

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

ÚLOHA NEUROPEPTIDŮ PŘI STRESU A A PATOFYZIOLOGII EAE

Autoreferát disertační práce

Mgr. Ivana Kramáriková

Praha, 2022

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: **Farmakologie a toxikologie**

Předseda oborové rady: **Prof. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.**

Školící pracoviště: **Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN, Albertov 4, 128 00 Praha 2**

Školitel: **Prof. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.**

Konzultant: **Mgr. Danica Michaličková, Ph.D.**

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

OBSAH	3
SOUHRN	4
ABSTRACT	5
SEZNAM ZKRATEK	6
1 ÚVOD	7
1.1 Galaninergní systém.....	7
1.2 CRH systém.....	8
1.3 Roztroušená skleróza	9
1.3.1 Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)	10
1.3.2 Galanin a jeho role v RS	10
2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	11
3 METODY	12
3.1 Experiment s galaninergním systémem.....	12
3.2 Experiment s CRH systémem.....	12
3.3 Experimentu s EAE modelem	12
3.4 Zpracování adenohipofýzy a míchy pro imunoflorescenci.....	13
3.5 Příprava homogenátů adenohipofýz a hypofýz pro Western blot a RT PCR	13
3.6 Western blot.....	13
3.7 Metoda s využitím imunoflorescence.....	14
3.7.1 Imunofluorescenční postup stanovení testovaných peptidů	14
3.8 Stanovení exprese mRNA testovaných peptidů	14
3.8.1 Experiment s galaninergním systémem a CRH systémem	14
3.8.2 Experiment s EAE modelem.....	15
3.8.2.1 Histologie v experimentu s EAE modelem.....	15
4 VÝSLEDKY	16
4.1 Stanovení galaninergního systému v adenohipofýze	16
4.1.1 Imunohistochemická detekce Gal a GalLP za fyziologických podmínek v adenohipofýze	16
4.1.2 Stanovení exprese galaninergních receptorů v adenohipofýze.....	17
4.1.3 Kolokalizace galaninergního systému a ACTH v adenohipofýze	19
4.1.3.1 Kolokalizace galaninu a galanin-like peptidu v adenohipofýze s ACTH	19
4.1.3.2 Kolokalizace galaninergních receptorových subtypů s ACTH v adenohipofýze	20
4.2 Stanovení CRH systému v hypofýze	20
4.2.1 Regulace genové exprese CRH receptorů a transkripčního proteinu CREB v hypofýze myši po stresu	21
4.3 Stanovení galaninergního systému u modelu EAE	22
4.3.1 Genová exprese	22
4.3.2 Imunohistochemie.....	24
4.3.3 Histologie	25
5 DISKUZE	26
6 ZÁVĚRY	31
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	32
8 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA SE VZTAHEM K PRÁCI.....	36

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 podmínek 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 adenohipofýze a CRH receptorů v hypofýze za bazálních podmínek a po stresu. Prokázali jsme zapojení galaninergního a CRH systému v adenohipofýze 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 adenohipophysis 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 adenohipophysis. It was found that the expression of the GalR2 mRNA in adenohipophysis under basal conditions was much higher than the GalR1 and GalR3 mRNA expression. Acute stress did not induce any alterations in GalR2 expression in adenohipophysis, 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.

Seznam zkratek

ACTH	Adrenokortikotropní hormon (z angl. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
cAMP	Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CNS	Centrální nervový systém
CREB	cAMP responsibilní 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-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 - 3	Galaninový receptor subtyp 1 - 3
HPA-os	Hypotalamo-hypofýzo-adrenální osa
IMO	Imobilizační stres
PBS	Fosfátový pufr
RS	Roztroušená skleróza
RT PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
WB	Western blot

1 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.

1.1 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 myšičího 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 obezité (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 nálezu 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 a 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).

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 adenohipofýzu.

1.2 CRH systém

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 prostresové 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 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 (van den Hoogen et al., 2017). 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.

1.3.1 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.

1.3.2 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.

