

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Model plicní hypertenze *in vitro* a *in vivo* u potkana pro testování nových léčiv
cílicích na galektin-3
Diplomová práce

2023

Bc. Kateřina Pokorná

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Pokorná**
Osobní číslo: **C21459**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Model plicní hypertenze *in vitro* a *in vivo* u potkana pro testování nových léčiv cílících na galektin-3**
Téma práce anglicky: ***In Vitro And In Vivo Rat Model Of Pulmonary Hypertension For Testing New Drugs***
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Cílem teoretické části práce bude vypracovat literární rešerši zaměřenou na téma:

1. plicní hypertenze – charakterizace onemocnění, možnosti léčby. Popis procesů odehrávajících se v tkáni plicních tepen při plicní hypertenzi na molekulární a buněčné úrovni.
2. galektinu-3 – vlastnosti proteinu, úloha ve fibrózách a kardiovaskulárních onemocněních se zaměřením na plicní hypertenzi. Popis známých inhibitorů galektinu-3.

Experimentální část:

Cílem experimentální části práce bude charakterizovat model plicní hypertenze u potkanů *in vivo* z hlediska exprese vybraných markerů v tkáních. Z potkanů budou izolovány primokultury z plicní tepny a pravé srdeční komory. U primokultur bude stanovena jejich schopnost proliferace a také exprese vybraných genů na úrovni mRNA a proteinu. Primokultury a potkani budou rovněž využiti pro testování účinku inhibitorů galektinu-3.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Fulton, David JR et al. "Galectin-3: A Harbinger of Reactive Oxygen Species, Fibrosis, and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension." *Antioxid Redox Signal* vol. 31,14 (2019): 1053-1069.

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Antonín Sedlář**
Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Prohlašuji:

Práci s názvem Model plicní hypertenze *in vitro* a *in vivo* u potkana pro testování nových léčiv cílících na galektin-3 jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 5. 2023

Kateřina Pokorná v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala mému vedoucímu práce RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D., za jeho rady při zpracování Diplomové práce. Velmi ráda bych tímto také poděkovala mému konzultantovi Mgr. Antonínu Sedláři za jeho odborné rady, bdělost a vstřícnost při mé práci v laboratoři a při psaní této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala Fyziologickému ústavu Akademie Věd oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství, za poskytnutí laboratoří a materiálu pro experimentální část této diplomové práce.

ANOTACE

Plicní hypertenze je závažné kardiovaskulární onemocnění, zvyšující mortalitu pacientů. Plicní hypertenze může být spojována mimo jiné i s aktivitou galektinu-3. Galektin-3 je schopen podporovat proliferaci hladkých svalových buněk mediální vrstvy cévní stěny a tím zvyšovat odpor cév vůči proudící krvi.

Plicní hypertenze může být vyvolána vystavením organismu hypoxii, a proto byl zkoumán rozdíl mezi buňkami izolovanými z plicních arterií potkanů vystavených hypoxickým nebo normoxickým podmínkám. Byla charakterizována adheze a růst normoxické primokultury a zjištěna čistota normoxických a hypoxických primokultur. Dále byly porovnány normoxické a hypoxické primokultury v závislosti na expresi typických hladkosvalových markerů, galektinu-3 a kolagenu I. Zároveň byla také porovnána exprese těchto markerů v plicní arterii, pravé srdeční komoře a plicích potkanů vystavených hypoxii nebo normoxii. Galektin-3 přispívá ke tvorbě plicní hypertenze, a proto byla rovněž testována cytotoxicita inhibitorů galektinu-3 v normoxických i hypoxických primokulturách.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plicní hypertenze, fibróza, hypoxie, galektin-3, inhibitory galektinu-3

TITLE

In vitro and *in vivo* rat model of pulmonary hypertension for testing new drugs targeting galectin-3

ANNOTATION

Pulmonary hypertension is a serious cardiovascular disease, increasing patient mortality. Pulmonary hypertension can be associated, among other things, with galectin-3 activity. Galectin-3 is able to support the proliferation of smooth muscle cells of the medial layer of the vascular wall and thus increase the resistance of the vessels to the flowing blood.

Pulmonary hypertension can be induced by exposing the organism to hypoxia, so the difference between cells isolated from pulmonary arteries of rats exposed to hypoxic or normoxic conditions was investigated. Adhesion and growth of normoxic primocultures were characterized and the purity of normoxic and hypoxic primocultures was determined. Furthermore, normoxic and hypoxic primocultures were compared with respect to the expression of typical smooth muscle markers, galectin-3 and collagen I. At the same time, the expression of these markers in the pulmonary artery, right ventricle and lungs of rats exposed to hypoxia or normoxia was also compared. Galectin-3 contributes to the formation of pulmonary hypertension, and therefore the cytotoxicity of galectin-3 inhibitors was also tested in normoxic and hypoxic primary cultures.

KEYWORDS

pulmonary hypertension, fibrosis, hypoxia, galectin-3, inhibitors of galectin-3

OBSAH

Úvod.....	14
1 Cíl diplomové práce.....	15
2 Teoretická část	16
2.1 Plicní hypertenze	16
2.1.1 Charakterizace onemocnění	17
2.1.2 Příčiny vzniku	17
2.1.3 Příznaky	19
2.1.4 Změny při plicní hypertenzi.....	19
2.1.5 Diagnostika	24
2.1.6 Léčba.....	25
2.1.7 Rizikové faktory, komplikace a prevence plicní hypertenze	26
2.2 Galektin-3.....	26
2.2.1 Biologické funkce galektinu-3.....	27
2.2.2 Fibrózy a kardiovaskulární onemocnění.....	29
2.2.3 Inhibitory galektinu-3	30
3 Experimentální část.....	32
3.1 Metodika výzkumné (praktické) části	32
3.1.1 Použité přístroje a materiály	32
3.1.2 Experimentální model plicní hypertenze	34
3.1.3 Izolace, expanze a kryoprezervace hladkých svalových buněk plicních arterií potkanů 35	
3.1.4 Kultivace buněk	35
3.1.5 Trypsinizace buněk – příprava buněk pro další pokusy	35
3.1.6 Automatické stanovení počtu buněk a jejich viability pomocí cell counteru Vi-CELL-XR Cell Viability Analyzer od firmy Beckman Coulter	36
3.1.7 Stanovení adheze buněk.....	36

3.1.8	Stanovení konfluence s ohledem na násadu buněk pro následné použití do pokusů	36
3.1.9	Stanovení proliferace buněk a jejich doby zdvojení.....	37
3.1.10	Imunofluorescenční barvení buněk markerů hladkých svalových buněk a galektinu-3	37
3.1.11	Fluorescenční barvení buněk fixovaných ledovým 70% ethanolem pro počítání jader a měření ploch buněk.....	38
3.1.12	Průkaz markerů hladkých svalových buněk pomocí průtokové cytometrie	38
3.1.13	Exprese genů v tkáních a adherentních buňkách	39
3.1.14	Inkubace buněk s inhibitory galektinu-3	41
3.1.15	Mikroskopie, analýza a zpracování mikrofotografií.....	41
3.1.16	Statistické zpracování dat	42
3.2	Výsledky	43
3.2.1	Charakterizace normoxické primokultury pro další pokusy.....	43
3.2.2	Porovnání normoxických a hypoxických buněk.....	50
3.2.3	Exprese genů v tkáních získaných z potkanů vystavených normoxickým a hypoxickým podmínkám.	61
3.2.4	Cytotoxicita inhibitorů galektinu-3 u normoxických a hypoxických buněk získaných z plicních arterií potkana.....	64
4	Diskuze	65
5	Závěr	71
6	Použitá literatura	73

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Zobrazení plic srdce a tepen vedoucích z pravé komory [1].....	16
Obrázek 2: Zobrazení zdravé tepny, zbytnělé tepny a více zbytnělé tepny [2].	17
Obrázek 3: Koláčový graf procent pacientů s plicní hypertenzí (PH), zařazených do skupin podle WHO [6; 7].	19
Obrázek 4: Porovnání zdravé normální plicní tepny a tepny postižené plicní hypertenzí s masivním ztluštěním <i>tunica media</i> [12].	21
Obrázek 5: Algoritmus diagnostiky plicní hypertenze (PH) a jejích příčin [9].....	25
Obrázek 6: Normoxické hladké svalové buňky inkubované v DMEM s 10% a 20% FBS v hypoxických a normoxických podmínkách. V jednotlivých časových intervalech byl spočítán počet buněk na jamku a následně přepočítán na procenta nasedlých buněk z původní koncentrace násady. Dále byla spočítán průměrná plocha buňky	45
Obrázek 7: Imunofluorescenční barvení normoxických hladkých svalových buněk. V buněčných kulturách byl vizualizován F-aktinový cytoskelet a vinkulin znázorňující fokální adheze.	46
Obrázek 8: A – hladké svalové buňky inkubované v normoxických podmínkách s různou koncentrací násady buněk na jamku. U buněk byla manuálně spočítána plocha buněk v jamce a následně přepočítána na procenta pokrývající dno jamky. B – Imunofluorescenční barvení hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkana vystavených normoxii. V buněčných kulturách byla obarvena plocha buněk	47
Obrázek 9: Normoxické hladké svalové buňky inkubované v normoxických podmínkách s různou koncentrací násady buněk na jamku. U buněk byl manuálně spočítán počet buněk na jamku a následně vypočítána doba zdvojení buněk v dané koncentraci násady. Bylo také porovnáno kolik procent buněk nasedlo za první den inkubace z celkové násady.....	49
Obrázek 10: Normoxické a hypoxické hladké svalové buňky inkubované v normoxických a hypoxických podmínkách. U buněk byl manuálně spočítán počet buněk na jamku	50
Obrázek 11: Normoxické a hypoxické buňky analyzované na průtokovém cytometru pro zjištění kontaminace endotelovými buňkami a fibroblasty	52
Obrázek 12: Imunofluorescenční barvení CD90 v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii	53
Obrázek 13: Imunofluorescenční barvení vimentinu a desminu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii	54

Obrázek 14: Imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii. V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu a kalponinu.....	55
Obrázek 15: Imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii. V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu a kalponinu.....	55
Obrázek 16: Relativní exprese genů v normoxických a hypoxických hladkých svalových buňkách. Zkoumané geny byly ACTA2 pro α -aktin a CNN1 pro kalponin 1.....	56
Obrázek 17: Imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii. V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu a těžký řetězec myosinu 11.....	57
Obrázek 18: Imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii. V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu a těžký řetězec myosinu 11.....	57
Obrázek 19: Relativní exprese genu MYH11 pro myosin-11.....	58
Obrázek 20: Imunofluorescenční barvení galektinu-3 v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii.....	59
Obrázek 21: Imunofluorescenční barvení kolagenu I v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii.....	59
Obrázek 22: Imunofluorescenční barvení kolagenu I v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii nebo hypoxii.....	60
Obrázek 23: Relativní exprese genů v normoxických a hypoxických hladkých svalových buňkách. Zkoumané geny byly LGALS3 pro galektin-3 a COL1A1 pro kolagen-1.....	61
Obrázek 24: Relativní exprese genů srdce, plicní arterie a plíce normoxických a hypoxických potkanů. Zkoumané geny byly ACTA2 pro aktin, CNN1 – pro kalponin, MYH11 pro myosin, LGALS3 pro galektin-3 a COL1A1 pro kolagen-1.....	63
Obrázek 25: Normoxické a hypoxické HSB inkubované s různými koncentracemi inhibitorů galektinu-3. U buněk byl stanoven počet jader v mikroskopických zorných polích.....	64

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AV	Akademie věd
Bcl-2	Rodina proteinů zapojujících se do apoptózy. Název odvozen od B-cell lymphoma
BH1	doména Bcl-2 homologie 1
BMP	Kostní morfogenetický protein
BMPR2	Receptor kostního morfogenetického proteinu typu 2
Ca ²⁺	Vápenatý kation
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CTEPH	Chronická tromboembolická plicní hypertenze
CRD	sacharid vázající doména
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EKG	Elektrokardografie
ERA	Antagonista endotelového receptoru
FBS	Fetální bovinní sérum
FGÚ	Fyziologický ústav
HSB	Hladké svalové buňky
K ⁺	Draselný kation
MBÚ	Mikrobiologický ústav
NH2	Malá N-terminální doména
NO	Oxid dusnatý
NWGR	sekvence aminokyselin BH1 rodiny Bcl-2

PDE-5	Inhibitor fosfodiesterázy-5
PAH	Plicní arteriální hypertenze
PH	Plicní hypertenze
RNA	Ribonukleová kyselina
sGCS	stimulátor rozpustné guanylátcyklázy
T4	Čtvrtý hrudní obratel
TGF- β	Transformující růstový faktor β
WHO	Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

Plicní hypertenze je závažné nevyléčitelné onemocnění, které značně zvyšuje morbiditu a mortalitu pacientů. Je charakterizovaná tlakem v plicní arterií vyšším než 25 mm Hg. Dle WHO je dělena do 5 skupin podle příčiny vzniku. Nejčastěji plicní hypertenze vzniká levostranným srdečním selháním, ale může vznikat i bez zjevných příčin. Při plicní hypertenzi dochází k ztluštění všech vrstev cévní stěny a tím vzniká větší odpor pro proudící krev. Kvůli tomu dochází ke ztluštění i pravé srdeční komory a následně i k srdečnímu selhání. Existuje mnoho léků, které pomáhají zpomalovat progresi onemocnění a ulevovat od symptomů, ale v některých případech je jedinou možností transplantace srdce a plic.

Galektin-3 se zapojuje do mnoha dějů, od buněčné signalizace, účasti při zánětlivé reakci, po proliferaci buněk a regulaci buněčné smrti. Jeho vlastnosti jsou dány lokalizací v buňce nebo v extracelulárním prostoru. V mnoha studiích je poukázáno na roli galektinu-3 při vzniku plicní hypertenze. Galektin-3 indukuje proliferaci hladkých svalových buněk a podílí se také na fibrózách. Farmakologická inhibice galektinu-3 se tedy jeví jako nový perspektivní způsob léčby plicní hypertenze.

1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem teoretické části práce bude vypracovat literární rešerši zaměřenou na téma:

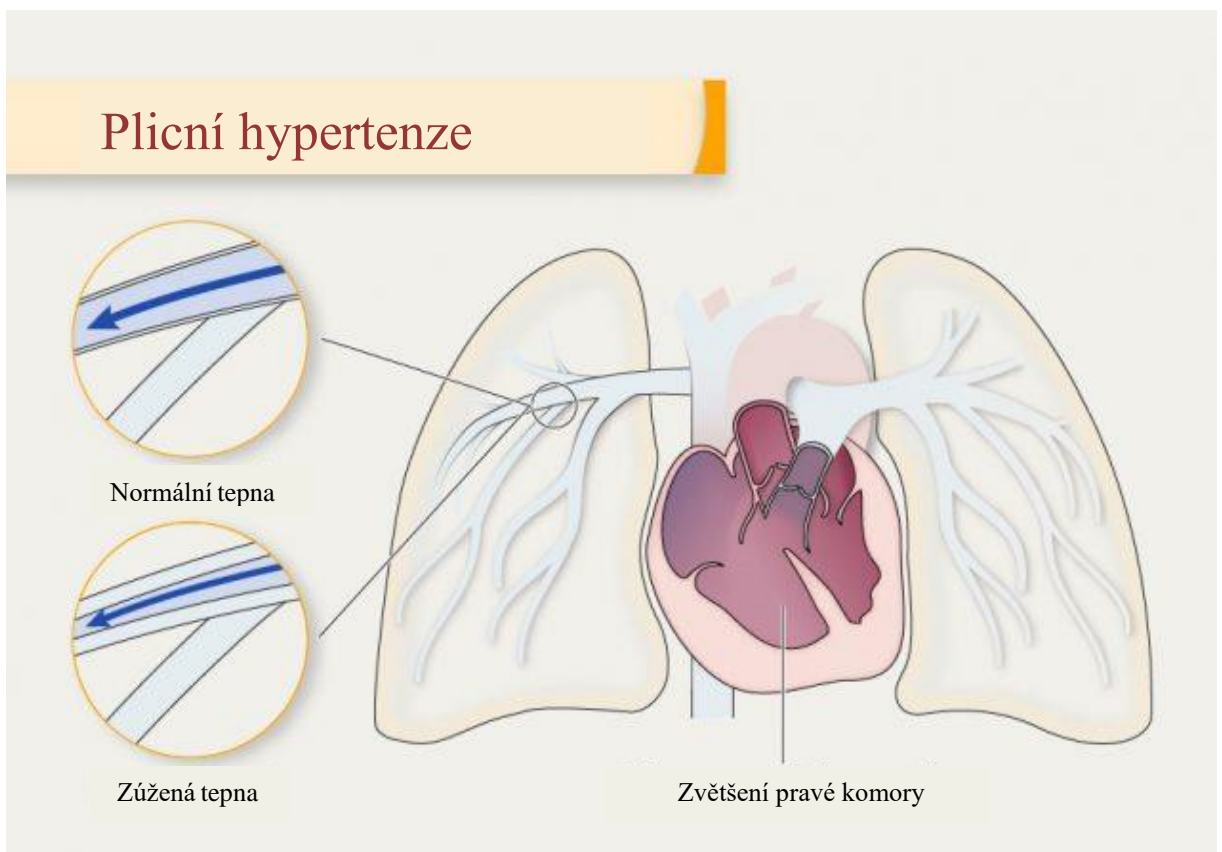
1. plicní hypertenze – charakterizace onemocnění, možnosti léčby. Popis procesů odehrávajících se v tkáni plicních tepen při plicní hypertenzi na molekulární a buněčné úrovni.
2. galektinu-3 – vlastnosti proteinu, úloha ve fibrózách a kardiovaskulárních onemocněních se zaměřením na plicní hypertenzi. Popis známých inhibitorů galektinu-3.

Cílem experimentální části práce bude charakterizovat model plicní hypertenze u potkanů *in vivo* z hlediska exprese vybraných markerů v tkáních. Z potkanů budou izolovány primokultury z plicní tepny a pravé srdeční komory. U primokultur bude stanovena jejich schopnost proliferace, a také exprese vybraných genů na úrovni mRNA a proteinu. Primokultury a potkani budou rovněž využiti pro testování účinku inhibitorů galektinu-3.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Plicní hypertenze

Plicní hypertenze je způsobená zvýšeným krevním tlakem v tepnách vedoucích do plic. Dochází k vývoji zvýšeného množství hladkých svalů v stěně cévy. Za normálních podmínek je tlak krve na této straně srdce a v těchto tepnách nižší než tlak systolický nebo diastolický v srdci, protože krev nemusí cestovat na velkou vzdálenost. Pokud je tlak v plicnici příliš vyšší, než je normální hodnota, tepny v plicích se mohou zúžit, krev neproudí tak, jak má a což způsobuje nižší hladiny kyslíku v krvi (Obrázek 1) [1].



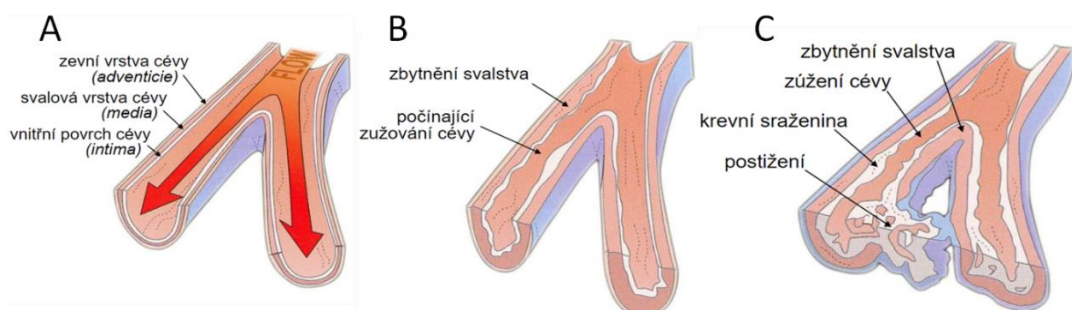
Obrázek 1: Zobrazení plic srdce a tepen vedoucích z pravé komory. Je zde označeno zvětšení pravé komory srdeční a porovnání normální a zúžené plicní tepny. Zúžení plicních tepen vede ke špatnému proudění krve, a to způsobuje malé okysličení krve [1].

Plicní hypertenze se může rozvinout v každém věku, její výskyt se ovšem věkem zvyšuje. Plicní hypertenze je častější u žen, nehispanšských černochů a u osob starších 75 let [1].

2.1.1 Charakterizace onemocnění

Plicní hypertenze je způsobena zvýšeným krevním tlakem v plicnici a plicních arteriích a způsobuje jejich zbytnění. Příčina vzniku plicní hypertenze je většinou kardiovaskulární onemocnění (jako například Levostranné srdeční selhání), ovšem může vzniknout i hypoxií organismu, kdy dochází k vasokonstrikci a je zvýšený tlak na cévní epitel. Dochází k hypertrofii hladkých svalů cév a fibroblastů srdce. Zbytnělé cévy plicnice působí odpor pro pravou komoru srdeční a tím dochází i k jejímu zbytnění. Ve zbytnělých cévách mohou vznikat tromby a způsobit plicní embolii (obrázek 2) [2].

Definicí plicní hypertenze je tlak v plicnici ≥ 25 mm Hg za klidu měřeným při katetrizaci, kdy horní hladina klidového středního tlaku v plicnici je 20 mm Hg. Pacienti s hodnotami mezi 21-24 mm Hg by měli být pečlivě sledováni. I menší zvýšení tlaku může mít prognostický význam u pacientů s onemocněním plicní tkáně [3; 4].



Obrázek 2: A – zdravá tepna s normálním průtokem krve; B – zbytnělá tepna, dochází k jejímu zužování, zvýšení tlaku v plicních cévách a snižování průtoku krve; C – více zbytnělá tepna, vyšší tlak způsobuje další zbytnění svalstva, v těchto místech mohou vznikat krevní sraženiny [2].

2.1.2 Příčiny vzniku

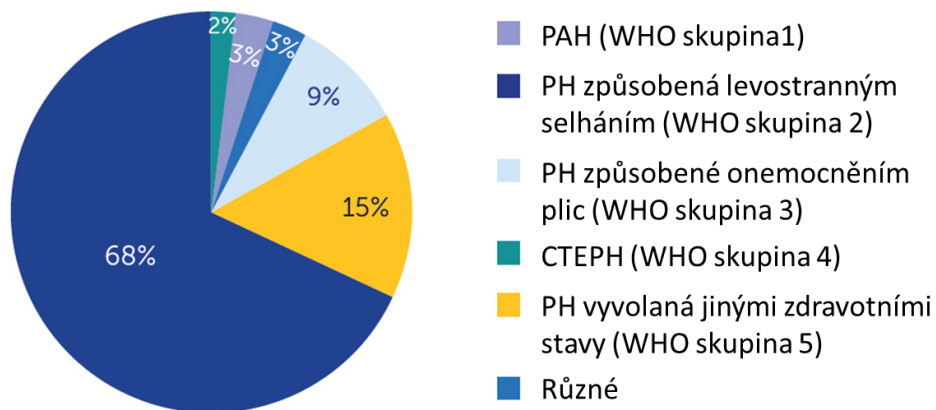
Příčinou plicní hypertenze mohou být některé typy vrozených srdečních chorob, onemocnění pojivové tkáně, onemocnění koronární tkáně, onemocnění jater (cirhóza), krevní sraženiny v plicích a chronická onemocnění plic jako například emfyzém. Důležitou roli zde hraje i

genetika. Plicní hypertenze se může vyskytnout ve spojení s mnoha dalšími onemocněními. Srdeční selhání je u plicní hypertenze běžné [1].

Plicní hypertenze se v závislosti na příčině dělí do pěti skupin (Obrázek 3) na:

1. Plicní arteriální hypertenze
 - a. Idiopatická plicní arteriální hypertenze – vznik z neznáme příčiny
 - b. Dědičná plicní arteriální hypertenze – příčinou je změna genu
 - c. Z příčiny užívány nelegálních látek a určitých drog
 - d. Vrozená srdeční vada
 - e. Jiné stavy (např.: HIV, cirhóza, sklerodermie, lupus, aj.)
2. Plicní hypertenze způsobená levostranným srdečním selháním
 - a. Levostranné srdeční onemocnění (onemocnění mitrální nebo aortální chlopně)
 - b. Selhání levé srdeční komory
3. Plicní hypertenze způsobená onemocněním plic
 - a. Chronické obstrukční plicní onemocnění
 - b. Plicní fibróza
 - c. Obstrukční spánková apnoe
 - d. Dlouhodobé vystavení vysokým nadmořským výškám u lidí s predispozicí pro plicní hypertenzi
4. Plicní hypertenze způsobená chronickými krevními sraženinami
 - a. Chronická tromboembolická plicní hypertenze (CTEPH)
 - b. Jiné poruchy srážlivosti
5. Plicní hypertenze vyvolaná jinými zdravotními stavy
 - a. Poruchy krve (např.: pravá polycytémie, esenciální trombocytémie)
 - b. Zánětlivé poruchy (např.: sarkoidóza, vaskulitida)
 - c. Nemoci ledvin
 - d. Nádory

[5; 2; 6]



Obrázek 3: Koláčový graf procent pacientů s plicní hypertenzí (PH), zařazených do skupin podle WHO. PAH – plicní arteriální hypertenze, CTEPH – chronická tromboembolická plicní hypertenze [6; 7].

2.1.2.1 Eisenmengerův syndrom

Jedná se o typ srdeční vady způsobující plicní hypertenzi. Nejčastěji je způsobená defektem komorového septa, kdy dochází k nesprávnému proudění krve v srdci. Okysličená a neokysličená krev se zde mísí. Krev se pak vrací do plic, místo aby byla rozváděna po těle, a tím zvyšuje tlak v plicních arteriích [5].

