

KORTIKOTROPIN UVOLŇUJÍCÍ HORMON, OD CHEMIE K LIGANDŮM A JEJICH MOŽNÉMU TERAPEUTICKÉMU VYUŽITÍ

VĚRA KLENEROVÁ, IVANA KRAMÁRIKOVÁ,
PAVEL ŠÍDA, JANA ŠÍPKOVÁ a SIXTUS
HYNIE

Univerzita Karlova, 1. LF UK Ústav lékařské biochemie,
Albertov 4, 128 00 Praha 2
vera.klenerova@LF1.cuni.cz

Došlo 2.8.17, přijato 14.12.17.

Klíčová slova: neuropeptidy, kortikotropin uvolňující hormon, receptory, stres, agonisté, antagonisté, terapeutické využití

Obsah

1. Úvod
2. Kortikotropin uvolňující hormon (CRH)
3. CRH receptory
 - 3.1. Struktura CRH receptorů
 - 3.2. Lokalizace CRH receptorů v CNS
4. CRH vazebný protein
5. Ligandy CRH
 - 5.1. Agonisté CRH
 - 5.2. Antagonisté CRH
 - 5.2.1. Antagonisté peptidové povahy
 - 5.2.2. Antagonisté nepeptidové povahy
 - 5.3. Současný výzkum terapeutického využití CRH ligandů
6. Závěr

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 signálů v mozku. Jejich široká distribuce v CNS přitahuje pozornost nejen vědců, ale v poslední době také farmaceutických společností. Tyto látky působí buď jako neurotransmitery nebo jako samostatné molekuly zasahující do periferních a centrálních regulačních funkcí i odpovědi na působení vnějších podnětů včetně stresu^{1,2}. V souvislosti s účinky stresu byla popsána řada neuropeptidů, z nichž primární úlohu zastává kortikotropin uvolňující hormon (kortikoliberin, CRH)³.

Tento přehled vychází z dlouhodobého výzkumu laboratoře biochemické neurofarmakologie, který je zaměřen na studium úlohy neuropeptidů při stresu na molekulu-

ární, buněčné a behaviorální úrovni. Uvádíme nové poznatky o mechanismu působení CRH a jeho dvou receptorů⁴ s odkazy na významné přehledové články. Názvosloví CRH, jeho receptorů a ligandů odpovídá údajům mezinárodní farmakologické unie v přehledu „International Union of Pharmacology“ (cit.⁵).

Studium CRH je zaměřeno na stresovou adaptační odpověď a psychické poruchy související se stresem, s cílem možného terapeutického využití získaných poznatků³. Hlavní funkcí CRH je regulace sekrece adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a dalších hypofyzárních hormonů. Syntetizuje se v hypotalamu a i v řadě dalších oblastí mozku a zřejmě se podílí i na průběhu psychických poruch, jako jsou deprese, demence a Alzheimerova choroba^{1,6}.

Objev CRH, dvou podtypů receptorů pro CRH a nerekceptorového vazebného proteinu, znamenal pro biochemii, farmakologii a další medicínské obory převratnou událost, která umožnila objev nových agonistů a antagonistů CRH vhodných pro možné terapeutické využití.

2. Kortikotropin uvolňující hormon (CRH)

Kortikotropin uvolňující hormon (CRH), tzv. kortikoliberin, je nazývaný také faktor, neboť byl původně objeven jako hypothalamický faktor (CRF) kontrolující sekreci hypofyzárních proopiomelanokortinových peptidů. CRF byl poprvé izolován v roce 1981 Valem⁷, jako peptid tvořený 41 aminokyselinami 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. Po odhalení struktury CRF se dává přednost označení hormon stimuluji sekreci kortikotropinu. Někteří autoři doporučují používat i nadále označení faktor s tím, že lépe vystihuje funkci tohoto peptidu⁸. Následovalo intenzivní studium purifikovaných hypothalamických extraktů u různých živočišných druhů a hledání mechanismu funkce těchto peptidů.

