



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Úloha galektinu-3 ve fyziologii a patofyziologii buněk srdce a cévní stěny

Role of galectin-3 in the physiology and pathophysiology of cells from heart and blood vessel wall

Bakalářská práce

Studijní program: (B5345) Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: (5345R020) Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Kateřina Pokorná

Vedoucí bakalářské práce: doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Kladno 2021

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Pokorná** Jméno: **Kateřina** Osobní číslo: **483298**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Úloha galektinu-3 ve fyziologii a patofyziologii buněk srdce a cévní stěny

Název bakalářské práce anglicky:

Role of galectin-3 in physiology and pathophysiology of cells from heart and blood vessel wall

Pokyny pro vypracování:

V některých tkáních kardiovaskulárního systému může dojít vlivem nedostatečného prokrvení (při ucpávání cév) nebo při obstrukcích a onemocněních dýchacího ústrojí vlivem nedostatečného příjmu kyslíku (obstruktivní spánková apnoe, cystická fibróza) ke vzniku patofyziologických změn. Jedním z perspektivních terapeutických cílů při léčbě těchto patofyziologických remodelací může být galektin-3. Jedná se o protein, který v závislosti na své subcelulární lokalizaci hraje roli v řadě fyziologických a patofyziologických buněčných procesů. Tento protein podporuje proliferaci a angiogenesi, může také ovlivňovat adhezi buněk k extracelulární matrix či k jiným buňkám. Navíc byla prokázána jeho schopnost indukovat srdeční hypertrofii a fibrózu, kornatění cév nebo hypoxií indukovanou pulmonální hypertenzi. Cílem teoretické části práce bude vypracovat rešerši shrnující současné poznatky o galektinu-3 a jeho roli ve fyziologických a patofyziologických procesech v buňkách srdce a cévní stěny. Cílem experimentální části práce bude charakterizovat vliv galektinu-3 a jeho inhibitorů na chování buněčných primokultur izolovaných ze srdce a cévní stěny.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Suthahar N., Meijers W. C., Silljé H. H. W., Ho J. E., Liu F-T., de Boer R. A., Galectin-3 activation and inhibition in heart failure and cardiovascular disease: an update, *Theranostics*, číslo 8(3), 2018, ISSN 1838-7640
- [2] He J., Li X., Luo H., Li T., Zhao L., Qi Q., Liu Y., Yu Z., Galectin-3 mediates the pulmonary arterial hypertension-induced right ventricular remodeling through interacting with NADPH oxidase 4., *Journal of the American Society of Hypertension*, 2017, ISSN 1933-1711
- [3] Barman S. A. et al, 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*, číslo 316(5), 2019, ISSN 1522-1504

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:


doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Mgr. Antonín Sedlář

Datum zadání bakalářské práce: **09.12.2020**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**


prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry


prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Úloha galektinu-3 ve fyziologii a patofyziologii buněk srdce a cévní stěny“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 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.

V Kladně dne 12.05.2021

.....
Kateřina Pokorná

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé práce doc. MUDr. Lucii Bačákové, CSc. za její vřelý přístup, ochotu a podnětné rady při psaní práce. Ráda bych také poděkovala Mgr. Antonínu Sedláři (student PhD) za jeho vlídnost, ochotu a hlavně trpělivost, za jeho cenné teoretické a praktické rady, které dopomohly k vypracování a dokončení této práce. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala celému kolektivu oddělení Biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky za veškerou pomoc a poskytnutí prostoru a materiálu k vypracování praktické části mé bakalářské práce.

ABSTRAKT

Galektin-3 je protein vázající specificky β -galaktosidy, a to za pomoci vazebné domény rozpoznávající sacharid (CRD). Galektinu-3 se přisuzuje mnoho funkcí napomáhajících regulovat vitální procesy buňky. Pro výsledky této práce je nejdůležitější, že se tento protein zapojuje do regulace proliferace a apoptózy.

Galektin-3 může podporovat, ale i naopak potlačovat buněčný růst. Byl pozorován také jeho apoptotický nebo antiapoptotický efekt. Účinek galektinu-3 závisí především na jeho lokalizaci v buňkách, na konkrétním buněčném typu, ve kterém je exprimován, a zda byl galektin-3 endogenního či exogenního původu.

V našich experimentech bylo zjištěno, že hladké svalové buňky (HSB) izolované z plicních arterií potkanů exprimují galektin-3. Při přidání rekombinantního galektinu-3 do média s 0,5% fetálním bovinním sérem (FS) měl galektin-3 negativní vliv na proliferaci, zatímco v médiu s 10% FS byl tento vliv maskován. Po přidání rekombinantního galektinu-3 došlo k apoptóze jak hypoxických, tak normoxických HSB. Tento účinek byl výraznější u hypoxických buněk. K zamezení apoptózy byla použita laktóza, která se projevila jako účinný inhibitor tohoto efektu.

Klíčová slova

Galektin-3; hladké svalové buňky; proliferace; apoptóza; hypoxie; pulmonální hypertenze; laktóza

ABSTRACT

Galectin-3 is a β -galactoside specific binding protein, using a carbohydrate recognition binding domain (CRD). Galectin-3 is believed to have many functions that help to regulate the vital processes of the cell. The most important function for the results of this work is that this protein is involved in the regulation of proliferation and apoptosis.

Galectin-3 can support but can also suppress the cell growth. Its apoptotic or antiapoptotic effect has also been observed. The effect of galectin-3 depends primarily on its localization in cells, particularly on cell type in which it is expressed, and whether galectin-3 is of endogenous or exogenous origin.

In our experiments, smooth muscle cells (SMCs) isolated from pulmonary arteries of rats were found to express galectin-3. When recombinant galectin-3 was added to a medium with 0.5% fetal bovine serum (FS), galectin-3 had a negative effect on the cell proliferation, which was masked in a medium with 10% FS. Apoptosis of both hypoxic and normoxic SMCs occurred upon addition of recombinant galectin-3. This effect was most pronounced in hypoxic cells. Lactose has been used to prevent apoptosis, and it proved to be a potent inhibitor of this effect.

Keywords

Galectin-3; smooth muscle cells; proliferation; apoptosis; hypoxia; pulmonary hypertension; lactose

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce.....	11
3	Přehled současného stavu.....	12
3.1	Lektiny.....	12
3.2	Galektiny.....	12
3.3	Galektin-3.....	14
3.4	Strukturální a biochemické vlastnosti galektinu-3.....	15
3.4.1	N-terminální řetězec (ND).....	15
3.4.2	Vazebná doména rozpoznávající sacharid (CRD).....	16
3.4.3	Vazebná specifčnost galektinu-3 pro sacharidy.....	17
3.5	Syntéza a sekrece galektinu-3.....	17
3.6	Lokalizace galektinu-3 v buňkách a v tkáních.....	18
3.7	Funkce galektinu-3.....	19
3.8	Proapoptotická a antiapoptotická aktivita galektinu-3.....	20
3.9	Regulace exprese galektinu-3.....	21
3.10	Role galektinu-3 při různých klinických stavech a onemocnění	22
3.10.1	Pulmonální arteriální hypertenze.....	23
4	Metodika.....	25
4.1	Použité přístroje a materiály.....	25
4.1.1	Přístrojové vybavení.....	25
4.1.2	Použitý materiál.....	25
4.2	Experimentální model hypoxické plicní arteriální hypertenze.....	26

4.3	Izolace a expanze hladkých svalových buněk plicních arterií potkanů	27
4.4	Kultivace buněk:	27
4.5	Trypsinizace buněk – příprava HSB pro další práci.....	28
4.6	Automatické stanovení počtu a viability buněk v suspenzi na Cell counter.....	28
4.7	Příprava rekombinantního galektinu-3	29
4.8	Inkubace buněk s galektinem-3	29
4.9	Nepřímé stanovení proliferace buněk	29
4.9.1	Princip	29
4.9.2	Postup:	30
4.10	Imunofluorescenční barvení markerů hladkých svalových buněk a galektinu-3:	30
4.10.1	Princip:	30
4.10.2	Postup:.....	31
4.11	Fluorescenční barvení	32
4.12	Stanovení apoptózy:	33
4.12.1	Stanovení apoptózy na adherovaných buňkách.....	33
4.12.2	Stanovení apoptózy buněk v suspenzi s využitím průtokového cytometru	34
4.13	Mikroskopie, analýza a zpracování mikrofotografií	34
4.14	Statistické zpracování dat	34
5	Výsledky	36
5.1	Expresse hladkosvalových markerů v buněčných kulturách izolovaných z plicní arterie potkana	36

5.2	Exprese galektinu-3 v hladkých svalových buňkách	37
5.3	Vliv rekombinantního galektinu-3 na proliferaci hladkých svalových buněk	39
5.4	Apoptotický účinek rekombinantního galektinu-3 v hladkých svalových buňkách	45
6	Diskuze	51
7	Závěr	57
8	Seznam použitých zkratk.....	58
9	Seznam použité literatury	60
10	Seznam použitých obrázků	68
11	Seznam použitých tabulek.....	72

1 ÚVOD

Galektin-3 je protein patřící do rodiny lektinů, vázající se pomocí vazebné domény rozpoznávající sacharid (CRD) specificky na β -galaktosidy. Podle známých studií galektin-3 podporuje proliferaci různých buněčných typů, včetně hladkých svalových buněk (HSB) cévní stěny a srdečních fibroblastů. Vlivem proliferace HSB dochází ke ztlušťování cév, které ztrácejí svou elasticitu a dochází tak k zvýšení krevního tlaku. K takovéto přestavbě cévních stěn, spojené s hypertrofií jejich hladké svaloviny, dochází např. při hypoxické pulmonální arteriální hypertenzi. Na počátku tohoto onemocnění stojí alveolární hypoxie, která může nastat vlivem nedostatku kyslíku ve vnějším prostředí organismu, jako je pobyt ve vysokých nadmořských výškách či v experimentální hypoxické komoře. Dalšími příčinami pulmonální hypoxie je obstrukce dýchacích cest, zánětlivé onemocnění plic, astma, chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), embolizace plicních cév nebo i kardiovaskulární onemocnění (např. srdeční selhání, syndrom obstrukční spánkové apnoe). Je známo, že galektin-3 je důležitým prognostickým ukazatelem závažnosti plicní hypertenze, ale jeho role ve vzniku a rozvoji tohoto onemocnění nebyla stále ještě dokonale objasněna. Cílem této práce je charakterizovat vliv galektinu-3 a jeho inhibitoru laktózy na chování primokultur hladkých svalových buněk izolovaných z pulmonálních arterií potkanů. Získané výsledky budou využity pro další výzkum úlohy galektinu-3 v patologických remodelacích tkání cévní stěny při hypoxické pulmonální arteriální hypertenzi a pro hledání nových možností léčby tohoto závažného onemocnění.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce je vypracovat rešerši shrnující současné poznatky o galektinu-3 a jeho roli ve fyziologických a patofyziologických procesech v buňkách srdce a cévní stěny.

Cílem experimentální části práce je charakterizovat vliv galektinu-3 a jeho inhibitoru laktózy na chování primokultur hladkých svalových buněk izolovaných z pulmonálních arterií potkana.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

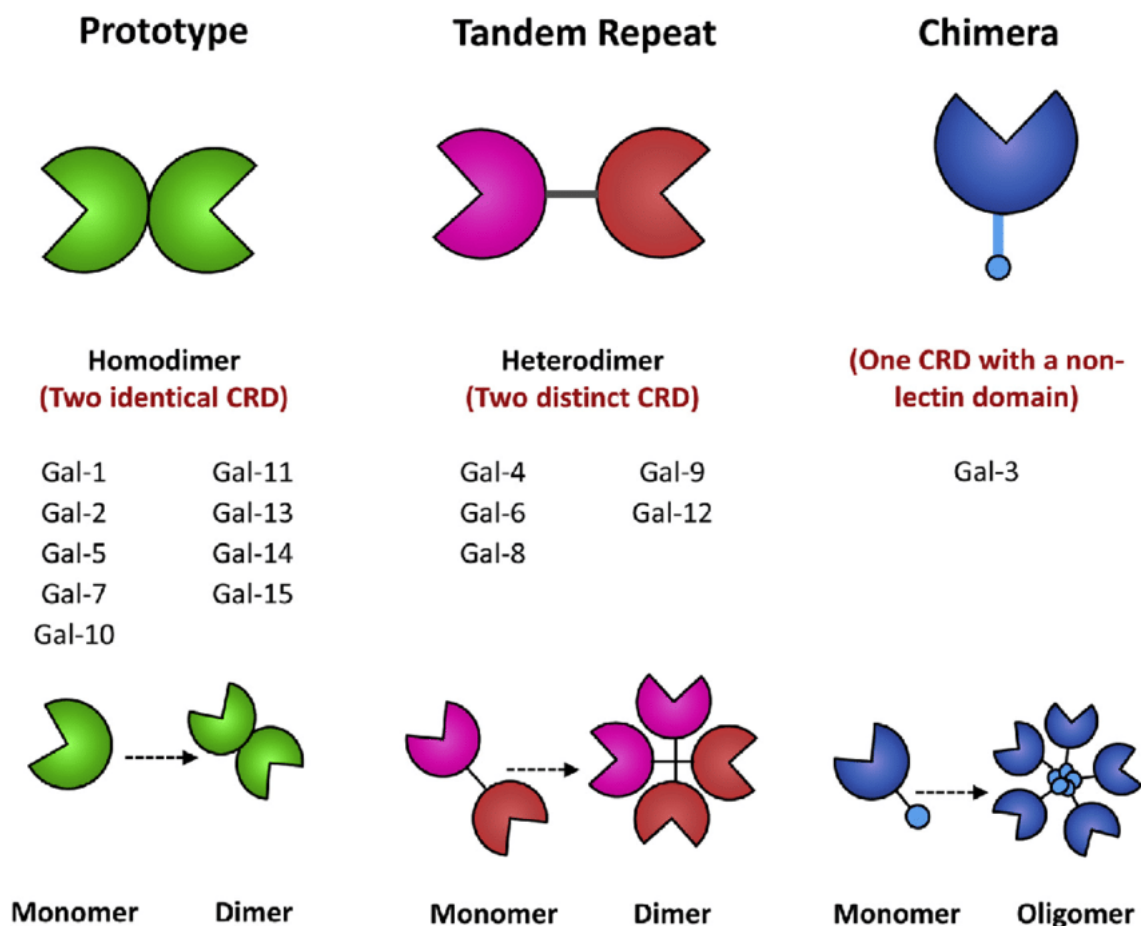
3.1 Lektiny

Lektiny jsou specifickou skupinou proteinů, které vážou specificky a reversibilně sacharidy. Hojně se vyskytují ve všech organismech a účastní se mnoha procesů, které souvisí s vitálními funkcemi buňky. Lektiny zprostředkovávají adhezi mezi buňkami, mezi buňkou a extracelulární matrix, buněčnou proliferaci a apoptózu. Jejich hlavní biomedicínské využití spočívá v detekci, izolaci a charakterizaci glykokonjugátů v roztoku, ale také na povrchu a uvnitř buňky. Lektiny jsou primárně děleny do pěti skupin s ohledem na monosacharidy, ke kterým mají největší afinitu: mannóza, galaktóza/N-acetylgalaktosamin, N-acetylglukosamin, fukóza a kyselina N-acetylneuraminová. Lektiny se dělí také podle fylogenetického původu na rodiny, ale některé skupiny mohou toto rozdělení přesahovat. Tyto rodiny sdílejí homologní sekvence a mají podobnou terciální a kvarterní strukturu. Galektiny jsou převážně živočišné [1; 2].

