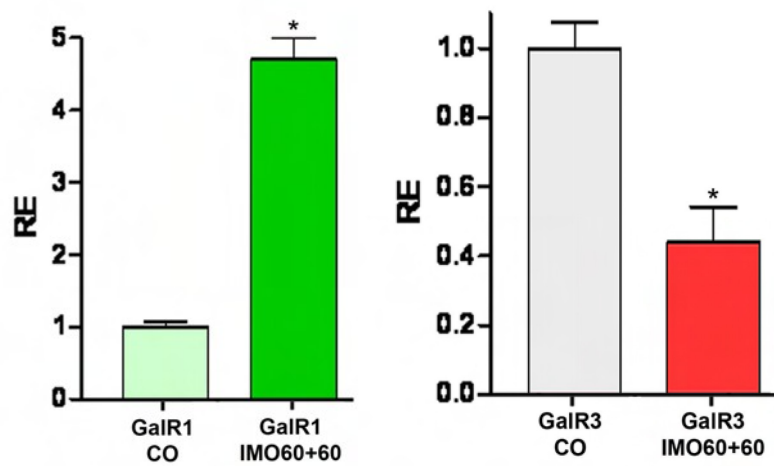
Expresi mRNA GalR1, GalR2 a GalR3 za bazálních podmínek jsme stanovili pomocí metody RT PCR. Po odečtení hodnot CT genů od hodnot CT referenčního genu beta-aktinu jsme zjistili, že exprese GalR2 byla významně vyšší než exprese GalR1 a GalR3, viz obrázek 17.

Pro větší srozumitelnost jsme uvedli výsledné hodnoty exprese receptoru GalR1 a GalR3 z grafu na obrázku 17 v jiném měřítku, viz obrázek 18.



Obr. 17. Srovnání exprese mRNA glaninových receptorových subtypů GalR1, GalR2 a GalR3 v adenohipofýze potkana.

Výsledky kontrolní skupiny (modře) a skupiny s aplikací akutního stresu (oranžově). Data jsou prezentována jako relativní exprese ($\times 100$) \pm SEM.



Obr. 18. Srovnání změn exprese mRNA glaninergních receptorových subtypů GalR1 (zelená barva) a GalR3 (červená barva) po aplikaci stresu v adenohipofýze potkana.

4.2.3 Exprese galaninergního systému po aplikaci stresu

V další části pokusů jsme určovali expresi obou neuropeptidů galaninu a galanin like-peptidu a všech tří receptorových galaninových subtypů i jejich mRNA po aplikaci stresu (viz metody). Sledovali jsme účinek akutního stresu na jednotlivé subtypy galaninergních receptorů.

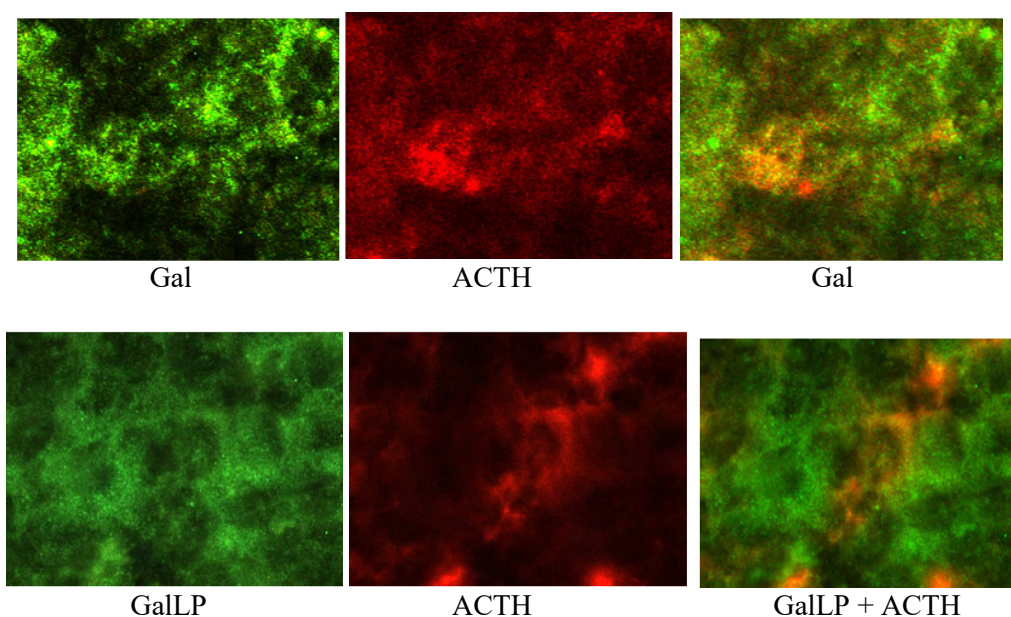
Výsledky na obrázku 17 a 18 demonstrují, že akutní stres nevyvolal žádné změny v expresi GalR2. Výpočty relativní exprese poukazují na zvýšenou expresi GalR1 a sníženou expresi GalR3, obě byly statisticky významné. Exprese GalR2 mnohonásobně převyšuje expresi GalR1 a GalR3, viz obrázek 18, což je v souladu i s výsledky exprese peptidů *de novo*.

U exprese mRNA GalR2, která mnohonásobně převyšuje expresi mRNA GalR1 a mRNA GalR3 (Obr. 17), po aplikaci stresu nedochází k signifikantní změně na rozdíl od GalR1 a GalR3, kde byla relativní exprese stresem ovlivněna.

4.2.4 Kolokalizace galaninergního systému a ACTH v adenohipofýze

Pro ověření naší hypotézy, že může být galanin a galanin-like peptid zapojený v modulaci uvolňování adenohipofyzárních hormonů, především ACTH, jsme v této fázi experimentů imunofluorescenční metodou určili kolokalizaci těchto peptidů, viz obrázek 19.

4.2.4.1 Kolokalizace galaninu a galanin-like peptidu v adenohipofýze s ACTH



Obr. 19. Kolokalizace galaninu a galanin-like peptidu s ACTH.

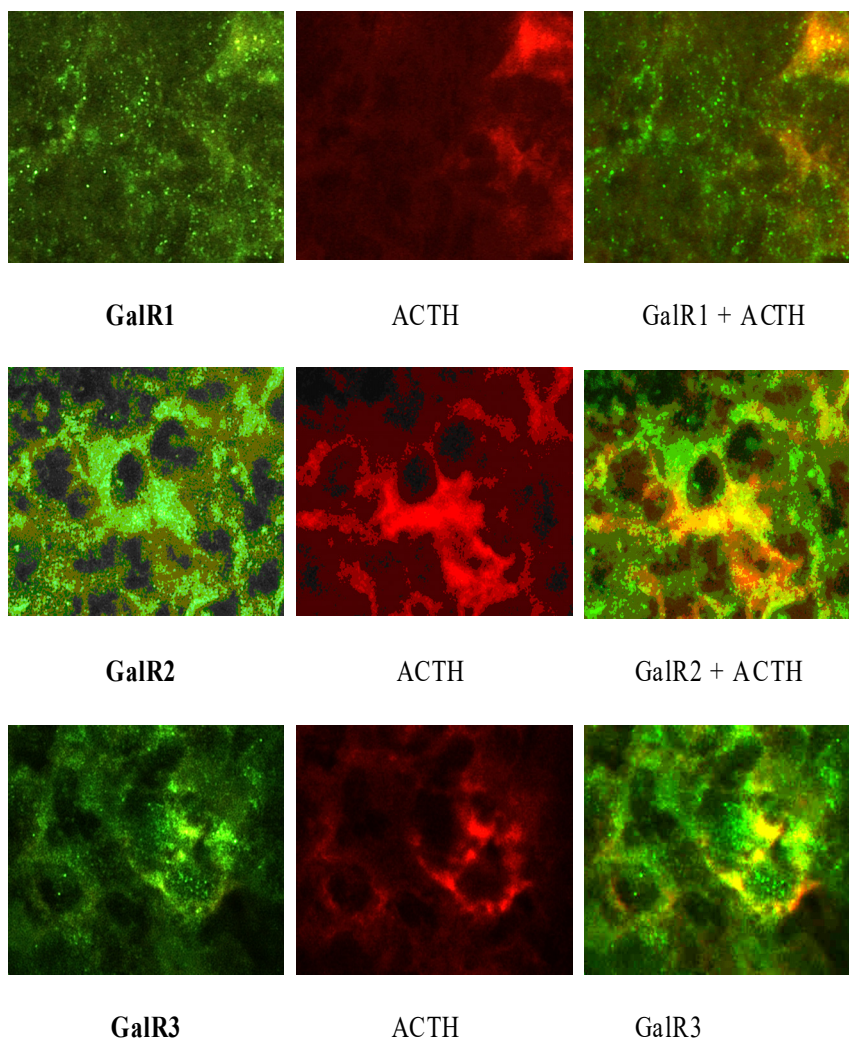
Na obrázku je zeleně označený galanin a galanin-like peptid, červeně je označené ACTH. Po sloučení zelené a červené barvy vznikne oranžová až žlutá barva, která značí místa, kde došlo k překryvu zeleného a červeného signálu, tzv kolokalizaci.

Tyto výsledky prokázaly kolokalizaci galaninu a galanin-like peptidu s adrenokortikotropním hormonem. Zatímco galanin je s ACTH kolokalizován ve velké míře, kolokalizace ACTH s galanin-like peptidem je pouze ojedinělá. Tento výsledek naznačuje možnou účast galaninu při regulaci sekrece ACTH.

Cílem dalšího experimentu proto bylo určit expresi a kolokalizaci ACTH s jednotlivými receptorovými subtypy galaninu.