CRH je syntetizován podle *Crh* genu se zakódovanou oblastí pro translaci prekurzoru CRH. Rozštěpením propeptidu vznikne plně funkční CRH peptid. Pre-pro-CRH peptidem nejsou kódovány další bioaktivní peptidy, na rozdíl od prekurzorů ostatních neuropeptidů. Promotor CRH obsahuje místo pro signalizační elementy odpovědi, jakými jsou glukokortikoidy a cyklický AMP. Jak již bylo uvedeno, hlavní funkcí CRH v CNS je aktivace sekrece některých mediátorů a hormonů, především glukokortikoidy kůry nadledvin s následnou produkcí stresových hormonů, hlavně kortisolu, u hlodavců kortikosteronu, na principu negativní zpětné vazby⁹ řízené aktivitou hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy (HPA osa).

Tyto regulační mechanismy jsou v organismu řízeny aktivitou hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy (HPA osa) nejen za fyziologických podmínek, ale i za působení stresu a dalších patologických stavů. Tato aktivace HPA osy má prostresové účinky. Po syntéze CRH v hypothalamu 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 k vyplavení glukokortikoidů, které připraví organismus na akutní stresovou reakci a inhibují tak 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 obranná reakce⁴.

3. CRH receptory

W. Vale se spolupracovníky ze Salk Institutu Kalifornské Univerzity 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 Bethesda. Následoval objev CRH receptoru a jeho identifikace v hypofýze potkanů v r. 1983, pomocí vazebných studií s radioligandy^{10,11}. Další pokrok v poznání struktury a fyziologie CRH receptoru se naskytl až po rekombinantní expresi lidského CRH receptoru¹² 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 tohoto přehledu, v literatuře je však řada publikací, z nich doporučujeme přehled pracovní skupiny Z. Liu z r. 2013 (cit.¹⁵).

CRH receptory jsou proteiny, kde je peptidový řetězec lidského CRH-R1 tvořen 415 rezidui aminokyselin a u různých živočišných druhů je homologní z 98 %. CRH-R2 se vyskytuje u savců ve třech isoformách, a to 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 α -forma je tvořena 411 aminokyselinami a má 71% homologii s receptorem CRH-R1 (cit.¹⁴).

3.1. Struktura CRH receptorů

Struktura lidského CRH receptoru je zobrazena na obr. 1. Patří do rodiny transmembránových receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR, G-protein coupled receptor), jejichž strukturálním znakem, společným pro všechny GPCR receptory, je přítomnost sedmi transmembránových α -šroubovicových segmentů (helixů). Tyto úseky peptidového řetězce zaujímající strukturu α -helixů v plazmatické

membráně jsou označovány jako transmembránové domény (TM) a jsou číslovány TM 1–7 od N-konce. Na mimobuněčné (extracelulární) straně receptoru je N-konec peptidu spolu se třemi extracelulárními (EC) smyčkami peptidového řetězce, které slouží jako vazebná místa pro ligandy. C-konec je umístěn na vnitrobuněčné (intracelulární) straně spolu se třemi intracelulárními (IC) smyčkami, které umožňují spolu s C-koncem vazbu α -podjednotky G-proteinu¹⁴ (viz obr. 1).

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 adenylátcyklyasy, která katalyzuje tvorbu druhého posla cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (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 translaci vznikne nový protein vedoucí k buněčné odpovědi¹⁵.

Tento typ přenosu signálu je dnes uváděn v klasických učebnicích chemie, biochemie, molekulární biologie nebo farmakologie^{16,17,18}. Současné poznatky o CRH-R signalizaci sumarizuje přehled D. K. Grammatopoulose¹⁹.

