



## OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

**Studentka:** Bc. Kateřina Pokorná, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

**Název diplomové práce:** Model plicní hypertenze *in vitro* a *in vivo* u potkana pro testování nových léčiv cílících na galektin-3

**Oponentka:** Doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc., Fyziologický ústav AVČR, Praha

Předkládaná práce se zabývá patofyziologií i možnostmi léčby plicní hypertenze, tj. závažného a poměrně rozšířeného onemocnění, jehož kauzální a účinná léčba není dosud uspokojivě vyřešena a omezuje se jen na mírnění symptomů a zpomalování progresu nemoci.

Práce má dvě základní části, a sice část teoretickou a část experimentální. Část teoretická analyzuje příčiny a klinické příznaky onemocnění, jeho charakteristiku na tkáňové, buněčné i molekulární úrovni, jeho diagnostiku a současné přístupy k léčbě, a rovněž se zaměřuje na roli hypoxie a galektinu-3 ve vzniku a rozvoji plicní hypertenze. Role hypoxie a galektinu-3 je dále podrobněji rozpracována v části experimentální. Tato část zahrnuje jednak studie *in vitro* na kulturách hladkých svalových buněk (HSB) izolovaných z plicních arterií normoxických a hypoxických potkanů, a jednak studie *in vivo* na normoxických a hypoxických potkanech, u nichž je analyzována a porovnána exprese vybraných genů v tkáni plic, pravé srdeční komory a plicní arterie.

Autorka zjistila, že HSB z plicních arterií hypoxických potkanů *in vitro* jeví určitou tendenci proliferovat rychleji (ač tento rozdíl nedosáhl úrovně statistické významnosti) než HSB z arterií potkanů normoxických, a mají zvýšenou expresi mRNA pro kalponin-1 a těžký řetězec myosinu (tj. pro proteiny zúčastněné v kontrakci HSB), a rovněž i pro galektin-3. U kalponinu-1 je zvýšená exprese u HSB z hypoxických potkanů patrna i na úrovni proteinu, a v případě galektinu-3 se u hypoxických a normoxických HSB liší distribuce tohoto proteinu v rámci buňky. Distribuce kolagenu I na úrovni proteinu se rovněž liší u hypoxických a normoxických HSB.

Ještě výraznější rozdíly v expresi vybraných ukazatelů jsou patrné v celkové plicní tkáni izolované z potkanů – u hypoxických potkanů je v této tkáni významně zvýšena exprese mRNA nejen pro kalponin-1, těžký řetězec myosinu, galektin-3 a kolagen I, ale i pro alfa-aktin, další kontraktilní protein HSB i dalších buněčných typů, např. myofibroblastů. Mírné zvýšení všech těchto markerů je patrné i v tkáni pravé srdeční komory a plicní arterie hypoxických potkanů ve srovnání s potkany normoxickými.

Po vědecké stránce je práce vypracována velmi pečlivě, přehledně a systematicky. Autorka musela zvládnout řadu zcela nových technik obvyklých spíše pro studenty biologických oborů, jako je izolace a kultivace buněk *in vitro*, jejich expanze do potřebných kvantit a jejich kryoprezervace, fluorescenční a imunocytochemické barvení specifických ukazatelů buněk, pokročilá mikroskopie, průtoková cytometrie a biochemické a molekulárně-biologické techniky, jako je především PCR v reálném čase. Celkový rozsah práce je 83 stran a text odkazuje na 68 citací, z nichž většina se vztahuje k odborným článkům, publikovaným v mezinárodních recenzovaných časopisech, čímž autorka prokázala i svou schopnost pracovat se světovou odbornou literaturou.