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. Naši hypotézou bylo, že podobně jako byly popsány účinky galaninergního systému na kardiiovaskulární 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).

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.

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).

3.4 Zpracování adenohipofýzy a míchy pro imunoflorescenci

Míchy myši byly po rozmrazení a promytí v PBS. Nеспецифická 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 ° 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 µm 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).

3.5 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.

3.6 Western blot

Vzorek tkáně se homogenizuje ihned po odběru, nebo je po odběru zmrazen 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. 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. 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“.

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.

3.7 Metoda s využitím imunoflorescence

V naší práci byly použity imunohistochemické stanovení jednotlivých peptidů na řezech z adenohypofýzy a také metodu western blot. Použili jsme komerčně dostupné protilátky.

3.7.1 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 adenohypofýzy byly krájeny na tloušťku 5 μm v kryostatu Leica CM1850 (Leica Microsystems, Germany).

Získaná data byla hodnocena softwarem NIS Elements Viewer (Laboratory Imaging 2015, Nikon Instruments, Tokyo, Japan) a ImageJ (freeware, <http://rsb.info.nih.gov>).

3.8 Stanovení exprese mRNA testovaných peptidů

3.8.1 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 adenohypofýz. 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 specifity PCR. Reakce všech vzorků byla stanovena v triplikátech. Kvantifikace dat byla provedena softwarem Optical System Software (Bio-Rad, USA). Stanovili jsme mRNA jednotlivých genů vztahením jejich CT hodnoty k CT hodnotě referenčního genu beta aktinu (Genbank Accession No. NM_031144). Specifita 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).

3.8.2 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.

3.8.2.1 Histologie v experimentu s EAE modelem

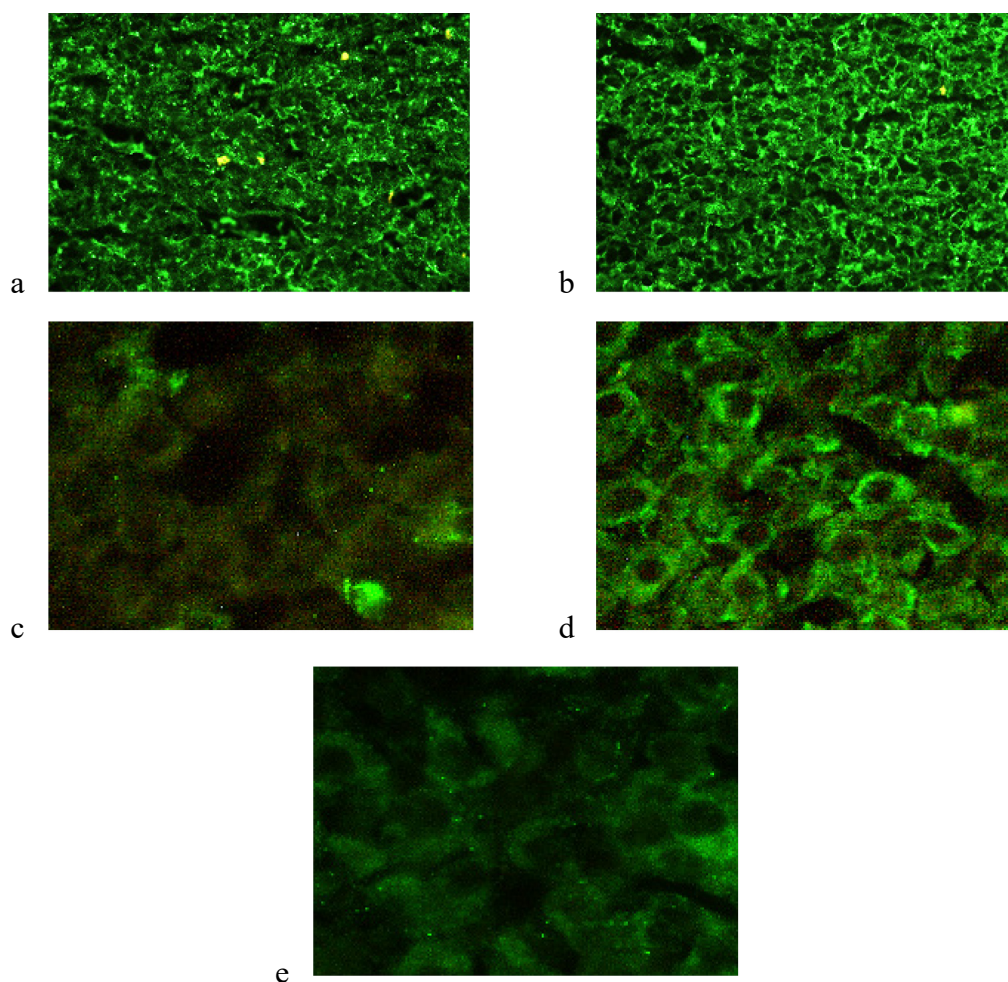
Vzorky páteře s míchami byly fixovány 4% formaldehydem a míchy byly opatrně odstraněny z obratlového kanálu. Materiál byl vložen do parafinového vosku. Sekce (tloušťka 7 μ m) byly obarveny barvením hematoxylin-eosin.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení galaninergního systému v adenohipofýze