2.1.3 Příznaky

V počáteční fázi jsou příznaky společné mnoha dalším zdravotním stavům – např. dýchací potíže, únava. Z toho důvodu dochází často k pozdní diagnostice, dokud se neobjeví závažné příznaky jako závrať, bolest na hrudi, otok kotníků nebo pocit zrychleného srdečního rytmu nebo bušení (palpitace) [1; 5]. Vzácně může plicní hypertenzi charakterizovat hemoptýza, arytmie a Ortnerův syndrom – chrapot (paréza levé hlasivky v důsledku zvětšení levé síně nebo plicních arterií [8]) [9]. Dušnost při námaze se objevuje v ranných stádiích, v pozdějších stádiích pak nakonec dušnost v klidu, špatné okysličení, úzkost a mdloby a může progredovat k pravostrannému srdečnímu selhání [2; 5; 9].

2.1.4 Změny při plicní hypertenzi

2.1.4.1 Morfologické změny – na úrovni buněk

Všechny tepny v těle se skládají ze tří vrstev. Vnitřní vrstva *tunica intima* je tvořena vrstvou hladkého svalstva, která obsahuje jednu vrstvu endoteliálních buněk, zbytek tvoří hladký sval a elastin. Další vrstvou je *tunica media*. Tato vrstva je tvořena velkou vrstvou hladkého

svalstva, aby se mohla céva dilatovat a zužovat. Poslední vrstva je *tunica adventitia*. Spojuje tepny s ostatními tkáněmi v těle, aby se nepohybovaly volně po těle. Tepny musí odolat velkému tlaku krve, kterou dostávají z levé srdeční komory. Plicní tepny jsou odlišné, protože dostávají krev z pravé srdeční komory, tedy krev nemá tak velký tlak a vedou neokysličenou krev [10]. Plicní tepna měří přibližně 5 centimetrů na délku a 2-3 centimetry v průměru. V úrovni obratle T4 se rozděluje na pravou a levou plicní tepnu a dále se dělí na lobární, segmentální a subsegmentální arterie plic, a nakonec na kapiláry, které obklopují bronchy plic [11].

Plicní hypertenze je charakterizována plicní vaskulární rezistencí a tlakovým přetížením pravé strany srdce vedoucí k smrti. Vaskulopatie je u ní identifikována ve všech arteriích plicního oběhu a také různé léze podílející se na zvýšené plicní vaskulární rezistenci mohou ovlivnit různé vrstvy cévní stěny. Cévní remodelace může nastat i v těch nejmenších kapilárách. Hypertrofii a hyperplazii *tunica media* lze nalézt v distálních tepnách spolu s fibrózou *tunica intima* a *tunica adventitia*. Častý je také vývoj plexiformních lézí, které přispívají k zhoršení plicního a bronchiálního oběhu. V menších cévách je běžně pozorována muskularizace, ucpání cév a perivaskulární zánět (u těžších případů plicní hypertenze) [12; 13].

2.1.4.1.1 Remodelace *tunica intima* a plexiformní léze

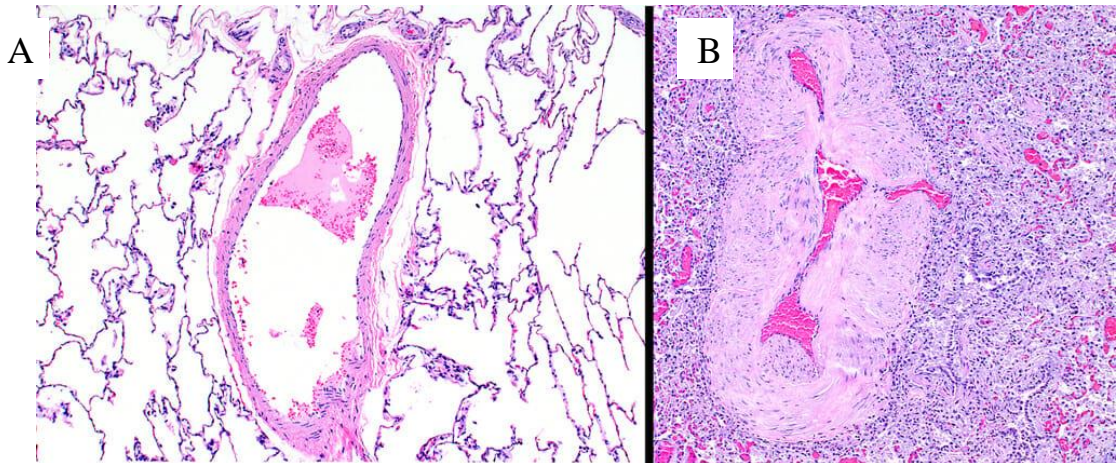
Léze v endoteliální vrstvě *tunica intima* významně přispívají k zvýšení plicní vaskulární rezistence. Charakteristickou změnou v *tunica intima* je její ztlustění v důsledku kumulace kolagenu, matrice bohaté na mucin, fibroblastů, endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva (HSB) [12].

Plexiformní léze jsou dlouhodobým histologickým znakem plicní arteriální hypertenze a mají funkční roli při vaskulární remodelaci jako anastomotické struktury mezi plicním a bronchiálním oběhem. Připomínají struktury podobné glomerulům a obvykle se nacházejí v místech vaskulárního větvení. V těchto strukturách se obvykle nachází T-lymfocyty, monocyty, makrofágy a žírné buňky. Plexiformní léze jsou obvykle pozorovány v pokročilejších stádiích onemocnění. Koncentrické léze mají také vliv na plicní vaskulární rezistenci. Tento typ lézí pochází zejména z remodelovaných plexiformních lézí, ale byly identifikovány také léze obsahující HSB [12; 13; 14].

2.1.4.1.2 Remodelace *tunica media*

Tunica media se skládá hlavně z HSB. Její tloušťka se může zvětšit až o 20 % (Obrázek 4), což zvyšuje plicní vaskulární rezistenci. Ve vaskulární remodelaci hraje klíčovou roli právě

proliferace HSB, která je známkou časného onemocnění. Nejvíce postižené jsou svalnaté tepny a prekapilární arterioly [12; 13; 14].



Obrázek 4: A – zdravá normální plicní tepna, B – tepna postižena plicní hypertenzí s masivním ztluštěním *tunica media* [12].

2.1.4.1.3 Remodelace tunica adventitia

Tunica adventitia je tvořena hlavně fibroblasty včetně imunomodulačních buněk, rezidentních progenitorových buněk, endotelových buněk *vasa vasorum* a adrenergických nervů. Ke ztluštění této vrstvy nedochází tak často. U idiopatické plicní arteriální hypertenze se může zvětšit až o 28 % průměru tepny. K tomu dochází z důvodu ukládání kolagenu. Role této vrstvy v remodelaci cév není jasná, změny v této vrstvě jsou ukazatelem zánětu, který podporuje interakci fibroblastů a makrofágů. Tedy nejenom ztluštění cévní stěny hraje roli v rozvoji plicní hypertenze [12; 13; 14].

2.1.4.2 Molekulární změny

Plicní arterie jsou velmi poddajné a mají nízký odpor a dokážou zapojit i normálně neprokrvené cévy. Udržování nízké plicní vaskulární rezistence je hlavní úlohou plicního endotelu, který moduluje rezistenci prostřednictvím komplexní rovnováhy mezi vazodilatátory (prostacykliny a oxid dusnatý) a vazokonstriktory (endotelin-1, tromboxan A₂, serotonin), inhibitory růstu a mitogeny a antitrombotickými mediátory a protrombotickými determinanty. Poškození nebo dysfunkce endoteliálních buněk je známý iniciační proces při vzniku plicní hypertenze, proto

je u plicní hypertenze snižená syntéza prostacyklinu a oxidu dusnatého (NO) a naopak zvýšené hladiny tromboxanu A₂ a endotelinu-1. Dalšími složkami podněcujícími patologické mechanismy plicního vaskulárního onemocnění jsou aktivace adventiciálních fibroblastů nebo změna složek extracelulární matrix. Tyto procesy vedou k variabilní vazokonstrikci, proliferaci HSB a endoteliálních buněk, remodelaci a trombóze *in situ*. To může představovat základní mechanismy vedoucí k zužování cév, progresivnímu zvýšení plicní vaskulární rezistence a patofyziologickým projevům plicní hypertenze [15].

2.1.4.2.1 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce je známkou mnohostranné nerovnováhy v endoteliální produkci vazokonstriktorů a vazodilatátorů, aktivátorů a inhibitorů růstu a migrace HSB, protrombotických a antitrombotických mediátorů a prozánětlivých a protizánětlivých signálů [16].

Mezi vazodilatátory patří například NO. Jeho snížená dostupnost může být způsobena sníženou expresí endoteliální NOSyntázy, inhibicí její enzymatické aktivity nebo inaktivací NO superoxidovým aniontem [16]. Snížení dostupnosti NO může také souviset s vysokou hladinou arginázy II, která vyvazuje L-arginin, který je substrátem endoteliální NOSyntázy [16; 17]

Prostacyklin patří také mezi vazodilatátory. Stimuluje tvorbu cyklického adenosinmonofosfátu, který inhibuje proliferaci HSB a snižuje agregaci trombocytů. U plicní hypertenze je nedostatek prostacyklinu a jeho syntázy a naopak nadbytek tromboxanu (vasokonstriktor). Se snížením prostacyklinů se rozvíjí závažnější plicní hypertenze [15; 16].

2.1.4.2.2 Hladké svalové buňky

Pro hladké svalové buňky plicních arterií je typická exprese transportéru serotoninu. Jeho zvýšená exprese je spojena se závažností plicní hypertenze. Pacienti s idiopatickou PAH mají v oběhu zvýšené hladiny serotoninu, a to i po transplantaci srdce a plic [16].

U HSB plicní arterie je pro kontrakci, migraci a proliferaci určující koncentrace volného Ca²⁺ v cytosolu. Abnormality v Ca²⁺ a K⁺ kanálech jsou spojené s patologickým plicním vaskulárním tonusem, dysregulací buněčné hemostázy a indukci fibroproliferace. U pacientů s idiopatickou PAH byla pozorována downregulace napětově řízených K⁺ kanálů s následnou depolarizací membrány, což vedlo k otevření napětově řízených Ca²⁺ kanálů a indukci svalové kontrakce. Ca²⁺ signalizace prostřednictvím iontových kanálů s přechodným receptorovým potenciálem hraje důležitou roli u plicní hypertenze, jejich upregulace se vyskytovala u pacientů s idiopatickou PAH a jejich inhibice výrazně snížila proliferaci HSB [16; 18].

Proliferace HSB je závislá na faktorech sekretovaných endoteliálními buňkami. Tato sekrece je zesílena stimulací rodinou proteinů transformující růstový faktor β (TGF- β), jejichž exprese je výrazně zvýšená v plicní tkáni a plazmě pacientů s idiopatickou PAH. Pozorována je také zvýšená koncentrace TGF- β mRNA v HSB plicních cév [19].

2.1.4.2.3 Mutace BMPR2

Kostní morfogenetické proteiny (BMP) jsou největší skupinou rodiny proteinů TGF- β [20]. BMP regulují růst, diferenciaci a apoptózu. Receptor kosterního morfogenetického proteinu typu 2 (BMPR2) iniciuje intracelulární signalizaci jako odpověď na specifické ligandy. Ligandová specifita může mít funkční význam pro tkáňově specifickou povahu BMP signalizace [16]. Mutace BMPR2 byly identifikovány u 23 % pacientů s plicní arteriální hypertenzí. Exprese BMPR2 byla snížena u pacientů s plicní arteriální hypertenzí bez přítomnosti jeho mutace. Mutace BMPR2 produkují zkrácený protein, což vede k snížené regulaci BMP a zvýšené proliferaci HSB [21; 18].

2.1.4.2.4 Extracelulární matrix

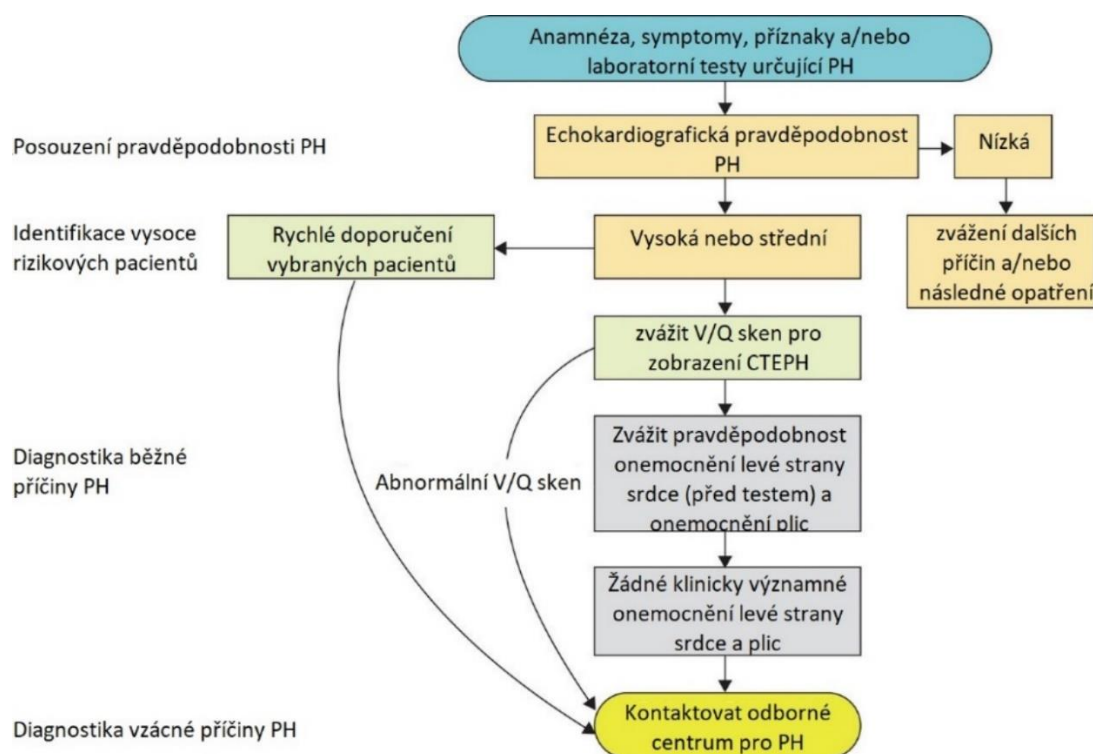
Extracelulární matrix představuje substrát pro tkáňovou morfogenezi a také instruuje téměř všechny formy chování buněk na biofyzikální a biochemické úrovni. Hlavní kvalitativní a kvantitativní změny v extracelulární matrix podtrhují řadu patologií včetně rakoviny a plicní hypertenze. Vzájemné vztahy mezi extracelulární matrix a signálními drahami jsou velmi významné. Spojení mezi integriny, ligandy extracelulární matrix a mikrofilamenty na bázi aktinu uvnitř buňky jsou nepřímé a jsou spojeny na bázi skafoldních proteinů jako je talin nebo α -aktin. Tyto skelety aktivují a zapojují četné signální molekuly včetně členů rodiny fokálních adhezních kináz a Src kináz, které pak fosforylují své substráty [16].

Plicní hypertenze je charakterizována buněčnými změnami ve stěnách plicních arterií. Je zde přítomný zvýšený počet buněk exprimujících α -hladkosvalový aktin. Buňky exprimující α -hladkosvalový aktin, které se akumulují ve vaskulárních lézích, jsou odvozeny od vaskulárních HSB, adventiciálních fibroblastů nebo buněk s možností přechodu do mezenchymálního fenotypu nebo fenotypu podobného HSB. Buňky přecházející do mezenchymálního fenotypu začnou exprimovat mezenchymální antigeny včetně α -hladkosvalového aktinu, fibronektinu a kolagenu I a III a vykazují proliferativní a migrační fenotyp. Endoteliálně-mezenchymový přechod je typický v embriogenezi, ale v dospělosti k němu může docházet v reakci na chronické zánětlivé podmínky jako je dlouhodobé vystavení zánětlivým cytokinům [16].

Cirkulující mezenchymální buňky, jako jsou fibrocyty, mohou být zdrojem akumulace myofibroblastů během reparačních procesů plic. Fibrocyty exprimují antigeny hematopoetických kmenových buněk, markery monocytární linie a produkty fibroblastů, produkují složky extracelulární matrix a také enzymy, které ji modifikují. Mohou se diferencovat na myofibroblasty. K diferenciaci na myofibroblasty dochází tam, kde je zvýšená produkce TGF- β 1 nebo endotelinu. S akumulací fibrocytů dochází k fibrogenzi tkáně nebo vaskulární remodelaci, což vede k neschopnosti dilatace cévní stěny v reakci na běžné vazodilatační stimuly [16].

2.1.5 Diagnostika

Diagnostika je závislá na nemocném, kdy navštíví svého lékaře s obtížemi. Lékař postupuje dle vyšetřovacího programu, kdy podrobně provede fyzikální vyšetření, udělá rozbor krve, EKG, rentgenové vyšetření srdce a plic, vyšetření funkční zdatnosti plic (spirometrie) až po echokardiografické vyšetření (ultrazvuk srdce). Ultrazvukem srdce lékař může poprvé pojmout podezření na plicní hypertenzi, lze zde popsat anatomické rozměry oddílů srdce (Obrázek 5). Jinak se využívají zobrazovací metody jako magnetická rezonance, spirometrie, 3D zobrazovací metody – zkoumá se tloušťka svalstva cév a srdce [2; 22].



Obrázek 5: Algoritmus diagnostiky plicní hypertenze (PH) a jejích příčin: třídění urgentních stavů a diagnostika běžných stavů. V/Q – ventilace/perfuze, CTEPH – chronická tromboembolická PH [9].

2.1.6 Léčba

Plicní hypertenzi není možné vyléčit. Léčba je hlavně symptomatická. Je tedy mnoho různých typů léčby, které pomáhají pouze zmírnit příznaky a zpomalit progresi onemocnění. Léčba je závislá na typu a závažnosti onemocnění. Plicní hypertenze by měla být léčena rychle a specificky. Do léčby patří rehabilitace a aktivní fyzioterapie, které pomáhají zlepšovat zátěžovou kapacitu a srdeční funkce (např.: oxygenoterapie). K léčbě plicní hypertenze se většinou využívá kombinace léčiv. Z počátku mohou být pacienti léčeni vysokými titry antagonistů vápníku, ale tato léčba lze použít pouze u méně než 5 % pacientů. Nově diagnostikovaní pacienti s nízkým nebo se středním rizikem mají léčbu zahrnující antagonistu endotelového receptoru (ERA) s inhibitory fosfodisesterázy-5 (PDE-5) nebo stimulant rozpustné guanylátcyklázy (sGCS). Pacienti s vysokým rizikem jsou léčeni trojkombinací ERA s inhibitory PDE-5 nebo sGCS a intravenózně podávaným analogem prostacyklinu. Pro některé typy plicní hypertenze tyto léky nejsou vhodné a mohly by pacientovi i ublížit, a tak je preferovanou léčbou chirurgický zákrok jako plicní endarterektomie (odstranění aterosklerotického plátu), případně transplantace plic [22; 23].

2.1.7 Rizikové faktory, komplikace a prevence plicní hypertenze

2.1.7.1 Rizikové faktory

Obecně zvyšuje riziko plicní hypertenze stárnutí. Ovšem plicní arteriální hypertenze z nejasných příčin se vyskytuje častěji u mladších osob. Mezi další faktory zvyšující riziko plicní hypertenze patří rodinná anamnéza, nadváha, poruchy srážení krve, vystavení azbestu, vrozená srdeční vada, pobyt delší dobu ve vysoké nadmořské výšce, užívání některých léků nebo drog [5].

2.1.7.2 Komplikace

Mezi komplikace plicní hypertenze patří pravostranné zatížení srdce a srdeční selhání, kde dochází k zvětšení pravé srdeční komory (na základě většího odporu plicních arterií) aby srdce bylo schopné pumpovat větší objem krve. Tyto změny však zatěžují srdce, a nakonec dochází k jeho selhání. K dalším komplikacím patří krevní sraženiny, arytmie, krvácení do plic a komplikace v těhotenství, kdy dochází k ohrožení vyvíjejícího se dítěte [5].

2.1.7.3 Prevence

Ne všem typům plicní hypertenze lze zabránit, ovšem můžeme ji předcházet přechodem na zdravý životní styl. Vhodná je také korekce vysokého krevního tlaku, ischemické choroby srdeční, chronického onemocnění jater a onemocnění plic, které ji mohou způsobit [1].

2.2 Galektin-3

Galektiny spadají do rodiny lektinů, jež jsou schopné specificky vázat β -galaktosidy prostřednictvím evolučně konzervovaných sekvenčních elementů domény rozpoznávající sacharidy (CDR). Na základě počtu CRD a jejich uspořádání se dělí do 3 skupin – prototypová skupina, skupina tandemových repetit a chimérická skupina, kam jako jediný patří galektin-3. Galektin-3 obsahuje jednu CRD a neobvykle dlouhou N-terminální doménou bohatou na prolin a glycin. Každá z těchto domén má odlišné vlastnosti. N-terminální doména nemá velkou sacharidy vázající aktivitu, ale je nezbytná pro jeho biologickou funkci a je zodpovědná za tvorbu pentamerů. Dále je jí připisována sekrece galektinu-3 extracelulárně. To má na svědomí počáteční 12 aminokyselinová sekvence N-terminální domény, zvaná také jako malá N-terminální doména (NH₂). Delece prvních 11 aminokyselin této sekvence blokuje sekreci galektinu-3, zatím co mutace serinu ovlivňuje antiapoptotickou signální aktivitu galektinu-3. CRD má přibližně 130 aminokyselin, které tvoří globulární strukturu, a obsahuje vazebné místo pro sacharidy. Galektin-3 má prodloužené vazebné místo a je tak schopen vázat i delší oligosacharidy jako například poly-laktosaminoglykany, ale nejvíce preferovaným ligandem je

N-acetyllaktosamin. Galektin-3 je však schopen interagovat i s neglykosylovanými molekulami prostřednictvím interakce protein-protein [24; 25].

Galektin-3 je kódován genem LGALS3, který se nachází na chromozomu 14, na lokusu q22.3. Tento gen má 6 exonů o velikosti 10-12kb a 5 intronů o velikost 17 kb [24; 26].

2.2.1 Biologické funkce galektinu-3

Vlastnosti galektinu-3 se odvíjí od toho, zda je intracelulární či extracelulární. Intracelulárně se galektin-3 nachází u jádra nebo v cytoplasmě. Jeho lokalizace je dána různými faktory jako je typ buňky, stav proliferace buňky kultivační podmínky a neoplastická progresse a transformace. Jeho biologická funkce je dána lokalizací v buňce. Extracelulárně se galektin-3 může nacházet na površích buněk, v extracelulární matrix a biologických tekutinách. Extracelulární galektin-3 zprostředkovává buněčnou adhezi, aktivaci, signalizaci a je součástí exosomů dendritických buněk. Má četné autokrinní a parakrinní účinky a působí jako chemoatraktant a tímto způsobem ovlivňuje různé biologické procesy jako je udržování buněčné hemostázy, imunitní reakce, organogenezi a angiogenezi a nádorovou invazi a metastázi [24; 27].

2.2.1.1 Cytoplasmatický a nukleární galektin-3

Cytoplasmatický galektin-3 se zapojuje do různých buněčných procesů díky svým ligandům. Účastní se regulace buněčné proliferace, diferenciaci, přežití a smrti. Přes CRD se váže s molekulou Bcl-2, která je represorem apoptózy, a tak se může podílet na antiapoptotické aktivitě. Dále se váže s CD95 (člen rodiny receptorů smrti) nebo s proteinem nucling (regulátor buněčné smrti) přes CRD [24; 27; 28].

Proč je galektin-3 lokalizován v jádře není přesně známo, ovšem jeho exprese koreluje s buněčnou proliferací a bylo zjištěno, že je začleněn do spliceosomu a usnadňuje sestřih pre-mRNA [24; 27; 28].

2.2.1.2 Extracelulární galektin-3

2.2.1.2.1 Adheze, aktivace, morfogeneze a chemoatrakce

Buněčnou adhezi galektin-3 ovlivňuje přes jeho multivalentní vlastnosti a schopnost vázat povrchové buněčné glykoproteiny a glykosylované složky extracelulární matrix. Galektin-3 se váže s lamininem, fibronectinem, hensinem, elastinem, kolagenem IV a dalšími. Galektin-3 může buněčnou adhezi potencovat nebo naopak inhibovat interakci buněk s proteiny extracelulární matrix. Galektin-3 například podporuje adhezi neutrofilů k laminu a endoteliálním buňkám [24; 29; 30].

Galektin-3 se zapojuje do aktivace buněk pomocí zesíťování povrchových proteinů jeho vazbou s jejich glykanovými částmi a tím spouští signální transdukční kaskády, které indukují biochemické reakce v buňkách. Nejčastěji se galektin-3 účastní aktivace buněk účastnících se imunitní reakce [24; 31].

Galektin-3 také indukuje morfogenezi a angiogenezi endoteliálních buněk. Hybnost endoteliálních buněk a tvorbu mnohobuněčné sítě galektin-3 zprostředkovává tvorbou komplexu s transmembránovým chondroitin sulfátovým proteoglykanem. Rovněž aktivuje srdeční fibroblasty. Jeho přítomnost může zesíťováním prodloužit či supresorovat buněčnou aktivitu [24; 29; 31].

Galektin-3 se může také chovat jako chemoatraktant pro monocyty a makrofágy. Indukuje jejich migraci. Vyšší koncentrace galektinu-3 působí chemotakticky (1 μM), v nižších koncentracích (10-100 nM) vyvolává chemokinezi (zvýšené nesměrové pohyby buněk) [24; 30].

2.2.1.2.2 Proliferace, diferenciaci a apoptóza

Proliferace a diferenciaci buněk je doprovázena zvýšenou či sníženou expresí galektinu-3. Galektin-3 stimuluje proliferaci mezenchymálních buněk a fibroblastů a stimuluje syntézu DNA. Může působit i naopak jako negativní regulátor buněčného růstu například u proliferace kostní dřeně. Jako modulátor buněčné diferenciaci se vyskytuje například u diferenciaci B-lymfocytů na plasmatické buňky [24].