Určité „rezervy“ spatřuji v jazykové stránce práce, kde lze najít poměrně četné překlepy (například hned v počátečním seznamu obrázků: „zobrazení zdravé tepny, zbytnělé tepny a více zbytnělé tepny“), občas i

pravopisné chyby (embriogeneze místo embryogeneze, pericity místo pericyty, či nedodržení shody podmětu s přísudkem – věty typu „buňky dosahovali“), výrazy z laboratorního slangu („mrazák“ místo mrazicí box, „focení“ místo fotografování) nebo i poněkud neobratná stylistická vyjádření, jako např. „To má na svědomí počáteční 12 aminokyselinová sekvence N-terminální domény“ (těžko říci, že aminokyselinová sekvence má nějaké „svědomí“). V práci se vyskytují i četná zkomolená anglická slova (např. „supresorovat“, „downregulace“ „upregulace“ či „skafoldní proteiny“, které se autorka mohla pokusit nahradit vhodnými českými výrazy. Výraz „cévní epitel“ rovněž není zcela vhodný, neboť výstelka cév se obvykle nazývá „endotel“. Samostatnou kapitolou je skloňování slov latinského původu – například není vhodné psát „vaskulárním tonusem“, ale „vaskulárním tonem“.

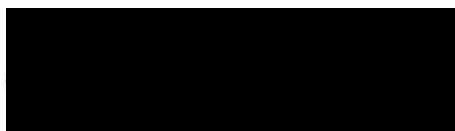
Tyto drobné nedostatky však nijak nesnižují značný přínos práce k objasnění mechanismů vzniku a rozvoje plicní hypertenze i v nastínění některých nových možností její léčby, např. inhibicí galektinu-3. V práci byly testovány čtyři potenciální inhibitory galektinu-3, vyvíjené ve spolupráci Fyziologického ústavu s Mikrobiologickým ústavem AVČR v rámci nedávno získaného grantového projektu GAČR č. 22-00317S, k jehož plnění Bc. Kateřina Pokorná rovněž významně přispěla. Ačkoli se neprokázal inhibiční účinek žádné z testovaných látek na proliferaci HSB z plicních arterií normoxických a hypoxických potkanů, tyto látky nepůsobily cytotoxicky na uvedené buňky, a zachovaly si tak potenciál pro budoucí vývoj léčiv.

Diplomovou práci proto doporučuji k obhajobě s následným udělením titulu Mgr., a hodnotím ji (vzhledem k její vědecké závažnosti) klasifikačním stupněm A. Na závěr bych ráda položila následující dotazy:

1) Bylo dosaženo zajímavého zjištění, že hladké svalové buňky (HSB) z plicních arterií hypoxických potkanů jeví zvýšenou expresi kalponinu-1 a těžkého řetězce myosinu, které jsou považovány za ukazatele fenotypické maturace a kontraktálního fenotypu HSB. Současně však HSB z hypoxických potkanů jeví tendenci ke zvýšené proliferaci, tedy zvýšenému počtu buněk *in vitro*, který je patrný z obrázků 10 i 25. Z literatury je známo, že zvýšená proliferace HSB je naopak spojena se ztrátou markerů fenotypické maturace a kontraktálního fenotypu. Je nějaké vysvětlení pro tuto určitou disproporci?

2) Absence cytotoxicity testovaných inhibitorů galektinu-3 byla určována víceméně nepřímo, a sice počítáním buněk v mikroskopických zorných polích. Takto ovšem mohly být započítány i buňky se sníženou životaschopností. Nebylo by vhodnější užít přímý test životaschopnosti buněk, například ve formě komerčně dostupného kitu, jako je LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen) nebo testy aktivity mitochondriálních enzymů, jako je MTS, XTT či resazurin (Alamar blue), apod.?

V Praze, dne 14. 5. 2023



**INSTITUTE OF PHYSIOLOGY ASCR**  
Institute of Physiology ASCR, v.v.i.  
Biomaterials and Tissue Engineering  
Videňská 1083, Prague 4  
142 20, Czech Republic

Lucie Bačáková

Doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.  
Vedoucí Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství  
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.  
Videňská 1083  
142 00 Praha 4 - Krč

Tel.: [redacted]; [redacted]  
E-mail: [redacted]