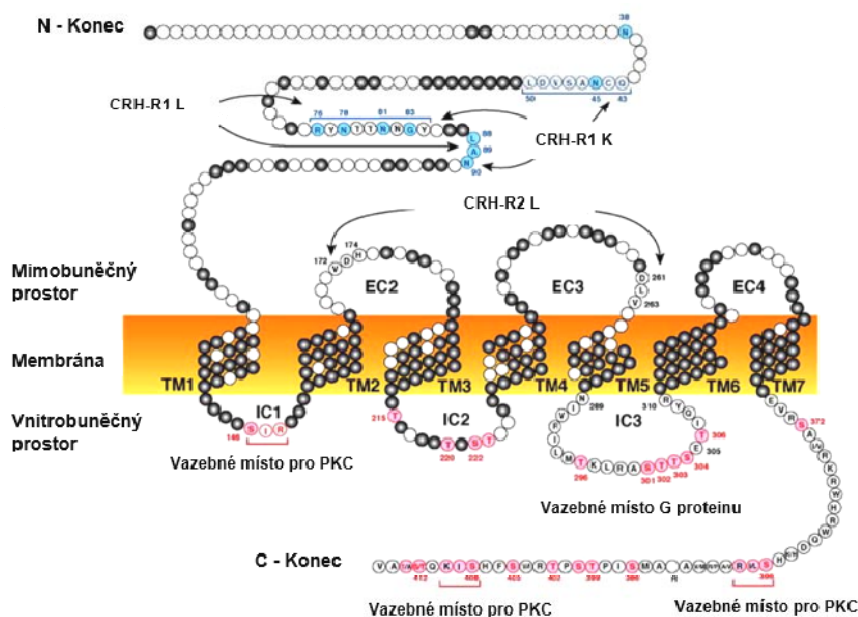
3.2. Lokalizace CRH receptorů v CNS

Řada studií ukázala odlišnou lokalizaci a odlišnou genovou expresi obou podtypů CRH receptorů²⁰. Nejvyšší denzita CRH-R1 je v hypofýze, kde tyto receptory působí uvolnění ACTH. V naší výzkumné práci jsme určili expresi mRNA obou receptorů CRH-R1 a CRH-R2 v hypofýze za fyziologických podmínek a po působení různých typů stresů²¹ a expresi obou CRH receptorů u zvířat s vyřazeným genem pro CRH u kontrol a po aplikaci stresu²². 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 v mozku odlišnou distribuci než je výše 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, má tato rozdílná afinita a distribuce receptorů fyziologický význam. Znalost lokalizace CRH receptorů je především velmi důležitá pro syntézu ligandů k selektivnímu ovlivnění funkce dané oblasti CNS a tím pro terapeutické využití. Na obr. 2 je znázorněna lokalizace CRH receptorů v jednotlivých oblastech mozku primátů.

4. 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



Obr. 1. **Struktura CRH receptoru.** CRH receptorový peptid prochází 7krát plazmatickou membránou (žlutá barva), která peptid rozdělí na tři části. Mimobuněčná (extracelulární, EC) část je tvořena N-koncem a třemi EC smyčkami peptidu (EC2, EC3, EC4). Tyto EC smyčky jsou spojeny s C-koncem pomocí tří intracelulárních IC smyček (IC1, IC2, IC3). Barevně (modře) jsou označeny aminokyseliny, na které se můžou vázat ligandy, tzv. vazebná místa (CRH-R1 L a CRH-R2 L) a vazebná místa (CRH-R1 K) v kapsovitě prohlubni, tzv. vazebné kapse. Druhou částí peptidového řetězce jsou úseky procházející plazmatickou membránou, tzv. α -helixy (šroubovice) označené jako transmembránové TM a číslované TM1–TM7. Třetí část receptoru je ve vnitrobuněčném (intracytoplazmatickém, IC) prostoru a je tvořena C-koncem a třemi intracelulárními smyčkami peptidového řetězce (IC1, IC2 a IC3). Označené sekvence aminokyselin (červeně) zahrnují vazebná místa pro vazbu G-proteinu, pro fosforylaci proteinkinasy (PKC) (upraveno podle cit.¹⁴)

ve velkém množství. CRH-BP je rozpustný protein o velikosti 37 kDa 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 antagonist²⁴.

CRH-BP se nachází v CNS mezi oblastmi exprimujícími CRH a CRH-receptor, jako je neokortex, hipokampus, hypofýza, amygdala a mozkový kmen. Různé 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. Nodostatek CRH-BP vede ke zvýšení volného CRH a toto zvýšení způsobí změny v CNS vedoucí k aktivaci HPA osy a tím zvýšení účinku stresu (viz²⁴). Modulace funkce CRH pomocí CRH-BP nepůsobí anxiogenní efekt, který je typický pro účinky agonistů CRH receptorů. CRH-BP je tak vhodný pro léčbu kognitivních deficitů s neurodegenerativní demencí. V současném výzkumu je sledována přítomnost CRH-BP v neuronálních propojeních s dalšími neuropeptidy²⁵.