Galektin-3 může působit jak proapoptoticky, tak i antiapoptoticky. Obecně platí, že intracelulární galektin-3 se spíše chová antiapoptoticky a buňky chrání před apoptózou. Pro antiapoptotický účinek galektinu-3 je nezbytná jeho sekvence aminokyselin NWGR v CRD, které se také vyskytují v doméně BH1 rodiny Bcl-2. Extracelulární Galektin-3 se chová proapoptoticky. Jeho nadměrně zvýšená exprese může potencovat apoptózu indukující ligand příbuzný s tumor nekrotizujícím faktorem [24; 29; 30].

2.2.1.2.3 Imunitní odpověď

Galektin-3 je silný prozánětlivý signál. Některé buňky vylučují galektin-3 ve zvýšené míře jako odpověď na různé zánětlivé podněty. Při sekreci nebo externalizaci může galektin-3 ovlivnit zánětlivé buňky parakrinně nebo autokrinně. Podporuje respirační vzplanutí v neutrofilech a monocitech a indukuje uvolňování mediátorů žírnými buňkami, podporuje adhezi neutrofilů k lamininu a endoteliálním buňkám a působí jako chemoatraktant pro monocyty a makrofágy. Galektin-3 je také schopen rozpoznat glykokonjugáty na patogenech. Prozánětlivá reakce byla

prokázána i u astmatu a byly identifikovány autoprotilátky proti galektinu-3 u autoimunitních a zánětlivých poruch [24; 32].

2.2.2 Fibrózy a kardiovaskulární onemocnění

Galektin-3 se váže na různé substráty, včetně signálních molekul (Ras, regulátorů transkripce, receptorů buněčného povrchu (integriny, receptor TGF- β) a proteinů extracelulární matrix, k ovlivnění různých procesů jako jsou proliferace, migrace, apoptóza, fibróza a zánět [33] a hraje tak významnou roli v mnoha různých klinických stavech a onemocněních [34].

2.2.2.1 Fibrózy

Tkáňová fibróza je důsledkem přerůstání tkáně, ztvrdnutím nebo zjizvením. Je charakterizována nadměrnou akumulací extracelulární matrix včetně kolagenu. Je to konečný výsledek chronických zánětlivých reakcí vyvolaných různými podněty jako jsou přetrvávající infekce, autoimunitní reakce, alergické reakce, chemické podráždění, radiace a poškození tkáně. V konečném důsledku to může vést k nadměrnému jizvení tkáně, poškození orgánů, a dokonce i k jejich selhání [34].

Expresí galektinu-3 je zvýšena u pacientů s fibrózou postihující různé tkáně, jako jsou játra, ledviny, plíce, srdce nebo také nervový systém. Při fibróze je galektin-3 identifikován jako spojení mezi makrofágy, fibroblasty a profibrotickým fenotypem [34]. Vaskulární fibróza je spojena s renin-angiotenzin-aldosteronovým systémem, oxidačním stresem, zánětlivými cytokiny a nerovnováhou sekrece cytokinů pocházejících z endotelu. Nadměrná exprese galektinu-3 zvyšuje syntézu kolagenu I v HSB a tím dochází k hypertrofii, zánětu a fibróze [35].

Srdeční fibróza je spojená s vyšším rizikem srdečního selhání. Galektin-3 indukuje proliferaci srdečních fibroblastů, produkci kolagenu a expresi cyklinu D1. Galektin-3 aktivuje makrofágy spolu s indukcí proliferace buněk produkujících extracelulární matrix [35].

Plicní fibróza je charakterizovaná nadměrnou depozicí extracelulární matrix a podílí se na abnormálním nárůstu zánětlivých buněk, proliferaci fibroblastů a jejich přeměnu na myofibroblasty, prokoagulační signalizací a oxidačním stresem. Z toho důvodu je přiřazena patogenní role molekule TGF- β . Galektin-3 je zapojený do její signalizace a indukuje produkci interleukinu-8 u makrofágů. Galektin-3 má klíčovou roli v zánětu a migraci buněk u plicní fibrózy [35].

2.2.2.2 Kardiiovaskulární onemocnění

Galektin-3 je v srdci exprimován na nízké úrovni, ale za patofyziologických podmínek se může jeho hladina měnit. Mechanismus účinku galektinu-3 na myokard není zcela objasněn, může se jednat o jev u dysfunkce levé srdeční komory způsobené různými etiologiemi. Jakmile dojde k nadměrné expresi galektinu-3 v myokardu, dochází k aktivaci fibroblastů a makrofágů s následnou indukci fibrózy, produkcí jizev a remodelaci srdce [34].

Plasmatické a srdeční hladiny galektinu-3 odrážejí srdeční zánětlivé reakce a lze ho tedy považovat za možný marker srdečního zánětu i fibrózy. Zvýšené hladiny galektinu-3 v plasmě jsou spojeny s nepříznivými dlouhodobými výsledky pacientů jak u akutních onemocnění, tak u chronických srdečních selhání. Galektin-3 se může podílet na strukturální remodelaci síní, která zahrnuje progresivní fibrogenezi u pacientů s fibrilací síní a jeho vyšší hladiny se výrazně častěji objevovali u pacientů s recidivou fibrilace síní. Hladina galektinu-3 je také zvýšená u pacientů s vrozenou srdeční vadou [36].

2.2.2.3 Plicní hypertenze

Chronická hypoxie zvyšuje hypertrofii i systolický tlak pravé srdeční komory. Hladiny galektinu-3 v oběhu korelují s dysfunkcí pravé srdeční komory. Jeho exprese je upregulována v plicních tkáních a podílí se na zvýšené proliferaci buněk a fibróze plicních arterií. To se děje pravděpodobně prostřednictvím signálních drah TGF- β [37].

Expresí galektinu-3 je zvýšena především u hyperproliferativních HSB. To koreluje se zvýšením četných buněčných markerů proliferace. Schopnost destičkového růstového faktoru stimulovat proliferaci HSB plicních arterií je závislá na zvýšené expresi galektinu-3. Dále k rozvoji plicní hypertenze přispívají reaktivní formy kyslíku (ROS), jejichž tvorbu podporuje galektin-3. Zvýšený intra- a extracelulární galektin-3 může přispět k produkci superoxidu a upregulaci oxidů dusíku (NOX), které přispívají k vaskulární remodelaci. Je prokázán vztah mezi galektinem-3 a oxidačním stresem v cévách, kde je galektin-3 exprimován na úrovni mRNA i proteinu. Plicní hypertenze je doprovázena zvýšeným zánětem cév a náborem zánětlivých buněk, zvýšenou tuhostí plicních arterií, zvýšeným ukládáním extracelulární matrix a zvýšeným počtem fibroblastů [37; 38].

2.2.3 Inhibitory galektinu-3

Protože CRD galektinu-3 se účastní mnoha reakcí, které mohou mít patologický účinek, inhibice galektinu-3 je téměř výhradně zaměřena tímto směrem. CRD může být inhibováno pomocí sacharidů, které soutěží o vazebné místo nebo je alostericky modulují, tak aby se CRD

stalo neschopným vázat se na ligandy. Inhibitory na bázi heparinu, zkrácený galektin-3 a další byly hodnoceny pouze u rakoviny [39].

Mezi inhibitory na bázi sacharidů patří jednoduché cukry jako LacNAc nebo laktóza. Tyto nízkomolekulární látky však nelze použít jako léky, protože se v organismu příliš rychle vstřebávají a metabolizují. Další inhibitory jsou galaktomannany a modifikovaný citrusový pektin. Mají poločas rozpadu 12-18 hodin, jsou větší než LacNAc a mají dobré klinické využití. Thiodigalaktosidy jsou nedávno objevené cukerné deriváty zacílené na jiná vazebná místa CRD. Thiodigalaktosid TD139 je schválen na léčbu idiopatické plicní fibrózy. Inhibitory na bázi heparinu jsou sulfátové nebo acetylované deriváty heparinu. Nebyla u nich detekována žádná antikoagulační aktivita. Tyto léky vypadají jako slibné terapeutické činidlo, ovšem byly zatím testovány na modelech metastáz *in vivo*. Neoglykokonjugáty slouží jako vysokoafinitní ligandy a mohou být modulovány pro dosažení selektivity vůči galektinu-3 oproti jiným galektinům. Galektin-3 terminálně zkrácený o NH₂ byl využit při terapii nádorů souvisejících s galektinem-3. Tato úprava galektinu-3 se zdá být slibnou látkou s nízkou toxicitou [39].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Metodika výzkumné (praktické) části

3.1.1 Použité přístroje a materiály

3.1.1.1 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Schoeller, Česká republika)
- Cell counter Vi-CELL-XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga Hermle Z 300 (biotech, Česká republika)
- Centrifuga minispin (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga multispin MSC-600 (Biosan, Litva)
- Centrifuga Sartorius 3-18K (Sigma, Německo)
- Homogenizátor Precellys Evolution (Bertin technologies, Francie)
- Komora s tekutým dusíkem (cryoAL, Francie)
- Komorová lednice 4 °C (Electrolux, Švédsko)
- Konfokální mikroskop Andor Dragonfly 503 s kamerou Zyla 4.2 PLUS sCMOS, zvětšení objektivu x63 (Andor Technology Ltd., Belfast, UK)
- Laminární box cytosafe-N (Faster, Itálie)
- Laminární box na chemikálie (Merci, Česká republika)
- Laminární box na PCR – PCR cabinet (Esco Lifesciences, Singapur)
- Lightcycler 480 (Roche, Švýcarsko)
- Mikroskop IX71 s digitální kamerou DP71 a s fluorescenční lampou, zvětšení objektivu 10x (Olympus, Japonsko)
- Mrazák -80 °C (Sanyo, Japonsko)
- Multi-mode reader Synergy HT (BioTek, USA)
- Nanodrop OneC (Thermo scientific, USA)
- PlateFuge microplate microcentrifuge (Benchmark scientific, USA)
- Průtokový cytometr NovoCyte (ACEA Biosciences Inc, USA)
- T personal thermocycler Biometra (AnalytikJena, Německo)
- Termostat 37 °C (Thermo Forma, USA)
- Vodní lázeň 37 °C (Isotemp – Fisher Scientific, USA)
- Vortex MS 3 basic (IKA, Německo)

3.1.1.2 Použité materiály

- 5xHOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Estonsko)
- 12jamková destička (TPP, Švýcarsko)

- 96jamková destička na PCR LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white Cat. no.: 04729692001 (Roche, Švýcarsko)
- 96jamková destička se skleněným dnem (96well glass bottom plate, Cellvis, P96-1.5H-N, USA)
- 96jamková destička se dnem do tvaru v (microplate 96 well, PP, V-bottom, 651201, Greiner bio-one, Rakousko)
- 96jamková destička (TPP, Švýcarsko)
- ANIMAL TISSUE RNA PURIFICATION kit (Norgen biotek, Kanada)
- Bovinní sérový albumin 1% (Sigma-Aldrich, USA)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Thermo Fisher Scientific, USA)
- DMSO – Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- FBS (fetální bovinní sérum, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Hoechst 33258 (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Německo)
- Inhibitor 1 – DVP34C1 (oddělení biotransformací MBÚ)
- Inhibitor 2 – DVP34C2 (oddělení biotransformací MBÚ)
- Inhibitor 3 – DVP26C3 (oddělení biotransformací MBÚ)
- Inhibitor 4 – DVP26C4 (oddělení biotransformací MBÚ)
- Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Německo)
- Paraformaldehyd 4% (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfáty, Sigma-Aldrich, USA)
- Phalloidine rhodamin (66 μ M, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Primární protilátka proti α -aktinu – mouse, tj. připravená na myších (6,1mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- Primární protilátka proti CD31 – rabbit, tj. připravená na králících, konjugovaná s alexa fluor 488 (1 μ g/ μ l; Bioss antibodies)
- Primární protilátka proti CD90 – rabbit, tj. připravená na králících, konjugovaná s alexa fluor 647 (1 μ g/ μ l; Bioss antibodies)
- Primární protilátka proti desminu – rabbit, tj. připravená na králících (0,4 mg/ml, Abcam, UK)
- Primární protilátka proti galektinu-3 – rabbit, tj. připravená na králících (1mg/ml, Sigma-Aldrich, Německo)
- Primární protilátka proti kalponinu – rabbit, tj. připravená na králících (0,1 mg/ml, Abcam, UK)
- Primární protilátka proti kolagenu 1 – mouse, tj. připravena na myších (5,9 mg/ml, Sigma-Aldrich, Německo)
- Primární protilátka proti těžkému řetězci myosinu 11 – rabbit, tj. připravená na králících (Abcam, UK)

- Primární protilátka proti vimentinu – mouse, tj. připravená na myších (1mg/ml, Exbio, Česká republika)
- Primární protilátka proti vinkulinu – rabbit, tj. připravená na králících (9,1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Německo)
- Propidium jodid (200 µg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- Random primer mix (New England Biolabs, USA)
- Roztok trypsin-EDTA (0,5 g trypsin a 0,2 g EDTA v 1 l PBS, Sigma-Aldrich, USA)
- Sekundární protilátka proti králíčímu antigenu (rabbit) konjugovaná s Alexou 546 (2 mg/ml; Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sekundární protilátka proti králíčímu antigenu (rabbit) konjugovaná s Alexou 488 (2 mg/ml; Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sekundární protilátka proti myšímu antigenu (mouse) konjugovaná s Alexou 488 (2 mg/ml; Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sonda pro gen ACTA2 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sonda pro gen ACTB (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sonda pro gen B2M (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sonda pro gen COL1A1 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sonda pro gen CNN1 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sonda pro gen LGALS3 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sonda pro gen MYH11 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Texas Red C2-maleimide (1 ng/ml, Thermo Fisher Scientific, USA)
- TOTAL RNA PURIFICATION PLUS MIKRO kit (Norgen biotek, Kanada)
- Triton X-100 (Serva, Německo)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Experimentální model plicní hypertenze

Skupina potkanů byla vystavena přerušované hypobarické hypoxii po dobu 5 týdnů v uměle vytvořených horských podmínkách (parciální tlak kyslíku 8,6 kPa, odpovídající přibližně 7000 m. n. m.) pro vytvoření hypoxické plicní hypertenze. Kontrolní skupina potkanů byla po stejnou dobu vystavena normoxickým podmínkám (parciální tlak kyslíku 20,7 kPa, odpovídající 200 m. n. m.). V každé skupině bylo 5 potkanů. Potkanům byly po usmrcení odebrány plicní arterie, pravé srdeční komory a plíce. Orgány a tkáně z potkanů byly poskytnuty oddělením Vývojové kardiologie FGÚ. Podrobnější popis celého postupu je popsán ve studii Kolář et al., 2007 [40].

3.1.3 Izolace, expanze a kryoprezervace hladkých svalových buněk plicních arterií potkanů

Odebrané plicní arterie byly zbaveny krevních sraženin promytím v PBS. Tkáň byla poté mechanicky rozmělněna na malé fragmenty o velikosti přibližně 0,5 mm³, a následně inkubována v roztoku 0,1% kolagenázy (w/v) v médiu DMEM bez bovinního séra (FBS). Po mechanickém a enzymatickém rozrušení tkáně byla tkáň převedena v DMEM s 10% FBS na kultivační lahve (75 cm²). Tímto procesem se buňky uvolnily a migrovaly z rozrušené tkáně na povrch kultivační lahve. Po dosažení konfluence byly buňky trypsinizovány a pasážovány. Buňky byly zamrazeny v druhé pasáži v DMEM s 20% FBS a 10% DMSO a uchovány v tekutém dusíku v kryozkumavkách. Buňky byly získány z 5 potkanů vystavených hypoxickým podmínkám a 5 potkanů vystavených normoxickým podmínkám. Buňky z potkanů vystavených hypoxickým podmínkám (dále označovány jako hypoxické buňky) byly expandovány *in vitro* v hypoxickém prostředí (2.5 % O₂, 5% CO₂, 37 °C); buňky z kontrolních potkanů vystavených pouze normoxii (dále označovány jako normoxické buňky) byly expandovány v normoxickém termostatu (21% O₂, 5% CO₂, 37 °C).

3.1.4 Kultivace buněk

Práce s buněčnými kulturami probíhala vždy sterilně v laminárním boxu. Buňky v kryozkumavkách byly rozmrazeny vložením do vody o teplotě cca 37°C. Buňky z kryozkumavek byly přeneseny pomocí pipetmana do centrifugační zkumavky. Ve zkumavce bylo 5 ml DMEM média s 10 % FBS. Buňky byly centrifugovány při 300 g po dobu 5 minut. Došlo k oddělení buněk (pelety) od média (supernatantu). Médium bylo odlito a buňky byly resuspendovány v menším objemu média. Poté bylo doplněno médium do objemu 4 ml. Celý objem byl přenesen na kultivační lahev s povrchem 75 cm², kde bylo předem napipetováno 10 ml média s 10 % FBS. Buňky byly kultivovány do dosažení konfluence. V pokusech byla použita 2.-3. pasáž buněk.

3.1.5 Trypsinizace buněk – příprava buněk pro další pokusy

U buněk byla zjištěna konfluence pozorováním povrchu kultivační lahve ve světelném mikroskopu. Po dosažení konfluence bylo buňkám odsáto médium. Poté byly promyty 6 ml PBS (fosfátový pufr). Po promytí byly buňky enzymaticky uvolněny z kultivačního povrchu pomocí 2 ml trypsinu s EDTA (0,5 g trypsinu, 0,2 g EDTA v 1 l PBS) přibližně 2 minuty. Poklepem na lahev bylo přispěno k uvolnění buněk od povrchu kultivační lahve. Pomocí mikroskopu bylo ověřeno, zda došlo k uvolnění buněk z povrchu (buňky – kulaté, přelévají se). Na lahev bylo napipetováno 8,5 ml DMEM s 10 % FBS. FBS inhibuje proteolytickou aktivitu

trypsinu. Médiem byly smyty buňky z lahve a láhev byla suspenzí s buňkami několikrát opláchnuta. Suspenze buněk byla přenesena do centrifugační zkumavky. Zde byla suspenze několikrát promíchána pomocí pipety. Po promíchání bylo odebráno 0,5 ml suspenze do kyvety pro změření celkového počtu buněk v suspenzi (viz kapitola 4.6). Zbýlých 10 ml buněk v centrifugační zkumavce bylo centrifugováno při 300 g po dobu 5 minut. Centrifugací došlo k oddělení supernatantu a buněk v peletě. Supernatant byl odlit. Buňky byly resuspendovány v malém objemu média a byly naředěny na potřebný počet buněk na ml pro další experimenty.

3.1.6 Automatické stanovení počtu buněk a jejich viability pomocí cell counteru Vi-CELL-XR Cell Viability Analyzer od firmy Beckman Coulter

Pomocí přístroje cell counter Vi-CELL-XR Cell Viability Analyzer byl stanoven celkový počet buněk na mililitr a jejich viabilita. Stanovení probíhají automaticky. Do stroje byla vložena kyveta s 0,5 ml suspenzí buněk v médiu. Viabilitu přístroj stanovuje pomocí trypanové modři, která barví mrtvé buňky. Buňky byly spočítány v 50 zorných polích a výsledná koncentrace přepočítána na mililitr. Množství buněk na kultivační lahvi (75 cm²) se při dosažení konfluencce pohybovalo mezi 2 až 4 miliony. Viabilita buněk se pohybovala okolo 90 %.

3.1.7 Stanovení adheze buněk

Po trypsinizaci (viz kapitola 4.5) byly nasazeny na 96jamkové kultivační destičky (TPP, Švýcarsko) normoxické hladké svalové buňky (HSB) v koncentraci 3 tisíce buněk na jamku v 200 µl média. Bylo nasazeno 12 jamek od obou primokultur pro každý časový interval. Polovina jamek byla v médiu s 10% FBS a druhá polovina v médiu s 20% FBS. Buňky byly inkubovány v normoxických i hypoxických podmínkách v termostatu při 37 °C. Buňky byly fixovány ledovým 70% ethanolem 10 minut při pokojové teplotě v intervalech 2, 4, 6 a 24 hodin po nasazení. Po fixaci byly buňky promyty PBS. Poté byly buňky obarveny (viz kapitola 4.10.3).

3.1.8 Stanovení konfluencce s ohledem na násadu buněk pro následné použití do pokusů

Po trypsinizaci (viz kapitola 4.5) byly nasazeny na 96jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) normoxické HSB v různých koncentracích. Koncentrace násady byly 1, 3, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 a 20 tisíc buněk na jamku v 200 µl média DMEM s 10% FS. Od každé koncentrace bylo nasazeno 6 jamek na destičku. Buňky byly inkubovány v normoxických podmínkách. Jeden den po nasazení bylo buňkám odsáto médium a byly fixovány a permeabilizovány ledovým

70% ethanolem 10 minut při pokojové teplotě. Po fixaci byly buňky promyty PBS. Poté byly buňky obarveny (viz kapitola 4.10.3).

3.1.9 Stanovení proliferace buněk a jejich doby zdvojení

Po trypsinizaci (viz kapitola 4.5) byly nasazeny na 96jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) normoxické HSB v různých koncentracích. Koncentrace násady byly 1, 3, 5, 10 a 15 tisíc buněk na jamku. Od každé koncentrace bylo nasazeno 6 jamek na destičku pro každý časový interval. Destičky byly inkubovány za normoxických podmínek v termostatu při 37 °C. Buňky byly fixovány ledovým 70% ethanolem 10 minut při pokojové teplotě v intervalech 1., 3. a 7. den po nasazení. Po fixaci byly buňky promyty PBS. Poté byly buňky obarveny (viz kapitola 4.10.3). Pro výpočet doby zdvojení buněk (čas, za který se počet buněk zdvojnásobí) byl využit vzorec:

$$\text{doba zdvojení} = \frac{\text{doba trvání} \cdot \ln(2)}{\ln\left(\frac{\text{konečná koncentrace}}{\text{počáteční koncentrace}}\right)}$$

3.1.10 Imunofluorescenční barvení buněk markerů hladkých svalových buněk a galektinu-3

Po trypsinizaci (viz kapitola 4.5) byly buňky nasazeny na 96jamkové destičky se skleněným dnem (96well glass bottom plate, Cellvis, USA) v množství 5 tisíc buněk na jamku v 200 μ l DMEM s 10 % FBS. Poté byly buňky inkubovány v termostatu při 37°C, 5% CO₂. Po 24 hodinách byly buňky promyty PBS a následně fixovány pomocí 4% paraformaldehydu. Po fixaci byly buňky opět promyty PBS. Dále byly buňky inkubovány s 1% Albuminem s 0,1% Tritonem 20 minut při pokojové teplotě. Albumin obsazuje nespecifická vazebná místa. Triton slouží jako detergent pro permeabilizaci buněčné membrány. Po inkubaci byly buňky promyty PBS a dále byly inkubovány s 1% Tween-20 v PBS 20 minut při pokojové teplotě. Tween rovněž slouží jako detergent k permeabilizaci buněčné membrány. Buňky po inkubaci byly promyty PBS.

Pro barvení markerů hladkých svalových buněk byly permeabilizované buňky inkubovány s protilátkami proti anti α -aktin – mouse (ředěna 400x), anti myosin – rabbit (ředěna 400x), anti kalponin – rabbit (ředěna 400x), anti kolagen I – mouse (ředěna 2000x) anti vimentin – mouse (ředěna 500x), anti desmin – (ředěna 100x), anti vinkulin – mouse (ředěna 400x), a anti galektin-3 rabbit (ředěna 400x) v PBS ve tmě při pokojové teplotě po dobu 3 hodin. Buňky byly následně promyty PBS (200 μ l/jamka). Dále byly buňky inkubovány se sekundárními protilátkami konjugovanými s fluorescenční barvou. Byly využity protilátky anti mouse

konjugovaná s Alexou 488 – zelená (ředěna 400x), anti rabbit konjugovaná s Alexou 546 – červená (ředěna 400x), anti rabbit konjugovaná s Alexou 488 (ředěna 400x) v PBS ve tmě při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Pro barvení F-aktinového cytoskeletu byl k sekundárním protilátkám přimíchán také phalloidin-rhodamin na barvení cytoskeletu (ředěn 500x) do kombinace s vinkulinem, protilátka proti CD90 konjugovaná s Alexou 633 (ředěna 100x) do kombinaci s α -aktinem a Hoechst 33258 na barvení jader (ředěn 200x) ke všem kombinacím. Buňky byly nakonec promyty znovu PBS. Do jamek byl následně přidán PBS, aby buňky nevyschly. Buňky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem: zelený α -aktin, červený calponin, červený myosin, zelený vimentin, červený desmin, zelený galektin-3, zelený transgelin, zelený vinkulin, červený phalloidin-rhodamin, červená CD90 a modrá jádra.

3.1.11 Fluorescenční barvení buněk fixovaných ledovým 70% ethanolem pro počítání jader a měření ploch buněk

Buňky fixované ledovým 70% ethanolem byly obarveny pomocí barviva Hoechst 33258 (ředěn 200x) na jádra a Texas Red C2-maleimidem (ředěn 100x) na plochy buněk při pokojové teplotě po dobu 30 minut. C2 maleimid je organická sloučenina, která se váže na cysteinové zbytky v proteinech buněk. Konjugací C2 maleimidu s fluorescenční značkou Texas Red lze dosáhnout obarvení a následné vizualizace plochy a tvaru buňky na kultivační desce. Po 30 minutách byly buňky promyty a bylo k nim napipetováno 200 μ l PSB, aby buňky nevyschly. Poté byly buňky pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem: plocha buňky červená, jádra modrá.

3.1.12 Průkaz markerů hladkých svalových buněk pomocí průtokové cytometrie

Po trypsinizaci (viz kapitola 4.5) bylo buňkám odsáto veškeré médium a buňky byly rozředěny 1% albuminem v PBS na koncentraci 2 miliony buněk na 1 mililitr. Albumin byl použit pro vyvázání nespecifických vazebných míst. 100 μ l buněčné suspenze bylo napipetováno do 96jamkové destičky (microplate 96 well, PP, V-bottom, 651201, Greiner bio-one, Rakousko). Do buněčné suspenze s albuminem byla přidána konjugovaná protilátka proti CD31 a CD90. Buňky byly inkubovány s konjugovanými protilátkami na ledu po dobu 30 minut. Po 30 minutách byly buňky stočeny při 500 g po dobu 5 minut. Poté bylo odstraněno médium a buňky byly 2x promyty 1% albuminem v PBS. Po napipetování albuminu byly buňky promíchány na vortexu. Mezi každým promytím byly buňky centrifugovány 5 minut při 500 g. Po posledním promytí bylo k buňkám napipetováno 150 μ l 1% albuminu v PBS a přidán propidium jodid (ředěný 40x) pro obarvení jader mrtvých buněk. S propidium jodidem byly buňky inkubovány 5-10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Poté byly buňky opět promíchány na vortexu a analyzovány na průtokovém cytometru.