4.2.4.2 Kolokalizace galaninergních receptorových subtypů s ACTH v adenohipofýze

Výsledky uvedené na Obr. 20 prokázaly kolokalizaci galaninu a galanin like peptidu s adrenokortikotropním hormonem svědčící pro možnou účast galaninu při regulaci sekrece ACTH. Dalším experimentem proto bylo určení exprese a kolokalizace ACTH s jednotlivými receptorovými subtypy galaninu.



Obr. 20. Kolokalizace ACTH a GalR subtypů v adenohipofýze.

Na obrázku je demonstrována kolokalizace galaninergních receptorových subtypů s ACTH, kde zeleně jsou označeny jednotlivé galaninové receptorové subtypy a červeně ACTH. Po překryvu oranžovožlutá barva vypovídá o kolokalizaci obou peptidů.

Tyto výsledky prokázaly nejsilnější kolokalizaci ACTH s GalR2, která byla přítomna u většiny GalR2 pozitivních buněk.

GalR1 je s ACTH kolokalizován pouze ojediněle a GalR3 kolokalizuje s ACTH pouze na některých buňkách.

Tyto výsledky svědčí o účasti galaninových receptorů při sekreci ACTH v adenohipofýze potkana.

4.3 Stanovení CRH systému v hypofýze

Jak bylo uvedeno v úvodu, CRH má široký rozsah behaviorálních a fyziologických účinků a v adenohipofýze působí jako neurohormon a jako centrální mediátor odpovědi na stres. V naší předchozí práci jsme v adenohipofýze potkana kvantifikovali expresi mRNA CRH-R1, CRH-R2a-in, CRH-R2a-so a CREBu (cAMP response element-binding protein) za fyziologických podmínek a po působení akutního stresu.

Zaměřili jsme proto na určení relativní kvantifikace exprese mRNA genů těchto receptorů u kontrolních zvířat a po aplikaci akutního a chronického stresu s různou délkou expozice stresu, jak je uvedeno v metodické části.

V literatuře je věnována velká pozornost srovnání mechanismu působení jednorázového akutního stresu a mechanismu působení chronického stresu (opakovanému) u různých psychických a degenerativních poruch, deprese, Alzheimerovy choroby a dalších. Byla popsána změna řady neurotransmitterových systémů a signálních molekul. Naše výsledky prokazují, že zatímco jednorázový stres působí snížení aktivity, opakovaný stres působí snížení exprese. U CRH nebyl tento závažný problém zatím popsán, a proto jsme se této problematice věnovali.

4.3.1 Regulace genové exprese CRH receptorů a transkripčního proteinu CREB v hypofýze myši po stresu

Opakovaný stres v intervalu 30 min vedl ke snížení exprese mRNA jak u kontrolních (WT), tak u knockoutovaných KO-CRH myši, zatímco prodloužení intervalu na 120 min vedlo k vysoce signifikantnímu snížení CRH-R1 mRNA pouze u CRH-KO myši. Naše výsledky tak svědčí o možném zapojení obou CRH receptorů v regulaci stresové odpovědi. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Testovali jsme i dopad systémové aplikace galaninu ihned po stresu. Výsledky behaviorálních studií zaměřeny na celkovou pohybovou vzdálenost a rychlost pohybu (data nejsou uvedena) naznačují, že systémová aplikace galaninu zabránila snížení lokomoce způsobené stresem (Klenerova et al., 2011a). Tento objev svědčí o pronikání galaninu přes hematoencefalickou bariéru a o

anxiolytickém působení galaninu a o jeho antistresovém účinku (Klenerova et al., 2009).

Tabulka 4. Stanovení exprese mRNA CRH-R1 a CRH-R2 po akutním a opakovaném stresu v hypofýzách wild-type (WT) a knock-out (KO) myši.

Stress	Samples	Expression of mRNA CRHR, $2^{-\Delta\Delta CT}$			WT vs WT CRHR1 co	KO vs KO CRHR1 co	KO vs WT CRHR1 co	WT vs KO	
		Recept.	WT	Knock-out					
	Control	CRH R1	0,976	1,117	100,0	100,0	114,4 ↑	114,4 ↑	
		CRH R2	1,076	1,07	110,2	95,8	109,6	99,4	
	IMO 7x	30 min	CRH R1	0,8215	0,194	84,2 ↓	17,4 ↓↓	19,9 ↓↓	23,6 ↓↓
		CRH R2	0,945	0,877	96,8	78,5 ↓	89,9	92,8	
	120 min	CRH R1	0,843	0,217	86,4 ↓	19,4 ↓↓	22,2 ↓↓	25,7 ↓↓	
		CRH R2	1,635	0,866	167,5 ↑↑	77,5 ↓	88,7 ↓	53,0 ↓↓	

Stress	Samples	Expression of mRNA CRHR, $2^{-\Delta\Delta CT}$			WT vs WT CRHR1 co	KO vs KO CRHR1 co	KO vs WT CRHR1 co	WT vs KO	
		Recept.	WT	Knock-out					
	Control	CRH R1	0,976	1,117	100,0	100,0	114,4 ↑	114,4 ↑	
		CRH R2	1,076	1,07	110,2	95,8	109,6	99,4	
	IMO 1x	30 min	CRH R1	0,977	1,129	100,1	101,1	115,7	115,6 ↑
		CRH R2	0,731	0,901	74,9 ↓	80,7	92,3	123,3 ↑	
	120 min	CRH R1	0,44	1,064	45,1 ↓↓	95,3	109,0	241,8 ↑↑↑	
		CRH R2	0,435	0,632	44,6 ↓↓	56,6 ↓↓	64,8 ↓↓	145,3 ↑↑	

V tabulce jsou shrnuty hodnoty exprese mRNA u kontrolních skupin zvířat, a skupin, kterým jsme aplikovali akutní (IMO 1x) a opakovaný imobilizační stres (IMO 7x) v intervalech 30 a 120 min.

V tabulce jsou hodnoty stanovené exprese CRH-R1 mRNA, a CRH-R2 mRNA.

Jako 100% byla zvolena kontrola CRH-R1. Expres mRNA byla stanovena metodou Real Time qPCR a výsledky jsou vyjádřeny jako relativní exprese, která byla počítána pomocí $2^{-\Delta\Delta CT}$, jak je popsáno v metodické části disertace.

Naše výsledky prokázaly, že expozice různých typů stresu mají rozdílné účinky jak na expresi obou subtypů CRH receptorů, tak na expresi CREB. Jako první jsme v adenohipofýze popsali expresi CREB za bazálních podmínek a po působení stresu. Zapojení CREB v regulaci genové exprese CRH systému a jeho účast v dalších funkcích nervového systému je důležitý cíl pro terapeutický účinek antidepressivních léčiv.

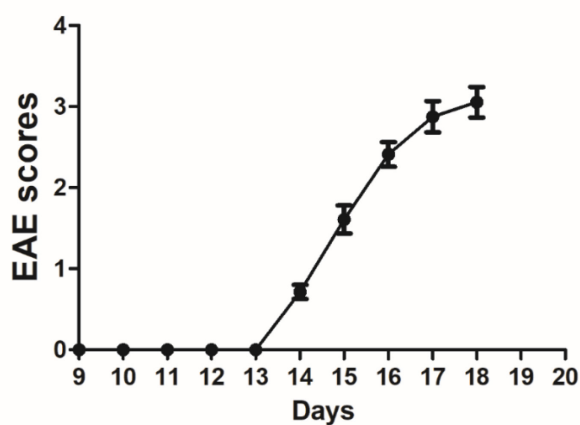
Opakovaný stres v intervalu 30 min vedl ke snížení exprese mRNA jak u kontrolních WT, tak u knockoutovaných CRH-KO myší, zatímco prodloužení intervalu na 120 min vedlo k vysoce signifikantnímu snížení CRH-R1 mRNA pouze u CRH-KO myší. Naše výsledky tak svědčí o možném zapojení obou CRH receptorů v regulaci stresové odpovědi.

4.4 Stanovení galaninergního systému u modelu EAE

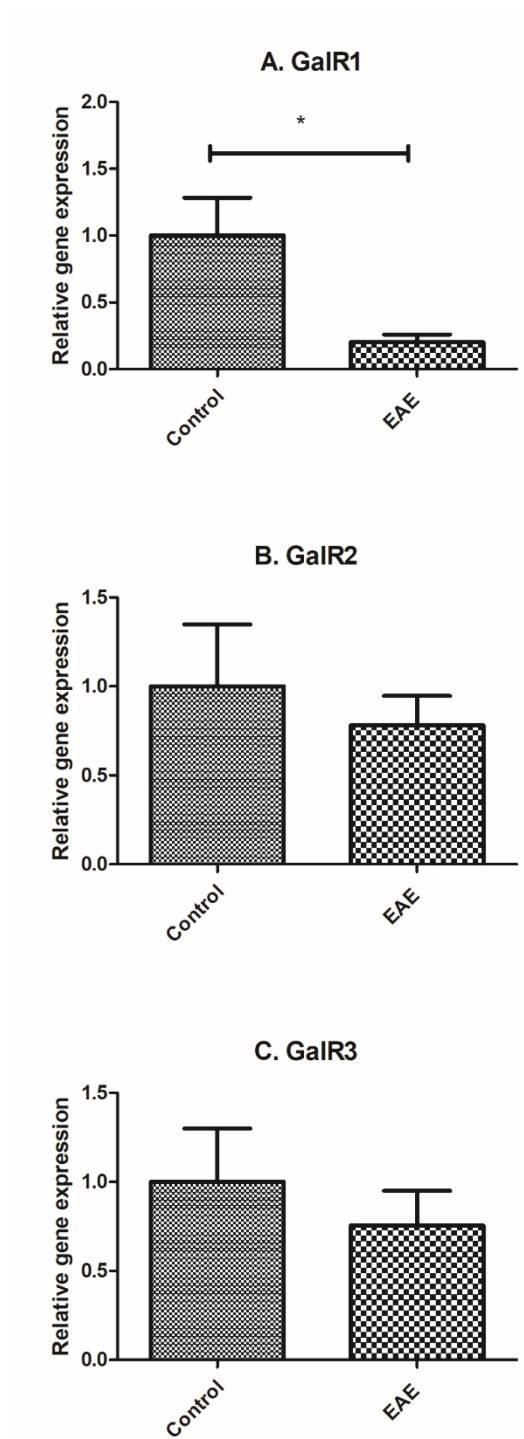
V poslední části práce jsme stanovovali expresi galaninových receptorů (GalR1, GalR2, GalR3) v míše u myšího modelu roztroušené sklerózy, EAE pomocí analýzy RT PCR a stanovení buněčné lokalizace GalR1 (v oligodendrocytech, mikroglíích, astrocytech, ependymálních buňkách a endotelových buňkách v kapilárách) imunohistochemicky. K ověření stupně neuroinflamace byla provedena histologická analýza.