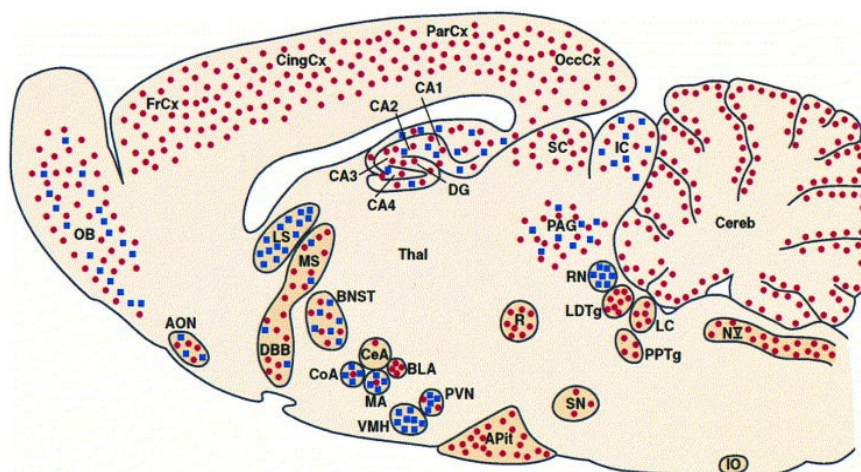
5. Ligandy CRH receptorů

Po objasnění struktury CRH receptorů a získání nových poznatků o regulaci signalizace G-proteiny a s nimi spřaženými receptory²⁶, pracoviště W. Valeho pokračovalo v syntéze nových CRH ligandů²⁷. Náš přehled z r. 2016 uvádí mechanismus vazby různých typů ligandů na GPCR receptory a přehled metod zabývajících se interakcí receptoru s ligandy, molekulárním dokováním a virtuálním screeningem¹⁵.

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.

5.1. Agonisté CRH

Wylie Vale se spolupracovníky popsal i další peptidy vázající se na CRH receptor. Na prvním místě je nutné jmenovat urokortin označený Valem urokortin 1 (zkratka



Obr. 2. Lokalizace CRH-R1 a CRH-R2 receptorů v CNS. CRH receptory se vyskytují v mozku odděleně, menší část receptorových subtypů je přítomná společně v olfaktorijní bulbu (OB), hipokampu (CA1-CA4, DG) a části amygdaly (CoA). Receptory CRH-R1 (červené kroužky) se vyskytují výhradně ve frontálním kortexu (Cx), v přední hypofýze (APit), v mozečku (Cereb) a v řadě mozkových jader (R a další R viz schéma). Výskyt CRH-R2 (modré čtverečky) je nejvíce lokalizován v subkortikální oblasti a v septu (LS, MS), které hraje významnou úlohu v klasickém limbickém okruhu důležitém pro emoce, strach i agresi. U primátů jsou CRH-R2 rozmístěny disperzně a vyskytují se s větší densitou v kortikálních oblastech²⁰. Popis jednotlivých oblastí mozku (včetně vysvětlení dalších zkratk) lze nalézt v učebnici neuroanatomie CNS²³

UCN 1)²⁸. Urokortin 1 je peptid složený ze 40 aminokyselin a má 5–20krát 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 přibuzný streskopinu) a urokortin UCN 3 (označovaný jako streskopin)⁸. 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.

Agonisté CRH a UCN 1 jsou vysoce důležité peptidy u většiny druhů savců a během evoluce prokazují 45% homologii také s nesavčími neselektivními agonisty CRH receptorů, sauvaginem a urotensinem I (cit.^{8,29}). Oba peptidy vedou *in vitro* i *in vivo* k sekreci ACTH a účinek urotensinu I je výraznější. Řada laboratorí sledovala fyziologický účinek a význam obou peptidů u patologických stavů s cílem využití těchto poznatků k syntéze selektivních antagonistů. Urotensin ovlivňuje řadu periférních funkcí, ale údaje o syntéze nového antagonisty nebyly doposud publikovány. U sauvaginu byly syntetizovány nové analogy, např. [¹²⁵I]-PD-sauvagin (PD-Svg), umožňující daleko přesnější určení exprese CRH receptorů v mozku myši, než doposud používané imunohistochemické metody³⁰. 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.