3.2 Galektiny

Galektiny byly zpočátku izolovány jako proteiny vázající β -galaktosidy. Jsou syntetizovány v cytoplazmě a interagují s glykany na buněčném povrchu, po nich následuje jejich sekrece neklasickou cestou, která je např. zprostředkována exosomy. Galektiny regulují mnoho buněčných procesů zahrnující proliferaci, migraci, apoptózu, fibrózu a zánět. Nacházejí se v houbách, hlísticích, hmyzu, obratlovcích (včetně savců) a ve virech. V kvasinkách se galektiny nenacházejí. Dosud bylo objeveno 15 savčích galektinů, z čehož bylo objeveno pouze 12 galektinových genů u člověka. Všechny obsahují jednu či dvě vazebné domény rozpoznávající sacharid (CRD – carbohydrate-recognition-binding domain) o délce okolo 130 aminokyselin. Na základě této vlastnosti se galektiny dělí do

dalších 3 skupin: prototypová skupina, chimérová skupina a skupina tandemových repetit (Obrázek 1). Do prototypové skupiny patří galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 a -15 (Obrázek 1, prototyp). Obsahují jednu CRD a tvoří nekovalentní homodimery. Galektin-4, -6, -8, -9, -12 jsou součástí skupiny tandemových repetit (Obrázek 1, tandem repeat). Jsou složeny z polypeptidového řetězce tvořícího dvě rozdílné, ale homologní CRD, oddělené nekonzervovaným spojovačem o sekvenci až 70 aminokyselin. V chimérové skupině se nachází pouze galektin-3, který je exprimován pouze u obratlovců (Obrázek 1, chiméra). Také obsahuje pouze jednu CRD, ale na neobvykle dlouhém N-terminálním řetězci bohatém na prolin a glycin. Z toho vyplývá, že galektiny se dvěma CRD mohou navázat dva individuální sacharidové epitopy. Některé galektiny obsahující jednu CRD jsou schopné tvořit dimery nebo oligomery; záleží na specifických podmínkách, jako je koncentrace a přítomnost ligandů. To umožňuje bivalentní či multivalentní slučování sacharidových ligandů, což je důležité pro některé jejich biologické funkce. Ačkoli je přítomnost galaktózy pro všechny galektinové vazby nezbytná, afinita k monosacharidům je velmi slabá. Afinita se zesiluje, pokud je galaktóza navázána na jiný monosacharid, například na N-acetylglukosamin, a tvoří N-acetylaktosamin [3; 4; 5; 6].

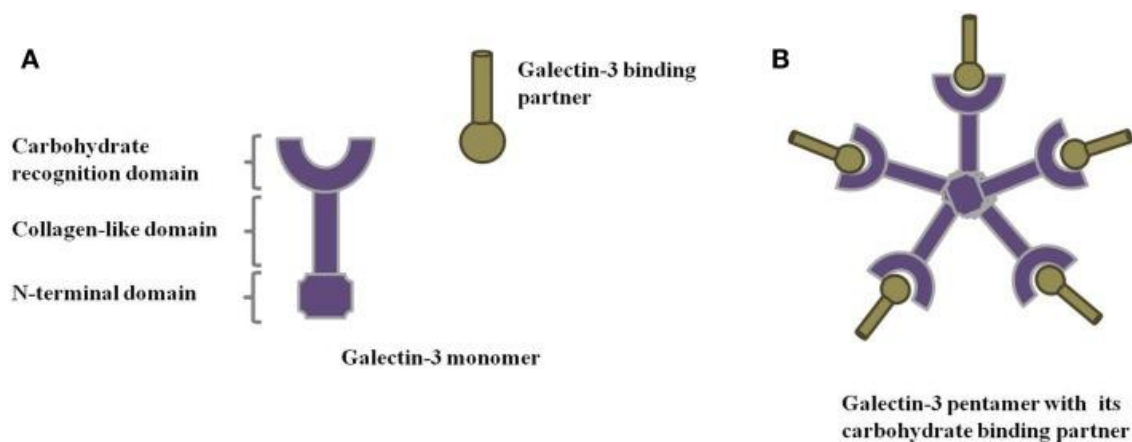


Obrázek 1: skupiny galektinů a jejich proteinová struktura. Prototypová skupina (prototype) s dvěma identickými doménami rozpoznávajícími sacharid (CRD), skupina tandemových repetitiv (tandem repeat) s dvěma odlišnými CRD a chimérová skupina (chimera) s jednou CRD a jednou neelektinovou doménou (N-terminální řetězec). Obrázek převzat z vědecké studie Wang et al. 2019 [7].

3.3 Galektin-3

Galektin-3 byl poprvé identifikován v myších peritoneálních makrofázích a pojmenován MAC-2. Od těch dob byl popsán v myších fibroblastech, bazofilních leukemických buňkách, v myších a lidských nádorových buňkách, v lidských plicích, krysích varlatech, v lidských HeLa buňkách a rovněž v řadě dalších typů buněk a tkání. Jeho molekulová hmotnost je přibližně 30 kDa a je kódován genem *LGALS3*. Má velice unikátní strukturu v porovnání se všemi galektiny obratlovců; na jednom řetězci totiž má dvě strukturálně odlišné

domény: N-terminální řetězec a CRD (Obrázek 2A). Díky N-terminálnímu řetězci tvoří pentamery (Obrázek 2B) a pomocí CRD je schopen vázat galaktosidy [3; 4].



Obrázek 2: schéma proteinové struktury galektinu-3. Monomer galektinu-3 s doménou rozpoznávající sacharid (carbohydrate recognition domain – CRD), na niž se váže vazebný partner galektinu-3 (galectin-3 binding partner), s doménou připomínající kolagen (collagen-like domain) a s N-terminální doménou (N-terminal domain). Monomer (A) se v kvarterní struktuře skládá do pentameru (B). Obrázek převzat z vědecké studie Fortuna-Costa et al. 2014 [8].

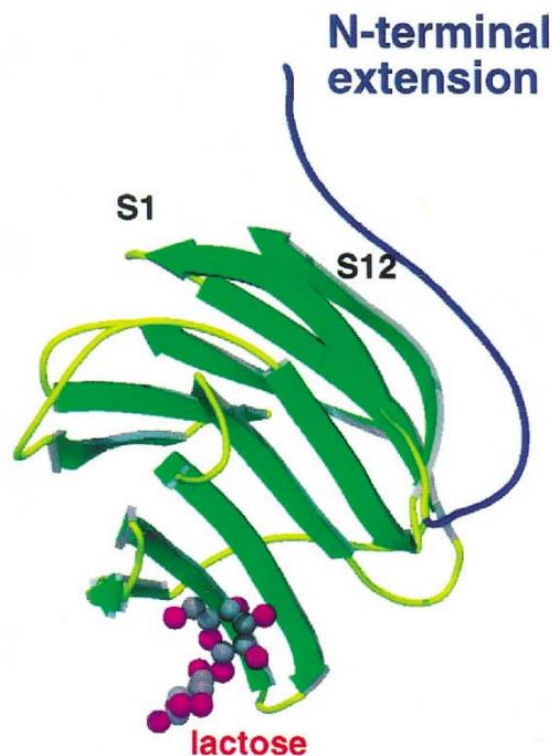
3.4 Strukturální a biochemické vlastnosti galektinu-3

3.4.1 N-terminální řetězec (ND)

Řetězec se skládá ze 110-130 aminokyselin. Z 25% je sekvence homologní s heterogenními jadernými ribonukleoproteinovými komplexy (hnRNP), což odpovídá homologii mezi jadernými ribonukleoproteiny. N-řetězec je z 33,5 % shodný s řetězcem kolagenu $\alpha 1$ (II) hovězí chrupavky (collagen-like domain). Tato struktura obsahuje 7-14 tandemových repetič krátkých aminokyselinových segmentů, přičemž každý z nich zahrnuje shodnou sekvenci Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly. Prvních 12 aminokyselin ND bylo klasifikováno jako vedoucí N-terminální řetězec. N-terminální řetězec má malou vazebnou aktivitu k sacharidům, ačkoli je tato aktivita nezbytná pro jeho plnou biologickou aktivitu (Obrázek 3, modrý řetězec) [3; 9].

3.4.2 Vazebná doména rozpoznávající sacharid (CRD)

CRD je složena z přibližně 130 aminokyselin, tvořících globulinovou strukturu, a obsahuje celou část vázající sacharid. Tato část je zodpovědná za lektinovou aktivitu galektinu-3. Má specifickou strukturu: dva antiparalelní β -listy složené z pěti až šesti β -vláken (Obrázek 3, zelený řetězec). Byla zjištěna interakce mezi částí ND a CRD. Součástí této domény je sekvence aminokyselin nazývaná NWGR. Bylo prokázáno, že tato sekvence je zodpovědná za antiapoptotickou aktivitu galektinu-3, a rovněž se podílí na vlastní asociaci molekul galektinu-3 v nepřítomnosti sacharidových ligandů [3; 9].



Obrázek 3: struktura galektinu-3. N-terminální řetězec (N-terminal extension, modrá), skládá se ze 110-130 aminokyselin; 33,5 % řetězce je shodných se sekvencí kolagenu 1 α (II) hovězí chrupavky. Vazebná doména rozpoznávající sacharid (CRD, zelená), se skládá ze 130 aminokyselin, struktura je tvořena 2 antiparalelními β listy z 5-6 β -vláken. Na doménu je navázána laktóza (lactose, červená), která je jejím vazebným partnerem. Obrázek převzat z vědecké studie Hughes, 2001 [10].

3.4.3 Vazebná specifičnost galektinu-3 pro sacharidy

Vaznost galektinů na sacharidy je nezávislá na přítomnost vápníku, na rozdíl od jiných skupin lektinů. Ovšem galaktóza je pro vysoce afinitní vaznost galektinů esenciální. Galektin-3 má vysokou afinitu k β -1,6,-N-acetylglukosaminovým rozvětveným glykanům. Preferuje vazbu s N-acetyllaktosaminem. Jeho vazebné místo je rozšířené, proto může galektin-3 pojmout delší oligosacharidy, jako jsou polylaktosaminoglykany. Interakce galektinu-3 nebo jeho CRD se sacharidovými ligandy je doprovázena konformační změnou a přeskupením páteřních smyček poblíž vazebného místa. Silný vliv na vazebnou afinitu cukrů má mimo jiné i fosforylace řetězce na pozici serinu. Proto je serin označován za „vypínač“ biologických efektů galektinu-3 (například oligomerace) [3; 8; 10].

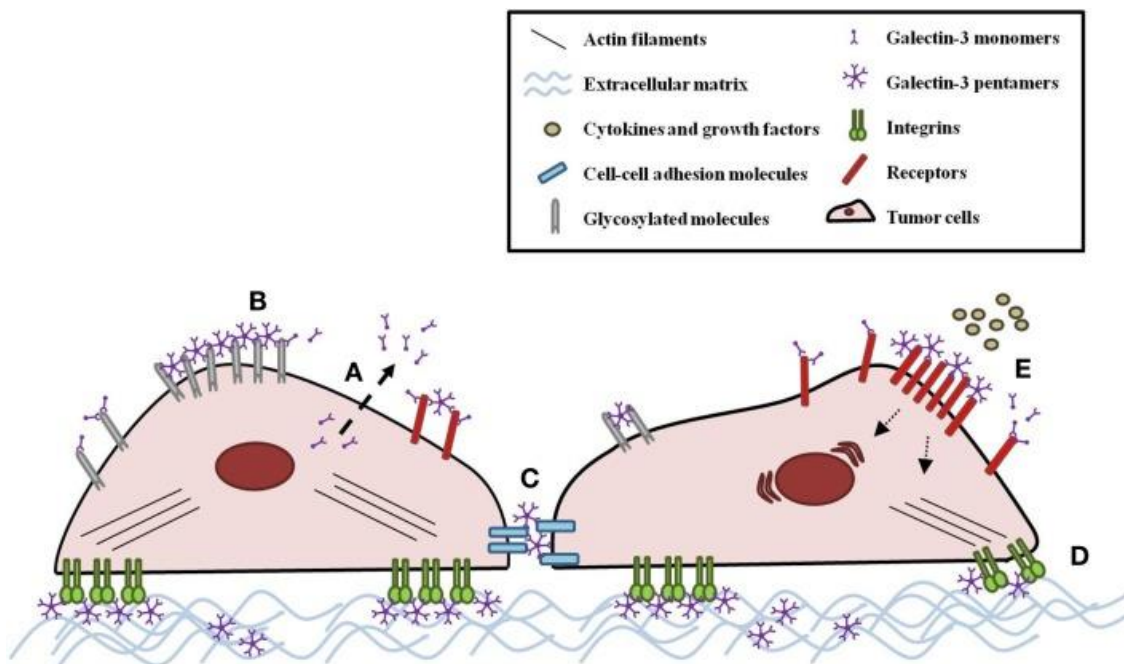
3.5 Syntéza a sekrece galektinu-3

Galektin-3 je v lidském genomu kódován *LGALS3* genem, který se nachází na 14 chromozomu v q21-q22 lokusu. Je dlouhý 10-12 kb a 17 kb, tedy je tvořen šesti exony a pěti introny. Je to rozpustný protein, syntetizující se ve volných ribozomech v cytosolu, a ačkoli postrádá jakoukoli signální sekvenci pro translokaci do endoplazmatického retikula (ER), galektin-3 se nachází i extracelulárně. Galektin-3 je z buněk vylučován mechanismem zvaným ektocytosa. Tento mechanismus je zcela nezávislý na ER a Golgiho systému. Významnou roli v sekreci galektinu-3 má krátký segment N-terminálního řetězce obsahující aminokyseliny v pozicích 89-96 (Tyr-Pro-Ser-Ala-Pro-Gly-Ala-Tyr). Tato sekvence sama o sobě není schopná spustit přímou sekreci fúzního proteinu CAT; je účinná pouze v kontextu s velkým N-terminálním řetězcem. Prvním krokem pro sekreci galektinu-3 je jeho nahromadění v cytoplazmě [3; 4].

3.6 Lokalizace galektinu-3 v buňkách a v tkáních

Galektin-3 je lokalizován jak intracelulárně, tak extracelulárně. Intracelulární galektin-3 je lokalizován hlavně v cytoplazmě, ale může být také detekován v buněčném jádře a na membráně mitochondrií (při ochraně před apoptózou). Nukleární galektin-3 je hlavně lokalizován v interchromatinových prostorech, na hranici kondenzovaného chromatinu na husté fibrilární složce a na okraji fibrilárních center nukleolů. Zda se galektin-3 nachází i v jádře či pouze v cytoplazmě závisí na tom, zda je fosforylován na pozici serinu. Nefosforylovaná forma galektinu-3 se nachází pouze v cytoplazmě, na rozdíl od jeho fosforylované formy, která se nachází jak v cytoplazmě, tak i v jádře. Extracelulární galektin-3 se váže na různé struktury na buněčném povrchu (receptory, integrinové adhezní molekuly a glykosylované molekuly), a rovněž se nachází v extracelulární matrix (Obrázek 4) [3; 4; 8; 11].

U dospělých je galektin-3 přítomen ve všech tkáních. V prvním trimestru embryogeneze je exprese galektinu-3 omezena na epitel, jako je kůže, epiteliální výstelka dýchacího a trávicího traktu, a rovněž je galektin-3 přítomen v buňkách myokardu nebo v játrech. Jeho exprese v dospělosti souvisí také s epiteliálními buňkami a myeloidními buňkami. Galektin-3 je exprimován v děložním čípku březích zvířat bezprostředně po implantaci, ale nikoli u negravidních zvířat. Nachází se také v buňkách účastnících se imunitní odpovědi a je exprimován i v různých nádorech, kde intenzita jeho exprese závisí na progresi nádoru, jeho invazivitě a metastatickém potenciálu [3].



Obrázek 4: vazba galektinu-3 na struktury nacházející se na buněčné membráně, jako jsou receptory (E) – díky nim dochází k navázání cytokinů a růstových faktorů a k buněčné reakci na ně, integriny (D) – pomáhají vazbě s extracelulární matrix, glykosylované molekuly (B) – pomáhají řídit chování buňky a její adhezi (C). Na obrázku je také zobrazena sekrece monomerů galektinu-3 (A), které pak v extracelulárním prostoru oligomerizují. Na obrázku jsou zobrazeny nádorové buňky. Obrázek převzat z vědecké studie Fortuna-Costa et al. 2014 [8].