3.1.13 Exprese genů v tkáních a adherentních buňkách

3.1.13.1 Izolace RNA z tkání pomocí ANIMAL TISSUE RNA PURIFICATION kitu

Tkáň přibližně o hmotnosti 30 mg byla vložena do zkumavky a k ní bylo přidáno 300 μ l pufru (součást kitu). Zkumavky s tkáněmi byly mechanicky homogenizovány pomocí keramických kuliček v homogenizátoru. Vzorky byly následně přefiltrovány přes filtrační kolonky (0,22 μ m, PVDF) centrifugací při 10000 g po dobu 2 minut pro odstranění zbytků tkáně. Přefiltrovaný lyzát byl přepipetován do RNase-free mikrozskumavky. K lyzátu bylo přidáno 210 μ l 96% ethanolu a vzorek byl promíchán. Lyzát s ethanolem byl převeden na kolonku vázající mRNA (pod ní je sběrná zkumavka) a poté byla soustava centrifugována 1 min při 6000 g. Bylo zkontrolováno, zda prošel celý vzorek zkumavkou. Sběrná zkumavky byla vyliata. Kolonka byla promyta 400 μ l promývacího roztoku (součást kitu) a centrifugována 2 min 14000 g. Byla dána nová sběrná zkumavka. Na kolonku bylo napipetováno 100 μ l enzymového inkubačního pufru A a 15 μ l DNasy I. Kolonka byla centrifugována 1 minutu při 14000 g. Celý prošlý objem byl znovu napipetován na kolonku a byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Poté byla kolonka 2x promyta promývacím roztokem při 14000 g 1 minutu. poté byly kolonky centrifugovány 2 minuty při 14000 g pro odstranění zbylého promývacího roztoku (do sucha). Sběrná zkumavka byla vyměněna za eluční, 1,7 ml velkou zkumavku. Na kolonku bylo napipetováno 50 μ l RNase free vody. Vzorky byly centrifugovány 2 min při 200 g a poté následovala centrifugace 1 min při 14000 g. Bylo zkontrolováno, zda prošel celý objem vody kolonkou. Kolonka byla vyhozena a ve zkumavce zbyl vzorek s nukleovou kyselinou. Takto purifikované RNA byla změřena čistota a koncentrace (viz kapitola 4.12.3) a byla skladována v -80 °C [41].

3.1.13.2 Izolace RNA z adherentních buněk pomocí TOTAL RNA PURIFICATION PLUS MIKRO kitu

Z 12jamkových destiček (TPP, Švýcarsko) s normoxickými nebo hypoxickými buňkami z pěti potkanů (násada 50 tisíc buněk/jamka, kultivace po dobu 6 dní) bylo odstraněno médium. Buňky byly promyty 500 μ l PBS. Po odsátí PBS bylo k buňkám přidáno 350 μ l RL pufru (směs β -merkaptoethanolu (10 μ l/ml) s RL pufrem). Buňky byly inkubovány s RL pufrem po dobu 5 minut s občasným promícháním. Po 5 minutách byl lyzát přepipetován do kolonky vázající gDNA pod níž byla sběrná zkumavka. Tato kolonka slouží k odstranění gDNA a získání čisté RNA. Kolonka s lyzátem byla centrifugována při 14 000 g 1 minutu. Po centrifugaci byla kolonka odstraněna a k tekutině, která prošla kolonkou, bylo přidáno 210 μ l 96% ethanolu. Směs byla promíchána na vortexu. Po promíchání byla směs přepipetována na kolonku pro

záchyt RNA opatřenou zkumavkou pro záchyt tekutiny. Kolonky byly centrifugovány při 6000 g 2 minuty. Po centrifugaci byla vylita sběrná zkumavka. Poté byla kolonka 3x promyta 400 µl Wash solution A. kolonky byly pokaždé centrifugovány při 14 000 g 1 minutu. Po každé centrifugaci byly vylity sběrné zkumavky. Po posledním promytí byly kolonky ještě jednou centrifugovány do sucha při 14 000 g 2 minuty. Poté bylo na kolonky napipetováno 25 µl RNA-free vody pro eluci RNA. Pod kolonky byly dány eluční zkumavky. Kolonky byly centrifugovány 2 minuty při 200 g a poté ještě 1 minutu při 14 000 g. Takto purifikované RNA byla změřena čistota a koncentrace (viz kapitola 4.12.3) a byla skladována v -80 °C [42].

3.1.13.3 Měření čistoty a koncentrace RNA ve vzorku

Po izolaci RNA byla změřena její koncentrace a čistota spektrofotometricky pomocí přístroje nanodrop. Jsou zde měřeny absorbance v 230 (organické látky), 260 (NK) a 280 (proteiny) nm vlnové délky. Jejich poměr určuje čistotu nukleové kyseliny, kdy oba poměry by se měly pohybovat v rozmezí 1,8-2,1. Poměr 260/280 nižší než 1,8 značí kontaminaci proteiny, 260/230 nižší než 1,8 značí kontaminaci organickými složkami. RNA poté byla skladována v -80 °C.

3.1.13.4 Přepis mRNA do cDNA

RNA byla přepsána do cDNA pomocí Omniscript Reverse Transcription Kit a s využitím random primer mixu. cDNA je stabilnější a je potřeba pro PCR. Pro přepis byl namíchán master mix – na jeden vzorek (reakci) bylo použito 2 µl RT pufru, 1 µl reverzní transkriptázy, 2 µl random primer mixu, 1,6 µl dNTP a 3,4 µl vody. Vzorek byl ředěn k mastermixu tak, aby v reakci bylo 750 ng RNA z tkáně a 500 ng RNA z adherentních buněk. Vzorek byl ředěn vodou do celkového objemu 10 µl. Výsledný objem reakce byl 20 µl. Master mix a poté i vzorky byly napipetovány do stripů. Následně pomocí termocykleru byla provedena reverzní transkripce při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

3.1.13.5 Měření exprese genů pomocí kvantitativní PCR na přístroji LIGHT CYCLER 480

Z cDNA byla pomocí PCR zjištěna exprese genů v dané tkáni nebo v buněčných primokulturách. Byl namíchán master mix – na jeden vzorek (reakci) přišlo 6,5 µl vody, 2 µl 5xHOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus a 0,5 µl sondy (pro daný gen). Do PCR destičky (LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white Cat. no.: 04729692001, Roche, Švýcarsko) byl pipetován master mix a vzorek v poměru 9:1. Celkový objem reakce byl 10 µl. Ze vzorků jednotlivých tkání nebo buněčných primokultur byl namíchán také směsný vzorek, který sloužil pro vytvoření kalibračních křivek pro jednotlivé geny a také jako kalibrátor pro porovnání dat

mezi jednotlivými deskami. Po napipetování byla deska zakryta fólií, zcentrifugována a byla provedena PCR pomocí analyzátoru light cycler 480. Teplotní program byl 1x cyklus preinkubace při 50 °C po dobu 2 minut. Dále navazovala 1x denaturace při 95 °C po dobu 10 minut. Poté pokračovalo 45 cyklů amplifikace s teplotami 95 °C po dobu 15 sekund a 60 °C po dobu 1 minuty. Posledním krokem je chlazení na teplotu 37 °C. Proces trvá asi 1 hodinu a 40 minut. Koncentrace genu ve vzorku byla zjištěna výpočtem z rovnice pro kalibrační křivky. Směs vzorků byla naředěna čtyřkovou řadou (1x, 4x, 16x, 64x, 256x, 1024x). Z ní byla vytvořena kalibrační křivka. Pomocí rovnice křivky byla spočítána koncentrace vzorku a poté byla porovnána exprese v tkáni nebo buněčné kultuře s kontrolním vzorkem. V tkáních a v buněčných kulturách byla detekována exprese genů ACTA2, CNN1, MYH11, COL1A1, LGALS3. Jako referenční geny byly použity pro tkáň B2M a pro buněčné kultury ACTB.

3.1.14 Inkubace buněk s inhibitory galektinu-3

3.1.14.1 Inhibitory galektinu-3

Inhibitory galektinu-3 byly připraveny a poskytnuty oddělením Biotransformací MBÚ. Molekulová struktura inhibitorů byla na bázi modifikovaných oligosacharidů vázaných na polyoxazolinové nosiče. Jejich přibližná molekulová hmotnost byla 12 kDa.

3.1.14.2 Vliv inhibitorů na proliferaci buněk

Po trypsinizaci (viz kapitola 4.5) byly nasazeny na 96jamkovou destičku normoxické a hypoxické HSB o koncentraci 5 tisíc buněk na jamku v 200 µl DMEM s 10% FBS. Buňky byly inkubovány 1 den v termostatu s 37 °C v normoxických (normoxické HSB) nebo hypoxických (hypoxické HSB) podmínkách. Po 24 hodinách inkubace, kdy buňky nasedly, byly buňky promyty PBS. K buňkám bylo následně přidáno čerstvé médium DMEM s 0,5% FBS a s inhibitory v koncentracích 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 µM. Jako kontrola sloužily buňky bez přídavku inhibitorů. Buňky byly fixovány 1. a 3. den po přídavku inhibitorů 70% EtOH 10 minut při pokojové teplotě. Buňkám byla obarvena jádra Hoechstem 33528, která byla následně spočítána v programu imageJ.

3.1.15 Mikroskopie, analýza a zpracování mikrofotografií

Fluorescenčně barvené vzorky byly pozorovány pomocí mikroskopu Olympus IX71 s digitální kamerou DP71 a konfokálního mikroskopu Andor Dragonfly 503 s kamerou Zyla 4.2 PLUS sCMOS a objektivem HC PL HC PL APO 63x/ 1.20 W CORR CS2. Fotografie byly snímány v programu cellSens Standard a dále upraveny v programu ImageJ. Fotografie jader a ploch byly analyzovány také v programu ImageJ.

3.1.16 Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování dat byl využit program SigmaPlot. Pro analýzu byla využita metoda One-Way ANOVA. Byl použit Holm-Šidákův test. Hladina významnosti p byla $\leq 0,05$. Statistické metody byly využity na výsledky získané ze stanovení adheze a růstu buněk a na výsledky exprese genů v hladkých svalových buňkách a tkáních.

3.2 Výsledky

3.2.1 Charakterizace normoxické primokultury pro další pokusy

3.2.1.1 Stanovení adheze hladkosvalových primokultur získaných z plicní arterie potkana

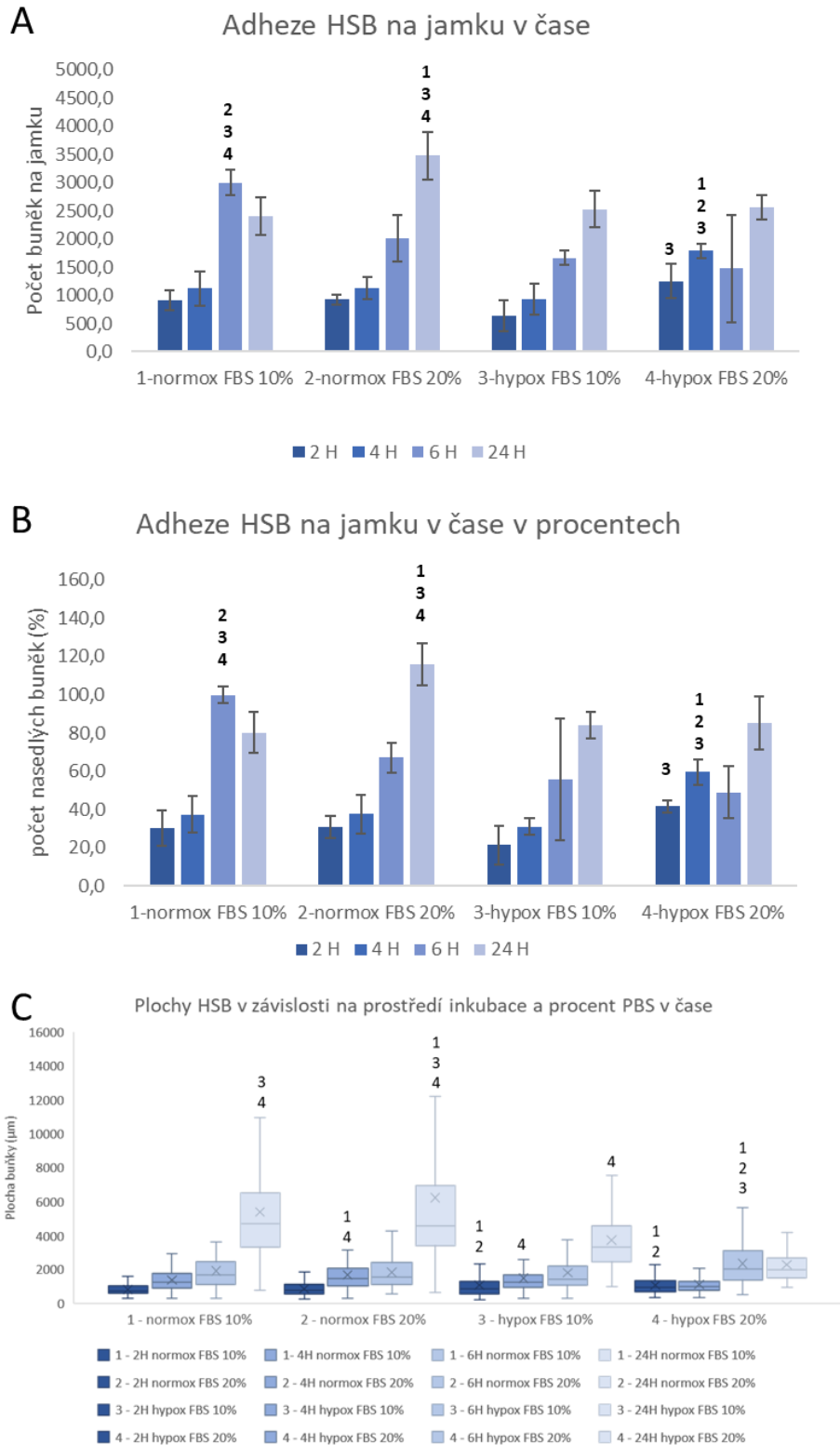
U primokultur byla nejprve měřena jejich schopnost adheze na povrch 96jamkové destičky. Normoxické buňky (pouze z jednoho potkana) byly s DMEM s 10% nebo 20% FBS inkubovány v termostatu s 37°C za normoxických (21% O₂) nebo hypoxických (2.5% O₂) podmínek a fixovány v intervalu 2, 4, 6 a 24 hodin. V jednotlivých časových intervalech byl zkoumán procentuální poměr buněk nasedlých na dno kultivační jamky z celkové počáteční násady a také plocha, kterou buňky zaujímají.

Na obrázku 6 můžeme vidět porovnání rychlosti nasedání normoxických buněk s ohledem na médium s 10% nebo 20% FBS a normoxické nebo hypoxické podmínky inkubace. Je patrné, že při 24hodinové inkubaci je na povrch jamky nasedlých více jak 80 % buněk z celkové násady 3000 buněk na jamku. Již za 6 hodin je na jamku nasedlých více jak 50 % buněk z celkové násady. U buněk v hypoxii není patrný rozdíl v počtu adherovaných buněk po 24 hodinách v závislosti na procentech FBS v médiu, ovšem buňky v médiu s 20% FBS nasedají rychleji. Buňky v normoxii naopak nasedají přibližně stejně rychle, nezávisle na procentech séra v médiu, ale po 24 hodinách je u buněk v médiu s 20% FBS patrné, že již dochází k jejich dělení a proliferovaci (procento nasedlých buněk přesahovalo přibližně 120% z počáteční násady).

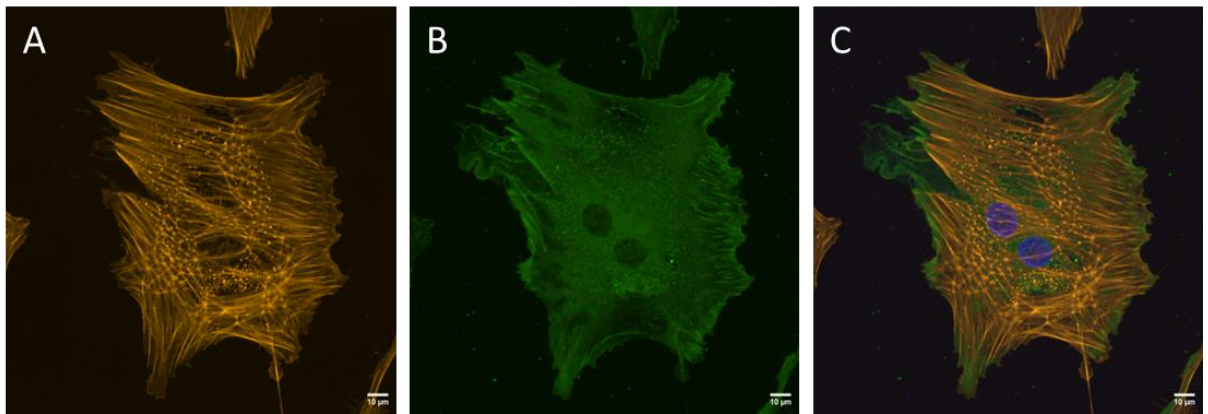
Dále byly porovnány plochy buněk, kdy ve 2 hodinách byly buňky v hypoxii větší než buňky v normoxii bez ohledu na obsah FBS v médiu. Ve 4 hodinách byly větší buňky v normoxii s 20% FBS v médiu oproti buňkám v normoxii s 10% FBS a buňkám v hypoxii s 20% FBS. Buňky v hypoxii s 10% FBS byly větší než buňky v hypoxii s 20% FBS. V 6 hodinách byly výrazně větší buňky v hypoxii s 20% FBS oproti buňkám v normoxii bez ohledu na obsah FBS a buňkám v hypoxii s 10% FBS. Ve 24 hodinách byly největší buňky v normoxii s 20% FBS, za nimi byly buňky v normoxii s 10% FBS pak buňky v hypoxii s 10% FBS a buňky v hypoxii s 20% FBS byly nejmenší.

Z těchto výsledků můžeme soudit, že k adhezi téměř všech buněk z počáteční násady dochází až po 24 hodinách. V tomto časovém intervalu dochází také k jejich největšímu rozptýlení na jamce. Zároveň je patrné, že zvýšená koncentrace séra (20%) nemá výrazně pozitivní vliv na adhezi a rozptýlení buněk. Umístění buněk do hypoxických podmínek může mít na rozptýlení buněk mírně negativní vliv.

Na obrázku 7 je zobrazen faloidinem obarvený F-aktinový cytoskelet buňky a fokální adheze (vinkulin). Fokální adheze jsou místa, kde je buňka přichycena ke dnu destičky. Z fokálních adhezí vychází F-aktinový cytoskelet buňky.



Obrázek 6: Normoxické hladké svalové buňky inkubované v DMEM s 10% a 20% FBS v hypoxických a normoxických podmínkách. V jednotlivých časových intervalech byl spočítán počet buněk na jamku (A) a následně přepočítán na procenta nasadilých buněk z původní koncentrace násady (B). Dále byla spočítána průměrná plocha buňky (C) pomocí programu imageJ. Průměr ± směrodatná odchylka z šesti jamek (A, B). Krabicový graf zobrazující medián plochy buněk (čára uvnitř krabice), průměr (značený křížkem) a 5. a 95. percentil (okraje úsečky) vypočítaný alespoň z 50 buněk. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. 1, 2, 3, 4 - vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s ostatními vzorky ve stejném časovém intervalu.

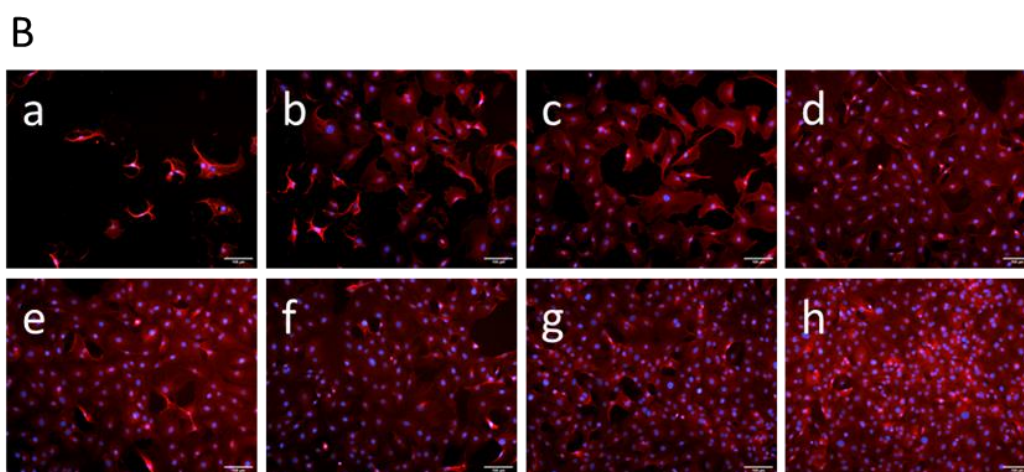
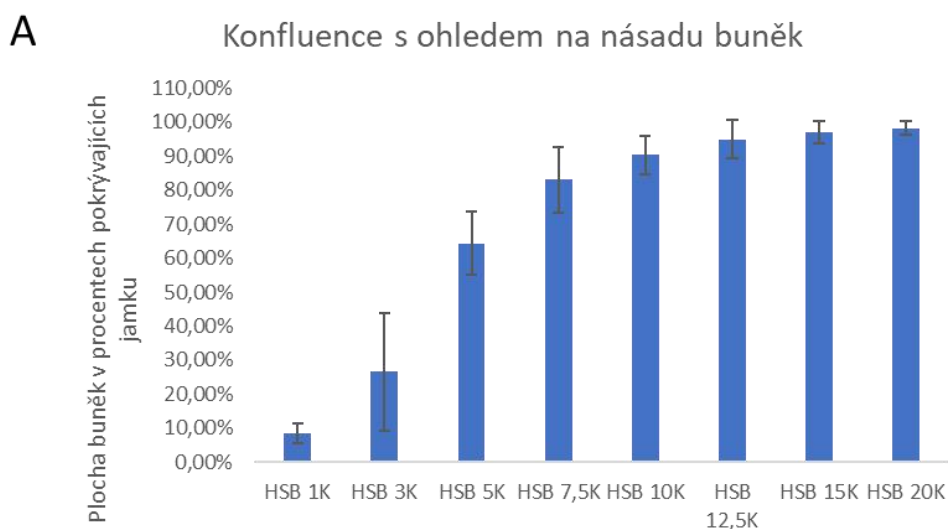


Obrázek 7: Imunofluorescenční barvení normoxických hladkých svalových buněk. V buněčných kulturách byl vizualizován F-aktinový cytoskelet pomocí faloidinu konjugovaného s rhodaminem (A – žlutá) a protilátkou proti vinkulinu (B – zelená) znázorňující fokální adheze. Kompozice obou barevných kanálů + modře znázorněná jádra obarvená Hoechstem 33258 (C). Měřítka 10 μm .

3.2.1.2 Stanovení konfluence hladkosvalových primokultur získaných z plicní arterie potkana

Dále bylo u normoxické primokultury zjišťováno, jaká násada je potřeba pro pokrytí celé jamky buňkami, tj. při jakém počtu buněk na jamce dosáhne buněčná kultura 100% konfluence. Tento údaj je potřebný pro pokusy, ve kterých je cílem sledovat proliferaci buněk za různých podmínek. Pokud by byla pro tyto pokusy zvolena příliš vysoká násada buněk na jamku, buňky by při dosažení 100% konfluence neměly prostor pro další růst. Na 96jamkovou destičku byly nasazeny buňky v koncentracích násady 1, 3, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 a 20 tisíc na jamku v DMEM s 10% FBS a inkubovány v termostatu s 37 °C. Po 24 hodinách byly buňky fixovány a obarveny TexasRed C2-maleimidem na plochy buněk a barvivem Hoechst 33258 na jádra.

Z obrázku 8 je patrné, že ideální koncentrace násady buněk na pokusy je 5 tisíc buněk na jamku. Nižší koncentrace nepokrývají rovnoměrně jamku a vyšší koncentrace vytváří na jamce jednolitý útvar a buňky nemají již kam dále růst. Při násadě 5 tisíc buněk na jamku jsou buňky rovnoměrně rozmístěny na jamce a zároveň mají dostatek prostoru pro proliferaci, buňky se neodlupují.



Obrázek 8: A – hladké svalové buňky inkubované v DMEM s 10% FBS normoxických podmínkách s různou koncentrací násady buněk na jamku. U buněk byla manuálně spočítána plocha buněk v jamce pomocí programu imageJ a následně přepočítána na procenta pokrývající dno jamky. Průměr \pm směrodatná odchylka z šesti jamek. B – Imunofluorescenční barvení hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkana vystavených normoxii. V buněčných kulturách byla obarvena plocha buněk pomocí Texas Red C2-maleimidu a jádra Hoechstem 33258. a – násada 1k buněk na jamku, b – násada 3k buněk na jamku, c – násada 5k buněk na jamku, d – násada 7,5k buněk na jamku, e – násada 10k buněk na jamku, f – násada 12,5k buněk na jamku, g – násada 15k buněk na jamku, h – násada 20k buněk na jamku. Měřítko 100 μ m.