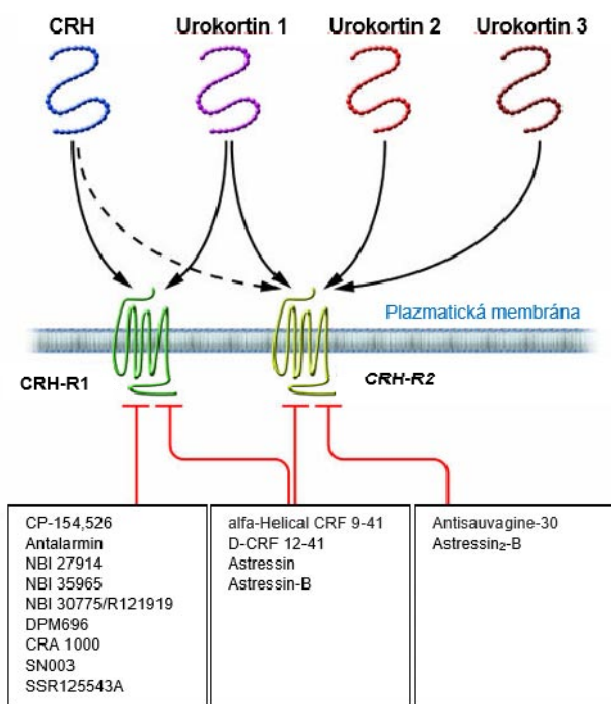
5.2. Antagonisté CRH

Antagonisté jsou látky, které po vazbě na CRH receptor blokuji navázání agonistů. Tím dochází k zabránění aktivace signalizační cesty, která by vedla expresi genů ke konečné buněčné odpovědi. Při interakci antagonisty s CRH receptorem se tak neindukuje žádný vlastní účinek. Tuto inhibici lze překonat vysokými dávkami agonistů¹⁶. Kromě interakce s receptory mohou antagonisté reagovat s efektorovým systémem. Podle mechanismu účinku lze antagonisty rozdělit na látky peptidové a nepeptidové povahy.

5.2.1. Antagonisté peptidové povahy

Antagonisté peptidové povahy jsou látky odvozené od fyziologicky se vyskytujících ligandů, které hrají roli ve studiu GPCR. Toto studium přispělo především k objasnění mechanismu účinků CRH a k objasnění stresových odpovědí. Vývoj kompetitivních CRH-R antagonistů byl důležitý pro určení funkcí CRH receptorů za bazálních a stresových podmínek s předpokladem, 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 α -helikální CRH9-41, analog CRH vzniklý po odebrání 8 aminokyselin na C-konci CRH³¹. Tento peptid 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}, CaMe Leu³⁷]



Obr. 3. Přehled CRH receptorových agonistů a antagonistů. Na schématu jsou uvedeny CRH receptory R1 a R2 lokalizované v plazmatické membráně, jejich agonisté (CRH a urokortiny) a vybraní 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. Upraveno podle Taché⁸

CRF12-41) a skupina odvozená od astresinu (cyklo(30-33) [D-Phe12,Nle21,38,Glu30,Lys33] Ac-CRF9-41) (cit.⁸). Tito antagonisté se váží na oba CRH-R1 a CRH-R2 receptory a neposkytují údaje o účasti CRH-R2 receptorů.

Průlomem byla syntéza selektivních antagonistů CRH-R2 receptorů s malou nebo žádnou afinitou pro CRH-R1 receptory. Prvně byl syntetizován specifický peptidový CRH-R2 antagonistista antisauvagin-30 [D-Phe11,His12] sauvagin 1140, K41498 [D-Phe11, His12, Nle17] sauvagin 1140 a pro další neurochemické, funkční a radiografické studie CRH-R2 receptorů analog antisauvaginu-30 K 41498 značený radiojodem³².