3.7 Funkce galektinu-3

Pro funkčnost galektinu-3 je důležitá jeho oligomerace (Obrázek 4). Hlavními funkcemi je regulace důležitých buněčných procesů, jako je buněčná homeostáza, proliferace, buněčný cyklus a apoptóza. Extracelulární galektin-3 moduluje důležité interakce mezi epiteliálními buňkami a extracelulární matrix, zajišťuje správný přenos extracelulárních signálů do buňky (Obrázek 4E) a hraje roli v embryonálním vývoji sběrných kanálků ledvin. Naproti tomu intracelulární galektin-3 je důležitý pro přežití buněk, a to kvůli jeho schopnosti blokovat vnitřní apoptotickou dráhu [3; 4; 8; 12].

3.8 Proapoptotická a antiapoptotická aktivita galektinu-3

Apoptóza je programovaná buněčná smrt. Buňky během apoptózy prochází mnoha morfologickými změnami. V rané fázi apoptózy dojde ke smrštění buněk a pyknóze. Se smrštěním buněk je jejich obsah menší, tedy i cytoplazma je denzní a orgány jsou těsněji obaleny. Pyknóza je výsledkem kondenzace chromatinu, což je nejtypičtější znak apoptózy. Později dochází k rozpadu plazmatických membrán, po kterém následuje destrukce buněčného jádra a oddělení buněčných fragmentů do apoptotických tělísek během procesu zvaného „pučení“. Tato tělíška jsou následně fagocytována makrofágy nebo jinými fagocytujícími buňkami [13].

Galektinu-3 je však připisována antiapoptotická i proapoptotická aktivita. Tato aktivita zřejmě záleží na lokalizaci galektinu-3, zda je intracelulární či extracelulární. U intracelulárního galektinu-3 je většinou popisována antiapoptotická aktivita, kdy galektin-3 chrání buňku před vlivy, které by mohly apoptózu spustit. Galektin-3 obsahuje v CRD sekvenci nazývanou NWGR, která je zodpovědná za antiapoptotickou aktivitu. Tato sekvence se nachází také v BH1 proteinu rodiny Bcl-2, které také disponují antiapoptotickou aktivitou. V závislosti na spouštěči apoptózy se galektin-3 přesouvá z cytosolu nebo z jádra do perinukleární mitochondriální membrány. Tím zabraňuje poškození mitochondrií a inhibuje uvolňování cytochromu c, čímž reguluje aktivaci kaspázy. Translokace galektinu-3 do mitochondrií je zprostředkována synexinem, což může být limitujícím faktorem jeho antiapoptotické aktivity. U extracelulárního galektinu-3 je popisována spíše proapoptotická aktivita. Proapoptotická aktivita je rovněž spojena s nadměrnou expresí galektinu-3, který podporuje cytotoxicitu vyvolanou ligandem indukujícím apoptózu, připomínajícím faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor, TNF), který

potlačuje aktivitu proteinkinázy B. U obou variant účinku galektinu-3 závisí nejspíše i na typu buňky [3; 14].

3.9 Regulace exprese galektinu-3

Regulace exprese galektinu-3 není přímo ovlivněna jedním faktorem, ale je závislá i na stavu diferenciaci buněk nebo na typu tkáně. Na regulaci exprese galektinu-3 se podílejí různé faktory, jako rodina runt-related proteinů (RUNX), homedoména-interagující protein kináza 2 (HIPK2), nukleární faktor κ B (NF- κ B), zánětlivé cytokiny a některé intracelulární dráhy. Mezi faktory ovlivňující transkripci patří RUNX, HIPK2, NF- κ B. RUNX se váže přímo na promotorovou oblast genu *LGALS3* a tím zvyšuje expresi galektinu-3. HIPK2 působí jako koregulátor rostoucího počtu transkripčních faktorů a moduluje mnoho buněčných procesů (apoptóza, proliferace, poškození DNA atd). Většina těchto procesů je zprostředkována fosforylací. Vazba galektinu-3 s jeho ligandy je regulována fosforylačním systémem serinu na N-terminálním konci proteinu, kde fosforylace snižuje vaznost a defosforylace ji zvyšuje. NF- κ B je heterodimerní transkripční faktor, který hraje důležitou roli v zánětlivých a stresových reakcích i v rezistenci nádorových buněk k apoptóze. NF- κ B snižuje expresi galektinu-3, z čehož plyne, že by NF- κ B mohl být klíčovým v regulaci exprese galektinu-3. Zánětlivé cytokiny, ačkoli galektin-3 je silný prozánětlivý signálizátor, neindukují expresi galektinu-3, ale běžné gama řetězcové signální cytokiny ano. Expresi galektinu-3 také indukuje faktor stimulující granulocytové a makrofágové kolonie a hematopoetický cytokin. Dalším cytokinem regulující expresi galektinu-3 je například sinexin (annexin VII). Je to člen rodiny annexinů, který funguje jako vápníkový kanál a vápníkem aktivovaná GTPáza, čímž reguluje fúzi intracelulárních vezikul a membránový přenos. Galektin-3 se synexinem interaguje po apoptotickém stimulu. Tato interakce pomáhá galektinu-3 translokovat se na perinukleární membránu [12; 15].

3.10 Role galektinu-3 při různých klinických stavech a onemocnění

Galektin-3 je multifunkční protein, účastnící se mnoha biologických procesů v různých tkáních, hrající významnou roli v různých klinických stavech a onemocněních. Galektin-3 by mohl být využíván jako diagnostický a prognostický biomarker pro mnoho klinických stavů a onemocnění a také by mohl mít léčebné využití [4; 16].

Pozitivně galektin-3 působí například při hojení ran, kdy napomáhá migraci buněk přes hojící se rány díky jeho schopnosti adheze k buňkám a jeho interakci s extracelulární matrix. Galektin-3 se účastní mnoha procesů během akutní zánětlivé reakce, včetně aktivace a adheze neutrofilů, opsonizace apoptotických neutrofilů (tj. označení určitých objektů, například komplementem, pro jejich rozpoznání fagocyty) nebo aktivace žírných buněk. Je nadměrně exprimován v makrofázích, a proto je považován za marker jejich aktivace [4; 17].

Působí také například při vzniku a progresi rakoviny. Zda působí pozitivně či negativně na přežití nádorové buňky, závisí na typu nádoru a na lokalizaci galektinu-3 v buňce [4].

Negativně působí při fibróze orgánů, kdy dochází k aktivaci makrofágů indukované interleukinem-4 (IL-4), což vede ke zvýšení hladiny profibrotických hormonů, jako je aldosteron, který stimuluje produkci matrix a zvyšuje fibrózu. V této souvislosti galektin-3 negativně ovlivňuje i kardiovaskulární onemocnění, jako je například srdeční selhání, ateroskleróza a systémová a pulmonální arteriální hypertenze, kde právě dochází k fibróze a k apoptóze buněk příslušných tkání [4; 6; 18].

3.10.1 Pulmonální arteriální hypertenze

Jedná se o závažné kardiovaskulární onemocnění, které je charakterizováno trvalým zvyšováním plicního arteriálního tlaku, zvýšenou vaskulární resistencí a zvýšenou ztuhlostí plicní arterie. Hlavním rysem jsou hyperplastické změny buněk hladkého svalstva plicní arterie a progresivní muskularizace malých distálních plicních arterií, což vede ke zvýšení periferní resistance vůči průtoku krve. Zvyšování plicního tlaku během pulmonální arteriální hypertenze je podporováno vaskulárními záněty, endoteliální dysfunkcí, aktivací růstu hladkých svalových buněk cév a vaskulární trombózou. Jedná se o smrtelné onemocnění a pacienti bez léčby umírají do tří let. Častěji jsou postiženy ženy. Projevuje se dušností, bolestmi na hrudníku, otoky dolních končetin, nechutenstvím, slabostí a stavy závratí až mdlob. Pulmonální arteriální hypertenzi dělíme na primární a sekundární. Primární vzniká bez zjevných poruch ve funkci organismu. Může nastat vlivem nedostatku kyslíku ve vnějším prostředí organismu, jako je pobyt ve vysokých nadmořských výškách. Sekundární vzniká jako následek plicního či kardiovaskulárního onemocnění, jako jsou CHOPN, infarkt myokardu, syndrom idiopatické spánkové apnoe atd., které vedou k alveolární hypoxii. Pokud se projeví u těchto nemocí, zvyšuje se jejich mortalita [4; 6; 19; 20].

Léčbu pulmonální arteriální hypertenze lze rozdělit na konvenční, specifickou a nefarmakologickou. Konvenční léčba zahrnuje léčbu srdečního selhání, pokud stojí v pozadí pulmonální hypertenze, dále podání blokátorů kalciových kanálů, které uvolňují vazokonstrikci, podání diuretik a oxygenoterapii. Specifická léčba zahrnuje podání analogů prostacyklinu, antagonistů receptorů pro endothelin a inhibitorů fosfodiesterázy 5. Tyto léky navozují vazodilataci, omezují proliferaci HSB a mají i antitrombogenní účinky [21]. Nefarmakologická léčba zahrnuje balónkovou atriální septostomii a transplantaci plic. Jedná se však již o invazivní chirurgické výkony – zejména v posledním případě – a proto je rozumné hledat

a dále rozvíjet nové možnosti šetrnější léčby konzervativní. Jednou z těchto možností je inhibice galektinu-3, např. pomocí oligosacharidových inhibitorů. Nejjednodušším oligosacharidovým ligandem pro galektin-3 je laktóza, jejíž schopnost inhibovat účinky galektinu-3 na hladké svalové buňky pulmonálních arterií byla sledována v této práci.

4 METODIKA

4.1 Použité přístroje a materiály

4.1.1 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Schoeller, Česká republika)
- Cell counter Vi-CELL-XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga Sartorius 3-18K (Sigma, Německo)
- Komora s tekutým dusíkem (cryoAL, Francie)
- Komorová lednice 4 °C (Electrolux, Švédsko)
- Laminární box cytosafe-N (Faster, Itálie)
- Mikroskop IX71 s digitální kamerou DP71 a s fluorescenční lampou (Olympus, Japonsko)
- Mrazák -80 °C (Sanyo, Japonsko)
- Multi-mode reader Synergy HT (BioTek, USA)
- Průtokový cytometr NovoCyte (ACEA Biosciences Inc, USA)
- Termostat 37 °C (Thermo Forma, USA)
- Vodní lázeň 37 °C (Isotemp – Fisher Scientific, USA)
- Vortex MS 3 basic (IKA, Německo)

4.1.2 Použitý materiál

- Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Švýcarsko)
- Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Thermo Fisher Scientific, USA)
- DMEM bez fenolové červeně (Thermo Fisher Scientific, USA)
- DMSO – Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- FS (fetální bovinní sérum, Thermo Fisher Scientific, USA)

- Galektin-3 (0,1; 0,3; 1; 3; 10 μ M) (zisk z MBÚ; 140 μ M)
- Hoechst 33258, 33342 (5 μ g/ml; Sigma-Aldrich, Německo)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfáty, Sigma-Aldrich, USA)
- Phalloidin TRITC p1951 (0,77 μ g/ml; Sigma-Aldrich, Německo)
- Primární protilátka proti α -aktinu – mouse, tj. připravená na myších (ředění 400x, Sigma-Aldrich, USA)
- Primární protilátka proti galektinu-3 – rabbit, tj. připravená na králících (ředění 400x, Sigma-Aldrich, Německo)
- Primární protilátka proti kalponinu – rabbit, tj. připravená na králících (ředění 400x, Abcam, UK)
- Primární protilátka proti těžkému řetězci myosinu 11 – rabbit, tj. připravená na králících (ředění 400x; Abcam, UK)
- Resazurin (Sigma-Aldrich, USA)
- laktóza (Sigma-Aldrich, USA)
- Roztok trypsin-EDTA (0,5 g trypsin a 0,2 g EDTA v 1 l PBS, Sigma-Aldrich, USA)
- Sekundární protilátka proti králičímu antigenu (rabbit) konjugovaná s Alexou 546 (ředění 400x; Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sekundární protilátka proti myšímu antigenu (mouse) konjugovaná s Alexou 488 (ředění 400x; Thermo Fisher Scientific, USA)
- Triton X-100 (Serva, Německo)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA)

4.2 Experimentální model hypoxické plicní arteriální hypertenze

Potkani byli vystaveni přerušované hypobarické hypoxii po dobu 5 týdnů v uměle vytvořených horských podmínkách (odpovídajících nadmořské výšce cca 7000 m. n. m.) pro vytvoření hypoxické plicní arteriální hypertenze u těchto

zvířat. Kontrolní potkani byli po celou dobu experimentu vystaveni pouze normoxickým podmínkám. Po usmrcení potkanů byly z jejich těl odebrány plicní arterie. Plicní arterie z potkanů byly poskytnuty oddělením Vývojové Kardiologie FGÚ. Podrobnější popis celého postupu je popsán ve studii Kolář *et al.*, 2007 [22].

4.3 Izolace a expanze hladkých svalových buněk plicních arterií potkanů

Ihned po odběru plicních arterií byla tkáň zbavena krevních sraženin. Tkáň byla poté mechanicky rozmělněna na jemné fragmenty o velikosti maximálně 0,5 mm³, a následně inkubována v roztoku obsahujícím 0,1% kolagenázu v médiu DMEM bez séra. Mechanicky a enzymaticky rozrušená tkáň byla v DMEM s 10% FS přenesena do kultivačních lahví. Uvedenou procedurou byly buňky jednak přímo uvolněny z tkáně, a jednak migrovaly z explantátů. Buňky se dále rozrůstaly, a po dosažení konfluence byly trypsinizovány, zmrazeny v DMEM s 10% FS a 10% DMSO a uchovány v tekutém dusíku pro další experimenty.

4.4 Kultivace buněk:

S buňkami bylo pracováno v laminárním boxu. Kryozkumavka s hladkými svalovými buňkami (HSB) byla rozmrazena ve vodě o teplotě přibližně 37 °C. Suspenze buněk byla sterilně přenesena do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml. K suspenzi bylo přidáno 5 ml média DMEM s 10% FS. Suspenze byla řádně promíchána. Zkumavka se suspenzí byla centrifugována při 300 g po dobu 5 minut. Centrifugací byly odděleny buňky (peleta) od média (supernatant). Supernatant byl odlit. K suspenzi buněk bylo přidáno 7 ml kultivačního média (DMEM +10% FS). Na kultivační lahev (S = 75 cm²) bylo nalito 7 ml kultivačního média, k němuž bylo přidáno 7 ml suspenze z centrifugační zkumavky. Suspenze byla promíchána a rovnoměrně rozprostřena na dně kultivační lahve.

Buňky byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře vzduchu s 5% CO₂, dokud buňky nedosáhly konfluence. V experimentech byly použity buňky vždy ve 2. - 3. pasáži.

4.5 Trypsinizace buněk – příprava HSB pro další práci

S buňkami bylo pracováno v laminárním boxu. Pomocí mikroskopu bylo zjištěno, zda buňky dosáhly konfluence. Z kultivační lahve bylo sterilně odstraněno médium. Buňky byly promyty 6 ml PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfáty). K buňkám byly přidány 2 ml roztoku trypsinu s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Buňky byly s roztokem trypsinu-EDTA (0,5 g trypsinu, 0,2 g EDTA v 1 l PBS) inkubovány 2 minuty v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře vzduchu s 5% CO₂. Pomocí mikroskopu bylo zjištěno, zda jsou buňky uvolněny ode dna kultivační lahve. K buňkám s trypsinem bylo přidáno 8,5 ml média DMEM s 10% FS. Tím byla inhibována proteolytická aktivita trypsinu. Lahev byla několikrát opláchnuta suspenzí s buňkami a suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky, kde byla celá směs znovu promíchána. Ze zkumavky bylo odebráno 0,5 ml suspenze pro zjištění celkového počtu buněk na mililitr v suspenzi. Zbylých 10 ml buněk bylo centrifugováno při 300 g po dobu 5 minut. Byl odlit supernatant. Buňky byly naředěny na potřebnou koncentraci pro následující experimenty.

4.6 Automatické stanovení počtu a viability buněk v suspenzi na Cell counteru

Na přístroji Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer byl stanoven počet HSB na mililitr a jejich viabilita. Obě tato stanovení probíhají automaticky. Do přístroje byla vložena kyveta s 0,5 ml suspenzí buněk v médiu. Viabilita byla určena pomocí trypanové modři, která barví mrtvé buňky. Buňky byly spočítány přístrojem v 50 zorných polích a koncentrace přepočítána na mililitr.