3.2.1.3 Stanovení proliferace a doby zdvojení buněk hladkosvalových primokultur získaných z plicní arterie potkana

V tomto experimentu byla u normoxické primokultury (pouze z jednoho potkana) stanovena jejich proliferace při různých koncentracích násady buněk a následně vypočítána doba zdvojení ze vzorce:

$$\text{doba zdvojení} = \frac{\text{doba trvání} \cdot \ln(2)}{\ln\left(\frac{\text{konečná koncentrace}}{\text{počáteční koncentrace}}\right)}$$

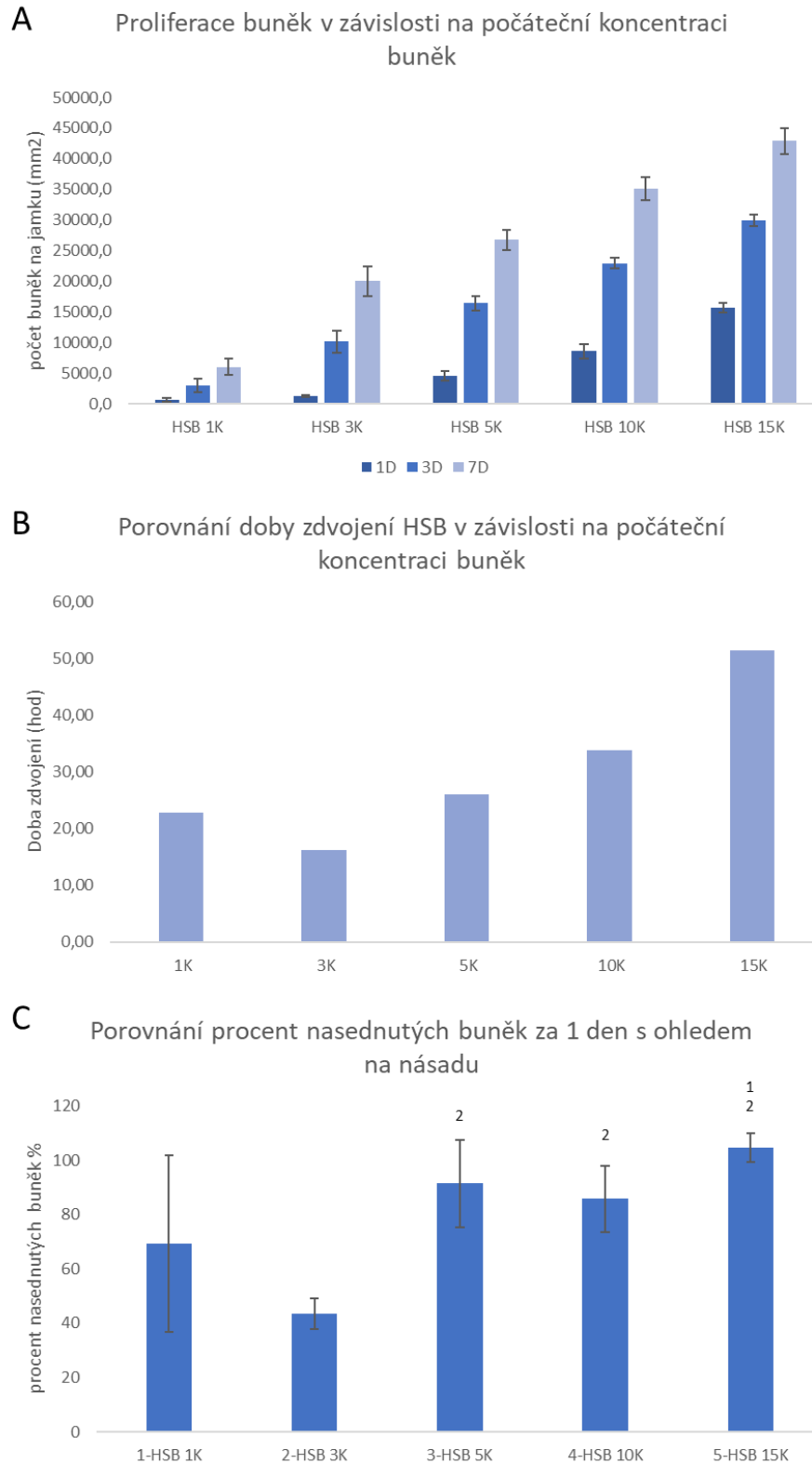
Na 96jamkovou destičku byly nasazeny normoxické buňky s koncentrací násady 1, 3, 5, 10 a 15 tisíc buněk na jamku. Buňky byly inkubovány 1, 3 a 7 dní v termostatu s 37 °C. Po době inkubace byly buňky fixovány a jádra obarvena pomocí Hoechst 33258. Počty buněk byly určeny počítáním jader v programu ImageJ.

Z obrázku 9A je patrné, že k největšímu procentuálnímu nárůstu počtu buněk dochází mezi časovými intervaly 1. a 3. den po nasazení. Nejvýznamnější nárůst ve srovnání s počáteční násadou je patrný u počtů 1, 3 a 5 tisíc buněk na jamku. U vyšších množství 10 a 15 tisíc buněk není nárůst tak vysoký, protože buňky již v těchto počtech dosahují 100% konfluence a nemají dostatek prostoru pro růst.

Doba zdvojení byla vypočítána z počtu buněk 1. a 3. den po nasazení. Nejrychleji buňky rostly v koncentraci 3 tisíce buněk na jamku. Se zvyšující se koncentrací násady buněk se také zvyšuje jejich čas zdvojení, což je způsobeno nedostatkem prostoru v jamce pro další růst buněk.

Dále bylo porovnáno, kolik procent buněk z násady zůstane přichyceno na jamku za jeden den. Hodnoty byly porovnány mezi sebou a nad 90 % nasedlých buněk se pohybovaly v množství násady 5–15 tisíc. V koncentraci 1 a 3 tisíc buněk na jamku bylo procento nasedlých buněk nízké a pohybovalo se kolem 70%, respektive 50% buněk z původní násady.

Pro další pokusy porovnávající proliferaci buněk za různých podmínek byla nakonec vybrána násada 5 tisíc buněk na jamku. Při této násadě je buněčná kultura v jamce 1 den po nasazení zhruba v 60% konfluenci, dochází k nasednutí přibližně 90% buněk a populace vykazuje relativně nízkou hodnotu doby zdvojení (26h).



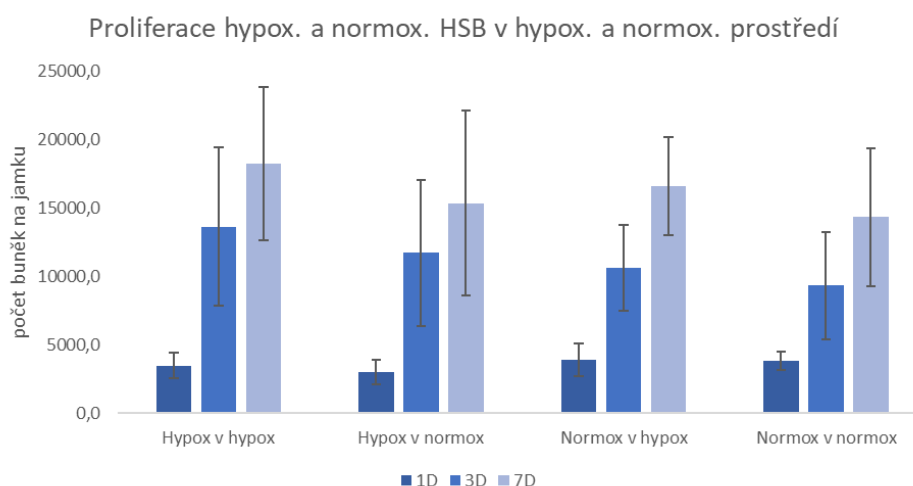
Obrázek 9: Normoxické hladké svalové buňky inkubované v DMEM s 10% FBS v normoxických podmínkách s různou koncentrací násady buněk na jamku. U buněk byl manuálně spočítán počet buněk na jamku (A) pomocí programu imageJ a z těchto dat následně vypočítána doba zdvojení buněk v dané koncentraci násady (B). Bylo také porovnáno kolik procent buněk nasedlo za první den inkubace z celkové násady (C). Průměr ± směrodatná odchylka z šesti jamek. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. 1, 2- vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s ostatními vzorky ve stejném časovém intervalu.

3.2.2 Porovnání normoxických a hypoxických buněk

3.2.2.1 Proliferace normoxických a hypoxických buněk v závislosti na prostředí inkubace

Z pěti potkanů vystavených normoxii a pěti potkanů vystavených hypoxii, u nichž se rozvinula hypertenze, byly odebrány plicní arterie a z nich izolovány buněčné primokultury. Cílem dalšího pokusu bylo porovnat vlastnosti normoxických a hypoxických buněčných kultur z hlediska jejich proliferace jak v normoxických (21% O₂), tak v hypoxických (2.5% O₂) podmínkách *in vitro*. Hypoxické i normoxické buňky (z pěti potkanů v každé skupině) byly nasazeny na 96jamkové kultivační desky v hustotě 5 tisíc buněk/jamka v 200 μl DMEM s 10% FBS. Buňky byly následně inkubovány v normoxii i hypoxii pro porovnání rychlosti proliferace.

Z grafu na obrázku 10 je patrný mírně zvýšený počet buněk v jednotlivých časových intervalech u hypoxických buněk kultivovaných v hypoxii ve srovnání s normoxickými buňkami v normoxii. Je zajímavé, že počet buněk se v případě umístění normoxických buněk do hypoxie mírně zvýší (v porovnání s normoxickými buňkami v normoxii), naopak u hypoxických buněk v normoxii dojde k poklesu počtu buněk (ve srovnání s hypoxickými buňkami v hypoxii). Zmíněné rozdíly ovšem nejsou statisticky významně odlišné.



Obrázek 10: Normoxické a hypoxické hladké svalové buňky inkubované v DMEM s 10% FBS v normoxických a hypoxických podmínkách. U buněk byl manuálně spočítán počet buněk na jamku pomocí programu imageJ. Průměr ± směrodatná odchylka z buněčných primokultur z pěti potkanů. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. Nebyla detekována žádná statisticky významná odlišnost mezi skupinami ve stejném časovém intervalu.

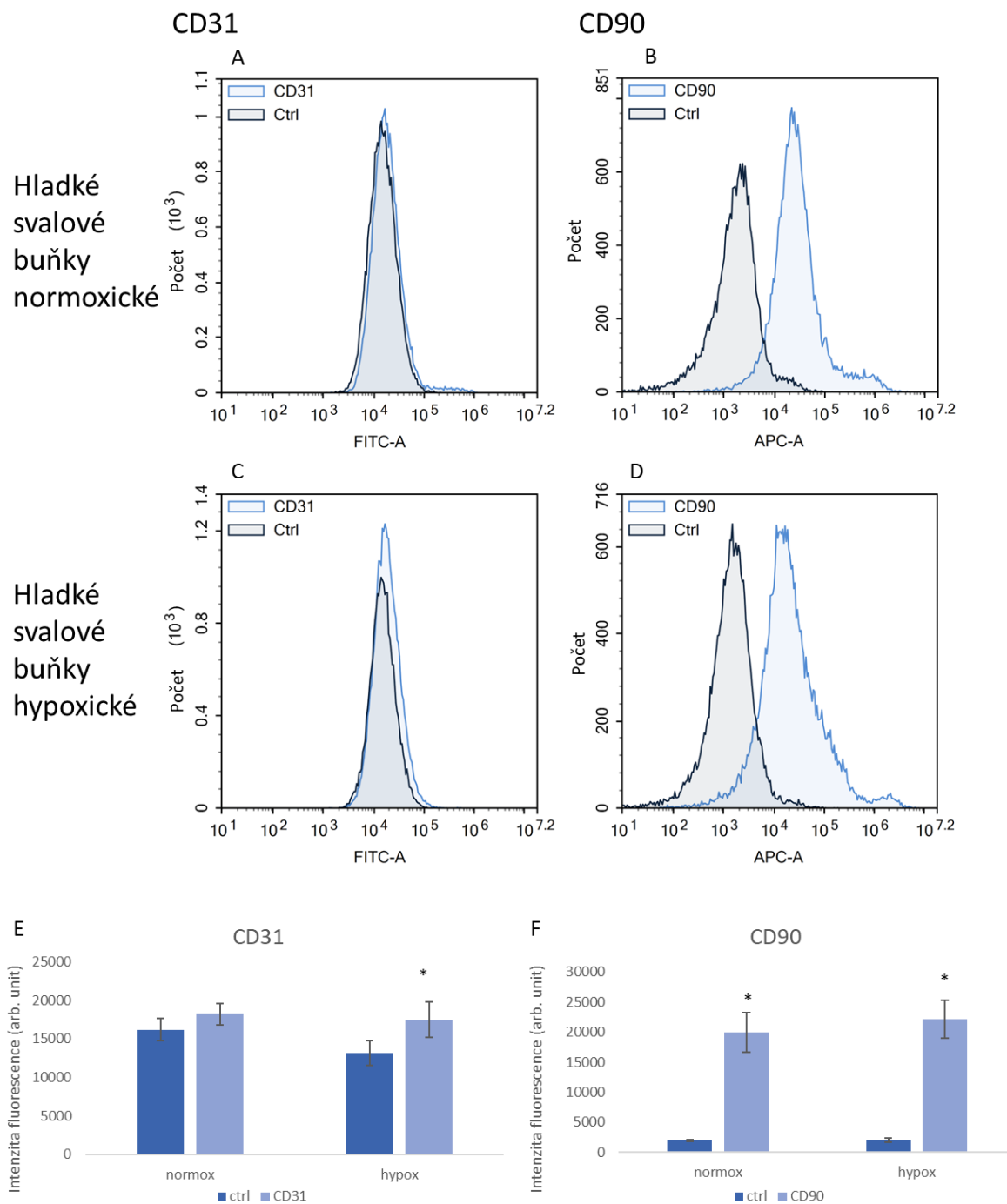
3.2.2.2 Exprese hladkosvalových markerů v buněčných kulturách získaných z plicní arterie potkana

Dalším cílem bylo porovnat hypoxické a normoxické buněčné kultury z hlediska exprese vybraných markerů na úrovni mRNA a proteinu. Exprese jednotlivých markerů byla detekována u buněk v druhé pasáži.

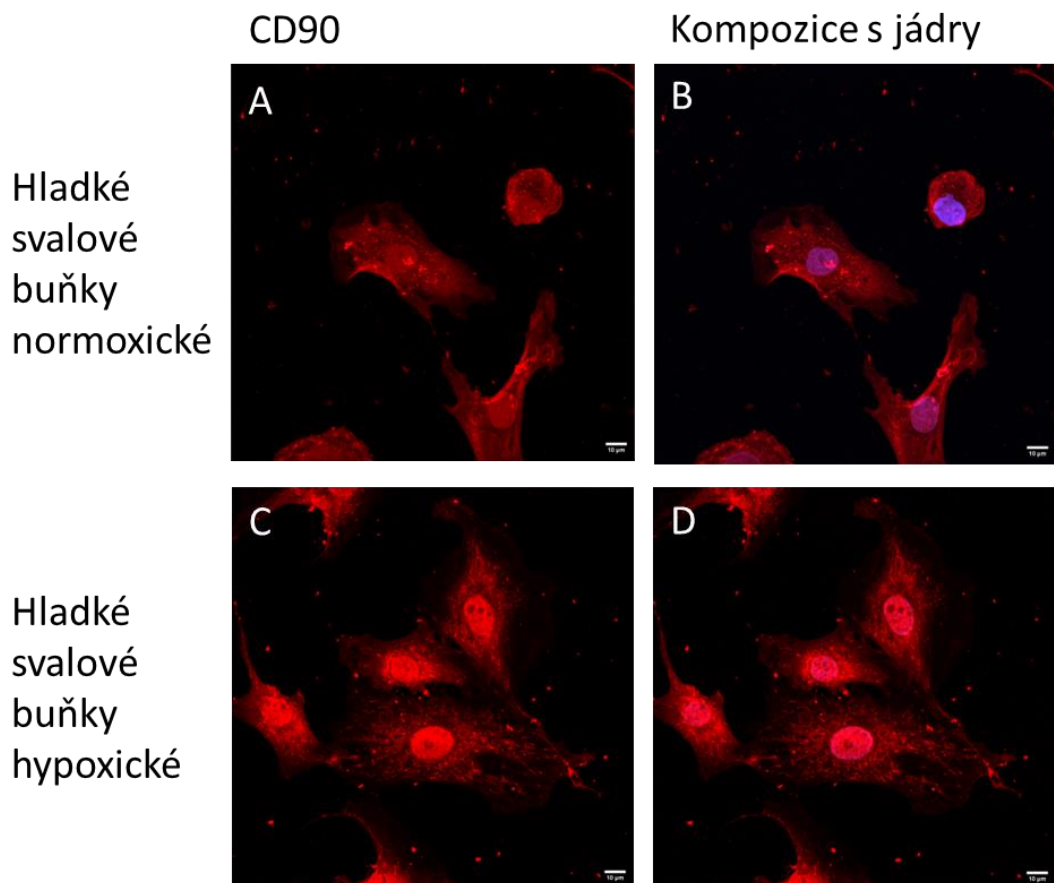
3.2.2.2.1 Stanovení čistoty primokultury získané z plicní aorty potkana – exprese CD31 a CD90

Před zahájením porovnávání hypoxických a normoxických buněk získaných z plicních arterií potkana byla nejprve otestováno, zda buňky nejsou kontaminovány jinými populacemi buněk. Při izolaci hladkosvalových buněk z cév hrozí kontaminace endotelovými buňkami z vnitřní vrstvy cévy (*tunica intima*) a fibroblasty z vnější vrstvy cévy (*tunica adventitia*). Pro tyto účely bylo využito protilátek proti CD31 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1; PECAM-1, jedná se o typický marker endotelových buněk) a CD90 (Thy-1, marker exprimovaný ve fibroblastech). Buňky byly zkoumány na průtokovém cytometru pro kvantifikaci pozitivních buněk na CD31 a CD90 a dále byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem.

Na průtokovém cytometru nebyla detekována přítomnost CD31 v izolovaných primokulturách (v normoxických ani hypoxických); medián fluorescence u barvených vzorků se výrazněji nelišil od nebarvené kontroly (Obrázek 11 A, C a E). Naopak u normoxických i hypoxických buněčných kultur byla pozorována exprese markeru CD90 (Obrázek 11 B, D a F). Medián fluorescence byl u barvených buněk významně vyšší ve srovnání s nebarvenou kontrolou, na histogramu ovšem nedošlo k jasnému oddělení populace barvených a nebarvených buněk. Mezi mediánem fluorescence normoxických a hypoxických buněk barvených na CD90 nebyl patrný žádný rozdíl. Protože exprese CD31 nebyla detekována na průtokovém cytometru, nebyly na něj buňky obarveny pro pozorování na fluorescenčním mikroskopu. Buňky byly obarveny na CD90 (Obrázek 12). CD90 byla přítomna jak u normoxických i hypoxických buněk. Nebyl pozorován významný rozdíl mezi normoxickými a hypoxickými buňkami.



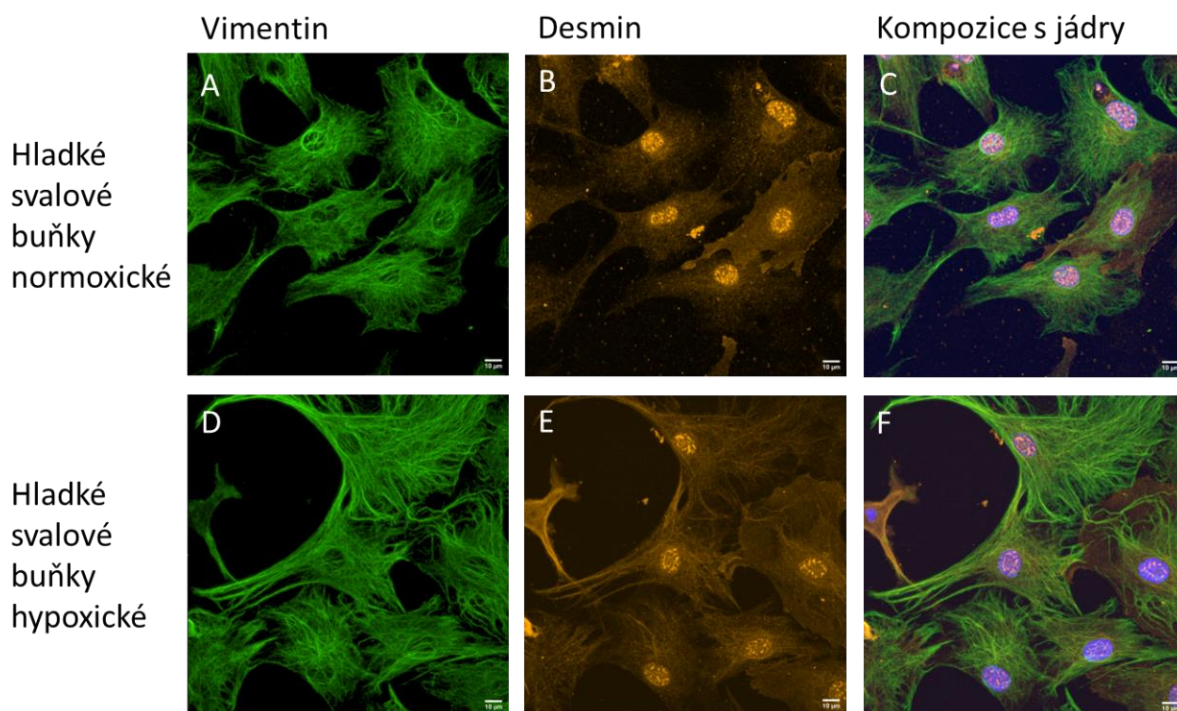
Obrázek 11: Normoxické a hypoxické buňky analyzované na průtokovém cytometru pro zjištění kontaminace endotelovými buňkami za pomoci protilátky CD31 (A, C) a kontaminace fibroblasty za pomoci protilátky CD90 (B, D). Buňky jsou porovnávány s nebarvenou kontrolou. Hodnotíme změnu mediánu fluorescence (E, F). Průměr \pm směrodatná odchylka z buněčných primokultur z pěti potkanů. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. *- vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s nebarvenou kontrolou.



Obrázek 12: Imunofluorescenční barvení CD90 v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A, B) nebo hypoxii (C, D). v buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost CD90 (A, C; červená). Zobrazena je rovněž kompozice společně s modře nabarvenými jádry (B, D). Měřítko 10 μm .

3.2.2.2 Stanovení čistoty primokultury získané z plicní aorty potkana – exprese vimentinu a desminu

CD90 se v předchozím pokusu neukázal jako vhodný marker pro identifikaci kontaminace populace hladkých svalových buněk fibroblasty. Proto bylo dále otestováno imunofluorescenční barvení buněk protilátkami proti vimentinu a desminu. Vimentin je typickým markerem pro mezenchymální buňky (tj. také pro fibroblasty) a desmin je typicky exprimován hladkými svalovými buňkami. Vimentin i desmin byl exprimován u hypoxických i normoxických buněk. Vimentin byl u všech buněk ve fibrózním stavu. Desmin byl u buněk přítomen spíše difúzně a v oblasti jádra, u hypoxických buněk byl více formován do fibrilárních struktur (Obrázek 13). Z těchto výsledků tedy není možné kontaminaci fibroblasty přesně určit.

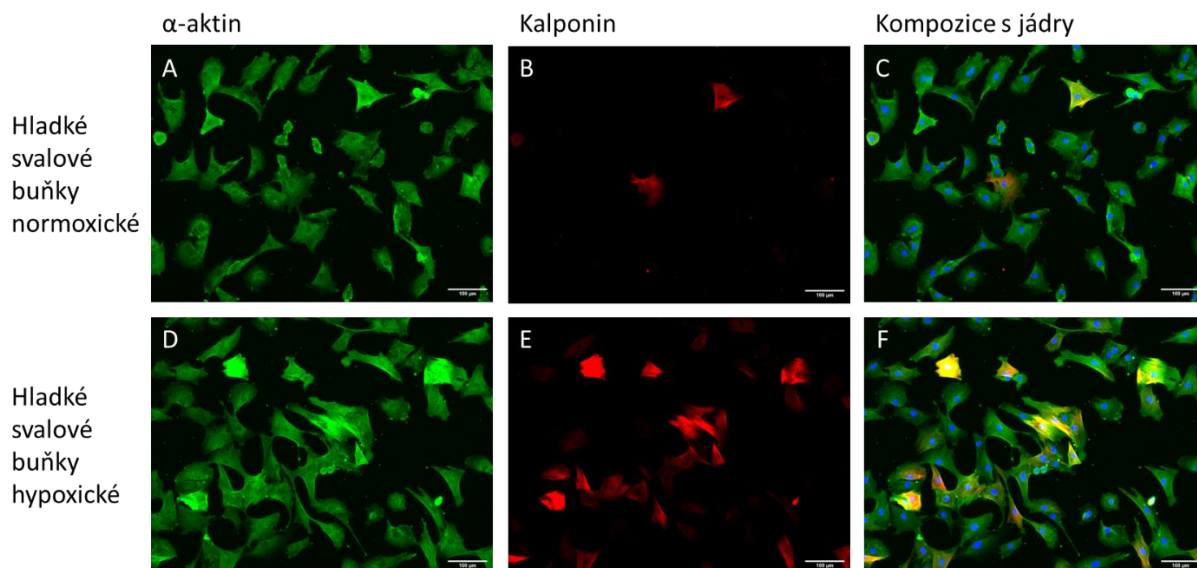


Obrázek 13: Imunofluorescenční barvení vimentinu a desminu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A-C) nebo hypoxii (D-F). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost vimentinu (A, D; zelená) a desminu (B, E; žlutá). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé kanály v kompozici společně s modře nabarvenými jádry (C, F). Měřítko 10 μ m.