Další analog je dlouhodobě působící antagonistista s dalšími konformačními změnami, astresin2-B cyklo(31-34)[D-Phe11,His12,Nle12,CaMeLeu13,39,Nle17, Glu31, Lys34] Ac-sauvagin8-40 (cit.³³). Byla syntetizována i řada dalších látek (viz přehledy níže).

5.2.2. 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 mozkomíšni bariérou. Tyto požadavky splňují antagonisté nepeptidové povahy o malé molekulové hmotnosti. K jejich identifikaci došlo v roce 1995 a jsou od té doby nejčastěji užívanými syntetickými látkami při studiu psychických poruch.

Mezi nejznámější a nejčastěji používané selektivní nepeptidové CRH-R1 antagonisty patří látka NBI 27914, látka CP-154,526 a antalarmin³⁴. Antalarmin inhibuje chování a emoce spojené se strachem a úzkostí, vyvolané vnějšími sociálními stresory, a může tak sloužit v léčbě úzkosti. Řada dalších syntetických antagonistů, např. DPM696, NBI30775 (známý jako R121919) a NBI35965, je charakterizována v řadě přehledů^{35–37}.

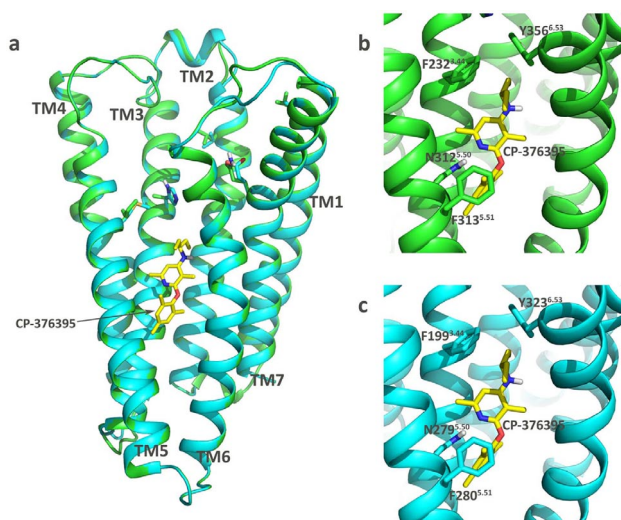
Pokrok v syntéze antagonistů nepeptidové povahy umožnilo využití nových technik pro zobrazení krystalové struktury. Na obr. 4 uvádíme příklad krystalové struktury lidského CRH-R1 receptoru v komplexu s antagonistou CP-376395, se zobrazením aminokyselinových zbytků klíčových pro vazbu resp. disociaci ligandu. To poskytuje informace o původu selektivity daného antagonisty. Tato generace antagonistů byla syntetizována především na základě analýzy struktury aminokyselin podílejících se na vazbě s ligandem, což však není postačující k objasnění účinků syntetizovaných látek³⁸. Tyto látky bylo nutné v pokusech aplikovat do mozku 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 z různých pracovišť.

5.3. 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, kteří mají terapeutický potenciál v léčbě psychiatrických poruch spojených se stresem.

Antagonisté nepeptidové povahy CRH-R1 receptorů mají řadu i dalších terapeutických účinků¹. Mezi indikace patří především již výše zmíněné poruchy CNS, deprese, anxiety, migréna, cévní mozkové příhody, ale také některé projevy látkové závislosti. Je nutné zdůraznit, že ligandy CRH jsou zapojeny nejen v CNS a hypofýze, ale také na periférii, kde se váží na periferní CRH receptory. U terapie řady nemocí, např. dráždivého tračníku, zánětu, se dnes již využívají jak agonisté, tak antagonisté CRH-R, jak je podrobněji uvedeno v přehledu laboratoře G. P. Chrousos a v dalších přehledech^{44,45}.