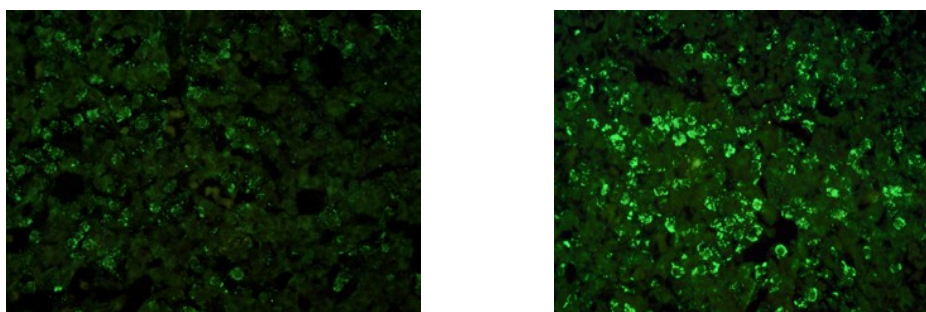
4.1.1 Imunohistochemická detekce Gal a GalLP za fyziologických podmínek v adenohipofýze

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.



Obr. 1. 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).

4.1.2 Stanovení exprese galaninergních receptorů v adenohipofýze

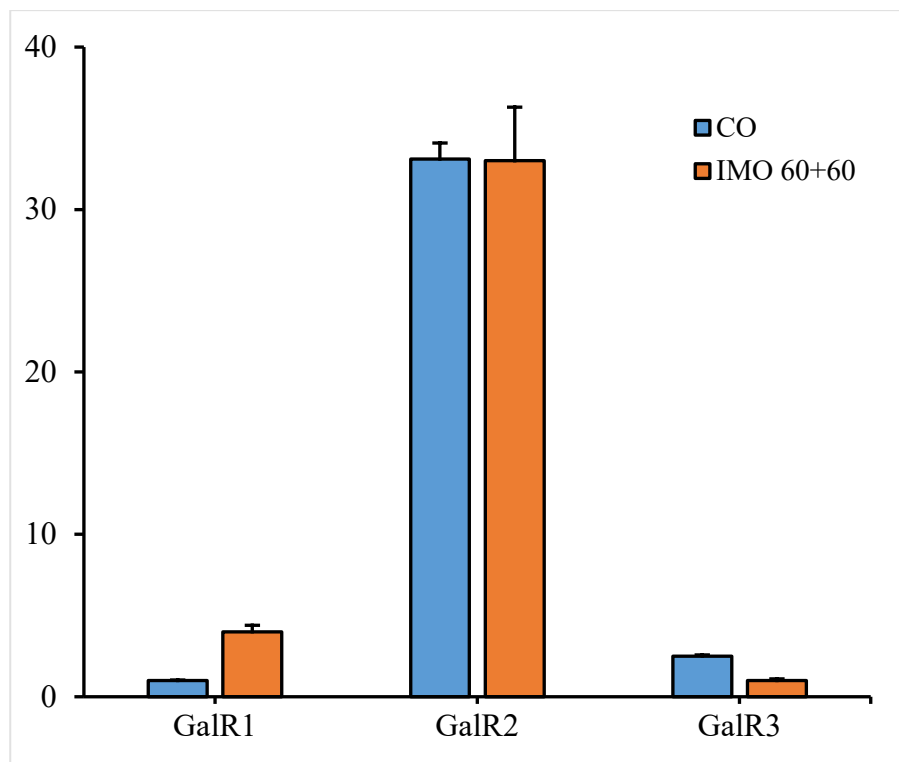


Obr. 2. Exprese GalR1 v adenohipofýze za fyziologických podmínek (vlevo) a po působení stresu (vpravo) stanovená na imunofluorescenčním snímku.

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 3, což je v souladu i s výsledky exprese peptidů de novo.