4.4.1 Genová exprese

Pátý den po indukci EAE, na vrcholu onemocnění (závažnost onemocnění měřená skóre EAE byla $3,27 \pm 1,20$), byla hladina mRNA GalR1 významně snížena u myší s EAE ve srovnání s kontrolami ($p = 0,016$), viz obrázek 21. Hladiny mRNA GalR2 a GalR3 se však mezi EAE a kontrolními myšmi významně nelišily. Nebyly nalezeny žádné významné korelace mezi závažností onemocnění a hladinou mRNA GalR1 ($r = -0,391$, $p = 0,083$), hladinou mRNA GalR2 ($r = 0,127$, $p = 0,01$) a hladinou mRNA GalR3 ($r = 0,408$, $p = 0,074$). Výsledky jsou uvedeny na obrázku 22.



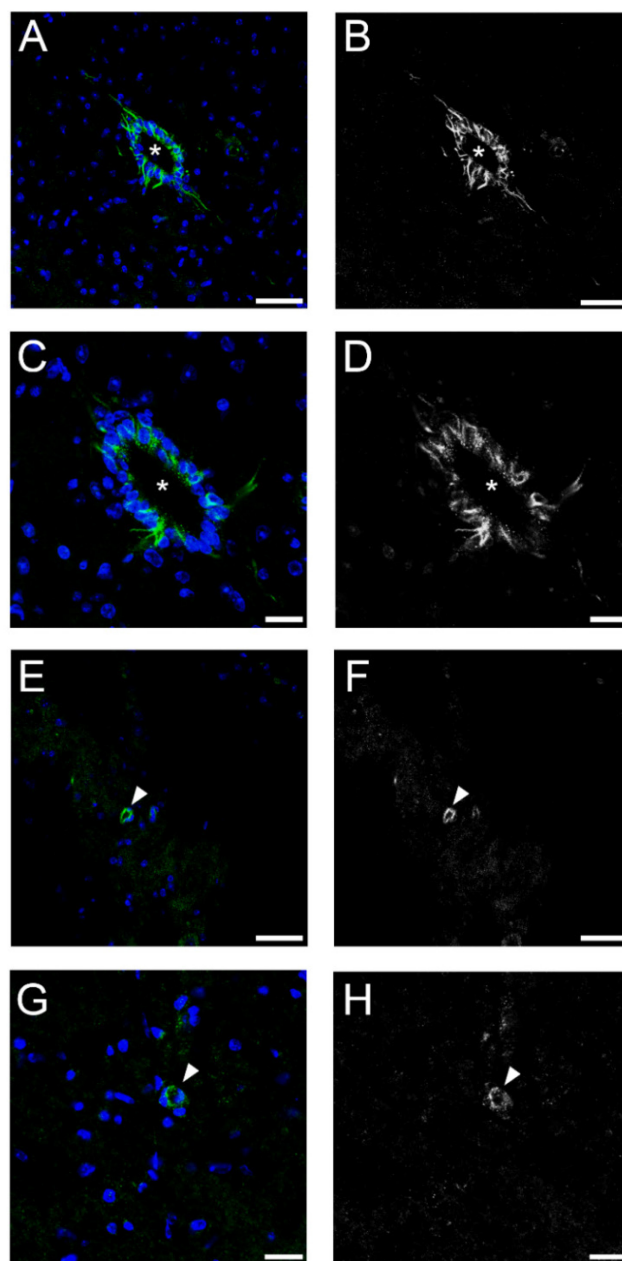
Obr. 21. Vývoj skóre EAE v experimentální skupině.



Obr. 22. Expres galaninových receptorů v míše u kontrolních a experimentálních myši s autoimunitní encefalomyelitidou (EAE). Relativní genová exprese: A – GalR1; B - GalR2; C - GalR3. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SD (n = 12 vzorků v EAE a 14 vzorků v kontrolní skupině), * p < 0,05.

4.4.2 Imunohistochemie

Imunohistochemická detekce GalR1 odhalila jeho expresi v míše myši s EAE, stejně jako u zdravých kontrolních zvířat. Nejsilnější imunoreaktivita byla pozorována u ependymálních buněk lemujících centrální kanál míchy (obr. 23A). Endoteliální buňky v kapilárách byly také imunoreaktivní k GalR1 (obr. 23B). Slabá imunoreaktivita k GalR1 byla příležitostně detekována v některých oligodendrocytech. Intenzita imunoreaktivity GalR1 byla srovnatelná mezi vzorky u myši s EAE a u kontrolních myši.

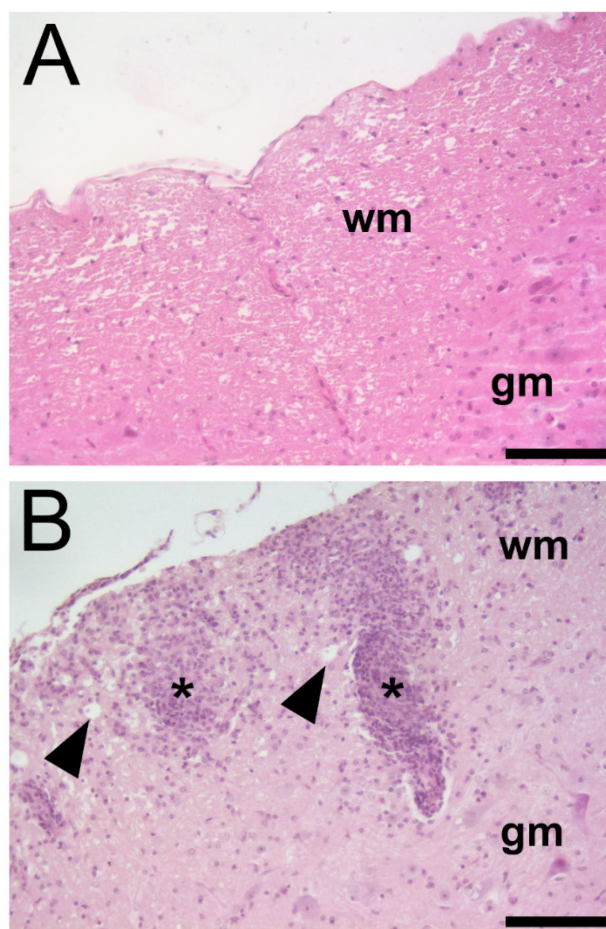


Obr.23. Imunohistochemická detekce GalR1 v míše.

Intenzita imunoreaktivity GalR1 byla srovnatelná u vzorků myši s EAE a kontrolních myši. Konfokální snímky zobrazující výsledky imunofluorescenčního značení GalR1 v míše myši s EAE (A, B, G, H) a zdravých kontrolních myši (C-F). (A, C) GalR1 je exprimován v endymálních buňkách (zeleně) kolem centrálního kanálu míchy (*). Jádra jsou obarvena DAPI (modře). (B, D) Jeden kanál z (A, C) odpovídající imunoreaktivitě GalR1. (E, G) GalR1 (zeleně) je exprimován v endotelu kapilár v míše (hrot šipky). Jádra jsou obarvena DAPI (modře). (F, H) Jeden kanál z (E, G) ukazující expresi GalR1. Měřítka v A, B, E, F = 50 μm ; v C, D, G, H = 20 μm .

4.4.3 Histologie

K ověření stupně neurozánětlivosti byla provedena histologická analýza pomocí tkáňových řezů připravených z kontrolní i EAE skupiny (obr. 24). Barvení hematoxylin-eosinem bylo použito ke stanovení rozsahu infiltrace mononukleárních buněk a perivaskulární manžety v míše. V souladu s klinickými výsledky kontrolní skupina vykazovala masivní infiltraci mononukleárních buněk do míchy s více ložisky zánětu (skóre zánětu bylo $2,67 \pm 0,33$).



Obr. 24. Morfologie míchy u zvířat s EAE.

A. Obrázek bílé hmoty míchy od zvířete s EAE. Jsou viditelná dvě zánětlivá ložiska (hvězdička) společně s vícero oteklými axony (vrcholy šipek).

B. Obrázek bílé hmoty míchy od kontrolního zdravého zvířete. Struktura míchy je dobře zachovaná a není přítomna žádná zánětlivá infiltrace.

Barvení hematoxylin-eosinem. Měřítka v A-B = 50 μ m.

5 DISKUZE

Disertační práce se věnuje galaninergnímu a CRH systému v CNS zejména v adenohipofýze, která tvoří hlavní část HPA osy a hraje zásadní roli v stresové odpovědi. Tortorella se své práci zjistila, že galanin má důležitou funkci v autokrinní/parakrinní funkční regulaci centrálních a periferních větví HPA osy (Tortorella et al., 2007). Mechanismus regulace adenohipofýzy je poměrně komplexní, a je obecně známo, že adenohipofýza je regulována hypothalamem přes portální systém (Raisman, 1997). Mechanismus působení galaninu nebyl dosud zcela objasněn (Liu a Ju 1998). Existuje řada důkazů, které poukazují na stimulační úlohu galaninu na centrální větev HPA osy, t.j. na uvolňování CRH a ACTH, čímž se stimuluje kůra nadledvin k sekreci glukokortikoidů (Klenerová et al., 2018). Galanin hraje důležitou roli v modulaci odpovědi HPA osy na stres (Kozlovsky et al., 2009), rovněž v patogenezi řady onemocnění, jako např. hypofyzárních adenomů (Kozlovsky et al., 2009), v patogenezi feochromocytomu (Rauch and Kofler 2010) a mnoha dalších. Ačkoli jsou galanin a jeho receptory exprimovány ve všech anatomických oblastech HPA osy, data zabývající se úlohou galaninergního systému ve fyziologii a patofyziologii HPA osy nejsou vysvětlena (Packard et al., 2016).