4.7 Příprava rekombinantního galektinu-3

Galektin-3 byl pro experimenty poskytnut Oddělením biotransformací MBÚ a byl připraven rekombinantní syntézou v *E. coli* dle postupu uvedeného ve studii Bumba *et al.*, 2018 [23].

4.8 Inkubace buněk s galektinem-3

HSB byly nasazeny do 96jamkových destiček. Do jedné jamky bylo nasazeno 5000 buněk v 200 μ l média. Polovina jamek s buňkami byla inkubována v DMEM s 0,5% FS a druhá polovina v médiu s 10% FS. Po jednom dni bylo k buňkám přidáno čerstvé médium s příměsí galektinu-3 o různých koncentracích (0; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 μ M). Buňky byly inkubovány 1 a 4 dny v termostatu při 37 °C.

4.9 Nepřímé stanovení proliferace buněk

Pro nepřímé stanovení proliferační aktivity HSB bylo použito stanovení metabolické aktivity buněk pomocí barviva resazurin.

4.9.1 Princip

Mitochondrie v buňce metabolizují resazurin. Měří se změna jeho zbarvení z modré na růžovou, kdy růžové zbarvení značí oxidaci NADH+H na NAD⁺. Resazurin se změní na resorufin (růžový redukovaný). Tato změna značí metabolickou aktivitu buňky (tj. redukční potenciál). Zvýšení koncentrace NAD⁺ je přímo úměrné zvýšení koncentrace resorufinu. Čím více je jamka zbarvena do růžova, tím větší je redukční potenciál buněk, což se považuje za přímo úměrné počtu buněk.

4.9.2 Postup:

Po inkubaci s galektinem-3 bylo z 96jamkové destičky s nasazenými HSB odstraněno médium. Buňky byly promyty PBS (100 μ l/jamka). Do poloviny jamek byla přidána směs 0,5% FS + DMEM bez fenolové červeně a resazurin (4 μ M), a do druhé poloviny směs 10% FS + DMEM bez fenolové červeně a resazurin (4 μ M). Buňky se směsí byly inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 4 hodin. Po 4 hodinách byly destičky s buňkami vyndány a z jamek byly odstraněny bubliny. Destičku byla spektrofotometricky měřena na multi-mode readeru Synergy HT (BioTek, USA). Byla změřena fluorescence: Excitace: 530/25 nm, Emise: 590/35 nm. Jako blank sloužilo médium s resazurinem bez inkubace s buňkami. Výsledek byl zpracován do grafu.

Tabulka 1: příprava směsí pro barvení resazurinem

	Resazurin	FS	DMEM bez fenolové červeně
Do jedné jamky 100 μ l mixu. (K počtu jamek + 3 na blank)	Ředění 100x	10%, 2%, 0,5% - vypočet objemu FS k celkovému objemu mixu	Doplnit do celkového objemu

4.10 Imunofluorescenční barvení markerů hladkých svalových buněk a galektinu-3:

4.10.1 Princip:

Buňky byly permeabilizovány. Byla navázána primární protilátka na antigenní struktury na buňce, které chceme zobrazit. Na primární protilátku byla

navázána sekundární protilátka, která je značená fluorescenčním barvivem. Buňky pozorujeme pod mikroskopem.

4.10.2 Postup:

Buňky byly nasazeny na 24jamkovou destičku. Do jedné jamky bylo nasazeno 20 000 buněk v 0,5 ml média. Buňky rostly do bodu konfluence. Po dosažení konfluence bylo z buněk odstraněno médium a byly promyty PBS. Poté byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem. Následně byly inkubovány v 1% albuminu s 0,1% Triton-X 100 v PBS po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Albumin na buňkách zablokuje nescifická vazebná místa pro protilátky a Triton slouží jako detergent pro permeabilizaci buněčné membrány. Roztok byl odstraněn a byl přidán 1% Tween-20 v PBS, se kterým byly buňky opět inkubovány 20 minut při pokojové teplotě. Tween rovněž slouží jako detergent k permeabilizaci buněčné membrány. Buňky byly promyty PBS.

Pro barvení markerů kontraktilního fenotypu HSB byly buňky inkubovány s následujícími primárními protilátkami: anti α -aktin – mouse (ředěna 400x), anti myosin – rabbit (ředěna 400x), anti calponin – rabbit (ředěna 400x) v PBS po dobu 3 hodin ve tmě při pokojové teplotě. Buňky byly promyty PBS (0,5 ml/jamka/24 destička). Buňky byly dále inkubovány s následujícími sekundárními protilátkami: anti mouse konjugovaná s Alexou 488 – zelená (ředěna 400x), anti rabbit konjugovaná s Alexou 546 – červená (ředěna 400x) v PBS ve tmě po dobu 1 hodiny. Do roztoku sekundární protilátky byl přimíchán Hoechst 33258 na barvení jader – modrá (5 μ g/ml). Buňky byly nakonec promyty PBS (0,5 ml/jamka/24jamková destička). Do jamek bylo přidán PBS, aby buňky nevyschly. Buňky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem: zelený α -aktin, červený calponin, červený myosin, modrá jádra.

Pro barvení galektinu-3 v HSB byla část buněk permeabilizována (pro barvení celkového galektinu-3, tj. nacházejícího se v buňce i na povrchu buňky) a část nepermeabilizována (pro barvení galektinu-3 nacházejícího se pouze na povrchu buňky). Buňky byly inkubovány s primární protilátkou anti galektin-3 – rabbit (ředěn 400x) v PBS po dobu 3 hodin ve tmě při pokojové teplotě. Buňky byly promyty PBS (0,5 ml/jamka/24jamková destička). Buňky byly inkubovány se sekundární protilátkou anti rabbit konjugovanou s Alexou 488 – zelená (ředěna 400x) s přídatkem barviva Hoechst 33258 na barvení jader – modrá (ředěn 200x) v PBS ve tmě po dobu 1 hodiny. Buňky byly promyty PBS (0,5 ml/jamka/24jamková destička). Do jamek byl přidán PBS, aby buňky nevyschly. Buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem: zelený galektin-3, modrá jádra.

4.11 Fluorescenční barvení

Buňky po nepřímém stanovení metabolické aktivity byly fixovány 4% paraformaldehydem. Následně byly inkubovány v 1% albuminu s 0,1% Triton-X 100 v PBS po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Albumin na buňkách zablokuje nespecifická vazebná místa a Triton slouží jako detergent pro permeabilizaci buněčné membrány. Roztok byl odstraněn a byl přidán 1% Tween-20 v PBS, se kterým byly buňky opět inkubovány 20 minut při pokojové teplotě. Tween rovněž slouží jako detergent k permeabilizaci buněčné membrány. Buňky byly promyty PBS (100 μ l/jamka).

Pro barvení cytoskeletu a jader hladkých svalových buněk byly buňky inkubovány v roztoku s fluorescenčními barvivy pro aktinový cytoskelet – phalloidin-TRITC p1951 (0,77 μ g/ml; červená), a pro jádra – hoechst 33258 (5 μ g/ml; modrá) po dobu 1 hodiny ve tmě (50 μ l/jamka/96jamková destička). Buňky byly promyty PBS. K buňkám bylo přidáno PBS, aby nevyschly. Buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem: červený cytoskelet, modrá jádra.

4.12 Stanovení apoptózy:

Apoptóza byla stanovena pomocí annexinu-V a propidium jodidu. Apoptóza se dělí na časnou a pozdní. Při časně apoptóze dochází ke změnám na buněčné membráně. Dochází k přesunu fosfatidylserinu z vnitřní části do vnější části buněčné membrány (označení buňky pro makrofágy, že buňky prochází apoptózou). Na fosfatidylserin se naváže annexin-V s navázaným zeleným fluoresceinem. Při pozdní apoptóze nejen že je navázán annexin-V na buněčné membráně, ale rovněž vznikají v buněčné membráně trhliny, jimiž se dostane dovnitř buňky propidium jodid, který barví buněčné jádro červeně. Uvedeným barvením lze tudíž odlišit buňky apoptotické od buněk nekrotických a od buněk zdravých. Pokud je buňka nekrotická, nemá již buněčnou membránu, a tudíž se zobrazí pouze její jádro pomocí propidium jodidu. Pokud je buňka zdravá, nedochází k navázání annexinu-V ani k průniku propidium jodidu do buňky (protokol – annexin-V flow cytometry kit) [24].

4.12.1 Stanovení apoptózy na adherovaných buňkách

Buňky byly nasazeny do 96jamkových destiček. Do jedné jamky bylo nasazeno 5000 buněk v 200 μ l média. Buňky se byly inkubovány v termostatu při 37 °C do dosažení konfluency buněk. Poté byly buňky promyty PBS. K buňkám byl přidán DMEM bez fenolové červeně s galektinem-3 o různých koncentracích (0,3; 1; 3; 10 μ M). Buňky byly s galektinem-3 inkubovány 4 hodiny v termostatu o teplotě 37 °C. Po inkubaci byly buňky promyty PBS a byl k nim přidán annexin-V (naředěn 50x) s propidium jodidem (naředěn 50x) a hoechstem 33342 (5 μ g/ml). Annexin-V barví zeleně buňky procházející apoptózou. Propidium jodid barví červeně jádra mrtvých buněk. Hoechst 33342 barví jádra všech buněk. Buňky s barvivou byly inkubovány 15 minut. Poté byly buňky promyty PBS a byl k nim přidán PBS, aby nevyschly. Buňky byly pozorovány pod mikroskopem.

4.12.2 Stanovení apoptózy buněk v suspenzi s využitím průtokového cytometru

Buňky byly trypsinizovány (viz kapitola 4.5). Buňky byly naředěny na výslednou koncentraci 0,5 mil./ml a inkubovány s 10 μ M galektinem-3 a 100 mM laktózou. Buňky byly krouživým pohybem promíchány a inkubovány na ledu po dobu 1,5 hodiny na antiadhezivní destičce. Poté byly buňky přeneseny do 96jamkové destičky (200 μ l suspenze na jamku). Každá směs (tj. nebarvená, s propidium jodidem, s annexinem-V a s propidium jodidem + annexinem-V) byla přenesena do 4 jamek. Před přenesením byla každá směs znovu řádně promíchána. 96jamková destička byla centrifugována při 300 g po dobu 5 minut. Po centrifugaci bylo médium od buněk odstraněno a k buňkám byly přidány roztoky podle daného barvení (inkubační pufr, propidium jodid naředěný inkubačním pufrem, annexin-V naředěný inkubačním pufrem a propidium jodid + annexin-V naředěné inkubačním pufrem). Buňky byly promíchány na vortexu a následně inkubovány s barvivou 10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Buňky byly měřeny na průtokovém cytometru rychlostí 50 μ l/minutu. Výsledky byly zpracovány do grafů.

4.13 Mikroskopie, analýza a zpracování mikrofotografií

Fluorescenčně barvené vzorky byly pozorovány v mikroskopu Olympus IX71 pomocí digitální kamery DP71. Fotografie byly snímány v programu cellSens Standard a následně upraveny v programu ImageJ. Fotografie jader byly zpracovány a jádra počítána rovněž v programu ImageJ.

4.14 Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování dat byl použit program SigmaPlot. Byla využita metoda One-Way ANOVA. Byl použit Holm-Šidákův test. Hladina významnosti p byla $\leq 0,05$. Statistické metody byly aplikovány na výsledky získané

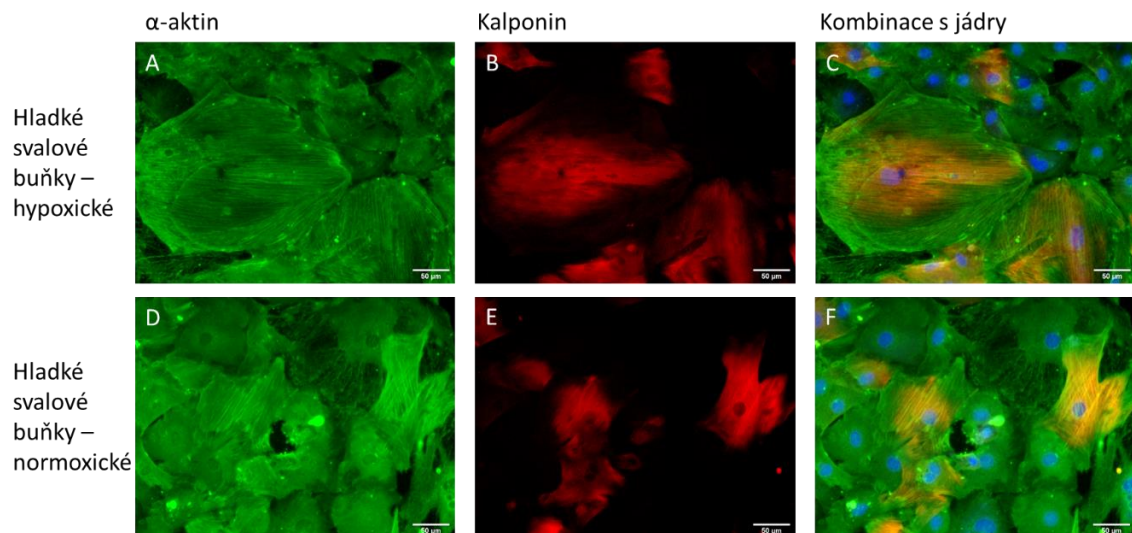
z nepřímého stanovení proliferace buněk a na výsledky z manuálního stanovení počtu buněk.

5 VÝSLEDKY

5.1 Exprese hladkosvalových markerů v buněčných kulturách izolovaných z plicní arterie potkana

U buněčných kultur izolovaných z plicní arterie potkana byla nejprve ověřena přítomnost typických hladkosvalových markerů pomocí imunofluorescenčního barvení. Buňky byly barveny protilátkami proti α -aktinu, kalponinu a hladkosvalovému myosinu, které představují časný, střednědobý a pozdní ukazatel maturace HSB směrem ke kontraktilnímu fenotypu.

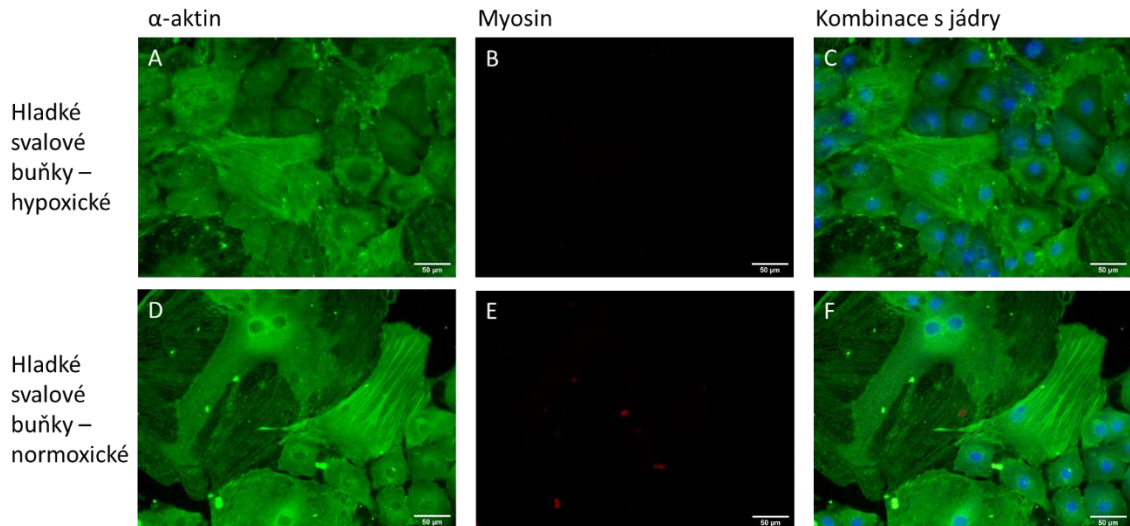
Buňky po kultivaci a pasážování už nemají typický vřetenovitý tvar, ale získávají tvar spíše polygonální. Buňky v hypoxických i normoxických kulturách exprimovaly α -aktin. U většiny buněk byl α -aktin zformován do vláken, v některých buňkách však byl α -aktin distribuován pouze difuzně. U některých buněk byla pozorována také exprese kalponinu (Obrázek 5). Mezi hypoxickými a normoxickými buňkami nebyl patrný žádný rozdíl v expresi těchto markerů.