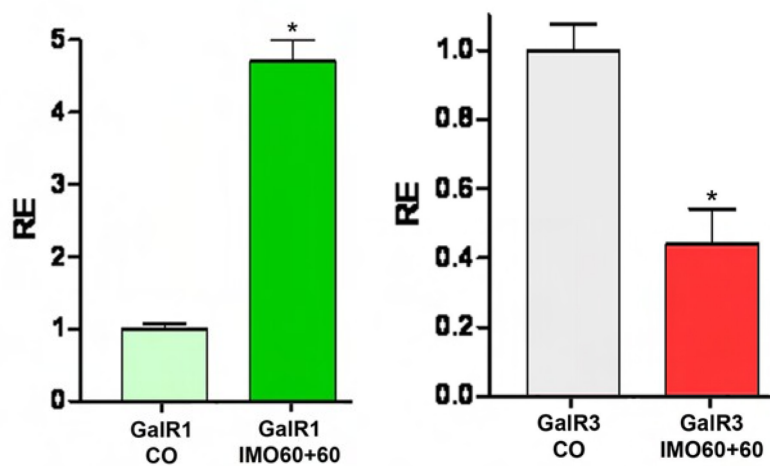
U exprese mRNA GalR2, která mnohonásobně převyšuje expresi mRNA GalR1 a mRNA GalR3 (Obr. 4), po aplikaci stresu nedochází k signifikantní změně na rozdíl od GalR1 a GalR3, kde byla relativní exprese stresem ovlivněna.

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 3.



Obr. 3. Srovnání exprese mRNA glaninových receptorových subtypů GalR1, GalR2 a GalR3 v adenohypofýze potkana.

Výsledky kontrolní skupiny (modře) a skupiny s aplikací akutního stresu (oranžově).
Data jsou prezentována jako relativní exprese (x100) ± SEM.