Řada autorů popsala distribuci galaninových receptorů v různých tkáních, detailně to uvádí publikace Watersa a Krause (Waters a Krause, 2000), ale údaje o přítomnosti mRNA galaninových receptorových subtypů v adenohipofýze zcela chybí. Přestože je známo, že některé neuropeptidy jsou zapojeny do stresové odpovědi (Klenerová et al., 2006; Klenerová et al.; 2017 Slavíková et al., 2016), úloha galaninových receptorových subtypů za stresu nebyla doposud popsána. Galanin má modulační účinek na krátkodobé a dlouhodobé změny chování u potkanů vyvolány imobilizačním stresem (Klenerová et al., 2011) a je zapojen do kontroly kardiovaskulárního systému počas stresu (Škopek et al., 2012; Šípková et al., 2017b). Přestože výzkumy zaměřené na účinky galaninu zaznamenaly v poslední době obrovský pokrok, žádná z publikací nezkoumala jeho funkce v adenohipofýze. V naší práci jsme prokázali expresi mRNA všech subtypů galaninových receptorů (GalR1, GalR2 a GalR3) za fyziologických podmínek. Zjistili jsme, že exprese mRNA GalR2 je mnohem vyšší než exprese zbylých

dvou receptorů GalR1 a GalR3. Naše experimenty s aplikací stresu vedou k závěru, že zatímco akutní stres nevyvolal žádné změny v expresi GalR2, exprese GalR1 se naopak zvýšila a exprese GalR3 se snížila.

Vzhledem k výše uvedeným výsledkům exprese galaninergních receptorů musíme vyvrátit dosavadní tvrzení, že buněčná signální kaskáda galaninergních receptorů se liší (Šípková et al., 2017a). Všechny tři galaninové receptory patří do velké rodiny receptorů spřažených s G-proteiny, ale stimulace GalR1 aktivuje adenylátcyklázu s Gal α inhibičním proteinem, stimulace GalR2 aktivuje fosfolipázu C a nakonec stimulace GalR3 aktivuje dráhu spřaženou s Gi/0 proteinem (Lang et al., 2007). V adenohipofýze je syntetizována řada hypofyzárních hormonů, které mohou mít funkční souvislost s galaninem, zejména syntéza ACTH. Podrobnější zkoumání kolokalizace galaninu a galaninových receptorových subtypů s ACTH by usnadnilo rozklíčování úlohy galaninu za působení různých typů stresu. V našich předběžných pokusech na tkáňových řezech adenohipofýzy jsme zkoumali kolokalizaci ACTH s galaninergním systémem. Zjistili jsme kolokalizaci ACTH s GalR2, přičemž GalR1 je kolokalizován jenom ojedinele a GalR3 je kolokalizován jenom v některých buňkách. Tyto výsledky svědčí o účasti galaninergních receptorů při sekreci ACTH v adenohipofýze potkana.

Výsledky naší studie lze shrnout tak, že biologická aktivita signalizace galaninu je velmi komplexní a hraje důležitou roli v několika důležitých procesech včetně akutního stresu. Galaninové receptorové subtypy GalR1, GalR2, a GalR3 se pravděpodobně účastní pochodů souvisejících s galaninem, proto jsme se zaměřili na stanovení relativní exprese těchto receptorů ve tkáních citlivých na galanin, včetně adenohipofýzy. Vzhledem k tomu, že byla vyslovena hypotéza, že komponenty galaninergního systému mohou sloužit jako terpaeutické cíle farmakologické léčby řady onemocnění, představuje galaninergní systém v adenohipofýze velmi aktuální téma, které si zaslouží další pozornost.

V druhé části práce bylo analyzováno zapojení CRH receptorů v hypofýze myši v reakci na akutní a opakovaný imobilizační stres. Použili jsme samce myši s deficitem CRH (CRH-KO), které mají výrazně sníženou HPA aktivitu. Literatura uvádí, že Kvetňanského skupina testovala možnou souvislost mezi CRH a fosforylací tau proteinu s využitím CRH-KO myši, u kterých byla použita

imobilizace jako induktor HPA osy (Filipčík et al., 2012), (Kvetňanský et al., 2008). CRH-KO myši vykazovaly změny v aktivitě HPA osy a odhalily zhoršené reakce stres a postrádaly normální denní reakce na glukokortikoidní rytmus. Vzhledem k tomu, že uvolňování ACTH v reakci na CRH je u CRH-KO myši normální, tyto údaje naznačují, že CRH je nezbytný pro odpověď hypofýzy a nadledvin na stres způsoben omezením pohybu.

Cílem práce bylo zjistit odpověď na otázku: "Jak by nedostatek CRH ovlivnil genovou expresi CRH receptorů v hypofýze kontrolních myši a myši, kterým aplikován stres". Naše výsledky ukázaly vliv akutního stresu na expresi genů CRH receptorů. Akutní stres v intervalu 120 min u myši WT vyvolal velmi výrazný pokles (na 48 %) exprese CRH-R1 mRNA po stresu ve srovnání s mRNA u CRH-KO myši, u nichž byla exprese bez odezvy. Exprese CRH-R2 po akutním stresu (120 min) odhalila velmi výrazný pokles u myši WT, ale ve skupině CRH-KO byl pokles nevýznamný.

Vystavení opakovanému stresu odhalilo velmi zajímavé výsledky v expresi obou receptorů. Opakovaný stres nezpůsobil žádné změny exprese CRH-R1 u myši WT, ale vyvolal velmi výrazný pokles exprese CRH-R1 u CRH-KO myši u obou intervalů stresu. Exprese mRNA receptorů CRH-R2 se velmi významně zvýšila u myši WT po opakovaném 120minutovém stresovém intervalu a u myši CRH-KO neodhalila žádné změny. Tyto výsledky by mohly naznačovat možnost odlišné regulace CRH receptorů u akutního a opakovaného chronického stresu v hypofýze.

CRH receptory jsou spřaženy s G-proteiny a využívají druhého posla cyklický adenosin-3,5-monofosfát k přenosu intracelulárních signálů v CRH neuronech. CRH může snižovat expresi mRNA CRH-R1 v hypofýze a hypothalamu. T. Suda se svým japonským týmem vyslovil hypotézu, že "CREB může zprostředkovávat přinejmenším část tohoto inhibičního účinku a může se podílet na signálech exprese genů CRH vyvolaných stresem" (Itoi et al., 1996; Kasagi et al., 2002). Nedávné studie naznačují, že CREB je nezbytný, ale nikoliv dostačující, pro aktivaci transkripce CRH, což naznačuje důležitost transkripčních koaktivátorů regulovaných cAMP (Liu et al. 2010). Tyto faktory by mohly potlačit transkripci CRH a sloužit jako ochranný mechanismus pro nadměrnou expresi CRH (Aguilera a Liu, 2012). Další zdroj uvádí, že CRH-R1 a CRH-R2

vyvolává fosforylaci transkripčního faktoru CREB a naznačuje přímou souvislost mezi aktivací G-spřažených membránových receptorů s expresí genů zprostředkovanou CREB. (Kishimoto et al. 2000). Vysvětlení našich výsledků týkajících se vlivu akutního stresu a opakovaného stresu na expresi mRNA faktoru CREB z tohoto hlediska není jednoduché a vyžaduje si další studium. Tato práce zkoumala účinek stresorů v hypofýze a popsala kvantitativní rozdíly v expresi hypofyzárních CRH receptorů u CRH-KO myši po akutním a opakovaném stresu. Zjistili jsme velmi významné rozdíly v expresi mRNA CRH receptorů mezi účinkem jednorázového (IMO 1×) a opakovaného stresu (IMO 7×) u WT i CRH-KO myši a velmi výrazný pokles mRNA CRH-R1 u CRH KO myši po opakovaném stresu. Naše výsledky naznačují, že oba CRH receptory se mohou podílet na regulaci stresové odpovědi v hypofýze myši. Zjistili jsme rozdíl v expresi CREB mRNA mezi skupinami WT a CRH-KO myši a předpokládáme, že CREB se podílí na reakcích na akutní a opakovaný stres v hypofýze. Regulace reakce na stres by mohla být lépe pochopena, kdyby bylo více poznatků o mechanismech transdukce signálu z CRH receptorů a zapojení systému CREB. Třetí část práce si kladla za cíl posoudit expresi galaninových receptorů v míše myši v modelu EAE a stanovení distribuce GalR1 v gliových buňkách. Do experimentu jsme vybrali míchu z toho důvodu, že se jedná o nejvíce postiženou část CNS v modelu EAE, kde je zánět omezen především na míchu (Lassmann a Bradl, 2017).

Hladina mRNA GalR1 byla významně snížena u myši s EAE ve srovnání se zdravými kontrolami, zatímco hladina mRNA ostatních galaninových receptorů nebyla změněna po indukci EAE. Imunohistochemická detekce GalR1 odhalila jeho expresi v ependymálních a endotelových buňkách. Navíc v některých oligodendrocytech byla ojediněle detekována slabá imunoreaktivita ke GalR1.