Obrázek 5: imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalů v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-C) nebo normoxii (D-F). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu (A, D; zelená) a kalponinu (B, E; červená). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé barevné kanály dohromady společně s modře

nabarvenými jádry (C, F). Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x20, měřítko 50 μm .

Myosin nebyl u buněk pozorován. (Obrázek 6).



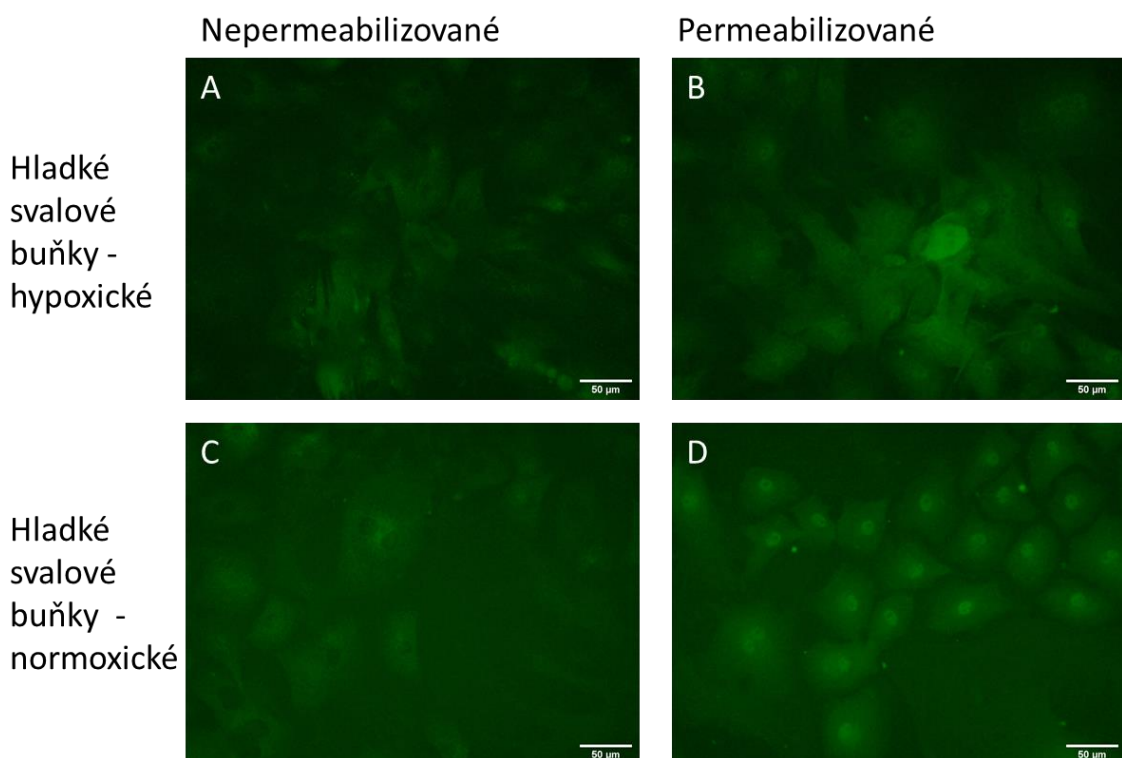
Obrázek 6: imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalů v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-C) nebo normoxii (D-F). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu (A, D; zelená) a myosinu (B, E; červená). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé barevné kanály dohromady společně s modře nabarvenými jádry (C, F). Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x20, měřítko 50 μm .

5.2 Exprese galektinu-3 v hladkých svalových buňkách

Bylo také provedeno porovnání hladkosvalových buněk hypoxických a normoxických v závislosti na obsahu galektinu-3 uvnitř a na povrchu buňky.

Galektin-3 je u nepermeabilizovaných buněk obarven pouze na povrchu buněčné membrány (protilátka neproniká přes buněčnou membránu). U permeabilizovaných buněk dochází k barvení galektinu-3 také v jádře a cytoplasmě. Na mikrofotografiích je možné pozorovat, že u hypoxických i normoxických HSB se galektin-3 vyskytuje na buněčné membráně (Obrázek 7A, C). U permeabilizovaných buněk je viditelná zvýšená intenzita fluorescence ve srovnání s nepermeabilizovanými buňkami (Obrázek 7B, D). To značí, že

převážná část galektinu-3 je v buňkách lokalizována především v intracelulárním prostoru. U hypoxických buněk byl galektin-3 v intracelulárním prostoru víceméně rovnoměrně distribuován, zatímco u buněk normoxických byla zvýšená exprese galektinu-3 pozorována především v oblasti buněčných jader (Obrázek 7 B, D). V některých částech jader není exprese galektinu-3 patrná (Obrázek 7B, D – černé tečky v oblasti zeleně obarvených jader).



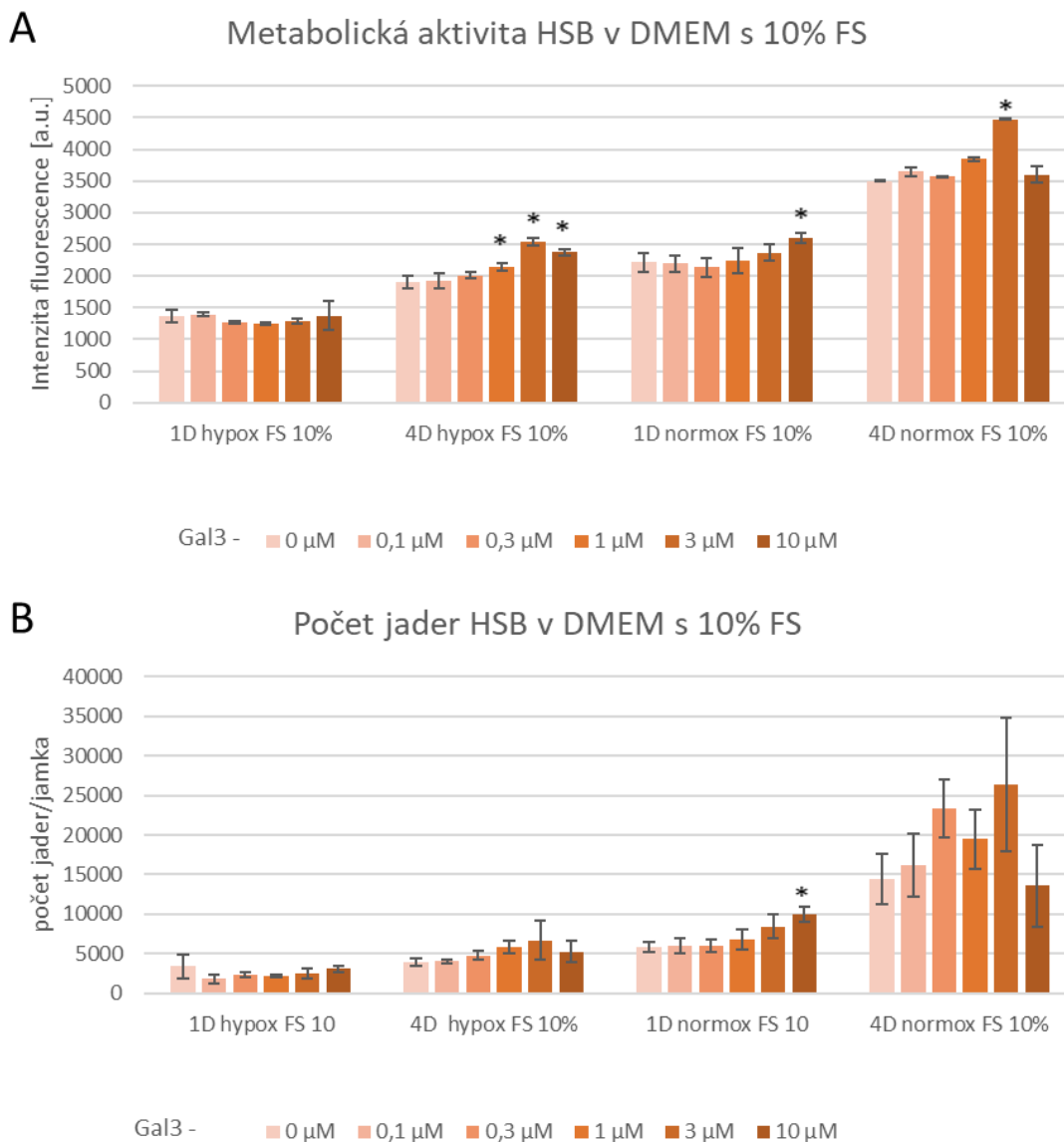
Obrázek 7: imunofluorescenční barvení galektinu-3 v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A, B) nebo normoxii (C, D). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost galektinu-3 (zelená) v nepermeabilizovaných buňkách na povrchu buněčné membrány (A, C) a v permeabilizovaných buňkách v oblasti jádra buňky (B, D). Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x20, měřítko 50 μm .

Nebyl pozorován výrazný rozdíl v intenzitě fluorescence galektinu-3 u hypoxických a normoxických buněk. Byly nalezeny některé abnormálně velké HSB, které nejspíše vyplňují prostor po buňkách apoptotických.

5.3 Vliv rekombinantního galektinu-3 na proliferaci hladkých svalových buněk

V následujícím experimentu byly hladké svalové buňky (HSB) kultivovány s různými koncentracemi rekombinantního galektinu-3 ve standardním kultivačním médiu DMEM s 10% FS po dobu 1 a 4 dní. U buněk byla nepřímo stanovena jejich proliferace měřením jejich metabolické aktivity fluorescenční metodou využívající resazurin. Současně byly také kvantifikovány počty buněk pomocí barvení jader s následnou analýzou mikroskopických polí v programu ImageJ.

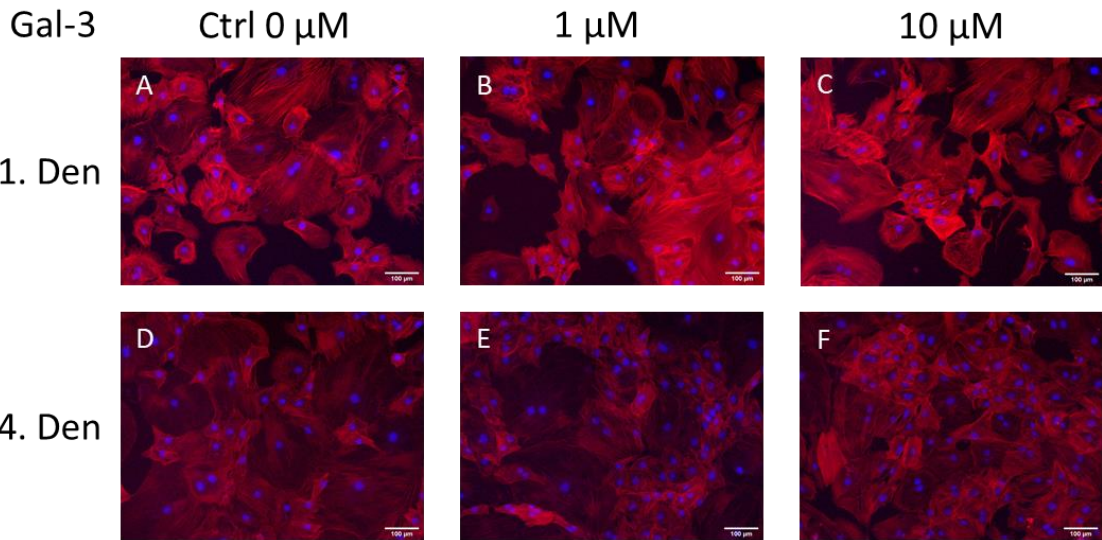
U buněk kultivovaných v DMEM s 10% FS byl pozorován mírný nárůst metabolické aktivity se zvyšující se koncentrací rekombinantního galektinu-3 v médiu. Hypoxické HSB vykazovaly statisticky významné zvýšení metabolické aktivity zejména 4. den po přidání rekombinantního galektinu-3 v koncentracích 1-10 μM . U normoxických HSB byl patrný nárůst metabolické aktivity 1. den při 10 μM koncentraci rekombinantního galektinu-3 a také 4. den při 3 μM koncentraci galektinu-3 (obrázek 8A). Kvantifikace počtu jader prokázala mírně zvýšený počet buněk ve vzorku normoxických HSB 1. den po inkubaci s 10 μM galektinem-3 (Obrázek 8B).



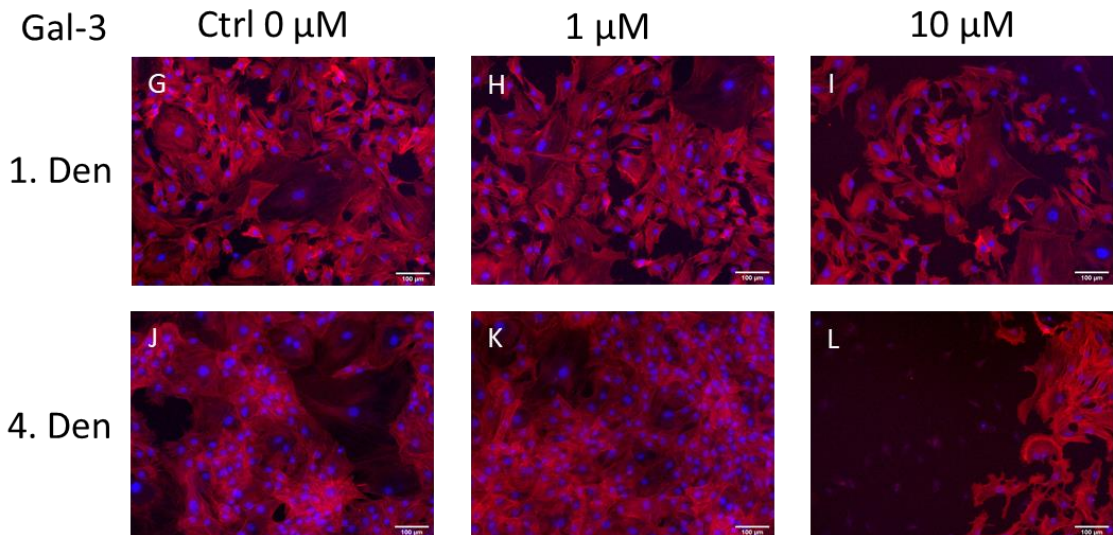
Obrázek 8: hladké svalové buňky inkubované v médiu s 10% FS s různými koncentracemi galektinu-3. U buněk byla měřena metabolická aktivita (A) a kvantifikovány počty jader v mikroskopických zorných polích pomocí programu ImageJ a přepočítány na povrch jamky (B). Průměr ± směrodatná odchylka ze tří jamek. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. *-vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem v daném dni bez přídavku galektinu-3.

U buněk byl také vizualizován aktinový cytoskelet barvením pomocí phalloidinu (obrázek 9). Na mikrofotografiích je patrné, že 4. den je buněk více než 1. den po inkubaci s galektinem-3, ale buňky jsou menší. Velký úbytek buněk byl pozorován 4. den v 10 μM koncentraci galektinu-3 u normoxických HSB.