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^{39,40}. Bohužel tyto studie nepřinesly jednoznačné výsledky. Preklinické a klinické studie opakovaně nepotvrdily terapeutické účinky antagonistů, výsledky jsou často protichůdné nebo žádné. Průkopníci v preklinickém vý-



Obr. 4. Krystalová struktura CRH-R receptoru s navázaným antagonistou CP-376395. Na schématu (a) na levé straně je zobrazena krystalová struktura vazebné štěrby tvořené transmembránovými helixy (TM1–TM7) u receptoru CRH-R1 s navázaným antagonistou CP-376395. Tato vazba je detailněji znázorněna v další části schématu, v zelené barvě (b) pro receptor CRH-R1 a v azurové barvě (c) pro receptor CRH-R2 s označením polohy klíčových aminokyselin této interakce. Tento postup umožňuje určit vazbu resp. disociaci ligandu a tím i původ selektivity antagonisty³⁸

zkumu 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 struktuře⁴¹. 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 látek a publikace o využití zvířecích modelů u mentálních poruch⁴².

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 a CRH-R1 systému v psychopatologii. Ve vynikající přehledové práci⁴³ „Nebojte se o CRF: posouzení selhání translace antagonistů CRF1“ Zorrilla se spolupracovníky vyhodnotili 174 publikací, kde podání CRH-R1 antagonisty nevyvolalo předpokládanou odpověď. Hodnocení výsledků studií nových ligandů v průběhu cca 15 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 (viz blíže citace uvedené v publikaci⁴³). 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. Cílem tohoto výzkumu je určit, prokázat a ověřit léčivé účinky daného ligandu, zjištění jeho nežádoucích a dalších účinků.

Zorrilla uzavírá hodnocení dosavadního výzkumu tím, 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 s cílem terapeutického využití.

6. Závěr

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

Práce byla realizována za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy PROGRES Q25//LF1/2 a SVV 266 377/2017.

LITERATURA

1. Klenerová V., Hynie S.: Čs. Fyziol. 56, 55 (2007).
2. Klenerová V., Hynie S.: Psychiatrie 10, 17 (2006).
3. Klenerová V., Hynie S.: Psychiatrie 6, 21 (2002).
4. Aguilera G., Nikodemova M., Wynn P. C., Catt K. J.: Peptides 25, 319 (2004).
5. Hauger R. L., Grigoriadis D. E., Dallman M. F., Plotzky P. M., Vale W. W., Dautzenberg F. M.: Pharmacol. Rev. 55, 21 (2003).
6. Inda C., Armando N. G., Dos Santos Claro P. A., Silberstein S.: Endocr. Connect. 6, R99 (2017).
7. Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J.: Science 213, 1394 (1981).
8. Taché Y., Bonaz B. J.: Clin. Invest. 117, 33 (2007).
9. Aguilera G., Rabadan-Diehl C., Nikodemova M.: Peptides 22, 769 (2001).
10. Wynn P. C., Aguilera G., Morell J., Catt K. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 602 (1983).
11. De Souza E. B., Perrin M. H., Insel T. R., Rivier J., Vale W. W., Kuhar M. J.: Nature 224, 1449 (1983).
12. Chen R., Lewis K. A., Perrin M. H., Vale W. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 8967 (1993).
13. Liu Z., Liu W., Yao L., Yang C., Xiao L., Wang Q., Gao K., Wang H., Zhu F., Wang G., Xiao Z.: Sci. Rep. 3, 1548 (2013).
14. Hauger R. L., Risbrough V., Brauns O., Dautzenberg F. M.: CNS Neurol. Disord. Drug Targets 5, 453 (2006).