Jak bylo popsáno výše, galaninové funkce jsou zprostředkovány přes 3 galaninové receptory (GalR1, GalR2, GalR3), které mají podstatné rozdíly v jejich funkční vazbě na G-regulační proteiny. V této části jsme zjistili pokles hladin GalR1 mRNA u myši s EAE a žádné změny v expresi GalR2. Literatura uvádí, že u modelu roztroušené sklerózy indukované kuprizonem byla zvýšena exprese GalR1 během demyelinizace a GalR2 během remyelinizace (Zhang et al., 2012). Příčin těchto nesrovnalostí může být několik. Za prvé, existují významné patofyziologické rozdíly mezi RS indukovanou kuprizonem a modelem EAE.

Tyto dva modely mohou být použity pro různé účely. Odrážejí různé aspekty patofyziologie RS. Model EAE je vhodný k napodobování autoimunitního původu RS, zatímco model indukovaný kuprizonem se využívá pro studium základů reakcí a interakcí mezi gliovými buňkami během demyelinizace a remyelinizace, zbaveno procesů souvisejících s imunitou (Gudi et al., 2014). Někteří vědci však vznesli pochybnosti o relevanci kuprizonového modelu RS, vzhledem k tomu, že indukce CNS lézí není imunitně zprostředkovaná a je zcela odlišná od lézí v RS (Gudi et al., 2014). Dále demyelinizace v modelu indukovaném kuprizonem se vyskytuje pouze v mozku myši (nejvíce postižená oblast v tomto modelu je kaudální segment corpus callosum (CC)) a ne v míše (Zhan et al., 2020). V našich pokusech jsme zkoumali expresi GalR3 ve vzorcích míchy v modelu EAE, jelikož výsledky publikací ukazují, že GalR3 je specificky zapojen do modulace imunitní odpovědi. Delece GalR3 v experimentálních modelech autoimunitních onemocnění, jako je artritida, psoriáza, pankreatitida, a kolitida zhoršila závažnost onemocnění (Barreto et al., 2011), (Brunner et al., 2021). Na rozdíl od naší hypotézy jsme nenašli žádné rozdíly v expresi GalR3 mezi EAE a kontrolními myšemi, proto jsme došli k závěru, že GalR3 není zapojený do patofyziologie EAE.

Toto je první studie, která popisuje distribuci GalR1 v gliových buňkách v modelu EAE, protože dřívější studie *in vivo* zkoumaly pouze buněčnou expresi galaninu. Dříve bylo zjištěno, že galanin je v RS lézích výrazně zvýšený, včetně stínových plaků v mozkových tkáních *post mortem* pacientů trpících chronickou RS výhradně v mikroglíích, i když ne všechny mikroglie byly pozitivní na galanin (Wraith et al., 2009). Stejní autoři uvedli, že galanin byl up-regulován v míše myši s EAE, ale zde výhradně v oligodendrocytech. V naší práci jsme zjistili, že GalR1 je exprimován v endydymálních buňkách lemujících centrální kanál míchy a v endoteliálních buňkách kapilár, se sporadickou imunoreaktivitou v oligodendrocytech míchy. Stejně výsledky jsme pozorovali jak ve skupině s EAE, tak ve zdravé kontrolní skupině. Naše práce přinesla zajímavé výsledky, zvláště když vezmeme v úvahu, že endydymální a endoteliální buňky jsou v patogenezi RS do značné míry podhodnoceny (Hatrock et al., 2020), (Yun et al., 2017).

Ependymální buňky jsou řasinkové epiteliální buňky, které lemují celý ventrikulární povrch CNS, včetně centrálního kanálu míchy (Del Bigio, 2010).

Tyto buňky produkují mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid, CSF); navíc představují imunologickou bariéru mezi CSF a CNS a také kontrolují obousměrný oběh a metabolismus různých molekul v CSF (Hatrock et al., 2020), (Del Bigio, 2010). Ependymální buňky jsou citlivé na mediátory zánětu; jejich poškození může případně vést ke zhoršené eliminaci buněčného odpadu, což může mít za následek akumulaci škodlivých a toxických faktorů pro CNS (Hatrock et al., 2020). Podle našich znalostí je naše studie první, která detekovala imunoreaktivitu GalR1 v ependymálních buňkách; potenciální role galaninu v regulaci ependymálních buněk nebyla dosud identifikována.

Receptory GalR1 byly dříve detekovány v endoteliálních buňkách v oku (Kaser-Eichberger et al., 2017), (Schrödl et al., 2015) a obecně bylo známo, že galanin hraje roli v procesu angiogeneze (Yamamoto et al., 2013), (Yamamoto et al., 2011). Souběžně se stimulací angiogeneze byla pozorována během granulace kožní tkáně upregulace GalR1 a GalR2 v pericytech (Yamamoto et al., 2011). Role angiogeneze v patofyziologii RS není zcela jasná. Nedávný výzkum ukazuje, že angiogeneze hraje negativní roli v patologii RS a EAE. Angiogenní faktory mohou způsobit poškození cévní bazální membrány, narušit hematoencefalickou bariéru a spustit infiltraci imunitních buněk do CNS (Rigau et al., 2007), (Roscoe et al., 2009). Podle literatury vedla farmakologická inhibice angiogeneze u myši s EAE ke zlepšení klinického skóre, což podporuje hypotézu ohledně škodlivosti angiogeneze v EAE (MacMillan et al., 2014), (Roscoe et al., 2009), (MacMillan et al., 2012). Na základě výsledků této studie tedy můžeme předpokládat, že galanin může mít roli v oběhovém systému mozku (Botz et al., 2016) a při podpoře angiogeneze v EAE. V tomto případě může snížení exprese mRNA GalR1 představovat kompenzační mechanismus proti škodlivé angiogenezi. Klinické použití antagonistů GalR1 by tedy mohlo potenciálně mít příznivý antiangiogenní účinek. Protože je tato hypotéza vysoce spekulativní, je zapotřebí dalšího výzkumu k objasnění možné úlohy galaninu v angiogenezi u EAE a RS.

Navzdory skutečnosti, že galaninové ligandy jsou velkým příslibem jako nová terapeutika CNS, konkrétní agonisté a antagonisté galaninu stále nejsou pro klinické použití k dispozici. Doposud byly vyvinuty nebo extrahovány různé nepeptidové a peptidové ligandy z přírodních zdrojů (např. antifungální metabolit Sch202596 pocházející z *Aspergillus sp.*) (Min et al., 1997). Žádná z těchto látek

však nevykázala příznivý farmakologický profil z hlediska metabolické stability, vysokého afinity k receptoru a z hlediska selektivity, stejně jako schopnost překonat hematoencefalickou bariéru (Freimann et al., 2015).

6 ZÁVĚRY

Zavedli jsme metodu Western blot s turbo blotovacím zařízením, využívající detekční technologii Stain-free, pomocí které lze kvantifikovat i velmi malé množství proteinu, a tak stanovit přítomnost galaniner-gních receptorů v adenohipofýze a míše a CRH receptorů v hypofýze. Metoda je založena na speciálním gelu, který emituje pod UV zářením fluorescenční signál, ten lze kvantifikovat za použití dokumentačního systému ChemiDoc MP a softwaru Image Lab. Tato metoda rovněž umožnila otestovat specifitu primárních protilátek.

Imunofluorescenční metodou jsme stanovili expresi galaninu, galanin-like peptidu a tří galaninových receptorových subtypů a ACTH. Stanovili jsme imunofluorescenčně značený galanin, galanin like-peptid a všechny tři podtypy galaninových v adenohipofýze za bazálních podmínek a po aplikaci stresu.

Určili jsme expresi všech testovaných galaniner-gníchch peptidů a CRH-R1 a CRH-R2 receptorů také metodou RT PCR. Zjistili jsme, že exprese mRNA GalR2 za bazálních podmínek je mnohem vyšší než exprese mRNA GalR1 a GalR3. Akutní stres nevyvolal žádné změny v expresi GalR2, zatímco exprese receptoru GalR1 se naopak zvýšila a exprese receptoru GalR3 se snížila. Různé typy stresu vedly ke změně exprese CRH receptorů.

V adenohipofýze jsme dále sledovali kolokalizaci Gal a GalLP s ACTH. Nalezli jsme kolokalizaci galaninu s ACTH, zatímco kolokalizace ACTH s galanin-like peptidem je pouze ojedinělá. Určili jsme také kolokalizaci ACTH s galaninovými receptory. Tyto výsledky potvrzují zapojení galaniner-gního systému v adenohipofýze při sekreci ACTH.

V naší studii zkoumající aktivitu HPA osy v hypofýze u akutního (jednorázového) a chronického (opakovaného) stresu jsme demonstrovali rozdíly v odpovědi na úrovni CRH, především rozdíly v expresi mRNA obou CRH receptorů. CRH knockoutované myši vykazují zvýšení exprese receptorů CRH-R2 a po aplikaci opakovaného stresu vykazují změny v závislosti na délce aplikace stresu. Naše výsledky tak svědčí o možném zapojení obou CRH receptorů v regulaci stresové odpovědi.

V části věnované expresi galaninových receptorů v míše myši v modelu EAE a stanovení distribuce GalR1 v gliových buňkách, jsme pomocí imunohistochemické analýzy odhalily expresi GalR1 v ependymálních a endotelových buňkách v míše, přičemž slabá imunoreaktivita byla detekována rovněž v oligodendrocytech. Expresie mRNA GalR1 byla snížena v míchách myši s EAE, což by mohlo představovat kompenzační mechanismus proti procesům zprostředkovaným galaninem, které mohou být škodlivé pro patofyziologii EAE. Studium genové exprese a imunohistochemické detekce galaninových receptorů v této práci však nevysvětlují mechanismy působení galaninu v patofyziologii EAE a RS. Jsou proto zapotřebí další studie zaměřeny na zkoumání role galaninu v patofyziologii EAE a RS.