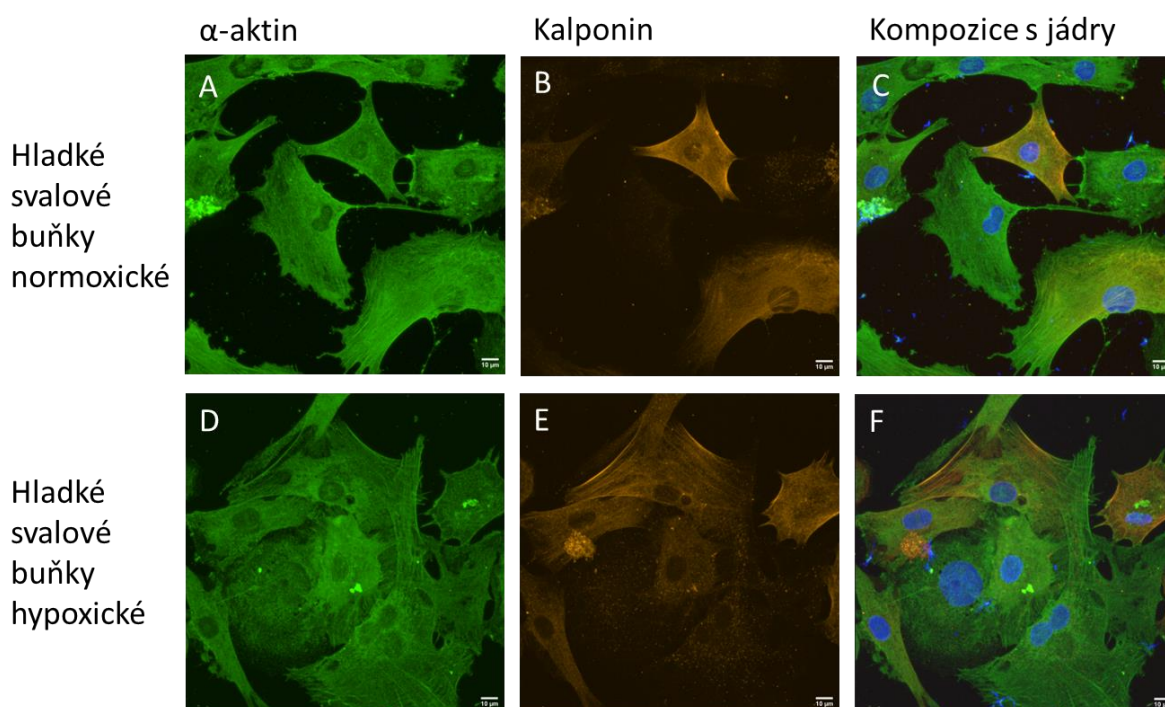
3.2.2.2.3 Exprese hladkosvalových markerů aktinu, kalponinu a myosinu v izolovaných primokulturách

U primokultur byla dále ověřena přítomnost typických hladkosvalových markerů pomocí imunofluorescenčního barvení a exprese na úrovni mRNA pomocí qPCR. Buňky byly barveny protilátkami proti α -aktinu, kalponinu, a myosinu.

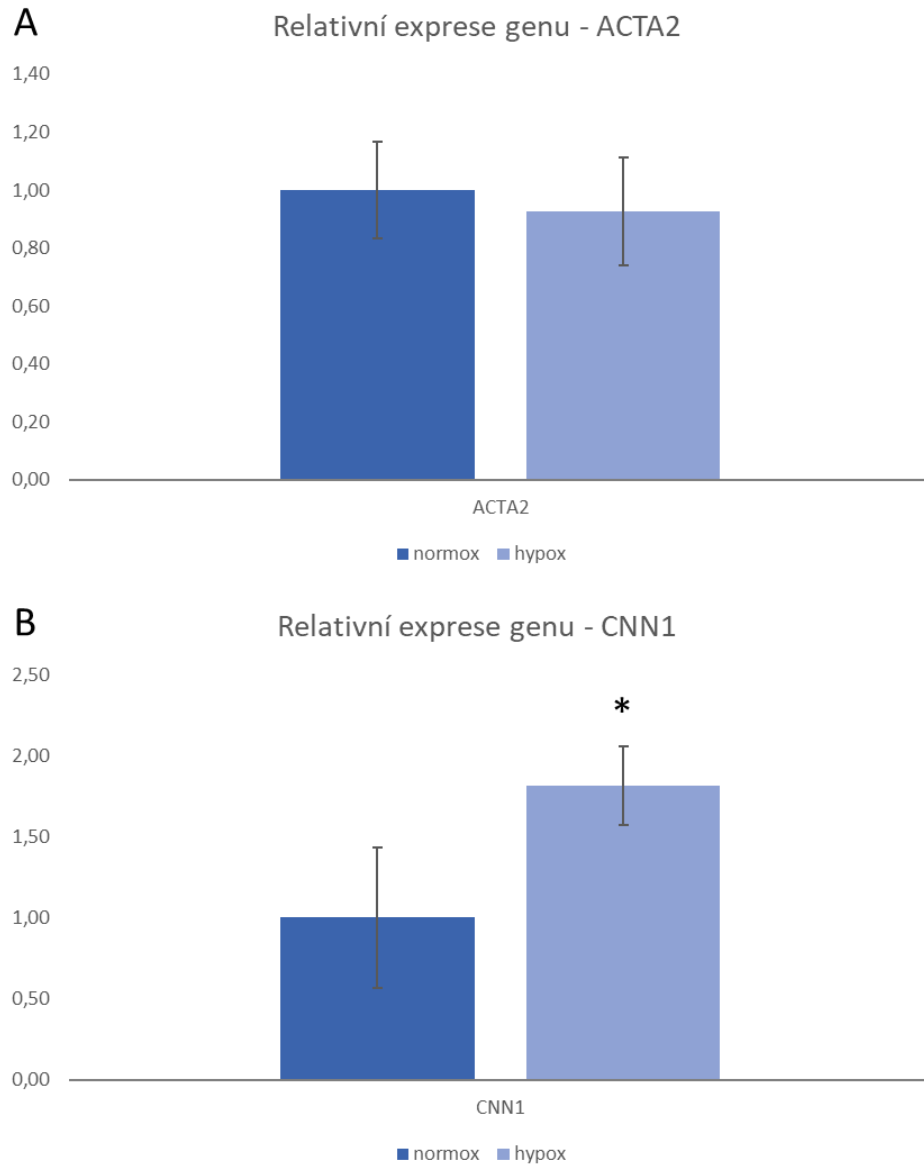
Buňky po kultivaci získávají spíše polygonální tvar místo svého typického větvenovitého tvaru. U všech buněk byl přítomen α -aktin. U většiny buněk byl α -aktin ve fibrózním stavu, ale některé buňky ho exprimovaly pouze difuzně. V relativní exprese genu pro α -aktin nebyl pozorován žádný rozdíl mezi normoxickými a hypoxickými buňkami. U buněk hypoxických i normoxických byly pozorovány buňky exprimující kalponin, ale u hypoxických buněk byla exprese pozorována ve větším počtu buněk (Obrázek 14), kalponin byl focen i konfokálním mikroskopem pro lepší pozorování jeho struktury (Obrázek 15), kde jsme mohli pozorovat, že u některých buněk byl kalponin i ve fibrózním stavu. Exprese kalponinu na úrovni mRNA byla významně vyšší u hypoxických buněk (Obrázek 16).



Obrázek 14: Imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A-C) nebo hypoxii (D-F). v buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu (A, D; zelená) a kalponinu (B, E; červená). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé kanály v kompozici společně s modře nabarvenými jádry (C, F). Měřítko 100 μ m.

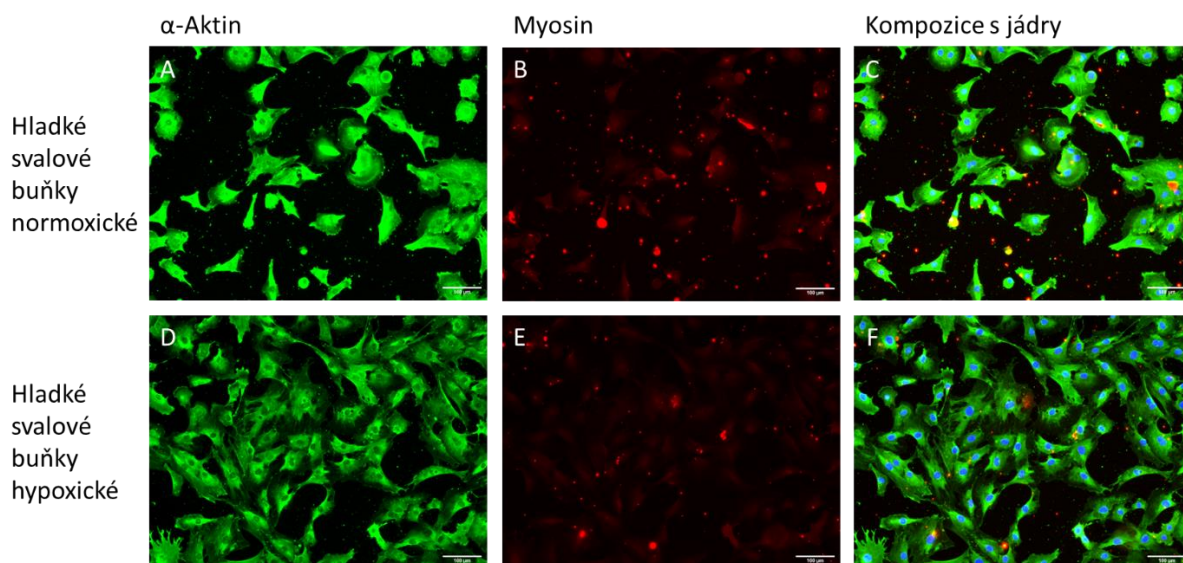


Obrázek 15: Imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A-C) nebo hypoxii (D-F). v buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu (A, D; zelená) a kalponinu (B, E; žlutá). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé kanály v kompozici společně s modře nabarvenými jádry (C, F). Měřítko 10 μ m.

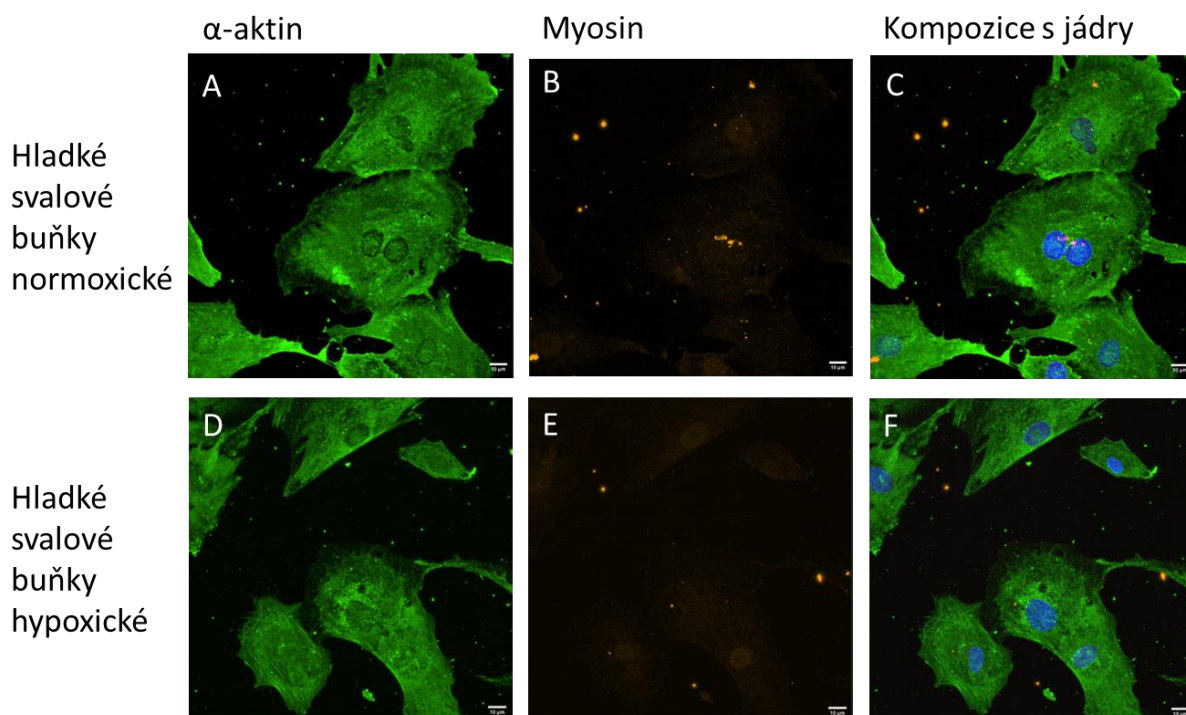


Obrázek 16: Relativní exprese genů v normoxických a hypoxických hladkých svalových buňkách. Zkoumané geny byly ACTA2 pro α -aktin (A) a CNN1 pro kalponin 1 (B). Normoxické buňky jsou považovány za kontrolní skupinu. Průměr \pm směrodatná odchylka z pěti jedinců. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. *- vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem.

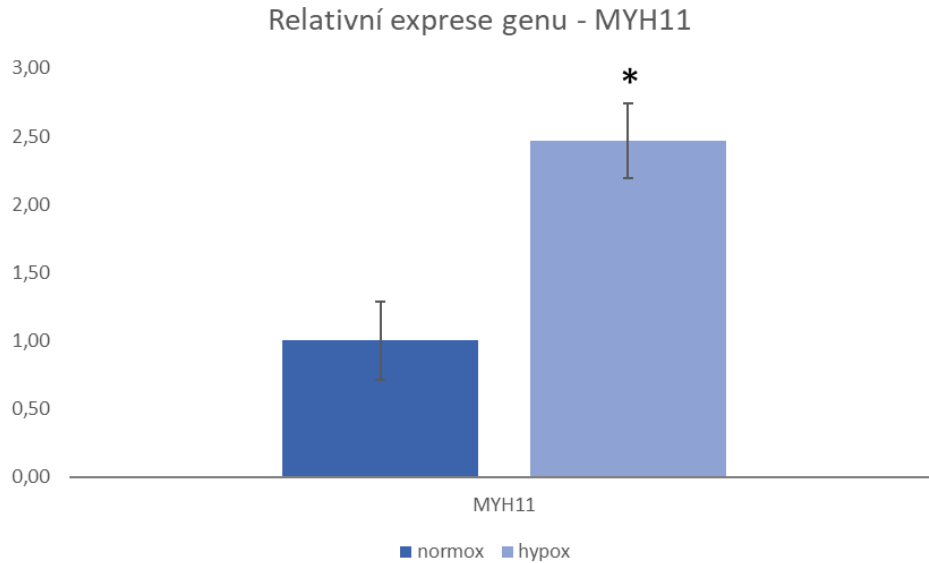
Těžký řetězec myosinu 11 je na imunofluorescenčním barvení patrný velice slabě (Obrázek 17 a 18). Na úrovni mRNA je exprese těžkého řetězce hladkosvalového myosinu výrazně zvýšená u hypoxických buněk (Obrázek 19).



Obrázek 17: Imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A-C) nebo hypoxii (D-F). v buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu (A, D; zelená) a těžký řetězec myosinu 11 (B, E; červená). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé kanály v kompozici společně s modře nabarvenými jádry (C, F). Měřítko 100 μ m.



Obrázek 18: Imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A-C) nebo hypoxii (D-F). v buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu (A, D; zelená) a těžký řetězec myosinu 11 (B, E; červená). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé kanály v kompozici společně s modře nabarvenými jádry (C, F). Měřítko 10 μ m.

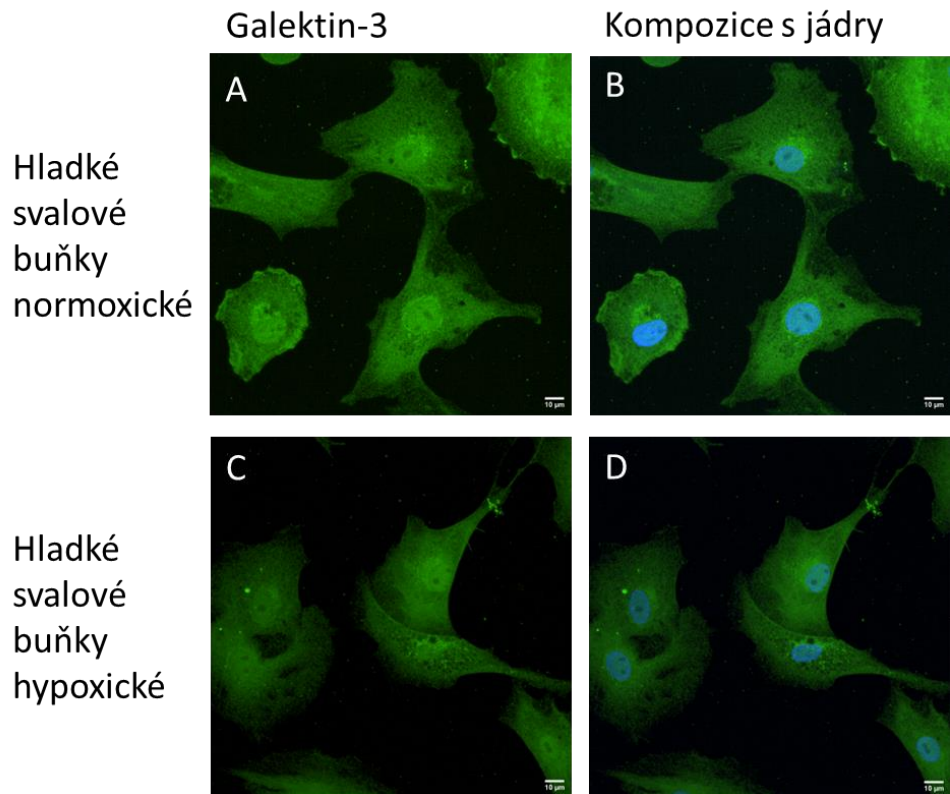


Obrázek 19: Relativní exprese genu MYH11 pro myosin-11. Normoxické buňky jsou považovány za kontrolní skupinu. Průměr ± směrodatná odchylka z buněčných kultur z pěti potkanů. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. *- vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem.

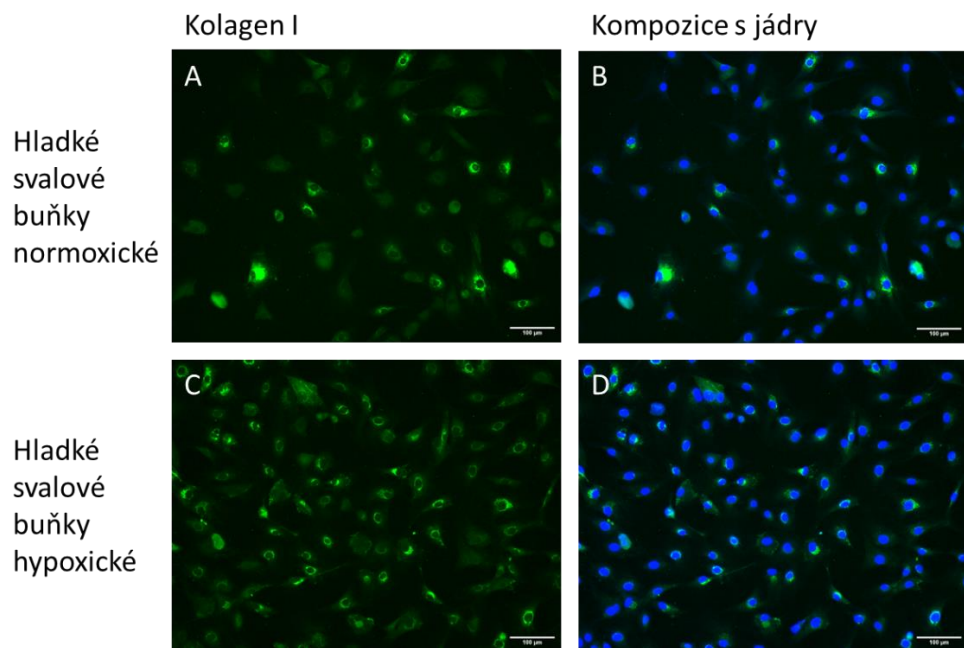
3.2.2.2.4 Exprese galektinu-3 a kolagenu I v buněčných kulturách získaných z plicní arterie potkana

Primokultury byly dále obarveny protilátkou proti galektinu-3 a kolagenu I. Galektin-3 se nacházel jak v normoxických, tak v hypoxických buňkách. V buňkách byl spíše přítomen difuzně, nejvíce však v okolí jader. U normoxických buněk je výraznější fluorescence galektinu-3 v okolí jádra. u hypoxických buněk je fluorescence nižší, ale jsou přítomny drobné inkluze v cytoplasmě. U hypoxických buněk je exprese genu pro galektin-3 významně vyšší než u normoxických buněk (Obrázek 20 a 23 A).

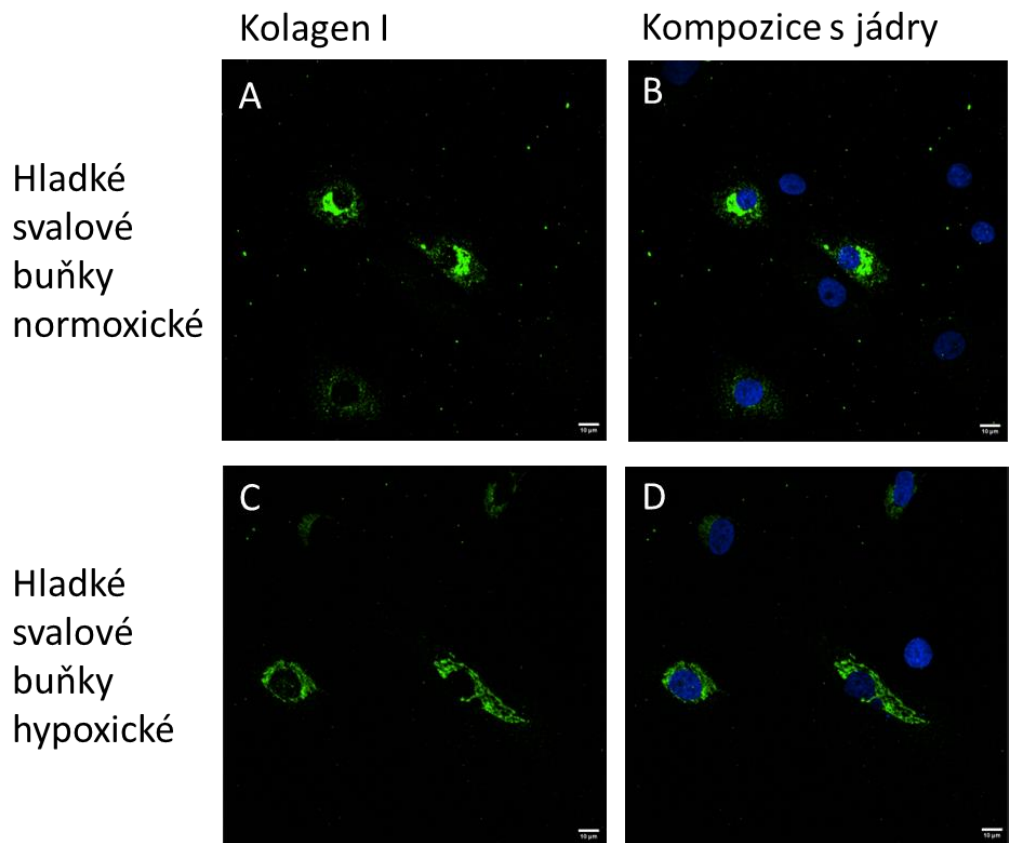
U hypoxických buněk je výraznější fluorescence kolagenu I kolem jader (obrázek 21 a 22). U normoxických buněk je slabší fluorescence kolagenu I a je přítomna u méně buněk. Exprese genu pro kolagen 1 se mezi hypoxickými a normoxickými buňkami nelišila (Obrázek 23 B).



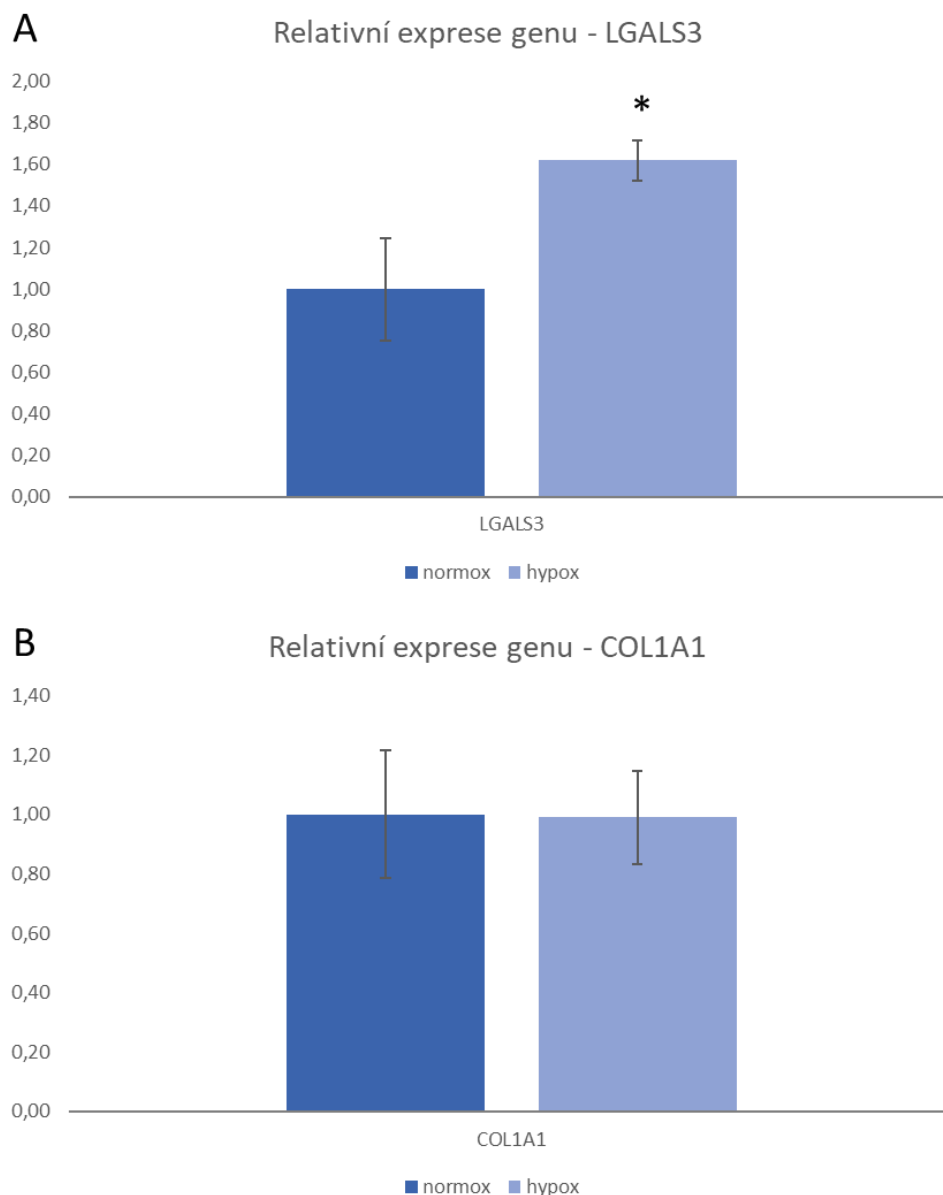
Obrázek 20: Imunofluorescenční barvení galektinu-3 v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A, B) nebo hypoxii (C, D). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost galektinu-3 (A, C; zelená). Zobrazena je rovněž kompozice s modře nabarvenými jádry (B, D). Měřítko 10 μm .