Hladké svalové buňky - hypoxické



Hladké svalové buňky - normoxické

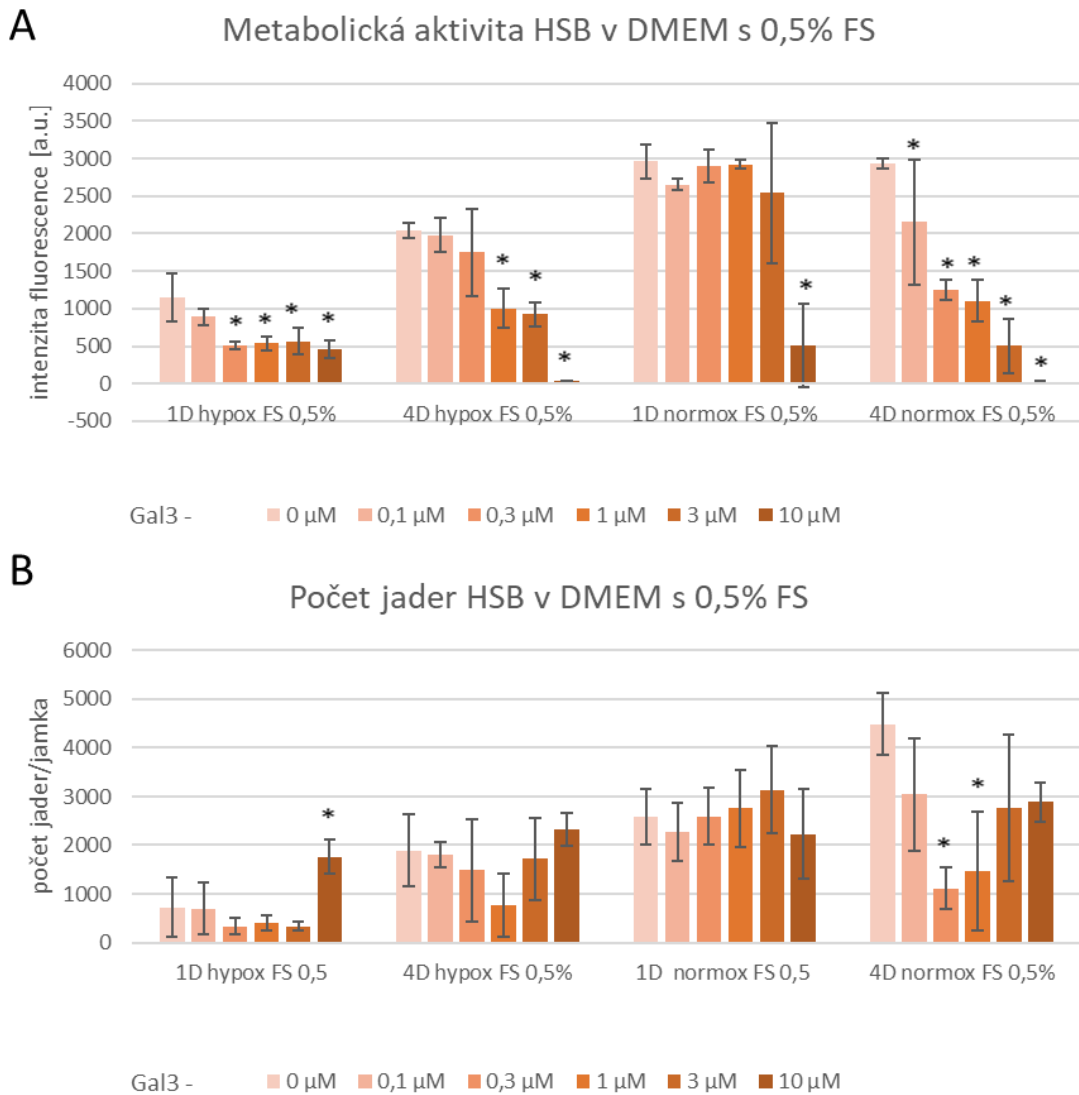


Obrázek 9: fluorescenční barvení cytoskeletu hladkých svalových buněk v kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-F) nebo normoxii (G-L). V buněčných kulturách v DMEM s 10% FS byl vizualizován aktinový cytoskelet phalloidinem (červená) a jádra Hoechstem 33258 (modrá) v různých koncentracích galektinu-3. Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu $\times 10$, měřítko 100 μ m.

Široká škála buněčných kultur je standardně kultivována v mediích s obsahem fetálního séra v rozmezí 10-20 %. Vysoký obsah séra má za úkol zajistit buňkám dostatečný přísun růstových faktorů nebo dalších proteinů a bioaktivních molekul, které následně pozitivně stimulují proliferaci buněk. Při zkoumání vlivu různých látek na proliferaci buněk v médiu může být ovšem

vysoký obsah fetálního séra nežádoucí. Fetální sérum obsahuje celou řadu proteinů a molekul, které se zkoumanou látkou mohou interagovat a maskovat tak její skutečný efekt na buňky [25; 26]. V dalším pokusu byl proto efekt galektinu-3 ověřen jeho přidáním k buňkám do média s obsahem pouze 0,5 % FS. Tato koncentrace séra je dostačující pro zachování viability a proliferačního potenciálu HSB (Obrázek 10).

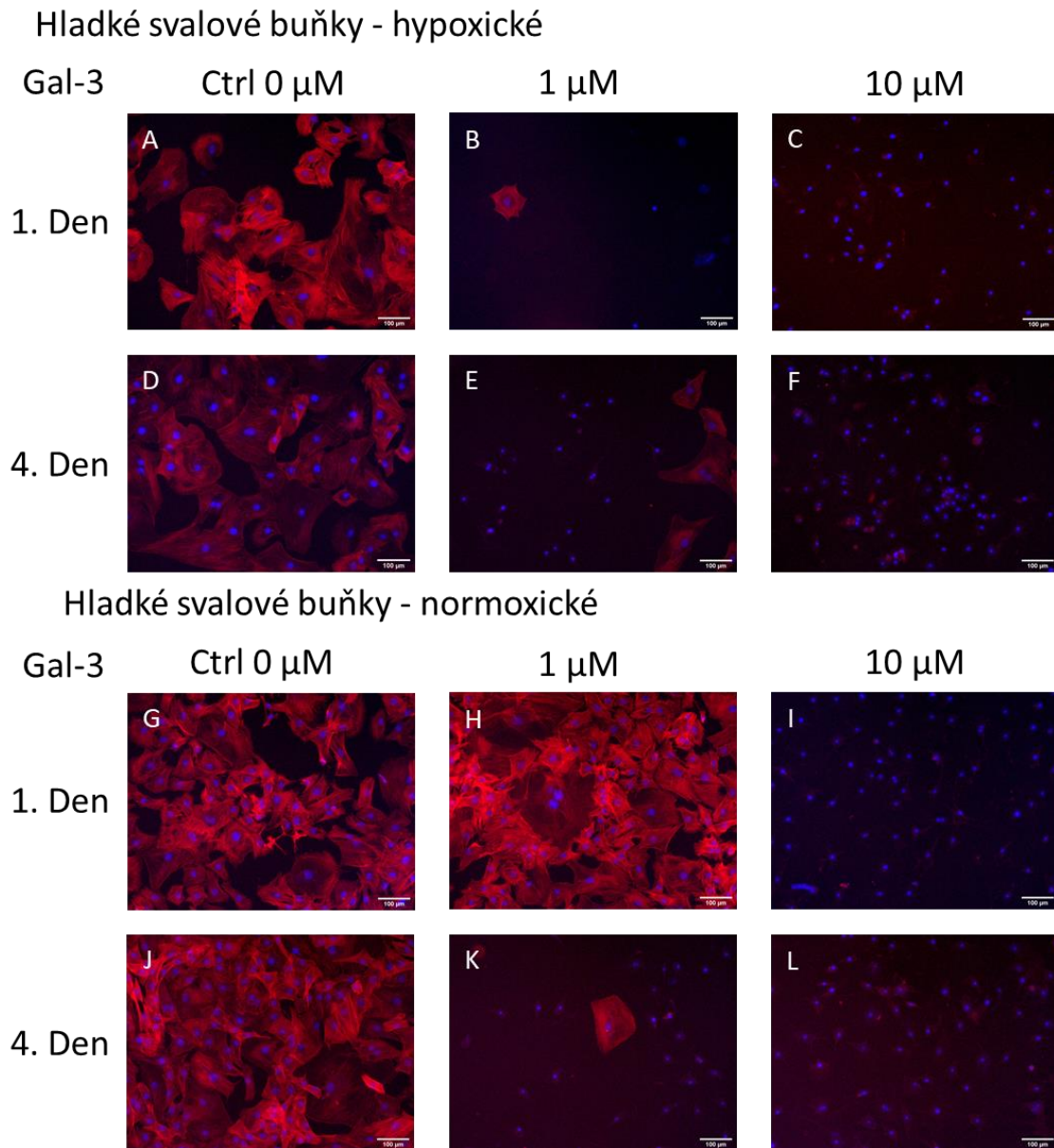
U hypoxických HSB byl pozorován pokles metabolické aktivity 1. a 4. den po přidání galektinu-3 v koncentracích 1-10 μM . U normoxických HSB metabolická aktivita výrazně poklesla 1. den pouze v nejvyšší koncentraci galektinu-3 a 4. den byl již pokles patrný u všech sledovaných koncentracích galektinu-3 (Obrázek 10A). Stanovení počtu jader ovšem neukázalo významnější pokles počtu buněk vlivem galektinu-3, pouze 4. den u normoxických HSB při použití koncentrace 0,3 a 1 μM (Obrázek 10B).



Obrázek 10: hladké svalové buňky inkubované v médiu s 0,5% FS s různými koncentracemi galektinu-3. U buněk byla měřena metabolická aktivita (A) a kvantifikovány počty jader v mikroskopických zorných polích pomocí programu ImageJ a přepočítány na povrch jamky (B). Průměr ± směrodatná odchylka ze tří jamek. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. * - vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem v daném dni bez přídavku galektinu-3.

Při vizualizaci cytoskeletu je ovšem jasně patrné, že u buněk přídavkem galektinu-3 došlo k rozpadu cytoskeletu, a na dně jamky byla pozorována pouze

jádra již mrtvých buněk (Obrázek 11), což vysvětluje nesoulad při porovnání počtu jader s metabolickou aktivitou ve vzorcích.



Obrázek 11: fluorescenční barvení cytoskeletu hladkých svalových buněk v kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-F) nebo normoxii (G-L). V buněčných kulturách v DMEM s 0,5% FS byl vizualizován aktinový cytoskelet phalloidinem (červená) a jádra Hoechstem 33258 (modrá) v různých koncentracích galektinu-3. Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu $\times 10$, měřítko 100 μm .

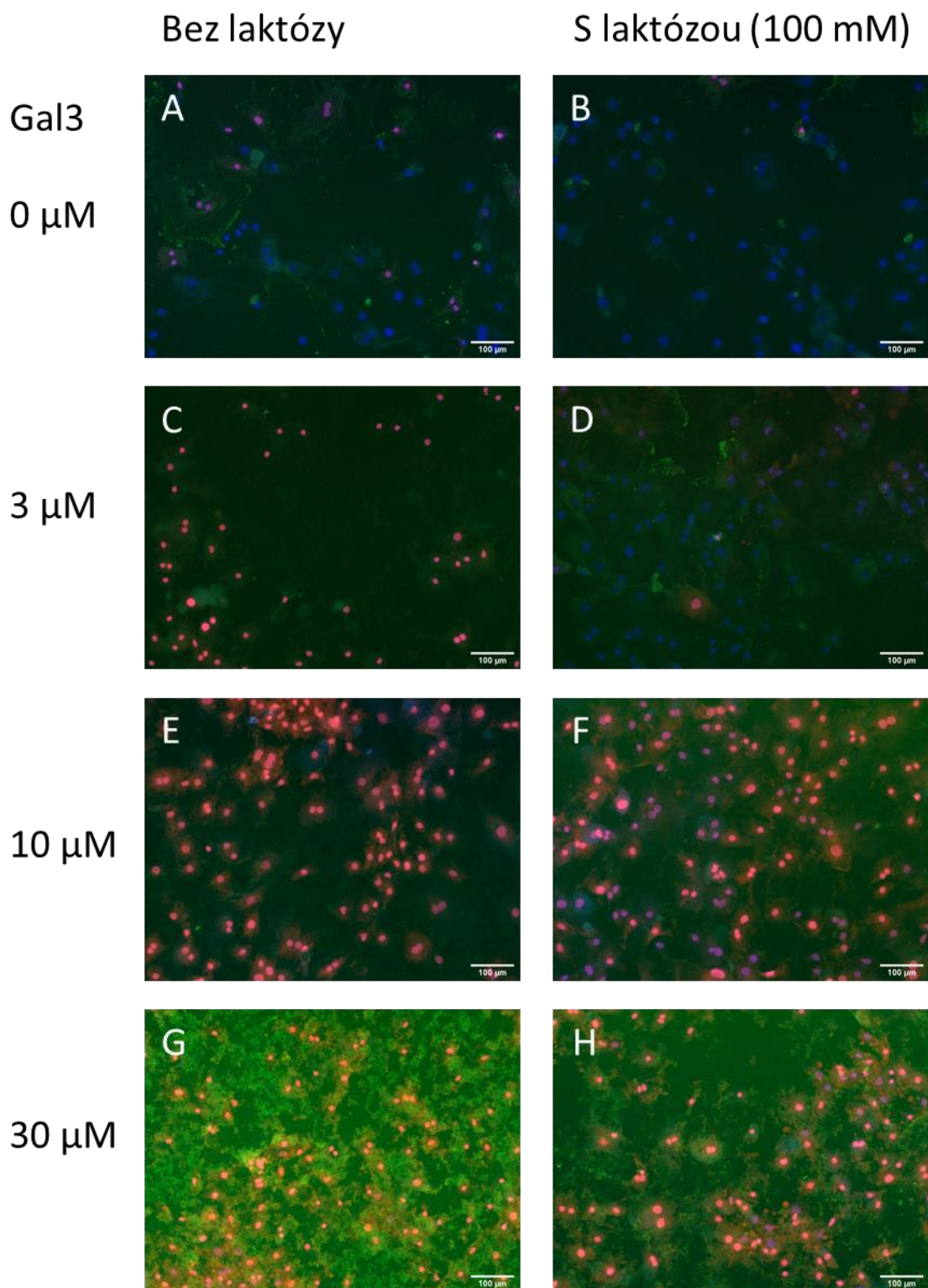
5.4 Apoptotický účinek rekombinantního galektinu-3 v hladkých svalových buňkách

Z předchozího pokusu je patrné, že rekombinantní galektin-3 způsobuje rozpad cytoskeletu a buněčnou smrt. V literatuře je galektin-3 často charakterizován v závislosti na extracelulární či intracelulární lokalizaci jako pro-apoptotický nebo anti-apoptotický protein [3]. Konfluentní buňky v 96jamkové destičce byly inkubovány po dobu 4 hodin s galektinem-3 o různých koncentracích (3, 10, 30 μM) a byl k nim přidán inhibitor galektinu-3 laktóza (Obrázek 12). Buňky byly obarveny pomocí kitu annexin-V-FLUOS. Annexin-V barví cytoplazmatickou membránu buněk procházejících apoptózou (zelená fluorescence), propidium jodid slouží k barvení jader mrtvých buněk (červená fluorescence) a Hoechst 33324 slouží k označení celkového počtu jader (živých i mrtvých; modrá fluorescence; Obrázek 12). Byla spočítána jádra mrtvých a živých buněk a bylo vypočítáno procentuální zastoupení mrtvých buněk v dané koncentraci galektinu-3 (Obrázek 13).