Závěry plynoucí z výše popsaných výsledků lze shrnout následovně: v této disertaci jsme prokázali v adenohypofýze přítomnost galaninu, galanin-like peptidu a všech tří subtypů receptorů galaninu a CRH a jeho receptorů v hypofýze za fyziologických podmínek i po aplikaci stresu. Prokázali jsme jako první v literatuře zapojení galaninergního a CRH systému v adenohypofýze a hypofýze v regulaci stresu. Popsali jsme distribuci GalR1 v gliových buňkách v modelu EAE a potvrdili zapojení galaninu do patofyziologie EAE a RS.

7 Seznam vlastních prezentací

a) s impakt faktorem

Michalickova D., **Kramarikova I.**, Ozturk H.K., Kucera T., Vacik T., Hrcir T., Kutinova Canova N., Sima M., Slanar O. Detection of galanin receptors in the spinal cord in the experimental autoimmune encephalomyelitis. Biomedical papers. V tisku

Klenerová V., **Kramáriková I.**, Šída P., Šípková J., Hynie S. Kortikotropin uvolňující hormon, od chemie k ligandům a jejich možnému terapeutickému využití. Chemické listy. 112 (2), 105-111, 2018

IF: 0,311

Kramáriková I., Šípková J., Šída P., Hynie S., Klenerová V. Effect of stress on galaninergic system in the rat adenohypophysis: expression of mRNA and immunohistochemistry of galanin receptors. Folia Biol. 63(5-6): 197-201, 2017

IF: 0,939

Šípková J., **Kramáriková I.**, Hynie S., Klenerová V. The galanin and galanin receptor subtypes, its regulatory role in the biological and pathological functions. Physiol Res. 66(5): 729-740, 2017

IF: 1,461

Šípková J., Šída P., Kaspříková N., **Kramáriková I.**, Hynie S., Klenerová V. Effects of stress factors on the expression of galanin receptors in rat heart of Wistar rat. Folia Biol. 63(3): 98-104, 2017

IF: 0,939

b) bez impakt faktoru

Šída P., **Kramáriková I.**, Hynie S., Šípková J., Klenerová V. Regulace genové exprese CRH receptorů a transkripčního proteinu CREB v mozku potkana po stresu. Regulation of gene expression of CRH receptors and transcription protein CREB in rat brain after stress. Psychiatrie. 22 (S1) : 57, 2018

Klenerová V., **Kramáriková I.**, Šída P., Šípková J., Hynie S.

Expres kortikotrofin uvolňujícího hormonu v CNS potkana po působení stresu
Expression of corticotrophin releasing hormone and receptor subtypes in rat brain
after stress. Psychiatrie. 22 (S1) : 55, 2018

Šída P., **Kramáriková I.**, Hynie S., Šípková J., Klenerová V.

Regulace genové exprese CRH receptorů a transkripčního proteinu CREB v
mozku potkana po stresu. Regulation of gene expression of CRH receptors and
transcription protein CREB in rat brain after stress. Jeseník: 60. konference
ČNSP, 2018

Klenerová V., **Kramáriková I.**, Šída P., Šípková J., Hynie S.

Expres kortikotrofin uvolňujícího hormonu v CNS potkana po působení stresu
Expression of corticotrophin releasing hormone and receptor subtypes in rat brain
after stress. Jeseník: 60. konference ČNSP, 2018

Pavlačková I. Optimalizácia metódy Western blot galaninových receptorových
subtypov v srdci potkana. 15. Studentská vědecká konference 1. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Galén, 2014. s. 56. ISBN 978-80-7492-150-6

Pavlačková I. Úloha neuropeptidů při stresu a některých poruchách v CNS.

Rešeršní práce ke státní zkoušce z farmakologie a toxikologie. Univerzita Karlova
v Praze. Praha 2014

Pavlačková I. Optimalizácia metódy Western blot galaninových receptorových
subtypov v srdci potkana. Praha: přednáška na 15. Studentské vědecké konferenci
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, 2014

8 Seznam použité literatury

- Aguilera G., Nikodemova M., Wynn P.C., Catt K.J. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides*. 25: 319-329, 2004
- Aguilera G., Rabadan-Diehl C., Nikodemova M. Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides*. 22: 769-774, 2001
- Ash B.L., Djouma E. Galanin Receptors as Pharmacological Targets in the Treatment of Addiction. *J Addict Res Ther*. S4: 003, 2011
- Awad A., Sütve O. Multiple sclerosis in the elderly patient. *Drugs and Aging*. 27: 283-294, 2010
- Bai Q., Shi D., Zhang Y., Liu H., Yao X. Exploration of the antagonist CP-376395 escape pathway for the corticotropin-releasing factor receptor 1 by random acceleration molecular dynamics simulations. *Mol Biosyst*. 10: 1958–1967, 2014
- Barreto S., Bazargan M., Zotti M., Hussey D., Sukocheva O., Peiris H., Leong M., Keating D., Schloithe A., Carati C. Galanin receptor 3—a potential target for acute pancreatitis therapy. *J Neurogastroenterol Motil*. 23: 141-151, 2011
- Bartova P., Walczyskova S., Plevova P. Hereditární časná forma Alzheimerovy nemoci v důsledku zárodečné mutace p.M139V v genu PSEN1 – kazuistika. *Cesk Slov Neurol N*. 107: 569-574, 2011
- Bennet W.M., Hill S.F., Ghatei M.A., Bloom S.R. Galanin in the normal human pituitary and brain and in pituitary adenomas. *J. Endocrinol*. 130: 463–467, 1991
- Berger A., Santic R., Hauser-Kronberger C., Schilling F.H, Kogner P., Ratschek M., Gamper A., Jones N., Sperl W., Kofler B. Galanin and galanin receptors in human cancers. *Neuropeptides*. 39: 353–359, 2005
- Botz B., Kemény Á., Brunner S.M., Locker F., Csepregi J., Mócsai A., Pintér E., McDougall J.J., Kofler B., Helyes Z. Lack of galanin 3 receptor aggravates murine autoimmune arthritis. *J Mol Neurosci*. 59: 260-269, 2016

- Brunner S.M., Reichmann F., Leitner J., Wölfl S., Bereswill S., Farzi A., Schneider A.-M., Klieser E., Neureiter D., Emberger M. Galanin receptor 3 attenuates inflammation and influences the gut microbiota in an experimental murine colitis model. *Sci Rep.* 11, 2021
- Bu XL, Xiang Y, Jin WS. Blood-derived amyloid- β protein induces Alzheimer's disease pathologies. *Mol Psychiatry.* 00: 1-9, 2017
- Chen Ch., Grigoriadis D.E. NBI 30775 (R121919), an orally active antagonist of the corticotropin-releasing factor (CRF) type-1 receptor for the treatment of anxiety and depression. *Drug development research.* 65: 216-226, 2005
- Chrousos G.P. The role of stress and the hypothalamic - pituitary - adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuroendocrine and target tissue-related causes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24: 50-5, 2000
- Contoreggi C., Lee M.R., Chrousos G. Addiction and corticotropin - releasing hormone type 1 receptor antagonist medications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1282: 107-118, 2013
- Dedic N., Chen A., Deussing J.M. The CRF family of neuropeptides and their receptors - mediators of the central stress response. *Curr Mol Pharmacol.* 11: 4-31, 2018
- Del Bigio M.R. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 55- 73, 2010
- Denga Q., Zhang Z., Wu Y. The Pulsatility of ACTH Secretion in the Rat Anterior Pituitary Cell Perifusion System. *Cell Physiol Biochem.* 41: 154-162, 2017
- De Souza E.B., Kuhar M.J. Corticotropin-releasing factor receptors in the pituitary gland and central nervous system: Methods and overview. *Methods in Enzymology.* 124: 560-590, 1986

- Diaz-Cabiale Z., Parrado C., Narvaez M., Millon C., Puigcerver A., Fuxe K., Narvaez J.A., Neurochemical modulation of central cardiovascular control: the integrative role of galanin. *EXS.* 102: 113-131, 2010
- Ellison G.W., Visscher B.R., Graves M.C., Fahey J.L. Multiple sclerosis. *Ann Intern Med.* 101: 514–526, 1984
- Fang P., Mei Y., Shi M., Zhang Z., Sui Y., Guo L. Galanin peptide family as a modulating target for contribution to metabolic syndrome. *General and Comparative Endocrinology.* 179: 115-120, 2012
- Fang P., Sun J., Wang X., Zhang Z., Bo P., Shi M. Galanin participates in the functional regulation of the diabetic heart. *Life Sci.* 92: 628-632, 2013
- Fang P., Yu M., Wan D., Zhang L., Han L., Shen Z., Shi M., Zhu Y., Zhang Z., Bo P. Regulatory effects of galanin system on development of several age-related chronic diseases. *Experimental Gerontology.* 95: 88-97, 2017
- Fathi, Z., Cunningham A.M., Iben L.G., Battaglino P.B., Ward S.A., Nichol K.A. et al. Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Mol Brain Res.* 51: 49–59, 1997
- Filipcik P., Novak P., Mravec B., Ondicova K., Krajciová G., Novak M., Kvetnansky R. Tau protein phosphorylation in diverse brain areas of normal and CRH deficient mice: up-regulation by stress. *Cell Mol Neurobiol.* 32: 837–845, 2012
- Freimann K., Kurrikoff K., Langel Ü. Galanin receptors as a potential target for neurological disease. *Expert Opin Ther Targets.* 19: 1665-1676, 2015
- Garcia-Rosa S., Trivella D.B., Marques V.D., Serafim R.B., Pereira J.G., Lorenzi J.C., Molfetta G.A., Christo P.P., Olival G.S., Marchitto V.B., Brum D.G., Sabedot T.S., Noushmehr H., Farias A.S., Santos L.M., Nogueira-Machado J.A., Souza J.E., Romano C.M., Conde R.M., Santos A.C., Guerreiro C.T., Schreuder W.H., Gleber-Netto F.O., Amorim M., Valieris R., Silva I.T.D., Silva W.A. Jr, Nunes D.N., Oliveira P.S., Valente V., Arruda M.A., Hill S.J., Barreira A.A.,