Obrázek 21: Imunofluorescenční barvení kolagenu I v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A, B) nebo hypoxii (C, D). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost kolagenu I (A, C; zelená). Zobrazena je rovněž kompozice společně s modře nabarvenými jádry (B, D). Měřítko 100 μm .



Obrázek 22: Imunofluorescenční barvení kolagenu I v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených normoxii (A, B) nebo hypoxii (C, D). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost kolagenu I (A, C; zelená). Zobrazena je rovněž kompozice společně s modře nabarvenými jádry (B, D). Měřítko 10 μm .



Obrázek 23: Relativní exprese genů v normoxických a hypoxických hladkých svalových buňkách. Zkoumané geny byly LGALS3 pro galektin-3 a COL1A1 pro kolagen-1. Normoxické buňky jsou považovány za kontrolní skupinu. Průměr ± směrodatná odchylka z buněk z pěti potkanů. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. *- vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem.

3.2.3 Exprese genů v tkáních získaných z potkanů vystavených normoxickým a hypoxickým podmínkám.

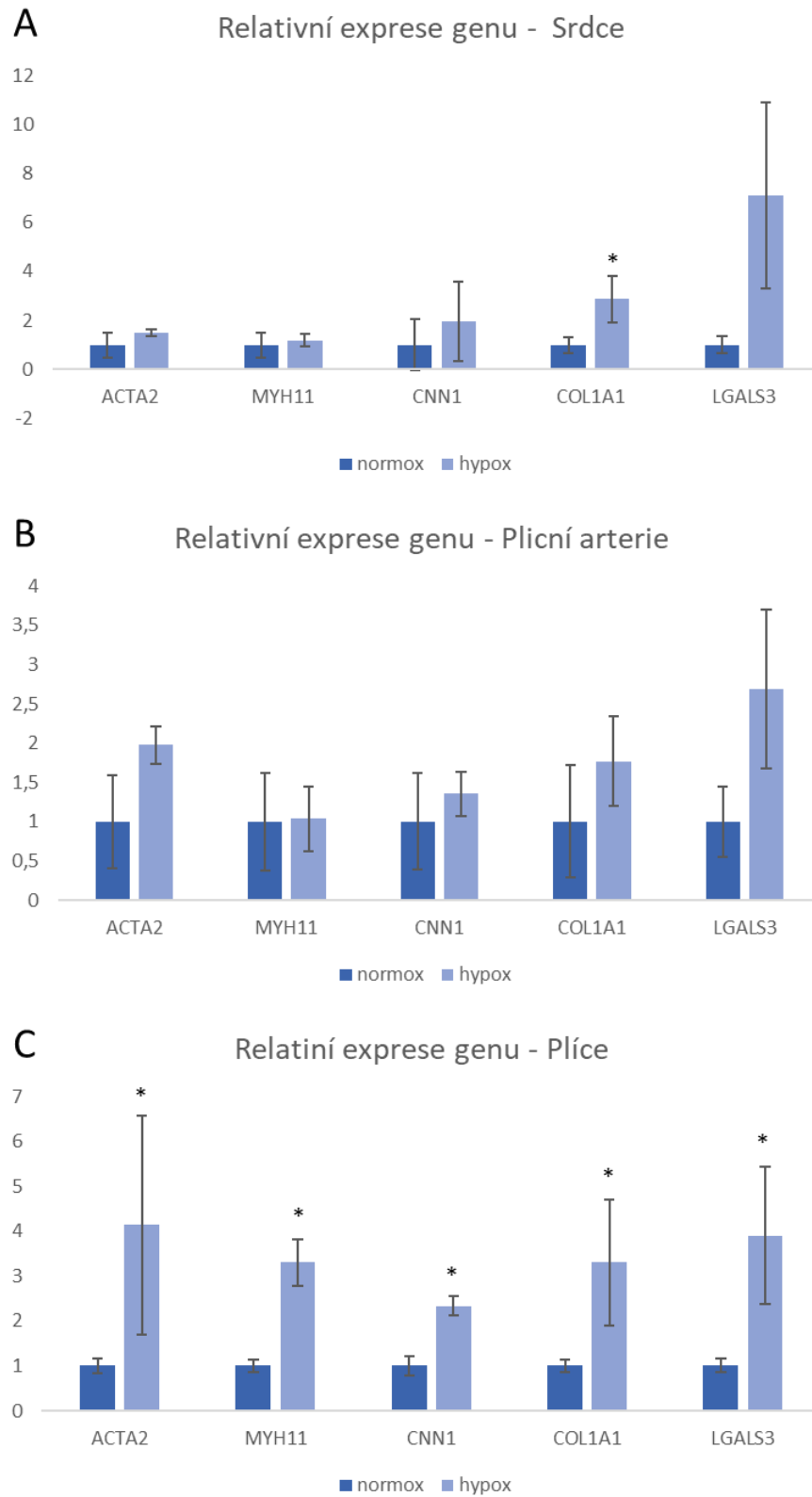
Dalším z cílů diplomové práce bylo srovnat expresi vybraných genů v tkáních izolovaných z potkanů vystavených normoxickým nebo hypoxickým podmínkám. Pro tyto účely byly využity tkáně plic, pravé srdeční komory a plicní arterie z potkanů vystavených normoxickým

a hypoxickým podmínkám. V pokusech s hladkými svalovými buňkami byly zkoumány geny ACTA2 (aktin), MYH11 (myosin), CNN1 (kalponin), LGALS (galektin-3), COL1A1 (kolagen 1), proto byly tyto geny zkoumány i v tkáních. Expze genů byla určena pomocí kalibračních křivek. Normoxické buňky jsou brány jako kontrolní skupina.

Srdeční tkáň u hypoxických potkanů měla zvýšenou expzi genu COL1A1. Expze LGALS3 je sice zvýšená, ale rozdíl není statisticky významný, kvůli velkým odchylkám (Obrázek 24 A). Expze dalších zkoumaných genů (ACTA2, CNN1 a MYH11) je mírně zvýšená v hypoxické srdeční tkáni.

Dále byla zkoumána tkáň plicní arterie, která nemá žádné statisticky významně zvýšené hodnoty hypoxické tkáně, z grafu je ovšem patrný nárůst expze u všech sledovaných genů v hypoxické tkáni (Obrázek 24 B).

Expze byla měřena také v plicní tkáň, abychom zachytili expzi genů také v obtížně izolovatelných plicních arteriích a arteriolách ve vyšším větvení a o malém průměru. Plicní tkáň měla expzi všech zkoumaných genů v hypoxické tkáni statisticky významně zvýšenou (obrázek 24 C). Expze vybraných genů v plicní tkáni mohla být ovlivněna nejenom buňkami, které se nacházejí v arteriích a arteriolách (tj. endotel, hladké svalové buňky a fibroblasty), ale také přítomností buněk typických pro plicní tkáň (tj. zejména plicními epitelovými buňkami).

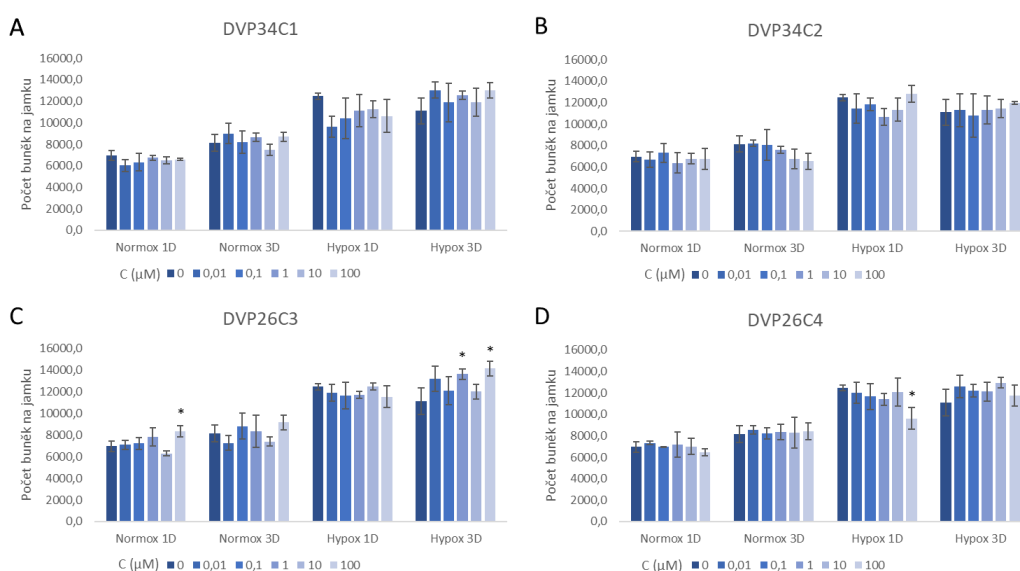


Obrázek 24: Relativní exprese genů srdce, plicní arterie a plíce normoxických a hypoxických potkanů. Zkoumané geny byly ACTA2 pro aktin, CNN1 – pro kalponin, MYH11 pro myosin, LGALS3 pro galektin-3 a COL1A1 pro kolagen-1. Normoxičtí potkani jsou považováni za kontrolní skupinu. Průměr ± směrodatná odchylka (pro srdce a plicní arterii byly vzorky tkání ze tří potkanů; pro plicní tkáň vzorky z pěti potkanů). One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. *- vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem.

3.2.4 Cytotoxicita inhibitorů galektinu-3 u normoxických a hypoxických buněk získaných z plicních arterií potkana

Posledním cílem práce bylo stanovit vliv nově připravených experimentálních inhibitorů galektinu-3 na buněčné kultury z plicní arterie potkana. Je potřeba aby inhibitory galektinu-3 neovlivňovaly negativně samotné buňky a nebyly pro ně toxické. Z toho důvodu jsme zkoumali cytotoxicitu těchto nových inhibitorů. Pro tento pokus byly buňky inkubovány v médiu s obsahem pouze 0.5% FBS z důvodu vyloučení maskujícího vlivu vysokých koncentrací séra na účinnost zkoumaných látek. Byl porovnán vliv inhibitorů jak na hypoxické (z jednoho potkana), tak normoxické buňky (z jednoho potkana). Byly zkoumány inhibitory s pracovními názvy DVP34C1, DVP34C2, DVP26C3 a DVP26C4. Inhibitory byly poskytnuty oddělením biotransformací MBÚ.

Z obrázku 25 je patrné, že buňky nejsou významně ovlivněny inhibitory galektinu-3. Není také zřejmý žádný rozdíl v působení inhibitorů na normoxické a hypoxické buňky. Některé hodnoty počtů buněk byly zvýšené (DVP26C3 normox 1D v nejvyšší koncentraci a hypox 3D v 1 a 100 μM koncentraci) oproti kontrolní skupině, nebo snižené (DVP26C4 hypox 1D v nejvyšší koncentraci), což bylo pravděpodobně způsobeno náhodnou chybou.



Obrázek 25: Normoxické a hypoxické HSB inkubované v médiu s 0.5% FS s různými koncentracemi inhibitorů galektinu-3. U buněk byl stanoven počet jader v mikroskopických zorných polích pomocí programu ImageJ a přepočítány na povrch jamky (A, B, C, D). Průměr \pm směrodatná odchylka ze tří jamek. One-Way ANOVA, Holm-Sidákův test, $p < 0,05$. *- vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem v daném dni bez přidavku inhibitoru galektinu-3.

4 DISKUZE

Pro charakterizaci normoxické primokultury HSB pro další pokusy bylo využito stanovení jejich adheze, dosažení konfluence a schopnost proliferace a doba zdvojení buněk. Hladké svalové buňky se nacházejí ve všech stěnách cév a zajišťují jejich strukturální integritu a regulují průměr tím, že se dynamicky stahují a uvolňují v reakci na vazoaktivní stimuly. Diferencovaný stav HSB je charakterizován specifickými kontraktilními proteiny, iontovými kanály a povrchovými receptory regulující kontraktilní proces. V reakci na zranění, anebo během vývoje jsou zodpovědné za syntézu proteinů extracelulární matrix, stávají se migrujícími a proliferací [43].

V našem pokusu pro zjištění adheze byly normoxické HSB inkubovány v normoxii a hypoxii v médiu s 10% nebo 20% FBS, kdy buňky inkubované v normoxii s 20% FBS v médiu sice po 24 hodinové inkubaci byly nasedlé všechny, ale i buňky které byly inkubovány v hypoxii s 10% FBS v médiu dosahovali 80 % adherovaných buněk po 24 hodinové inkubaci, což je pro naše pokusy dostačující a proto bylo pro inkubaci v dalších pokusech použito pouze 10% FBS v médiu.

Fetální bovinní sérum (FBS) se široce používá jako doplněk pro kultivaci buněk a je považován za univerzální standardní složku většiny kultivačních médií. Obsahuje klíčové faktory pro uchování a úspěšnou expanzi buněk *in vitro* [44]. Obvyklé koncentrace FBS v médiu jsou 2-10 % [45], kdy 10 % FBS je výchozích pro většinu buněčných linií [46]. Ve vědecké studii Khasawneh *et al.* 2019 zkoumali dopad různých procent FBS na biologickou výkonnost mezenchymálních kmenových buněk, kdy zkoušeli FBS v koncentracích mezi 5-20 %. Ve vysokých procentech (15 % a 20 %) byla u buněk zvýšená jejich proliferace a expanze. V nižších procentech FBS (7 %) byly zlepšeny jejich imunosupresivní charakteristiky, ale míra proliferace byla snížena. 5 % FBS v médiu způsobilo rapidní pokles proliferační kapacity a imunosupresivních vlastností [47].

Dále byla stanovena schopnost dosažení konfluence po 24hodinové inkubaci s ohledem na počáteční násadu buněk. Buňky dosahovaly více jak 90% konfluence s násadou 10 tisíc buněk na jamku a více. Násady nižší jak 3 tisíce buněk na jamku nedosahují ani 30% konfluence. Pro další pokusy byla použita koncentrace 5 tisíc buněk na jamku, kdy buňky dosahují 60% konfluence. Ve vědecké studii Proudfoot *et al.* 2012 poukazují na vliv koncentrace násady hladkých svalových buněk na jejich optimální růst. V nízkých koncentracích násad nejsou buňky rovnoměrně rozprostřeny a tvoří kolonie kvůli mezibuněčným interakcím. Ve vyšších

koncentracích mají buňky mezi sebou pravděpodobně příliš silné vazby a například při trypsinizaci se oddělí od desky jako celistvý list, a ne jako suspenze. Ideální hustotou pro pokusy je tedy konfluence mezi 40-80 % [48].

Poté byla stanovena proliferace buněk a jejich doba zdvojení. S ohledem na koncentraci násady je u všech přibližně stejně velký nárůst buněk s časem. Doba zdvojení byla nejkratší u násady 3 tisíce buněk na jamku. Ovšem s ohledem na počet nasednutých buněk za den byla pro další pokusy vybrána koncentrace 5 tisíc buněk na jamku i když je její čas zdvojení mírně delší. Doba zdvojení a proliferace buněk byla v našem pokusu zjištěna obarvením jader fluorescenční barvou a manuálním počítáním buněk v programu imageJ. Ve vědecké studii Tonarova *et al.* 2021 zjišťovali proliferaci buněk pomocí metabolické aktivity buněk, kdy nasazovali 8 tisíc a 10 tisíc buněk na cm² jamky. Dobu zdvojení poté zjišťovali pomocí Bürkerovy komůrky [44].

Po charakterizaci normoxických buněk jsme dále porovnávali normoxické a hypoxické buňky. Prvním pokusem bylo porovnání proliferace buněk a bylo zjištěno, že není významný rozdíl mezi proliferací normoxických a hypoxických buněk. Hypoxie je důležitým stimulem pro proliferaci HSB. Nachází se v anteriosklerotických lézích a rychle rostoucích nádorech. Trvalá hypoxie indukuje expresi genů kodujících transportéry, enzymy a růstové faktory. Ve vědecké studii Humar *et al.* 2002 zkoumali efekt mírné hypoxie (3 % O₂) a buněčně specifických, lokálně produkovaných růstových regulačních molekul na proliferaci buněk vaskulární arteriální stěny a angiogenezi *in vitro*. Rozdíl v proliferaci mezi hypoxií a normoxií není patrný. Přítomností mitogenů dochází k zvýšené proliferaci hypoxických buněk [49].

Poté byla hodnocena čistota buněčné kultury pomocí markerů CD31 a CD90, a vimentinu a desminu. CD31 je obvykle exprimována na endoteliálních buňkách, cirkulujících krevních destičkách, monocitech a podskupinách T-lymfocytů. Je to adhezní receptor, jehož funkce jsou adheze imunitních buněk, transendoteliální migrace, koagulace, angiogeneze a aktivace integrinů [50].

CD90 je marker pro mezenchymální kmenové buňky a byl dříve popsán ve vzorcích gliomů a immortalizovaných gliomových buněčných linií. CD90 je také exprimován v glioblastomových asociovaných stromálních buňkách a pericytech podobných mezenchymálním kmenovým buňkám. CD90 je N-glykosylovaný, glykofosfatidylinositolem ukotvený povrchový protein buněk. Může být exprimován i v mnoha jiných typech buněk jako jsou endoteliální buňky, fibroblasty a neurony. Podílí se například na aktivaci a apoptóze T-lymfocytů, adhezi a migraci leukocytů a proliferaci a migraci fibroblastů při hojení ran a fibróze [51].

V našich experimentech byla u hypoxických i normoxických buněk zjištěna zvýšená exprese CD90 na průtokovém cytometru a byla potvrzena i imunofluorescenčně. CD31 v našich kulturách přítomna nebyla. Ve vědecké studii Avril *et al.* 2017 poukazují na fakt, že CD90 může být exprimována i jinými buňkami od glioblastomových buněk přes fibroblasty až po epiteliální buňky a nemůžeme ji proto považovat za specifický marker [51]. Ve vědecké studii Clément *et al.* 2019 porovnávají expresi CD90 a hladkosvalového α -aktinu v HSB, fibroblastech a myofibroblastech, kdy HSB exprimují pouze α -aktin, fibroblasty pouze CD90 a myofibroblasty exprimují CD90 a ve sníženém množství α -aktin. Dále ve své studii zmiňují, expresi α -aktinu v buňkách z oblastí bez elastických lamel mimo *tunica media* ze vzorků disekovaných aort. Většina těchto buněk neexprimovala CD90, což naznačuje, že buňky pravděpodobně expandovali z *tunica media* aorty [52]. Při plicní hypertenzi mohou adventiciální fibroblasty diferencovat na HSB a migrovat do tunica media [14]. Mohli by si tedy udržet své markery, a proto bychom viděli zvýšený CD90 u hypoxických buněk, to ovšem nevysvětluje zvýšení i u normoxických buněk. Proto se pravděpodobně jedná o kontaminaci fibroblasty vzniklou při preparování plicních arterií.

Dále byla hodnocena čistota našich primokultur pomocí protilátek proti vimentinu a desminu. Vimentin je intermediární filamentový protein typu III. Je obvykle exprimován v buňkách mezenchymálního původu, jako jsou například fibroblasty, ovšem může být exprimován i v epiteliálních buňkách, když jsou zapojeny do fyziologických či patologických procesů vyžadující jejich migraci [53]. Intermediární filamenta udržují strukturu buňky, tkáňovou integritu a mohou regulovat různé buněčné funkce. Vimentin hraje roli v buněčné migraci a epiteliálně-mezenchymálním přechodu například u epiteliálních karcinomů [54].

Desmin je intermediární filamentový protein hladkého svalstva, ale může být exprimován i ve fibrotické tkáni při hojení ran. Je také popsán jako marker pericytů ve spojení s angiogenezí. Takové buňky byly popsány jako buňky nástěnné nebo vysoce pohyblivé buňky podobné myofibroblastům [55].

V našem experimentu byl u normoxických i hypoxických buněk exprimován vimentin i desmin. Dle vědecké studie Smyth *et al.* 2018 je desmin selektivním markrem pro HSB cév. V této studii zkoumali proteinové markery pericytů a HSB, zda jsou specifické pro nástěnné buňky a nebarví jiné tkáně mozku a kvantifikovali jejich distribuci v malých a velkých cévách *in situ*. Zjistili, že mozek obsahuje několik typů nástěnných buněk včetně důležitých obalových pericytů, a že HSB cév v mozku exprimují vysoké hladiny desminu a dalších proteinů

specifických pro HSB [56]. Ve studii Yao *et al.* 2015 a Tang *et al.* 2018 naznačují spojitost exprese vimentinu v HSB s jejich migrací zprostředkovanou TGF- α , kdy potlačení jeho exprese vedlo k snížené migraci HSB cév [57; 58].

Dále byla u normoxických a hypoxických buněk porovnána exprese hladkosvalových markerů α -aktinu, kalponinu a myosinu. Při identifikaci populace HSB slouží jako markery několik izoform kontraktálního aparátu. α -aktin je časným markerem diferenciaci HSB a je pro ně velmi selektivní, ačkoli může být přechodně exprimován řadou mezodermálně derivovaných buněk během vývoje. Bazický kalponin je střednědobým markerem během vývoje HSB, je téměř selektivní pouze na HSB, ale může být exprimován i v srdečních myocytech, myofibroblastech a řadě nádorových buněk. Těžký řetězec myosinu je pozdním markerem, vykazuje nejvyšší stupeň buněčné specifity v diferenciaci v HSB [59].

V našich experimentech byl exprimován α -aktin ve všech buňkách stejně, kalponin ve vyšší míře v hypoxických buňkách a myosin byl exprimován velmi slabě ve formě proteinu, ale na úrovni mRNA byl v hypoxických buňkách výrazně zvýšen. Snížení proteinové exprese hladkosvalových markerů může být způsobeno kultivací HSB, kdy dochází k vymizení hladkosvalových markerů od těch nejpozdnějších (těžký řetězec myosinu) s přeměnou kontraktálního fenotypu HSB na syntetický [60]. Zvýšená exprese hladkosvalových markerů je pravděpodobně způsobena hypoxií. Ve vědecké studii Lin *et al.* 2020 zkoumali, jak hypoxie podporuje diferenciaci HSB z adipózních kmenových buněk regulací N6-adenosin-methyltransferázy a parakrinních faktorů. Hypoxie upreguluje N6-adenosin-methyltransferázu, která podporuje diferenciaci kmenových buněk v HSB a zvyšuje v nich expresi hladkosvalových markerů [61].

Dále byla porovnána exprese galektinu-3 a kolagenu I v normoxických a hypoxických buňkách. Galektin-3 se účastní mnoha dějů v buňce od imunitních reakcí, přes angiogenezi po migraci a proliferaci. Jeho funkce je závislá na jeho umístění [62]. Je lokalizován jak intracelulárně, tak extracelulárně. Intracelulárně se může nacházet jak v cytoplasmě, tak difuzně v nukleoplasmě jádra a je také spojován s řadou diskretních tečkových struktur (například interchromatinová granula, Cajalova tělíska a jiné) [28].

Kolagen I je jedním ze základních proteinů extracelulární matrix a hraje důležitou roli při tvorbě tkání [63]. Kolagen I ukládají hlavně fibroblasty a myofibroblasty. Podílí se na fibróze u hojení ran a pomáhá tvorbě jizev. Jizvení orgánů je hlavní příčinou morbidity a mortality [64].

Galektin-3 byl v buňce rozprostřen difuzně s větší koncentrací v jádře a občasnou přítomností inkluzí a na úrovni mRNA je více exprimován v hypoxických buňkách. Kolagen I je více exprimován v hypoxických buňkách a nachází se kolem jádra. Exprese galektinu-3 je zvýšena hlavně u mediálních HSB u plicní hypertenze. Ve vědecké studii Barman *et al.* 2018 zkoumali jakým způsobem přispívá galektin-3 k plicní hypertenzi. Zjistili že exprese galektinu-3 je zvýšena v hypertenzních plicních tepnách hlavně v mediální vrstvě a stimulací proliferace HSB podporuje vaskulární remodelaci a vznik plicní hypertenze [38]. Hladina kolagenu I by mohla odrážet stupeň fibrózy. Ve vědecké studii Zhang *et al.* 2020 zkoumali poškození myokardu, kdy ukládání kolagenu I výrazně vzrostlo u skupiny s ischemickým/reperfuzním poraněním (vaskulární akutní stav po infarktu myokardu) a jeho exprese byla upregulována [65].

Dále jsme zkoumali expresi genů pro α -aktin, kalponin, těžký řetězec myosinu, kolagen I a galektin-3 v tkáních srdce, arterií plic a v plicích. Tyto geny byly zkoumány, protože pro plicní hypertenzi je typická zvýšená proliferace HSB a ukládání kolagenu I v extracelulární matrix cévní stěny plicních arterií. V *tunica media* plicních arterií je také pozorována zvýšená exprese galektinu-3. V odpovědi na plicní hypertenzi se mění i pravá srdeční komora, což zahrnuje změny v kontraktilní funkci, velikosti komory, hypertrofii a extracelulární matrix [38; 66].

V našem experimentu byla u srdce zvýšená zejména exprese kolagenu I, exprese ostatních genů byla zvýšená pouze mírně. U plicních arterií byla mírně zvýšená exprese všech sledovaných genů. Pro zachycení exprese genů také v obtížně izolovatelných plicních arteriích a arteriolách o malém průměru byla použita rovněž plicní tkáň. V plicní tkáni byly rozdíly v expresi genů nejvýraznější, v hypoxické tkáni měly všechny zmíněné geny zvýšenou expresi.