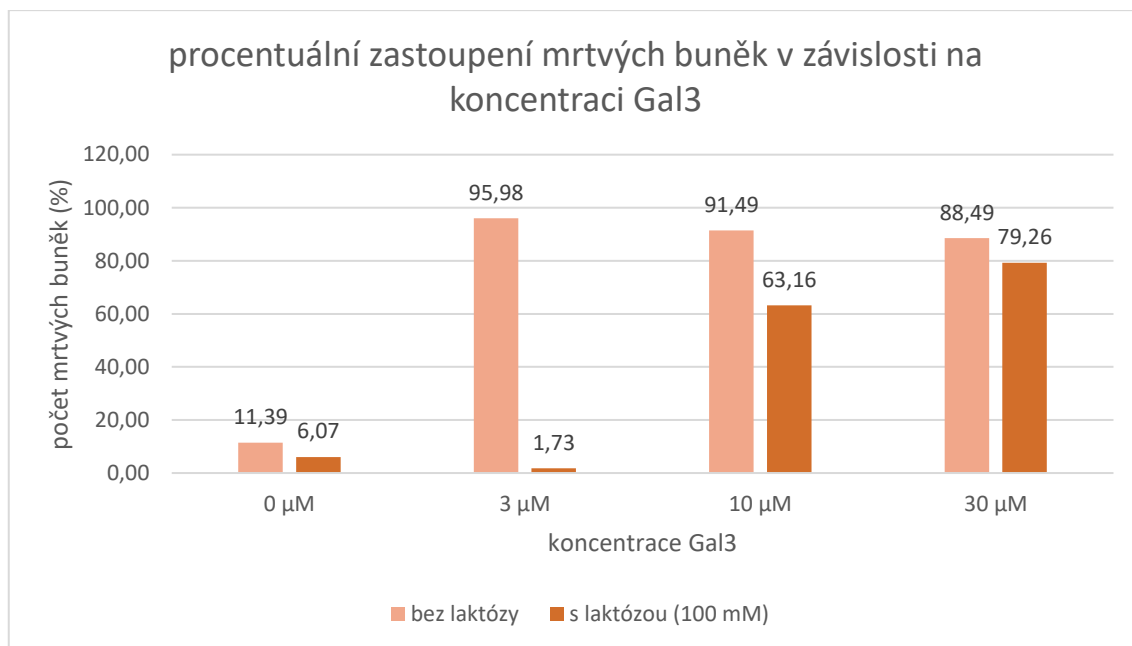
Na mikrofotografiích je možné pozorovat, že již při použití 3 μM galektinu-3 dochází k pronikání propidium jodidu do jader, a tedy k buněčné smrti. Vyšší koncentrace galektinu-3 poté způsobují úplný rozpad buněčných membrán (zelená fluorescence v okolí jader). Všechny použité koncentrace galektinu-3 způsobily smrt téměř všech buněk v jamce (Obrázek 13).

Dále je z mikrofotografií zřejmé, že přidavek laktózy výrazně inhibuje negativní efekt galektinu-3 (Obrázek 12). Největší rozdíl v procentuálním zastoupení mrtvých buněk po inhibici laktózou je při 3 μM koncentraci galektinu-3. Ve vyšších koncentracích galektinu-3 není účinek inhibitoru tak výrazný (Obrázek 13).

Uspořádání experimentu s adherovanými buňkami v 96jamkové destičce ovšem neumožňuje přesnou kvantifikaci buněk v časně apoptóze (zelená fluorescence cytoplazmatické membrány není na mikrofotografiích jasně patrná).



Obrázek 12: fluorescenční barvení apoptózy hladkých svalových buněk v kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii. V buněčných kulturách byla vizualizována raná apoptóza (zelená buněčná membrána), pozdní apoptóza (červená jádra a zelená buněčná membrána) a nekróza (červená jádra). Živé buňky jsou zobrazeny modrým barvením jader. Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivou x10, měřítko 100 μm .



Obrázek 13: procentuální zastoupení mrtvých buněk v závislosti na koncentraci Gal-3 v médiu a přídavku laktózy. Procentuální zastoupení mrtvých buněk ve vzorku bylo vypočítáno jako poměr mrtvých buněk (červená fluorescence jader) k celkovému počtu buněk v zorných polích (modrá fluorescence jader).

Z tohoto důvodu byla apoptóza buněk kvantifikována na průtokovém cytometru. Buňky byly inkubovány s 10 μM galektinem-3 a 100 mM laktózou po dobu 1,5 hodiny na tajícím ledu (4°C). Buňky byly obarveny pomocí kitu annexin-V-FLUOS. Annexin-V barví cytoplazmatickou membránu buněk procházejících apoptózou (zelená fluorescence), propidium jodid slouží k barvení jader mrtvých buněk (červená fluorescence). Barvivo bylo inkubováno s buňkami 10 minut při pokojové teplotě. V této kombinaci času a teploty buňky nevykazovaly v kontrolním vzorku příliš velké množství mrtvých buněk. Nejprve byl změřen kontrolní vzorek, tj. vzorek buněk neovlivněných galektinem-3, podle kterého se nastavily hranice, kde se nacházejí vitální buňky. Následně byl změřen vzorek s galektinem-3 a vzorek s galektinem-3 a laktózou. V každém vzorku bylo změřeno 10 000 buněk.

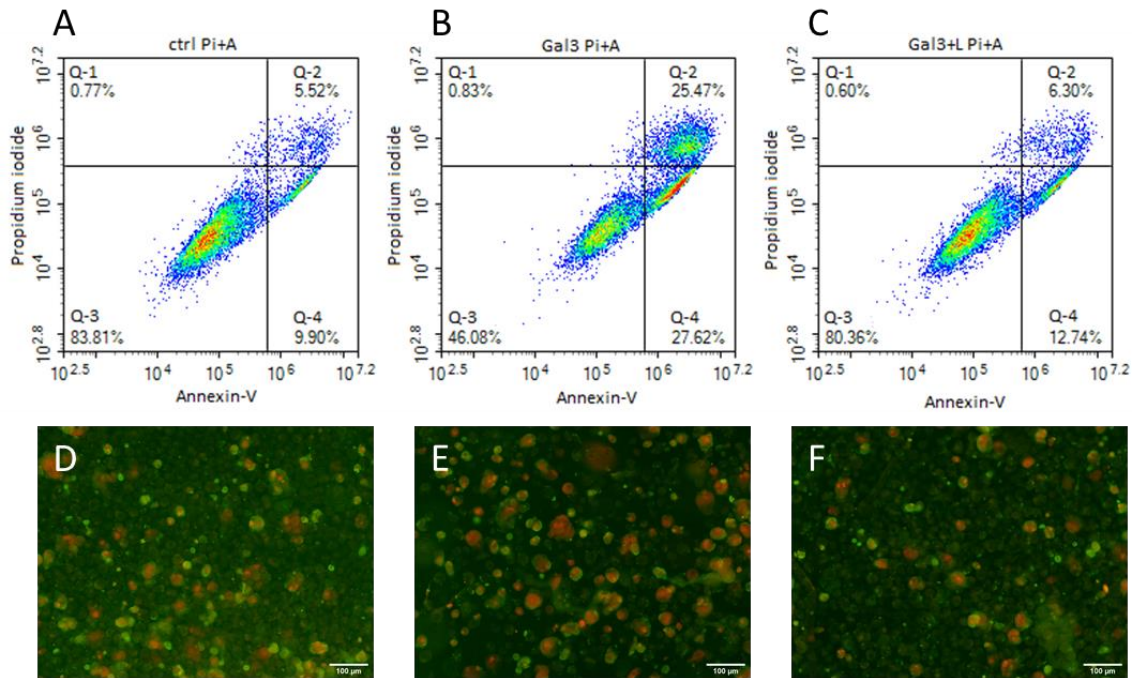
Hypoxické buňky měly již v kontrolním vzorku 9,9 % buněk procházející ranou apoptózou a 5,52 % buněk procházející pozdní apoptózou. Nekrotických

buněk bylo 0,77 % a 83,81 % buněk bylo živých (Obrázek 14A). Po inkubaci s galektinem-3 došlo k výraznému nárůstu procentuálního zastoupení apoptotických buněk - 27,62 % buněk procházejících ranou apoptózou a 25,47 % buněk procházející pozdní apoptózou. Procentuální zastoupení nekrotických buněk po inkubaci s galektinem-3 zůstalo téměř nezměněno (0,83 %). Živých buněk bylo 46,08 % (Obrázek 14B). Po inkubaci s galektinem-3 a laktózou došlo k výraznému potlačení apoptotického účinku galektinu-3 – ve vzorku bylo pouze 12,74 % buněk procházejících ranou apoptózou, 6,3 % buněk procházejících pozdní apoptózou a 0,6 % buněk bylo nekrotických. Živých buněk bylo 80,5 % (Obrázek 14C).

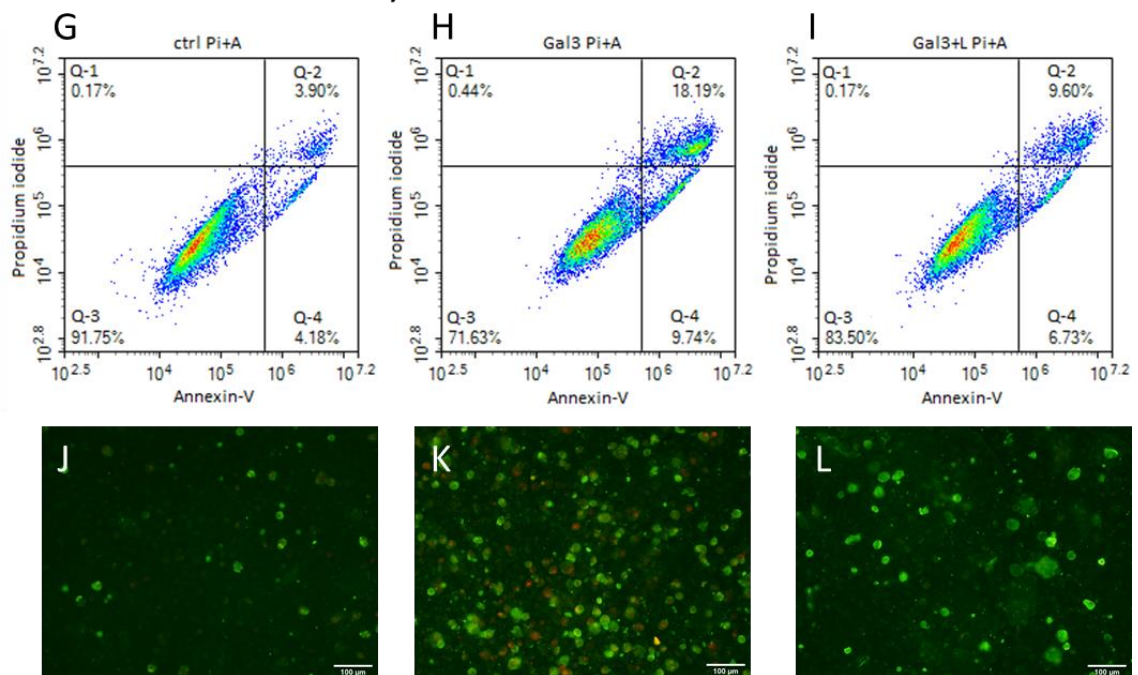
Normoxické buňky v kontrolním vzorku bez přidání galektinu-3 obsahovaly 4,18 % buněk v rané apoptóze, 3,9 % buněk v pozdní apoptóze a 0,17 % buněk nekrotických. Živých buněk bylo 91,75 % (Obrázek 14G). U normoxických buněk byl pozorován obdobný efekt galektinu-3 jako u hypoxických buněk. Buňky inkubované s galektinem-3 měly 9,74 % buněk v rané apoptóze, 18,19 % buněk v pozdní apoptóze a 0,44 % buněk bylo nekrotických. Živých buněk bylo 71,63 % (Obrázek 14H). Po inkubaci buněk s galektinem-3 a laktózou bylo 6,73 % buněk procházejících ranou apoptózou, 9,6 % buněk procházejících pozdní apoptózou a 0,17 % buněk bylo nekrotických. Živých buněk bylo 83,4 % (Obrázek 14I).

U hypoxických buněk je tedy po inhibici galektinu-3 laktózou zhruba o 34 % více živých buněk než u inkubace pouze s galektinem-3. U normoxických buněk je přibližně o 11 % více živých buněk. Z toho je patrné, že laktóza je dobrý inhibitor galektinu-3, protože procentuální zastoupení buněk živých, buněk v rané apoptóze, v pozdní apoptóze a nekrotických buněk je přibližně stejné jako v kontrolním vzorku bez přidání galektinu-3. Rovněž je zajímavé, že negativní účinek galektinu-3 je výraznější u hypoxických buněk.

Hladké svalové buňky - hypoxické



Hladké svalové buňky - normoxické



Obrázek 14: kvantifikace apoptózy hladkých svalových buněk v kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-F) nebo normoxii (G-L) průtokovou cytometrií. Ctrl Pi+A – kontrolní vzorek bez inkubace s galektinem-3 (A, D, G, J), Gal3 Pi+A: buňky inkubované s galektinem-3 (B, E, H, K), Gal3+L Pi+A: buňky inkubované s galektinem-3 s inhibítozem laktózy (C, F, I, L). Q-1: nekrotické buňky (pouze červená jádra), Q-2 buňky v pozdní apoptóze (červená jádra a zelená buněčná membrána), Q-3 živé buňky (neobarvené), Q-4 buňky v rané apoptóze (pouze zelená buněčná membrána). Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x10, měřítko 100 μm .

6 DISKUZE

Pro ověření přítomnosti (tj. identity) hladkosvalových buněk v primokulturách izolovaných z plicních arterií potkanů byly použity specifické markery, kterými jsou α -aktin, kalponin a myosin.

Aktin obecně je protein hojně se vyskytující hlavně v eukaryotických buňkách. V buňkách plní mnoho důležitých funkcí od pohyblivosti buňky a udržování jejího tvaru a její polarity až po regulaci transkripce. Účastní se více interakcí protein-protein než jakýkoli jiný protein a je schopný přecházet mezi monomerními globulárními (G-aktin) a polymerními vláknitými stavy (F-aktin). Aktin se vyskytuje v izoformách α , β a γ . Isoforma α je typická pro zralé diferencované HSB kontraktálního fenotypu, zatímco ostatní dvě isoformy se vyskytují v nezralých HSB i v jiných buněčných typech. Alfa-aktin je považován za časný marker diferenciac buněk směrem ke hladkosvalovému fenotypu [27; 28; 29; 30].

Kalponin má tři isoformy: alkalickou, neutrální a acidickou. Alkalická forma je selektivní biomarker pro diferencované hladké svalstvo. Neutrální a acidické isoformy jsou širěji exprimovány. Všechny isoformy jsou proteiny vázající aktin a regulují aktivitu myozinové APTázy. Kalponin je považován za střednědobý marker diferenciac buněk směrem ke hladkosvalovému fenotypu [28].

Myosin v hladkém svalstvu, podobně jako v srdečním a kosterním svalstvu, má společnou kontrakci s aktinem založenou na tzv. „cyklu křížení mostů“ (cross-bridge cycling), tj. sledu molekulárních událostí, které jsou základem teorie posuvného vlákna. Cross-bridge formace a myosin-ATPázová aktivita je regulována primárně fosforylací myosinových regulačních lehkých řetězců. Fosforylace těchto řetězců je důležitá pro aktivaci hladkosvalového myosinu a iniciaci kontrakce. Takto se dá rozeznat natažený svalový myosin, který je

enzymaticky aktivní při absenci fosforylace. Přítomnost těžkého řetězce myosinu je považována za pozdní (tj. pokročilý) marker diferenciaci buněk směrem ke hladkosvalovému fenotypu [28].

V HSB izolovaných z plicní arterie potkanů vystavených hypoxii a normoxii byla pozorována přítomnost α -aktinu a kalponinu, ovšem myosin pozorován nebyl. To bylo nejspíše způsobeno kultivací *in vitro* v statickém systému, kdy dochází k vymizení exprese některých kontraktilních markerů (hlavně těžkých řetězců myosinu a cytoskeletárního proteinu smoothelinu), což je spojeno s přechodem buněk z kontraktilního na syntetický fenotyp [29].

Další možnou příčinou rychlé fenotypické modulace HSB a ztráty myosinu bylo i získání HSB explantační metodou, tj. jejich migrací z explantátů tkáně, která byla jen částečně natrávena kolagenázou. Ve vědecké studii Christen *et al.* 2015 byla proto upřednostněna metoda úplné enzymatické digesce tkáně, protože umožňuje zahrnout populaci HSB co nejrepresentativnější pro prostředí zdravé cévní stěny *in vivo*. HSB se mimo jiné výrazně barvily na α -aktin a myosin, a oba proteiny měly typickou strukturu. Imunofluorescenční barvení ukázalo, že buňky čerstvě izolované vykazují přítomnost α -aktinu a těžkých řetězců myosinu, ale po 7 dnech kultivace intenzita zbarvení myosinu klesla přibližně o polovinu, a v páté pasáži dokonce až na 3 % původní hodnoty. Tento trend potvrdil i denzitometrický sken imunoblotů [31].

U HSB izolovaných z plicní arterie potkanů vystavených hypoxii nebo normoxii byl rovněž obarven galektin-3 u permeabilizovaných a nepermeabilizovaných buněk. Galektin-3 u HSB izolovaných z plicní arterie potkanů vystavených hypoxii nebo normoxii byl nalezen u permeabilizovaných buněk v okolí buněčného jádra, přičemž v oblasti jádra byly pozorovány neurčité

inkluze. V nepermeabilizovaných buňkách byl galektin-3 pozorován velmi slabě na buněčné membráně.