- Dias-Neto E. A non-functional galanin receptor-2 in a multiple sclerosis patient. *Pharmacogenomics J.* 19: 72-82, 2019
- Fernandes de Abreu D.A., Babron M.C., Rebeix I. Season of birth and not vitamin D receptor promoter polymorphisms is a risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 15: 1146–1152, 2009
- Gresle M.M., Butzkueven H., Perreau V.M., Jonas A., Xiao J., Thiem S., Holmes F.E., Doherty W., Soo P.Y., Binder M.D. Galanin is an autocrine myelin and oligodendrocyte trophic signal induced by leukemia inhibitory factor. *Glia.* 63(6): 1005-1020, 2015
- Grimm S., Wirth K., Fan Y., Weigand A., Gärtner A., Feeser M., Dziobek I., Bajbouj M., Aust S. The interaction of corticotropin-releasing hormone receptor gene and early life stress on emotional empathy. *Behavioural Brain Research.* 329: 180-185, 2017
- Gudi V., Gingele S., Skripuletz T., Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci.* 8: 73, 2014
- Habert-Ortoli E., Amiranoff B., Loquet I., Laburthe M., Mayaux J.F. Molecular cloning of a functional human galanin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 9780-9783, 1994
- Hauger R.L., Risbrough V., Brauns O., Dautzenberg F.M. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 5: 453-79, 2006
- Hatrock D, Caporicci-Dinucci N, Stratton JA. Ependymal cells and multiple sclerosis: proposing a relationship. *Neural Regen Res.* 15: 263, 2020
- Heida J.E., Minović I., van Faassen M., Kema I.P., Boertien W.E., Bakker S.J.L., van Beek A.P., Gansevoort R.T. Effect of Vasopressin on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in ADPKD Patients during V2 Receptor Antagonism. *Am J Nephrol.* 51(11): 861-870, 2020
- Hökfelt T., Tatemoto K. Galanin: a multitasking neuropeptide. *EXS.* 102: 1–5, 2010

- Hsu D.W., Hooi S.C., Hedley-Whyte E.T., Strauss R.M., Kaplan L.M.
Coexpression of galanin and adrenocorticotrophic hormone in human pituitary and pituitary adenomas. *Am. J. Pathol.* 138: 897–909, 1991
- Hynie S.: *Farmakologie v kostce*. Praha: Triton, 2008.
- Hynie S., Klenerová V. Centrální regulační úloha oxytocínu. *Psychiatrie*. 12: 4-10, 2008
- Hynie S., Dzúr-Gejdošová M., Šída P., Klenerová V. Studium neuropeptidu galaninu v neurohypofýze pomocí exprese mRNA galaninu a galaninových receptorových subtypů. *Psychiatrie*. 17: 52–53, 2013
- Inda C., Armando N.G., dos Santos Claro P.A., Silberstein S. Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocrine Connections*. 6: 99-120, 2017
- Itoi K., Horiba N., Tozawa F., Sakai Y., Sakai K., Abe K., Demura H., Suda T. Major role of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate- dependent protein kinase A pathway in corticotropin-releasing factor gene expression in the rat hypothalamus in vivo. *Endocrinology* 137:2389–2396, 1996
- Kaminsky O., Klenerová V., Stohr J., Šída P., Hynie S. Differences in the behaviour of sprague–dawley and lewis rats during repeated passive avoidance procedure: effect of amphetamine. *Pharmacological Research*. 4: 117-122, 2001
- Kaser-Eichberger A., Trost A., Strohmaier C., Bogner B., Runge C., Bruckner D., Hohberger B., Jünemann A., Kofler B., Reitsamer H.A. Distribution of the neuro-regulatory peptide galanin in the human eye. *Neuropeptides*. 64: 85-93, 2017
- Kishimoto T., Radulovic J., Radulovic M., Lin C.R., Schrick C., Hooshmand F., Hermanson O., Rosenfeld M.G., Spiess J. Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet*. 24: 415–419, 2000

Klenerova V., Flegel M., Skopek P., Sida P., Hynie S. Galanin modulating effect on restraint stress-induced short- and long-term behavioral changes in Wistar rats. *Neurosci. Letters*. 502: 147–151, 2011

Klenerová V., Krejčí I., Šída P., Hliňák Z., Hynie S. Timing of stress and testing influence the long-lasting behavioral performance in rats. *Neuroscience Letters*. 410: 100-104, 2006

Klenerová V., Hynie S. Stres, paměť a návykové látky – účastníci se mechanismy. *Psychiatrie*. 6: 21-27, 2002

Klenerová V., Hynie S. Interakce mezi nervovým, endokrinním a imunitním systémem. *Psychiatrie*. 8: 36–42, 2004

Klenerová V., Hynie S. Strukturálně funkční změny u stresu a poruch chování. *Psychiatrie*. 10: 17-22, 2006

Klenerová V., Hynie S. Existuje vztah mezi stresem, pamětí a silnými emocemi, jako jsou obavy a strach? *Československá fyziologie*. 56: 97-103, 2007

Klenerová V., Hynie S. Nové pohledy na účinky g proteinu spojeného s receptorem, význam při hledání nových léčiv. *Chemické listy*. 110: 900-908, 2016

Klenerova, V., Kaminsky, O., Sida, P., Krejci, I., Hlinak, Z., Hynie, S. Impaired passive avoidance acquisition in Sprague-Dawley and Lewis rats after restraint and cold stress. *Behav. Brain Res*. 36: 21-29, 2002

Klenerova V., Kvetnansky R., Hynie S. The effect of acute and repeated stress on CRH-R1 and CRH-R2 mRNA expression in pituitaries of wild type and CRH knock-out mice. *Cell Mol. Neurobiol*. 38: 163–169, 2018

Klenerová V., Sery O., Hynie S. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes in the rat anterior pituitary after two types of restraint stress. *Stress, Neurotransmitters, and Hormones: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1148: 415-420, 2008

Kolakowski L.F.Jr., O'Neill G.P., Howard A.D., Broussard S.R., Sullivan K.A., Feighner S.D., Sawzdargo M., Nguyen T., Kargman S., Shiao L.L., Hreniuk D.L., Tan C.P., Evans J., Abramovitz M., Chateauneuf A., Coulombe N., Ng G.,

Johnson M. P., Tharian A., Khoshbouei H., George S.R., Smith R.G., O'Dowd B.F. Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem.* 71: 2239-2251, 1998

Koob G. F., Zorrilla E. P. Update on Corticotropin-Releasing Factor Pharmacotherapy for Psychiatric Disorders: A Revisionist View. *Neuropsychopharmacology.* 37: 308–309, 2012

Kozlovsky N., Matar M., A., Kaplan Z., Zohar J., Cohen H. The Role of the Galaninergic System in Modulating Stress-Related Responses in an Animal Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Biol Psychiatry.* 65: 383–391, 2009

Kvetnansky R., Mikulaj L. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology.* 87: 738–743, 1970

Lane M., Yadav V. Multiple Sclerosis. *Textbook of natural medicine.* 2020: 1587–1599, 2020

Lang R., Gundlach A. L., Kofler B. The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol. Ther.* 115: 177–207, 2007

Lang R., Gundlach A.L., Holmes F.E., Hobson S.A., Wynick D., Hoekfelt T., Kofler B. Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacol Rev.* 67: 118-175, 2015

Lassmann H.; Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 133(2): 223-244, 2017

Lawrence A.J., Krstew E.V., Dautzenberg F.M., Rühmann A. The highly selective CRF(2) receptor antagonist K41498 binds to presynaptic CRF(2) receptors in rat brain. *Br J Pharmacol.* 136: 896–904, 2002
Lengfeld J., Cutforth T., Agalliu D. The role of angiogenesis in the pathology of multiple sclerosis. *Vasc Cell.* 6: 1-6, 2014

Liu H., Hökfelt T. The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends in Pharmacological Sciences.* 23: 468-474, 2002

Liu Z., Liu W., Yao L., Yang C., Xiao L., Wan Q., Gao K., Wang H., Zhu F., Wang G., Xiao Z. Negative life events and corticotropin-releasing-hormone receptor1 gene in recurrent major depressive disorder. *Scientific Reports*. 3: 1548, 2013

Love S. Demyelinating diseases. *Journal of Clinical Pathology*. 59: 1151–1159, 2006

Lovejoy D.A., de Lannoy L. Evolution and phylogeny of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides: Expansion and specialization in the vertebrates. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 54: 50-56, 2013

MacMillan C.J., Furlong S.J., Doucette C.D., Chen P.-L., Hoskin D.W., Easton S. Bevacizumab diminishes experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting spinal cord angiogenesis and reducing peripheral T-cell responses. *J Neuropathol Exp Neurol*. 71: 983-999, 2012

MacMillan C.J., Doucette C.D., Warford J., Furlong S.J., Hoskin D.W., Easton A.S. Murine experimental autoimmune encephalomyelitis is diminished by treatment with the angiogenesis inhibitors B20-4.1. 1 and angiostatin (K1-3). *PLoS One*. 92: 89770, 2014

Månsson K., Salami A., Frick A., Carlbring P., Andersson G., Furmark T. and Boraxbekk C.J. Neuroplasticity in response to cognitive behavior therapy for social anxiety disorder. *Transl Psychiatry*. 6: 727, 2016

Markou A., Chiamulera Ch., Geyer M., Tricklebank M., Steckler T. Removing Obstacles in Neuroscience Drug Discovery: The Future Path for Animal Models. *Neuropsychopharmacology Reviews*. 34: 74-89, 2009

Martínez V., Wang L., Rivier J.E., Vale W., Taché Y. Differential Actions of Peripheral Corticotropin-Releasing Factor (CRF), Urocortin II, and Urocortin III on Gastric Emptying and Colonic Transit in Mice: Role of CRF Receptor Subtypes 1 and 2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* May. 301: 611-617, 2002