V posledním pokusu byla zkoumána cytotoxicita nově připravených oligosacharidových inhibitorů galektinu-3 na normoxických i hypoxických buněčných kulturách. Inhibitory byly navázány na polyoxazolinové nosiče pro zvýšení rozpustnosti ve vodném prostředí a prodloužení poločasu rozpadu. Inhibitory galektinu-3 jsou primárně zaměřeny na interakci s CRD galektinu-3, tedy obsahují cukernou složku, která je schopná tuto strukturu obsadit a tím inhibovat jeho funkci. Také je možné galektin-3 inhibovat přes jeho N-terminální konec anebo delecí NH2 konce pomocí genetického inženýrství [67; 39].

Inhibitory, které byly použity v pokusu, neměly cytotoxický účinek na HSB. Ve vědecké studii Stegmayer *et al.* 2019. Porovnávali 3 inhibitory galektinu-3, dva byly thiodigalaktosidy a jeden byl α -d-galaktosid. V této studii zjišťovali jejich bazální toxicitu měřením buněčné

životaschopnosti v přítomnosti a nepřítomnosti inhibitorů. U ani jednoho z testovaných inhibitorů nebyla pozorována změna životaschopnosti buněk [68].

5 ZÁVĚR

Cílem experimentální části této práce bylo charakterizovat model plicní hypertenze u potkanů *in vivo* z hlediska exprese vybraných markerů v tkáních. Z potkanů vystavených normoxii a hypoxii byly izolovány pravé srdeční komory, plicní arterie a plíce. Bylo zjištěno, že:

1. V hypoxické plicní tkáni je exprese všech sledovaných markerů (α -aktinu, kalponinu, těžkého řetězce hladkosvalového myosinu, galektinu-3 a kolagenu I) významně zvýšená. V hypoxických tkáních z pravé srdeční komory a plicní arterie je exprese těchto markerů zvýšená pouze mírně, rozdíl není statisticky významný.

Z potkanů byly izolovány primokultury z plicní tepny. U normoxických primokultur byla v pilotních experimentech stanovena jejich schopnost adheze a proliferace. Ze získaných dat je patrné, že:

2. K adhezi téměř všech buněk dochází až po 24 hodinách po nasazení, zároveň buňky v tomto čase zaujímají největší plochu na kultivačním povrchu. Buňky dobře adherují s 10% FBS v médiu, přídavek 20% FBS do média adhezi buněk významně neovlivní. Při adhezi nezáleží, zda jsou buňky inkubovány v normoxických (21% O₂) nebo hypoxických (2.5% O₂) podmínkách. Inkubace v hypoxii může mít pouze mírně negativní vliv na rozprostření buněk.
3. Optimální násada pro pokusy zkoumající proliferaci buněk je 5 tisíc buněk na jamku v 96jamkové destičce. Po 1 dni jsou buňky při této násadě v 60% konfluenci, dochází k přichycení více jak 90% buněk a doba zdvojení dosahuje nízkých hodnot (26h).

U hypoxických a normoxických primokultur byla stanovena jejich schopnost proliferace a také exprese vybraných genů na úrovni mRNA a proteinu. Bylo zjištěno, že:

4. Není žádný významný rozdíl v proliferaci hypoxických a normoxických buněk. Významný vliv na proliferaci nemá ani změna kultivačních podmínek *in vitro* (hypoxie 2.5% O₂ vs. normoxie 21% O₂).
5. Izolované primokultury neexprimují marker CD31. Naopak marker CD90 je v menší míře v buňkách exprimován. V buňkách je pozorována rovněž exprese vimentinu i desminu. Není rozdíl v expresi těchto markerů mezi hypoxickými a normoxickými buňkami.

6. U hypoxických buněk je ve zvýšené míře exprimován gen pro kalponin, těžký řetězec hladkosvalového myosinu a galektin-3; v expresi α -aktinu a kolagenu I není patrný žádný rozdíl. Na úrovni proteinu lze pozorovat zvýšenou expresi pouze u kalponinu a kolagenu I.

Primokultury byly rovněž využity pro testování účinku inhibitorů galektinu-3. Z výsledků je možné soudit, že:

7. Žádný z testovaných inhibitorů nepůsobí ve sledovaných koncentracích a časových intervalech toxicky na hypoxické a normoxické primokultury.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Pulmonary hypertension* [online]. USA Atlanta: Center for Disease Control and Prevention, 2019 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: https://www.cdc.gov/heartdisease/pulmonary_hypertension.htm
- [2] *PLICNÍ HYPERTENZE* [online]. Praha: IKEM, 2014 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://www.pah.cz/experts.html#onas>
- [3] HOEPER, Marius M., Harm Jan BOGAARD, Robin CONDLIFFE, Robert FRANTZ, Dinesh KHANNA, Marcin KURZYNA, David LANGLEBEN, Alessandra MANES, Toru SATOH, Fernando TORRES, Martin R. WILKINS a David B. BADESCH. Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. 2013, **62**(25), 42-50 [cit. 2023-01-11]. ISSN 07351097. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2013.10.032
- [4] GALIè, Nazzareno, Vallerie V. MCLAUGHLIN, Lewis J. RUBIN a Gerald SIMONNEAU. An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *European Respiratory Journal* [online]. 2019, **53**(1) [cit. 2023-01-11]. ISSN 0903-1936. Dostupné z: doi:10.1183/13993003.02148-2018
- [5] *Pulmonary hypertension* [online]. USA Minnesota: Mayo clinic, 2022 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-hypertension/symptoms-causes/syc-20350697>
- [6] *About Pulmonary Hypertension: The Five Groups* [online]. Washington D.C.: Pulmonary Hypertension Association, 2020 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://phassociation.org/types-pulmonary-hypertension-groups/>
- [7] STRANGE, Geoff, David PLAYFORD, Simon STEWART, Jenny A DEAGUE, Helen NELSON, Aaron KENT a Eli GABBAY. Pulmonary hypertension: prevalence and mortality in the Armadale echocardiography cohort. *Heart* [online]. 2012, **98**(24), 1805-1811 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1355-6037. Dostupné z: doi:10.1136/heartjnl-2012-301992
- [8] KARDOS, Marek, Matus MACAJ, Monika KALDARAROVA a Jozef MASURA. Hoarse voice, first symptom of severe pulmonary hypertension. *International Journal of*

- Pediatric Otorhinolaryngology Extra* [online]. 2017, **16**, 4-6 [cit. 2023-04-17]. ISSN 18714048. Dostupné z: doi:10.1016/j.pedex.2016.12.002
- [9] FROST, Adaani, David BADESCH, J. Simon R. GIBBS, Deepa GOPALAN, Dinesh KHANNA, Alessandra MANES, Ronald OUDIZ, Toru SATOH, Fernando TORRES a Adam TORBICKI. Diagnosis of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* [online]. 2019, **53**(1) [cit. 2023-01-11]. ISSN 0903-1936. Dostupné z: doi:10.1183/13993003.01904-2018
- [10] MERCADANTE, A. A. a Avais RAJA. *Anatomy, Arteries* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls, 2023 [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547743/>
- [11] TRUCKER, William D., Carly WEBER a Bracken BURNS. *Anatomy, Thorax, Heart Pulmonary Arteries* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls, 2023 [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534812/>
- [12] *Pulmonary arterial hypertension: histology* [online]. Rare disease advisor, 2022 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://www.rarediseaseadvisor.com/hcp-resource/pulmonary-arterial-hypertension-histology/>
- [13] TOBAL, Rachid, Judith POTJEWIJD, Vanessa P. M. van EMPEL, Renee YSERMANS, Leon J. SCHURGERS, Chris P. REUTELINGSPERGER, Jan G. M. C. DAMOISEAUX a Pieter van PAASSEN. Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension: The Potential Involvement of Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in Medicine* [online]. 2021, **8** [cit. 2023-04-18]. ISSN 2296-858X. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2021.806899
- [14] TUDER, Rubin M., John C. MARECKI, Amy RICHTER, Iwona FIJALKOWSKA a Sonia FLORES. Pathology of Pulmonary Hypertension. *Clinics in Chest Medicine* [online]. 2007, **28**(1), 23-42 [cit. 2023-04-18]. ISSN 02725231. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccm.2006.11.010
- [15] YILDIZ, Pinar. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2009, **403**(1-2), 9-16 [cit. 2023-04-19]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2009.01.018

- [16] MORRELL, Nicholas W., Serge ADNOT, Stephen L. ARCHER Jocelyn DUPUIS, Peter LLOYD JONES, Margaret R. MACLEAN, Ivan F. MCMURTRY, Kurt R. STENMARK, Patricia A. THISTLETHWAITE, Norbert WEISSMANN, Jason X.-J. YUAN a E. Kenneth WEIR. Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. 2009, **54**(1), 20-31 [cit. 2023-04-19]. ISSN 07351097. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2009.04.018
- [17] RABINOVITCH, Marlene. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2012, **122**(12), 4306-4313 [cit. 2023-04-21]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI60658
- [18] SCHERMULY, Ralph T., Hossein A. GHOFrani, Martin R. WILKINS a Friedrich GRIMMINGER. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology* [online]. 2011, **8**(8), 443-455 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1759-5002. Dostupné z: doi:10.1038/nrcardio.2011.87
- [19] GAJECKI, Damian, Jakub GAWRYS, Ewa SZAHIDEWICZ-KRUPSKA a Adrian DOROSZKO. Novel Molecular Mechanisms of Pulmonary Hypertension: A Search for Biomarkers and Novel Drug Targets—From Bench to Bed Site. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2020, **2020**, 1-17 [cit. 2023-04-22]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2020/7265487
- [20] CHAUDHURY, Arindam a Philip H. HOWE. The tale of transforming growth factor-beta (TGF β) signaling: A soigné enigma. *IUBMB Life* [online]. 2009, **61**(10), 929-939 [cit. 2023-04-22]. ISSN 15216543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.239
- [21] RAJKUMAR, Revathi, Kazuhisa KONISHI, Thomas J. RICHARDS, David C. ISHIZAWAR, Andrew C. WIECHERT, Naftali KAMINSKI a Ferhaan AHMAD. Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [online]. 2010, **298**(4), 1235-1248 [cit. 2023-04-21]. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00254.2009
- [22] *Pulmonary hypertension: diagnostika a léčba* [online]. USA Minnesota: Mayo clinic, 2022 [cit. 2023-04-12]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-hypertension/diagnosis-treatment/drc-20350702>

- [23] HOEPER, Marius M, Hossein-Ardeschir GHOFrani, Ekkehard GRÜNIG, Hans KLOSE, Horst OLSCHIEWSKI a Stephan ROSENKRANZ. Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int.* [online]. 2017, **114**(5), 73-84 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: doi:10.3238/arztebl.2017.0073
- [24] DUMIC, Jerka, Sanja DABELIC, Mirna FLÖGEL, Jingni HE, Tangzhiming LI, Lihuang ZHA, Xiaohui LI, Qiangqiang QI, Yuwei LIU a Zaixin YU. Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2006, **1760**(4), 616-635 [cit. 2023-04-23]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2005.12.020
- [25] GALECTIN-3 AS A MULTIFUNCTIONAL PROTEIN. *CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS* [online]. 2004, **9**, 305–328 [cit. 2023-04-24]. Dostupné z: http://www.cmbl.org.pl/pdf/Vol9_p305.pdf
- [26] *LGALS3: galectin 3 [Homo sapiens (human)]* [online]. USA Bethesda: National Library of Medicine, 2023 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3958>
- [27] VAN DEN BRÛLE, Frédéric A. WALTREGNY, Fu-Tong LIU a Vincent CASTRONOVO. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int. J. Cancer* [online]. 2000, **89**, 361-367 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: doi:10.1002/1097-0215(20000720)89:4<361::AID-IJC8>3.0.CO;2-U
- [28] HAUDEK, Kevin C., Kimberly J. SPRONK, Patricia G. VOSS, Ronald J. PATTERSON, John L. WANG a Eric J. ARNOYS. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2010, **1800**(2), 181-189 [cit. 2023-04-23]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.005
- [29] OCHIENG, Josiah, Vyacheslav FURTAK a Pavel LUKYANOV. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate Journal* [online]. 2002, **19**(7-9), 527-535 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0282-0080. Dostupné z: doi:10.1023/B:GLYC.0000014082.99675.2f

- [30] NANGIA-MAKKER, Pratima, Vitaly BALAN a Avraham RAZ. Regulation of Tumor Progression by Extracellular Galectin-3. *Cancer Microenvironment* [online]. 2008, **1**(1), 43-51 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1875-2292. Dostupné z: doi:10.1007/s12307-008-0003-6
- [31] FORTUNA-COSTA, Anneliese, Angélica M. GOMES, Eliene O. KOZLOWSKI, Mariana P. STELLING a Mauro S. G. PAVÃO. Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis. *Frontiers in Oncology* [online]. 2014, **4** [cit. 2023-04-24]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2014.00138
- [32] HENDERSON, Neil C. a Tariq SETHI. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological Reviews* [online]. 2009, **230**(1), 160-171 [cit. 2023-04-24]. ISSN 01052896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00794.x
- [33] BARMAN, Scott A., Xueyi LI, Stephen HAIGH, Dmitry KONDRIKOV, Keyvan MAHBOUBI, Zsuzsanna BORDAN, David W STEPP, Jiliang ZHOU, Yusi WANG, Daniel S. WEINTRAUB, Peter TRABER, William SNIDER, Danny JONIGK, Jennifer SULLIVAN, G. Ryan CRISLIP, Joshua T. BUTCHER, Jennifer TOMPSON, Yunchao SU, Feng CHEN a David J. R. FULTON. Galectin-3 is expressed in vascular smooth muscle cells and promotes pulmonary hypertension through changes in proliferation, apoptosis, and fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [online]. 2019, **316**(5), 784-797 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1040-0605. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.00186.2018
- [34] SCIACCHITANO, Salvatore, Luca LAVRA, Alessandra MORGANTE, Alessandra ULIVIERI, Fiorenza MAGI, Gian DE FRANCESCO, Carlo BELLOTTI, Leila SALEHI a Alberto RICCI. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(2) [cit. 2023-04-24]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19020379
- [35] LI, Liu-cheng, Jun LI a Jian GAO. Functions of Galectin-3 and Its Role in Fibrotic Diseases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2014, **351**(2), 336-343 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.114.218370
- [36] HARA, Akira, Masayuki NIWA, Tomohiro KANAYAMA, Kei NOGUCHI, Ayumi NIWA, Mikiko MATUSO, Takahiro KURODA, Yuichiro HATANO, Hideshi OKADA

- a Hiroyuki TOMITA. Galectin-3: A Potential Prognostic and Diagnostic Marker for Heart Disease and Detection of Early Stage Pathology. *Biomolecules* [online]. 2020, **10**(9) [cit. 2023-04-24]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10091277
- [37] FULTON, David J. R., Xueyi LI, Zsuzsanna BORDAN, Yusi WANG, Keyvan MAHBOUBI, R. Daniel RUDIC, Stephen HAIGH, Feng CHEN a Scott A. BARMAN. *Galectin-3: A Harbinger of Reactive Oxygen Species, Fibrosis, and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension* [online]. 2019, **31**(14), 1053-1069 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2019.7753
- [38] BARMAN, Scott A., Feng CHEN, Xueyi LI, Stephen HAIGH, David W. STEPP, Dimitry KONDRIKOV, Keyvan MAHBOUBI, Zsuzsanna BORDAN, Peter TRABER, Yunchao SU a David J. R. FULTON. Galectin-3 Promotes Vascular Remodeling and Contributes to Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2018, **197**(11), 1488-1492 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1073-449X. Dostupné z: doi:10.1164/rccm.201711-2308LE
- [39] SUTHAHAR, Navin, Wouter C. MEIJERS, Herman H.W. SILLJÉ, Jennifer E. HO, Fu-Tong LIU a Rudolf A. DE BOER. Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. *Theranostics* [online]. 2018, **8**(3), 593-609 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.22196
- [40] KOLÁŘ, František, Jana JEŽKOVÁ, Patricie BALKOVÁ, Jiří BŘEH, Jan NECKÁŘ, František NOVÁK, Olga NOVÁKOVÁ, Helena TOMÁŠOVÁ, Martina SRBOVÁ, Bohuslav OŠŤÁDAL, Jiří EILHELM a Jan HERGET. Role of oxidative stress in PKC- δ upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [online]. 2007, **292**(1), 224-230 [cit. 2023-04-13]. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00689.2006
- [41] *ANIMAL TISSUE RNA PURIFICATION kit* [online]. In: . [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: <https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/PI25700-9%20Animal%20Tissue%20RNA%20Purification%20Kit%20Insert.pdf>
- [42] *Total RNA Purification Plus Micro Kit* [online]. In: . [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/PI48500-5%20Total%20RNA%20Purification%20Plus%20Micro%20Kit%20Insert_0.pdf

- [43] METZ, Richard P., Jan L. PATTERSON a Emily WILSON. Vascular Smooth Muscle Cells: Isolation, Culture, and Characterization. *Cardiovascular Development* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 169-176 [cit. 2023-04-25]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-522-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-523-7_16
- [44] TONAROVA, Pavla, Katerina LOCHOVSKA, Robert PYTLIK, Marie HUBALEK KALBACOVA a Philippe BOURIN. The Impact of Various Culture Conditions on Human Mesenchymal Stromal Cells Metabolism. *Stem Cells International* [online]. 2021, **2021**, 1-15 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1687-9678. Dostupné z: doi:10.1155/2021/6659244
- [45] *What does fetal bovine serum do* [online]. USA: ThermoFischer Scientific [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media/fbs-basics/what-does-fetal-bovine-serum-do.html>
- [46] *Culture Collections: Screening FBS* [online]. UK: UK Health Security Agency, 2017 [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://www.culturecollections.org.uk/news/ecacc-news/fbs-screening.aspx>
- [47] KHASAWNEH, Ramada R., Ahmed Hesham AL SHARIE, Ejlal ABU-EL RUB, Abdullah Omar SERHAN a Hayam Nizar OBEIDAT. Addressing the impact of different fetal bovine serum percentages on mesenchymal stem cells biological performance. *Molecular Biology Reports* [online]. 2019, **46**(4), 4437-4441 [cit. 2023-04-25]. ISSN 0301-4851. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-019-04898-1
- [48] PROUDFOOT, Diane a Catherine SHANAHAN. Human Vascular Smooth Muscle Cell Culture. *Human Cell Culture Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 251-263 [cit. 2023-04-25]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-366-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-367-7_17
- [49] HUMAR, Rok, Fabrice N. KIEFER, Hartmut BERNS, Thérèse J. RESINK a Edouard J. BATTEGAY. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR) -dependent signaling. *FASEB J* [online]. 2002, **16**, 771–780 [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1096/fj.01-0658com

- [50] VENKATARAMANI, Vivek, Stefan KÜFFER, Kenneth C.P. CHEUNG, Xuejun JIANG, Lorenz TRÜMPER, Gerald G. WULF a Philipp STRÖBEL. CD31 Expression Determines Redox Status and Chemoresistance in Human Angiosarcomas. *Clinical Cancer Research* [online]. 2018, **24**(2), 460-473 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1778
- [51] AVRIL, Tony, Amandine ETCHEVERRY, Raphaël PINEAU, Joanna OBACZ, Gwénaële JEGOU, Florence JOUAN, Pierre-Jean LE RESTE, Masumeh HATAMI, Rivka R. COLEN, Brett L CARLSON, Paul A DECKER, Jann N SARKARIA, Elodie VAULÉON, Dan Cristian CHIFOREANU, Anne CLAVREUL, Jean MOSSER, Eric CHEVET a Véronique QUILLIEN. CD90 Expression Controls Migration and Predicts Dasatinib Response in Glioblastoma. *Clinical Cancer Research* [online]. 2017, **23**(23), 7360-7374 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1549
- [52] CLÉMENT, Marc, Joel CHAPPELL, Juliette RAFFORT, Fabien LAREYRE, Marie VANDESTIENNE, Annabel L TAYLOR, Alison FINIGAN, James HARRISON, Martin R. BENNETT, Patrick BRUNEVALL, Soraya TALEB, Helle F. JØRGENSEN a Ziad MALLAT. Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Autophagy in Dissecting Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2019, **39**(6), 1149-1159 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.118.311727
- [53] DAUPHIN, Maryline, Coralie BARBE, Sarah LEMAIRE, Béatrice NAWROCKI-RABY, Eymeric LAGONOTTE, Gonzague DELEPINE, Philippe BIREMBAUT, Christine GILLES a Myriam POLETTE. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* [online]. 2013, **81**(1), 117-122 [cit. 2023-04-25]. ISSN 01695002. Dostupné z: doi:10.1016/j.lungcan.2013.03.011
- [54] MCINROY, Lorna a Arto MÄÄTTÄ. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2007, **360**(1), 109-114 [cit. 2023-04-25]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.036
- [55] ARENTZ, Georgia, Tim CHATAWAY, Timothy J PRICE, Zaipul IZWAN, Gemma HARDI, Adrian G CUMMINS a Jennifer E HARDINGHAM. Desmin expression in

- colorectal cancer stroma correlates with advanced stage disease and marks angiogenic microvessels. *Clinical Proteomics* [online]. 2011, **8**(1) [cit. 2023-04-25]. ISSN 1542-6416. Dostupné z: doi:10.1186/1559-0275-8-16
- [56] SMYTH, Leon C.D., Justin RUSTENHOVEN, Emma L. SCOTTER, Patrick SCHWEDER, Richard L.M. FAULL, Thomas I.H. PARK a Mike DRAGUNOW. Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells. *Journal of Chemical Neuroanatomy* [online]. 2018, **92**, 48-60 [cit. 2023-04-25]. ISSN 08910618. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchemneu.2018.06.001
- [57] YAO, Wenjuan, Qinju SUN, Lei HUANG, Guoliang MENG, Huiming WANG, Xiang JING a Wei ZHANG. Tetrahydroxystilbene glucoside inhibits TNF- α -induced migration of vascular smooth muscle cells via suppression of vimentin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* [online]. 2016, **94**(2), 155-160 [cit. 2023-04-25]. ISSN 0008-4212. Dostupné z: doi:10.1139/cjpp-2015-0160
- [58] TANG, Lian, Fan DAI, Yan LIU, Xiaoqiang YU, Chao HUANG, Yuqin WANG a Wenjuan YAO. RhoA/ROCK signaling regulates smooth muscle phenotypic modulation and vascular remodeling via the JNK pathway and vimentin cytoskeleton. *Pharmacological Research* [online]. 2018, **133**, 201-212 [cit. 2023-04-25]. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2018.05.011
- [59] LIU, Yingxi, Bingqing DENG, Yong ZHAO, Shuanglun XIE a Ruqiong NIE. Differentiated markers in undifferentiated cells: Expression of smooth muscle contractile proteins in multipotent bone marrow mesenchymal stem cells [online]. 2013, **55**(5), 591-605 [cit. 2023-04-25]. ISSN 00121592. Dostupné z: doi:10.1111/dgd.12052
- [60] RENSEN, S. S. M., P. A. F. M. DOEVENDANS a G. J. J. M. VAN EYS. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal* [online]. 2007, **15**(3), 100-108 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1568-5888. Dostupné z: doi:10.1007/BF03085963
- [61] LIN, Jiaying, Qianqian ZHU, Jialyu HUANG, Renfei CAI a Yanping KUANG. Hypoxia Promotes Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC) Differentiation of Adipose-Derived Stem Cell (ADSC) by Regulating Mettl3 and Paracrine Factors. *Stem Cells International*

- [online]. 2020, **2020**, 1-11 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2020/2830565
- [62] BLANDA, Valeria, Umberto Marcello BRACALE, Maria Donata DI TARANTO a Giuliana FORTUNATO. Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(23) [cit. 2023-04-25]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21239232
- [63] WAGENHÄUSER, Markus U, Matthias F PIETSCHMANN, Birte SIEVERS, Denitsa DOCHEVA, Matthias SCHIEKER, Volkmar JANSSON a Peter E MÜLLER. Collagen type I and decorin expression in tenocytes depend on the cell isolation method. *BMC Musculoskeletal Disorders* [online]. 2012, **13**(1) [cit. 2023-04-25]. ISSN 1471-2474. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2474-13-140
- [64] HOSPER, Nynke A., Paul P. VAN DEN BERG, Saskia DE ROND, Eliane R. POPA, Martijn J. WILMER, Rosalinde MASEREEUW a Ruud A. BANK. Epithelial-to-mesenchymal transition in fibrosis: Collagen type I expression is highly upregulated after EMT, but does not contribute to collagen deposition. *Experimental Cell Research* [online]. 2013, **319**(19), 3000-3009 [cit. 2023-04-25]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2013.07.014
- [65] ZHANG, Jing, Lelin HUANG, Xing SHI, Liu YANG, Fuzhou HUA, Jianyong MA, Wengen ZHU, Xiao LIU, Rui XUAN, Yunfeng SHEN, Jianping LIU, Xiaoyang LAI a Peng YU. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway. *Aging* [online]. 2020, **12**(23), 24270-24287 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1945-4589. Dostupné z: doi:10.18632/aging.202143
- [66] FENSTER, Brett E., Luis LASALVIA, Joyce D. SCHROEDER, Jamey SMYSER, Lori J. SILVEIRA, J. Kern BUCKNER a Kevin K. BROWN. Galectin-3 levels are associated with right ventricular functional and morphologic changes in pulmonary arterial hypertension. *Heart and Vessels* [online]. 2016, **31**(6), 939-946 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0910-8327. Dostupné z: doi:10.1007/s00380-015-0691-z

- [67] SLACK, R.J., R. MILLS a A.C. MACKINNON. *The therapeutic potential of galectin-3 inhibition in fibrotic disease* [online]. 2021, **130** [cit. 2023-04-25]. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2020.105881
- [68] STEGMAYR, John, Fredrik ZETTERBERG, Michael C. CARLSSON, Xiaoli HUANG, Gunjan SHARMA, Barbro KAHL-KNUTSON, Hans SCHAMBYE, Ulf j. NILSSON, Stina OREDSSON a Hakon LEFFLER. Extracellular and intracellular small-molecule galectin-3 inhibitors. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2023-04-25]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-38497-8