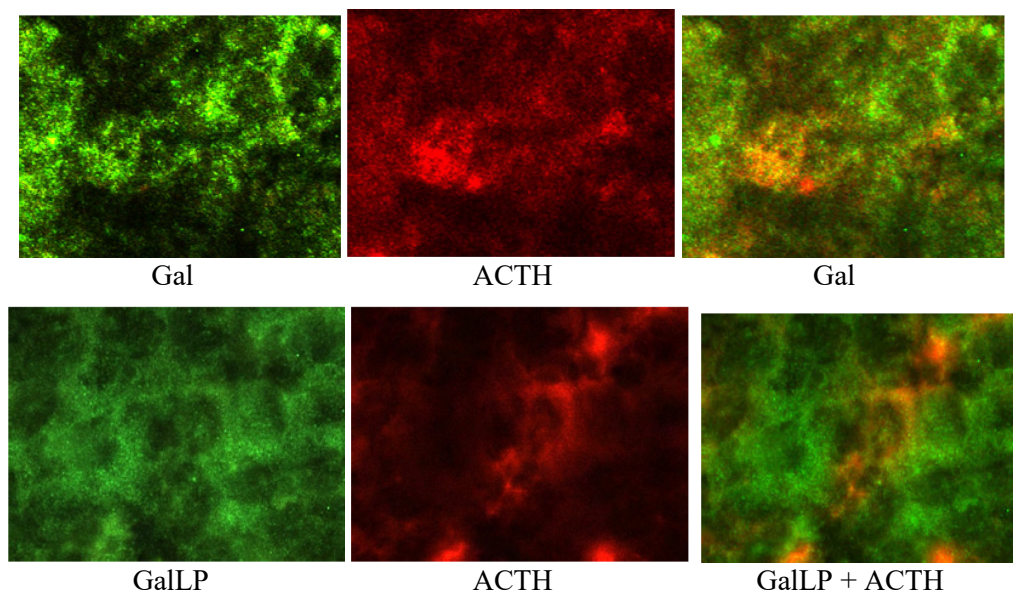


Obr. 4. Srovnání změn exprese mRNA glaninergních receptorových subtypů GalR1 (zelená barva) a GalR3 (červená barva) po aplikaci stresu v adenohypofýze potkana.

4.1.3 Kolokalizace galaninerního systému a ACTH v adenohypofýze

Pro ověření naší hypotézy, že může být galanin a galanin-like peptid zapojený v modulaci uvolňování adenohypofyzárních hormonů, především ACTH, jsme v této fázi experimentů imunofluorescenční metodou určili kolokalizaci těchto peptidů, viz obrázek 5.