15. Klenerová V., Hynie S.: Chem. Listy 110, 900 (2016).
16. Hynie S.: *Farmakologie v kostce*. Triton, Praha 2008.
17. Matouš a kolektiv: *Základy lékařské chemie a biochemie*. Galén, Praha 2010.
18. Kodíček M., Valentová O., Hynek R.: *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. VŠCHT, Praha 2015.
19. Grammatopoulos D. K.: Brit. J. Pharmacol. 166, 85 (2012).
20. Steckler T., Holsboer F.: Biol. Psychiatry 46, 1480 (1999).
21. Klenerová V., Sery O., Hynie S.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1148, 415 (2008).
22. Klenerová V., Kvetnansky R., Hynie S.: Cell. Mol. Neurobiol. 10.1007/s10571-017-0556-3 (2017).
23. Petrovický P.: *Klinická neuroanatomie CNS*. Triton, Praha 2008.
24. Ketchesin K. D., Stinnett G. S., Seasholtz A. F.: Stress 10.1080/10253890.2017 (2017).
25. Ketchesin K. D., Huang N. S., Seasholtz A. F.: Front. Neuroanat. org/10.3389/fnana.2017.00090 (2017).
26. Zhang D., Zhao Q., Wu B.: Mol. Cells 38, 836 (2015).
27. Perrin M. H., Vale W. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 885, 312 (1999).
28. Martínez V., Wang L., Rivier J. E., Vale W., Taché Y.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 301, 611 (2002).
29. Lovejoy D. A., de Lannoy L.: J. Chem. Neuroanat. 54, 50 (2013).
30. Tan L. A., Vaughan J. M., Perrin M. H., Rivier J. E., Sawchenko P. E.: J. Comp. Neurol. 525, 3840 (2017).
31. Rivier J., Rivier C., Vale W.: Science 224, 889 (1984).
32. Lawrence A. J., Krstew E. W., Dautzenberg F. M., Ruhmann A.: Brit. J. Pharmacol. 136, 896 (2002).
33. Contoreggi C., Lee M. R., Chrousos G.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1282, 107 (2013).
34. Zaretsky D. V., Zaretskaia M. V., Sarkar S., Rusyniak D. E., DiMicco J. A.: Neurosci. Lett. 653, 1 (2017).
35. Chen C., Grigoriadis D. E.: Drug Dev. Res. 65, 216 (2005).
36. Schreiber A. L., Lu Y. L., Baynes B. B., Richardson H. N., Gilpin N. W.: Neuropharmacol. 113, 323 (2017).
37. Zorrilla E. P., Koob G. F.: Drug Discov. Today 15, 371 (2010).
38. Bai Q., Shi D., Zhang Y., Liu H., Yao X.: Mol. Biosyst. 10, 1958 (2014).
39. Dedic N., Chen A., Deussing J. M.: Curr. Mol. Pharmacol. 10.2174/1874467210666170302104053 (2017).
40. Grimm S., Wirth K., Fan Y., Weigand A., Gärtner M., Feeser M., Dziobek I., Bajbouj M., Aust S.: Behav. Brain Res. 329, 180 (2017).
41. Winsky L., Brady L.: Psychopharmacol. 234, 1645 (2017).
42. Markou A., Chiamulera C., Geyer M. A., Tricklebank M., Steckler T.: Neuropsychopharmacol. 34, 74 (2009).
43. Spierling S. R., Zorrilla E. P.: Psychopharmacol. 234, 1467 (2017).
44. Zoumakis E., Rice K. C., Gold P. W., Chrousos G. P.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1083, 239 (2006).
45. Koob G. F., Zorrilla E. P.: Neuropsychopharmacol. 37, 308 (2012).

V. Klenerová, I. Kramáriková, P. Šída, J. Šípková, and S. Hynie (Department of Medical Biochemistry, First Faculty of Medicine, Charles University, Praha): **Corticotropin-Releasing Hormone – from Chemistry to Ligands and its Possible Use in Therapy**

This review summarizes past and recent findings related to corticotropin releasing hormone (CRH, CRF) regulation and its involvement in the neuroendocrine, autonomic and behavioral stress reaction. CRH belongs to a larger family of neuropeptides that also includes urocortins with different affinity toward the two types of CRH receptors, CRH-R1 and CRH-R2. The new advances in the knowledge of mechanisms of CRH and its receptor subtypes effects show an involvement of CRH in stress and stress-related disorders, such as depression, anxiety and other psychiatric and physic diseases. This review lists some ligands and new drugs that act as agonists and antagonists on CRH receptor subtypes. Recent studies open up new possibilities for finding antidepressants that would also influence defensive stress mechanisms. Because CRH receptors are also located in the periphery, the use of CRH antagonists can have therapeutic potential in the treatment and prevention of organic diseases. Mainly non-peptide antagonists that have a potential for the therapeutic use in psychiatric, behavioral and other disorders are prospective in this respect. The aim of the current research is to find non-peptide ligands that penetrate the cerebrospinal barrier and, by binding to the respective CRH receptor, will have an anti-stress effect.