Matouš a kolektiv: *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, 2010

- Merchenthaler I. Galanin and the neuroendocrine axes. *EXS.* 102: 71–85, 2010
- Min C., Mierzwa R., Truumees I., King A., Sapidou E., Barrabee E., Terracciano J., Patel M.G., Gullo V.P., Burrier R. A new fungal metabolite, Sch 202596, with inhibitory activity in the galanin receptor GALR1 assay. *Tetrahedron Lett.* 38: 6111-6114, 1997
- Mitrofanova L. B., Konovalov P. V., Krylova J. S., Polyakova V. O., Kvetnoy I. M. Plurihormonal cells of normal anterior pituitary: Facts and conclusions. *Oncotarget.* 8: 29282–29299, 2017
- Nytrová P., Blahová Dušánková J., Horáková D. Roztroušená skleróza - včasná diagnostika a možnosti léčby. *Farmakoterapeutická revue.* 4: 108-120, 2019
- Ohtaki T., Kumano S., Ishibashi Y., Ogi K., Matsui H., Harada M., Kitada C., Kurokawa T., Onda H., Fujino M. Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 274: 37041–37045, 1999
- Packard A. E., Egan A. E., Ulrich-Lai Y. M. HPA Axis Interactions with Behavioral Systems. *Compr. Physiol.* 6: 1897-1934, 2016
- Palacios N, Alonso A, Brønnum-Hansen H, Ascherio A. Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Ann Epidemiol* 21: 536–542, 2011
- Petrovický P. *Klinická neuroanatomie CNS.* Praha: Triton, 2008
- Perrin M.P., Vale W.W. Corticotropin Releasing Factor Receptors and Their Ligand Family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 885: 312-328, 1999
- Pfaffl M. W., Horgan G.W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: 36, 2002
- Picciotto M.R., Brabant C., Einstein E.B., Kamens H.M., Neugebauer N.M. Effects of galanin on monoaminergic systems and HPA axis: Potential

- mechanisms underlying the effects of galanin on addiction- and stress-related behaviors. *Brain Res.* 1314: 206–218, 2010
- Raisman, G. An urge to explain the incomprehensible: Geoffrey Harris and the discovery of the neural control of the pituitary gland. *Annual Review of Neuroscience.* 20: 533–566, 1997
- Rauch I., Kofler B. The galanin system in cancer. *EXS.*102: 223-41, 2010
- Rigau V., Morin M., Rousset M.-C., de Bock F., Lebrun A., Coubes P., Picot M.-C., Baldy- Moulinier M., Bockaert J., Crespel A. Angiogenesis is associated with blood–brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain.* 130: 1942-1956, 2007
- Rivier J., Rivier C., Vale W. Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science.* 4651: 889-891, 1984
- Roscoe W., Welsh M., Carter D., Karlik S. VEGF and angiogenesis in acute and chronic MOG peptide induced EAE. *J Neuroimmunol.* 209: 6-15, 2009
- Saito M., Ozaki Y., Kawasaki M., Ohnishi H., Okimoto N., Nakamura T., Ueta Y. Induction of galanin-like peptide gene expression in the arcuate nucleus of the rat after acute but not chronic inflammatory stress. *Molecular Brain Research.* 133: 233–241, 2005
- Santic R., Schmidhuber S.M., Lang R., Rauch I., Voglas E., Eberhard E., Bauer J.W., Brain S.D., Kofler B. Alarin is a vasoactive peptide. *PNAS.* 104: 10217-10222, 2007
- Schreiber A.L., Lu Y., Baynes B.B., Richardson H.N., Gilpin N.W. Corticotropin-releasing factor in ventromedial prefrontal cortex mediates avoidance of a traumatic stress-paired context. *Neuropharmacology.* 113: 323-330, 2017
- Schrödl F., Kaser-Eichberger A., Trost A., Strohmaier C., Bogner B., Runge C., Bruckner D., Motloch K., Holub B., Kofler B. Distribution of galanin receptors in the human eye. *Exp Eye Res.*138: 42-51, 2015

- Selye H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 138: 32, 1936
- Shioda S., Kageyama H., Takenoya F., Shiba K. Galanin-like peptide: a key player in the homeostatic regulation of feeding and energy metabolism? *International Journal of Obesity*. 35: 619–628, 2011
- Slavikova J., Mistrova E., Klenerova V., Kruzliak P., Caprnda M., Hynie S., Sida P., Dvorakova M. Effects of immobilizations stress with or without water immersion on the expression of atrial natriuretic peptide in the hearts of two rat strains. *Am. J. Transl. Res.* 8: 3148-3158, 2016
- Smith K.E., Walker M.W., Artymyshyn R., Bard J., Borowsky B., Tamm J.A., Yao W.J., Vaysse P.J., Branchek T.A., Gerald C., Jones K.A. Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem*. 273: 23321-23326, 1998
- Spielerling S.R., Zorrilla E.P. Don't stress about CRF: assessing the translational failures of CRF1 antagonists. *Psychopharmacology*. 234: 1467-1481, 2017
- Steckler, T., Holsboer, F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol. Psychiatry*. 46: 1480-1508, 1999
- Šípková J., Kramáriková I., Hynie S., Klenerová V. The galanin and galanin receptor subtypes, its regulatory role in the biological and pathological functions. *Physiol. Res*. 66: 729-740, 2017a
- Šípková J., Šída P., Kaspříková N., Kramáriková I., Hynie S., Klenerová V. Effect of Stress on the Expression of Galanin Receptors in Rat Heart. *Folia Biol*. 63: 98-104, 2017b
- Škopek P., Hynie S., Chottova-Dvorakova M., Sida P., Slavikova J., Mistrova E., Klenerova V. Effects of acute stressors on the expression of oxytocin receptor mRNA in hearts of rats with different activity of HPA axis. *Neuroendocrinol. Lett*. 33: 124–132, 2012
- Škopek P., Hynie S., Šída P., Klenerová V. Galanin a jeho receptorové subtypy v neurohypofýze za fyziologických podmínek a za stresu pomocí fluorescenčního zobrazení. *Psychiatrie*. 17: 53, 2013

- Taché Y., Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest.* 117: 33–40, 2007
- Tan L.A., Vaughan J.M., Perrin M.A., Rivier E., Sawchenko P.E. Distribution of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binding in the mouse brain using a new, high-affinity radioligand, [¹²⁵I]-PD-Sauvagine. *J Comp Neurol.* 525: 3840-3864, 2017
- Tortorella C., Neri G., Nussdorfer G.G. Galanin in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int. J. Mol. Med.* 19: 639-647, 2007
- Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science.* 213: 1394-1397, 1981
- Wang S., He C., Hashemi T., Bayne M. Cloning and expressional characterization of a novel galanin receptor. Identification of different pharmacophores within galanin for the three galanin receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* 272, 31949–31952, 1997
- Waters, S. M., Krause, J. E. Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience.* 95: 265-271, 2000
- Webling K.E., Runesson J., Bartfai T., Langel U. Galanin receptors and ligands. *Front. Endocrinol.* 3: 1–14, 2012
- Winsky L., Brady L.S. Athina Markou's contributions to treatment development for mental illnesses: a perspective. *Psychopharmacology.* 234: 1645-1647, 2017
- Wraith D.C., Pope R., Butzkueven H., Holder H., Vanderplank P., Lowrey P., Day M.J., Gundlach A.L., Kilpatrick T.J., Scolding N. A role for galanin in human and experimental inflammatory demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 15466-15471, 2009
- Wynn P.C., Aguilera G., Morell J., Catt K.J. Properties and regulation of high-affinity pituitary receptors for corticotropin-releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 110: 602-608, 1983

Yamamoto H., Arai T., Ben S., Iguchi K., Hoshino M. Expression of galanin and galanin receptor mRNA in skin during the formation of granulation tissue.

Endocrine. 40: 400-407, 2011

Yamamoto H., Okada R., Iguchi K., Ohno S., Yokogawa T., Nishikawa K., Unno K., Hoshino M., Takeda A. Involvement of plasmin-mediated extracellular activation of progalanin in angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 430: 999-1004, 2013

Yamashita M., Ukibe K., Matsubara Y., Hosoya T., Sakai F., Kon S., Arima Y., Murakami M., Nakagawa H., Miyazaki T. Lactobacillus helveticus SBT2171 Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. Front Microbiol. 8: 2596, 2017

Yaribeygi H., Panahi Y., Sahraei H., Johnston T.P., Sahebkar A. The impact of stress on body function: A review. EXCLI J. 16: 1057-1072, 2017

Yun J.W., Minagar A., Alexander J.S. Emerging roles of endothelial cells in multiple sclerosis pathophysiology and therapy. In: Inflammatory Disorders of the Nervous System: Pathogenesis, Immunology, and Clinical Management. edn. Edited by Minagar A., Alexander J.S. Cham: Springer International Publishing. 1-23, 2017

Zaretsky D. V., Zaretskaia M. V., Sarkar S., Rusyniak D. E., DiMicco J. A. The non-peptide CRH1-antagonist CP-154,526 elicits a paradoxical route-dependent activation of the HPA axis. Neuroscience Letters. 653: 1-66, 2017

Zhan J., Mann T., Joost S., Behrangi N., Frank M., Kipp M. The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. Cells. 9, 2020

Zhang L., Yu W., Schroedter I., Kong J., Vrontakis M. Galanin transgenic mice with elevated circulating galanin levels alleviate demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model. PLoS One. 7: 33901, 2012

Zorrilla E.P., Koob G.P. Progress in corticotropin-releasing factor-1 antagonist development. Drug Discovery Today. 15: 371-383, 2010

Zoumakis E., Rice K.C., Gold P.W., Chrousos G.P. Potential uses of corticotropin-releasing hormone antagonists. *Ann N Y Acad Sci.* 1083: 239-51, 2006