4.1.3.1 Kolokalizace galaninu a galanin-like peptidu v adenohypofýze s ACTH

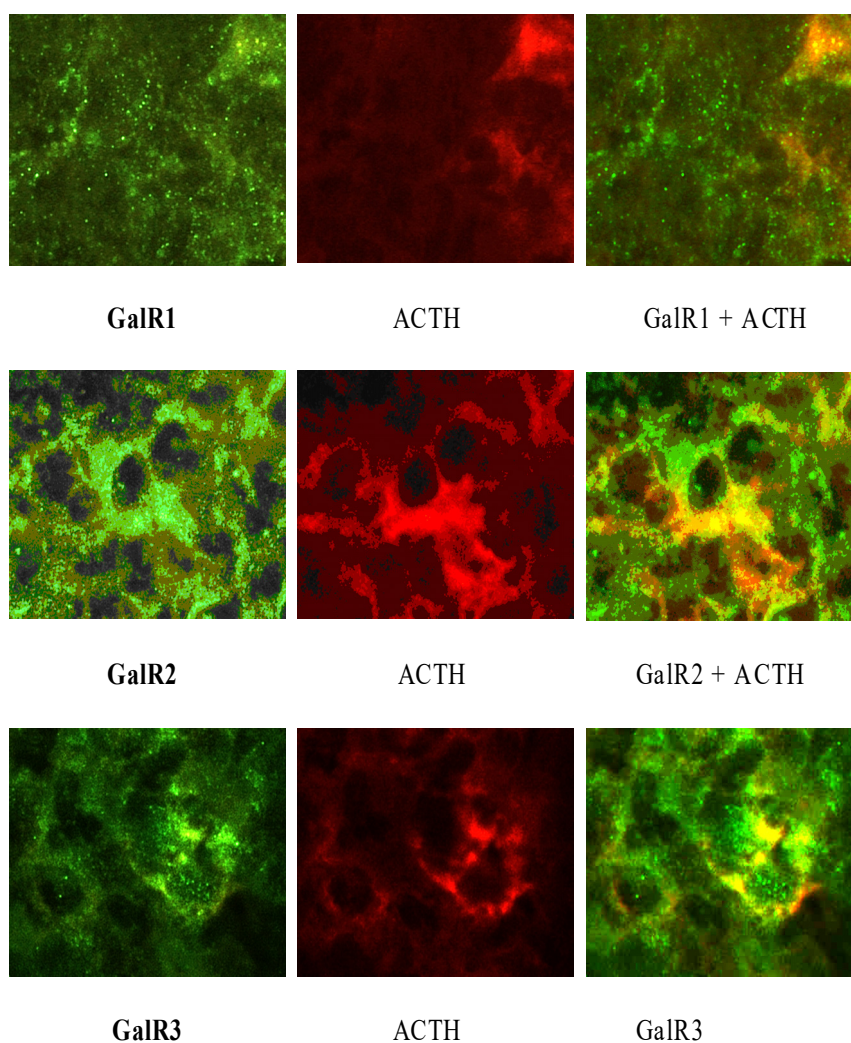


Obr. 5. Kolokalizace galaninu a galanin-like peptidu s ACTH.

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.

4.1.3.2 Kolokalizace galaninergních receptorových subtypů s ACTH v adenohypofýze



Obr. 6. Kolokalizace ACTH a GalR subtypů v adenohypofýze.

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 adenohypofýze potkana.

4.2 Stanovení CRH systému v hypofýze

Jak bylo uvedeno v úvodu, CRH má široký rozsah behaviorálních a fyziologických účinků a v adenohypofýze působí jako neurohormon a jako centrální mediátor odpovědi na stres. V naší předchozí práci jsme v adenohypofýze 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.

4.2.1 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 1.

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 (Begley, 1994) a o anxiolytickém působení galaninu a o jeho antistresovém účinku (Klenerova et al., 2009).

Tabulka 1. 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	Recept.	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	
			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	Recept.	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	
			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 ↑↑	

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

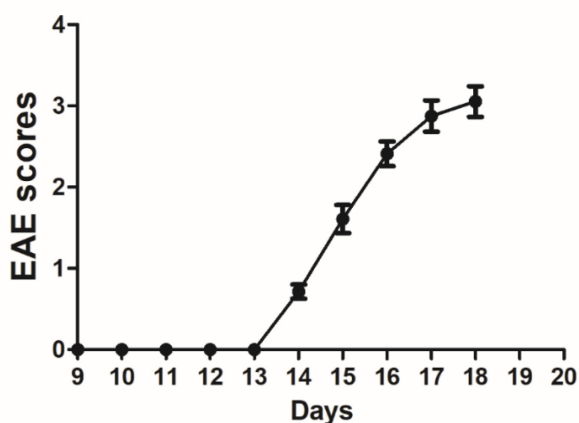
genové exprese CRH systému a jeho účast v dalších funkcích nervového systému je důležitý cíl pro terapeutický účinek antidepresivních léčiv. Opakovaný stres v intervalu 30 min vedl ke snížení exprese mRNA jak u kontrolních WT, tak u knockoutovaných CRH-KO myší, zatímco prodloužení intervalu na 120 min 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.

4.3 Stanovení galaninergního systému u modelu EAE

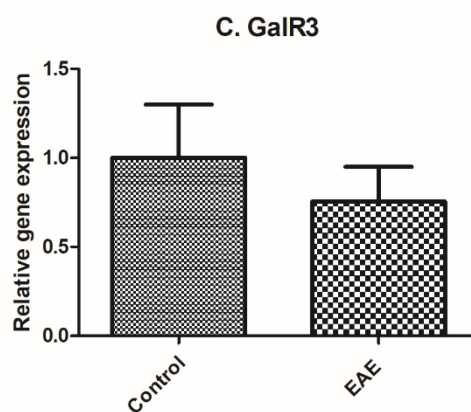
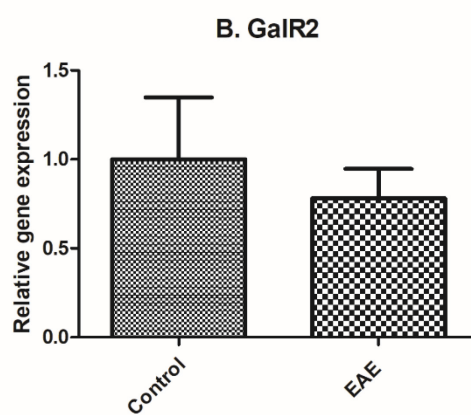
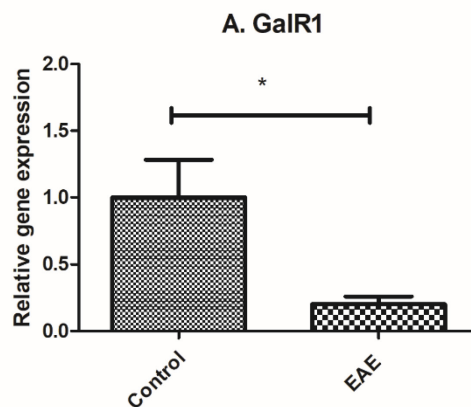
V poslední části práce jsme stanovovali expresi galaninových receptorů (GalR1, GalR2, GalR3) v míše u myšího modelu roztroušené sklerózy, EAE pomocí analýzy RT PCR a stanovení buněčné lokalizace GalR1 (v oligodendrocytech, mikroglíích, astrocytech, ependymálních buňkách a endotelových buňkách v kapilárách)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

4.3.1 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 7. 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 8.



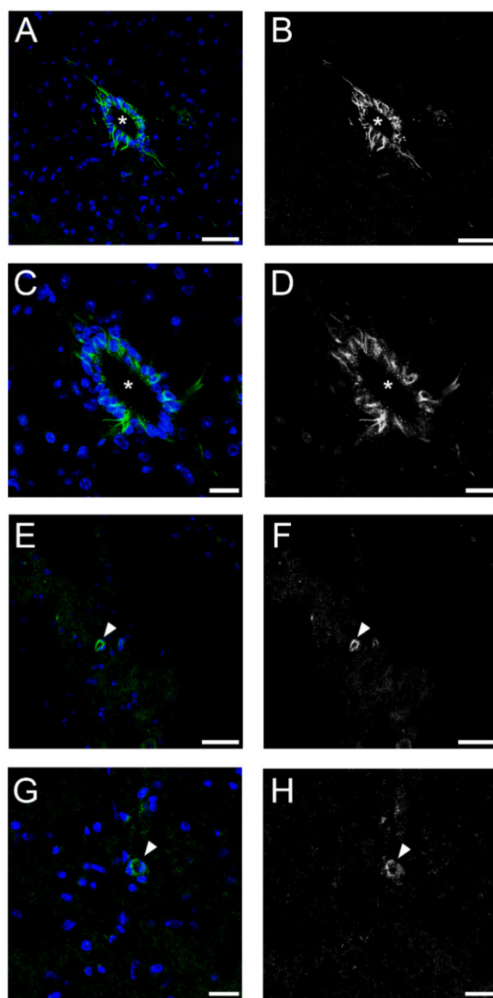
Obr. 7. Vývoj skóre EAE v experimentální skupině.



Obr. 8. Expresse galaninových receptorů v míše u kontrolních a experimentálních myší s autoimunitní encefalomyelitidou (EAE). Relativní genová exprese: A – GalR1; B - GalR2; C - GalR3. Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SD (n = 12 vzorků v EAE a 14 vzorků v kontrolní skupině), * $p < 0,05$.

4.3.2 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. 9A). Endoteliální buňky v kapilárách byly také imunoreaktivní k GalR1 (obr. 9B). 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.



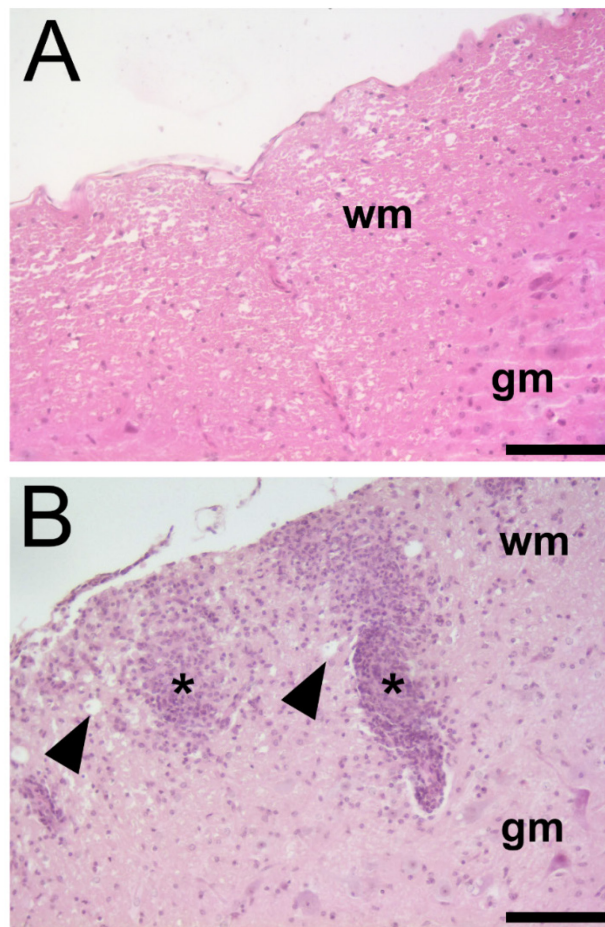
Obr. 9. Imunohistochemická detekce GalR1 v míše.

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 ependymálních 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 .

4.3.3 Histologie

K ověření stupně neurozánětlivosti byla provedena histologická analýza pomocí tkáňových řezů připravených z kontrolní i EAE skupiny (obr. 10). 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. 10. 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. Měřítko v A-B = 50 μ m.

5 DISKUZE

Disertační práce se věnuje galaninergnímu a CRH systému v CNS zejména v adenohypofýze, 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 adenohypofýzy je poměrně komplexní, a je obecně známo, že adenohypofýza je regulována hypotalamem 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., 2017). 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).

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 (viz 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 adenohypofýze 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 adenohypofýzy 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.

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 (Muglia et al. 2000). 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 (Venihaki a Majzoub, 1999).

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 hypotalamu. 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-spřážených 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 endodermálních 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 endymálních 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 endymální a endoteliální buňky jsou v patogenezi RS do značné míry podhodnoceny (Hatrock et al., 2020), (Yun et al., 2017).

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 (Langfeld et al., 2014). 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 (Betz 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.

6 ZÁVĚRY

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 galaninergních 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.

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. Exprese 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 nevysvětluje mechanismy působení galaninu v patofyziologii EAE a RS.

Závěry plynoucí z výše popsaných výsledků lze shrnout následovně: v této disertaci jsme prokázali v adenohipofýze 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 adenohipofýze 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 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

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

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., Wöfl 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
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

Filipcik P., Novak P., Mravec B., Ondicova K., Krajciova 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

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

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

- Hatrock D, Caporicci-Dinucci N, Stratton JA. Ependymal cells and multiple sclerosis: proposing a relationship. *Neural Regen Res.* 15: 263, 2020
- 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
- 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., Hynie S. Existuje vztah mezi stresem, pamětí a silnými emocemi, jako jsou obavy a strach? *Československá fyziologie.* 56: 97-103, 2007
- 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
- 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
- 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

- 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
- Packard A. E., Egan A. E., Ulrich-Lai Y. M. HPA Axis Interactions with Behavioral Systems. *Compr. Physiol.* 6: 1897-1934, 2016
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Taché Y., Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest.* 117: 33–40, 2007

- 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
- Webling K.E., Runesson J., Bartfai T., Langel U. Galanin receptors and ligands. *Front. Endocrinol.* 3: 1–14, 2012
- 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
- 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
- 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
- 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

8 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA SE VZTAHEM K PRÁCI

a) s impakt faktorem

Michalickova D., **Kramarikova I.**, Ozturk H.K., Kucera T., Vacik T., Hrnčíř 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