Galektin-3 může být lokalizován jak intracelulárně, tak extracelulárně. Galektin-3 se nachází hlavně v intracelulárních kompartmentech jako je jádro, cytosol a v membránovitých strukturách. Jeho lokalizace závisí na typu buněk a na specifických experimentálních podmínkách. V jádře lze galektin-3 nalézt difuzně v nukleoplazmě a může být spojen s řadou diskrétních bodových struktur. Ty mohou odpovídat subnukleárním strukturám charakterizovaným odlišnými ultrastrukturálními rysy nebo specifickými markerovými proteiny, které jsou pod světelnou mikroskopií vidět jako shluky granulí interchromatinu, tečky, Cajalova tělíska atd. Extracelulárně se galektin-3 váže na buněčnou membránu. Není citlivý na oxidační inaktivaci, ale N-terminální řetězec může být blokován acetylací [32].

Galektin-3 byl izolován z fibroblastů, nádorových buněk, myeloidních buněk, epitelálních a endotelových buněk a z HSB [17].

V našich experimentech byla intenzita exprese galektinu-3 srovnatelná u hypoxických a normoxických buněk. Dle vědecké studie autorů Kataoka *et al.* 2019 hypoxie zvyšuje expresi galektinu-3. Lidské buněčné linie nemalobuněčných karcinomů plic A549 a LK-2 byly kultivovány za hypoxických (2 % O₂) nebo normoxických (21 % O₂) podmínek po dobu 72 hodin. V obou liniích měl protein zvýšenou expresi při hypoxii ve srovnání s normoxií. Poté byla změřena hladina vylučovaného galektinu-3 a bylo zjištěno, že hladina vylučovaného galektinu-3 není hypoxií ovlivněna. Ovšem dochází k akumulaci cytoplazmatického galektinu-3 [33]. V souladu s tímto nálezem jsme u hypoxických HSB pozorovali rovnoměrnou distribuci galektinu-3 v cytoplazmatické oblasti buněk, zatímco u normoxických HSB byl galektin-3

přednostně lokalizován v oblasti jádra (Obrázek 7B, D). K nárůstu exprese galektinu-3 dochází po vystavení hypoxii také u endotelových buněk [34]. V našich experimentech byla však intenzita fluorescence galektinu-3 v hypoxických HSB obdobná jako v normoxických buňkách. Příčinou by mohl být fakt, že buňky po izolaci z plicních arterií potkanů vystavených normoxii či hypoxii byly dále kultivovány pouze v normoxických podmínkách. Domníváme se, že u hypoxických buněk došlo vlivem vystavení normoxickým podmínkám k poklesu exprese galektinu-3 na stejnou hladinu jako u normoxických buněk, a proto nebyl pozorován významný rozdíl v jeho expresi u normoxických a hypoxických buněk.

K HSB izolovaným z plicní arterie potkanů inkubovaných v hypoxii nebo normoxii byl přidán rekombinantní galektin-3 o různých koncentracích a byla změřena proliferace buněk. V kultivačním médiu s 10% FS byl pozorován mírný nárůst proliferace pouze při použití vysokých koncentrací galektinu-3 (1 – 10 μ M). Naopak s přibývající koncentrací galektinu-3 v médiu s 0,5% FS byl pozorován pokles proliferace. Galektin-3 má vliv na buněčný růst, kontroluje buněčný cyklus a podílí se na regulaci apoptózy. Proliferace a diferenciaci určitých typů buněk je doprovázena sníženou či zvýšenou expresí galektinu-3. Endogenní i exogenní galektin-3 může specifickým způsobem indukovat či inhibovat buněčný růst nebo přímo buněčnou diferenciaci. Zda exogenní galektin-3 podporuje či naopak inhibuje buněčný růst, závisí na typu buňky; např. pokud byl rekombinantní galektin-3 přidán do klidových kultur normálních plicních fibroblastů (koncentrace 0,1 – 10 μ g/ml), stimuloval syntézu DNA a indukoval proliferaci, přičemž k nejvyššímu nárůstu proliferace došlo v jeho nejvyšší koncentraci [3; 35]. Zvýšená proliferace 24 hodin po přidání rekombinantního galektinu-3 (koncentrace 1 a 10 μ g/ml) byla pozorována také u HSB z plicní arterie potkanů a také u fibroblastů ze srdcí z potkanů (0,1 – 10 μ g/ml) [6; 36]. Naopak rekombinantní galektin-3 inhiboval proliferaci buněk

kostní dřeně potkana vyvolanou faktorem stimuluujícím kolonie. Po 7 dnech inkubace s 100 nM galektinem-3 došlo k zastavení proliferace, a tento účinek byl zvrácen přidáním 50 mM laktosy [37]. Inhibiční vlastnosti galektinu-3 jsou zprostředkovány jeho interakcí s vhodným glykokonjugátem na povrchu buňky [3]. Naše výsledky ukazují spíše na negativní efekt galektinu-3 na proliferaci HSB. Je zajímavé, že se tento negativní vliv neprojevuje u buněk kultivovaných v médiu s 10% FS, kde vysoké koncentrace galektinu-3 naopak proliferaci buněk mírně podporují. Obdobný jev byl zaznamenán například při kultivaci HSB s lysofosfatidylcholinem [25]. V médiu s 10% FS tato sloučenina proliferaci buněk podporovala, naopak při kultivaci v médiu s 1% FS měl lysofosfatidylcholin negativní efekt na proliferaci. Bylo také prokázáno, že fetální sérum inhibuje apoptózu indukovanou neomycinem v linii vláskových buněk sluchového ústrojí [26]. Domníváme se, že v našem případě některé složky ze séra interagují s galektinem-3 a tím blokují jeho negativní vliv na proliferaci buněk.

U galektinu-3 je také popisována pro- a antiapoptotická aktivita. Obecně se uvádí, že intracelulární galektin-3 se chová spíše jako antiapoptotický faktor a extracelulární galektin-3 jako proapoptotický faktor. Intracelulární galektin-3 chrání různé typy buněk před apoptózou v reakci na různé podněty. Avšak ve vědecké studii Lee *et al.* 2003 byla prokázána proapoptotická aktivita i u intracelulárního galektinu-3, u něhož se ukázalo, že jeho nadměrná exprese (vyvolaná transfekcí buněk) potencuje apoptózu-indukující ligand, příbuzný s TNF, který indukuje cytotoxicitu [3; 38]. Z našich výsledků je patrné, že přidavek rekombinantního galektinu-3 indukuje apoptózu HSB. 90 minut po inkubaci s 30 μ M galektinem-3 došlo k výraznému nárůstu v zastoupení raně i pozdně apoptotických buněk; na zastoupení nekrotických buněk galektin-3 vliv neměl (Obrázek 14). Indukce apoptózy po přidání exogenního galektinu-3 byla detekována například u T-lymfocytů [39]. Přídavek galektinu-3 do média

způsobil také pokles exprese antiapoptotických proteinů v endotelových buňkách [34].

Dle našich výsledků přidavek laktózy k buňkám výrazně inhibuje proapoptotický účinek galektinu-3. Laktóza je přirozeně se vyskytující β -galaktosid schopný vázat se na galektin-3. Laktóza byla úspěšně použita v řadě studií pro inhibici účinku rekombinantního galektinu-3. Přídavek laktózy v milimolárních koncentracích byl například schopen zabránit vazbě galektinu-3 na povrch buněk a také blokovat následné biologické účinky galektinu-3, jako je například proliferace, migrace nebo apoptóza buněk [6; 35; 40].

7 ZÁVĚR

Cílem experimentální části práce bylo charakterizovat vliv galektinu-3 a jeho inhibitoru na chování buněčných primokultur izolovaných ze srdce a cévní stěny.

Ze získaných výsledků vyplývá, že:

- Hladké svalové buňky z plicních arterií potkanů exprimují galektin-3
- Přídavek rekombinantního galektinu-3 do kultivačního média s 0,5 % fetálního bovinního séra má významně negativní vliv na proliferaci HSB
- Kultivační médium s 10 % fetálního bovinního séra maskuje negativní vliv rekombinantního galektinu-3 na proliferaci buněk
- Při inkubaci hypoxických nebo normoxických HSB s rekombinantním galektinem-3 buňky podléhají apoptóze
- apoptotický účinek galektinu-3 je výraznější u hypoxických buněk
- Pro potlačení apoptózy buněk byla použita laktóza, která se projevila jako účinný inhibitor apoptotického efektu galektinu-3

Na výsledky této bakalářské práce bude navázáno dalším výzkumem zabývajícím se endogenním galektinem-3 produkovaným hladkými svalovými buňkami, endotelovými buňkami cév a srdečními fibroblasty, a jeho inhibicí pro následné potenciální využití při léčbě hypoxické pulmonální hypertenze.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP – adenosintrifosfát

Bcl-2 – rodina proteinů obsahující BH1 řetězec

BH1 – protein obsahující NWGR a působící antiapoptoticky

CAT – kataláza – fúzní protein

CRD – sacharid rozpoznávající vazebná doména

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMOS – dimethylsulfoxid

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ER – endoplazmatické retikulum

FS – fetální bovinní sérum

GTP – guanosintrifosfát

HIPK2 – homodoména-interagující protein kináza 2

HSB – hladké svalové buňky

CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc

LGALS3 – gen kódující galektin-3

MBÚ – mikrobiologický ústav

NAD⁺/NADH+H – oxidovaný/redukovaný nikotinamidadeninukleotid

ND – N-terminální doména

NF-κB – nukleární faktor κB

NWGR – úsek CRD působící antiapoptoticky

PBS – fyziologický roztok pufovaný fosfáty

RUNX – runt-related protein

SMC – smooth muscle cells

TNF – faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SHARON, N. a H. LIS. Lectins. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. Elsevier, 2013, **2013**(2), 701-705 [cit. 2021-04-07]. ISBN 9780123786319. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00217-6
- [2] RAPOPORT, Eugenia, Elena KOVALENKO, Ivan BELYANCHIKOV a Nicolai BOVIN. Probing Cell Surface Lectins with Neoglycoconjugates. *Lectins* [online]. Elsevier, 2007, , 397-415 [cit. 2021-04-29]. ISBN 9780444530776. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044453077-6/50018-1
- [3] DUMIC, Jerka, Sanja DABELIC a Mirna FLÖGEL. Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2006, **1760**(4), 616-635 [cit. 2021-02-01]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2005.12.020
- [4] SCIACCHITANO, Salvatore, Luca LAVRA, Alessandra MORGANTE et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(2) [cit. 2021-04-16]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19020379
- [5] VARKI, A., R. CUMMINGS a J.D. ESIKO. *Essentials of Glycobiology* [online]. 2nd edition. NY: Cold Spring Harbot Laboratory Press, 2009 [cit. 2021-04-16].
- [6] BARMAN, Scott, Xueyi LI, Stephen HAIGH et al. 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. 2021-02-01]. ISSN 1040-0605. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.00186.2018

- [7] WANG, Wen-Hung, Chih-Yen LIN, Max CHANG et al. The role of galectins in virus infection - A systemic literature review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* [online]. 2020, **53**(6), 925-935 [cit. 2021-04-15]. ISSN 16841182. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmii.2019.09.005
- [8] FORTUNA-COSTA, Anneliese, Angélica GOMES, Eliene KOZŁOWSKI, Mariana STELLING a Mauro PAVÃO. Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis. *Frontiers in Oncology* [online]. 2014, **4** [cit. 2021-04-15]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2014.00138
- [9] GAO, Xiaoge, Dan LIU, Yuying FAN et al. The Two Endocytic Pathways Mediated by the Carbohydrate Recognition Domain and Regulated by the Collagen-like Domain of Galectin-3 in Vascular Endothelial Cells. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(12) [cit. 2021-04-29]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0052430
- [10] COLIN HUGHES, R. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* [online]. 2001, **83**(7), 667-676 [cit. 2021-04-16]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-9084(01)01289-5
- [11] YU, Fei, Russell FINLEY, Avraham RAZ a Hyeong-Reh KIM. Galectin-3 Translocates to the Perinuclear Membranes and Inhibits Cytochrome c Release from the Mitochondria. *Journal of Biological*

- Chemistry* [online]. 2002, **277**(18), 15819-15827 [cit. 2021-05-04]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M200154200
- [12] BRINCHMANN, Monica, Deepti PATEL a Martin IVERSEN. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators of Inflammation* [online]. 2018, **2018**, 1-11 [cit. 2021-04-30]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2018/9186940
- [13] ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. 2007, **35**(4), 495-516 [cit. 2021-04-30]. ISSN 0192-6233. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337
- [14] AKAHANI, Shiro, Pratima NANGIA-MAKKER, Hidenori INOHARA, Hyeong-Reh CHOI KIM a Avraham RAZ. Galectin-3: A Novel Antiapoptotic Molecule with A Functional BH1 (NWGR) Domain of Bcl-2 Family. *American Association for Cancer Research* [online]. 1997, **57**(23), 5272-5276 [cit. 2021-05-05]. Dostupné z: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/57/23/5272>
- [15] WANG, Lei a Xiu-Li GUO. *Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression* [online]. 2016, **78**, 165-171 [cit. 2021-05-05]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2016.01.014
- [16] DONG, Rui, Min ZHANG, Qunying HU, Shan ZHENG, Andrew SOH, Yijie ZHENG a Hui YUAN. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *International Journal*

of Molecular Medicine [online]. 2017, **41**(2), 599-614 [cit. 2021-05-07]. ISSN 1107-3756. Dostupné z: doi:10.3892/ijmm.2017.3311

- [17] DÍAZ-ALVAREZ, Laura a Enrique ORTEGA. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. *Mediators of Inflammation* [online]. 2017, **2017**, 1-10 [cit. 2021-04-26]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2017/9247574
- [18] FILIPE, Mando, Wouter MEIJERS, A. ROGIER VAN DER VELDE et al. Galectin-3 and heart failure. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, **443**(5), 48-56 [cit. 2021-05-07]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2014.10.009
- [19] *Plicní hypertenze* [online]. 2014 [cit. 2021-05-07]. Dostupné z: <http://www.pah.cz>
- [20] FOSHAT, Michelle a Nahal BOROUMAND. The Evolving Classification of Pulmonary Hypertension. *Arch Pathol Lab Med* [online]. 2016, **141**(5), 696-703 [cit. 2021-05-10]. ISSN 0003-9985. Dostupné z: doi:10.5858/arpa.2016-0035-RA
- [21] JANSA, Pavel, Michael ASCHERMANN a Aleš LINHART. LÉČBA CHRONICKÉ PLICNÍ HYPERTENZE. *INTERNÍ MEDICÍNA PRO PRAXI* [online]. 2008, **10**(9), 392-396 [cit. 2021-05-11]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2008/09/05.pdf>
- [22] KOLÁŘ, František, Jana JEŽKOVÁ, Patricie BALKOVÁ et al. 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. 2021-04-06].
ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00689.2006
- [23] BUMBA, Ladislav, Dominic LAAF, Vojtěch SPIWOK, Lothar ELLING, Vladimír KŘEN a Pavla BOJAROVÁ. Poly-N-Acetyllactosamine Neo-Glycoproteins as Nanomolar Ligands of Human Galectin-3: Binding Kinetics and Modeling. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(2) [cit. 2021-04-06]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19020372
- [24] ROCHE. *Annexin-V-FLUOS Staining Kit*. Německo, 2016.
- [25] ASAI, Daisuke, Takahito KAWANO, Masaharu MURATA, Hideki NAKASHIMA, Riki TOITA a Jeong-Hun KANG. Effect of Fetal Bovine Serum Concentration on Lysophosphatidylcholine-mediated Proliferation and Apoptosis of Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Journal of Oleo Science* [online]. 2020, **69**(3), 255-260 [cit. 2021-04-28]. ISSN 1345-8957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess19268
- [26] GUAN, Ming, Yuhua ZHANG, Qiusheng HUANG et al. Fetal bovine serum inhibits neomycin-induced apoptosis of hair cell-like HEI-OC-1 cells by maintaining mitochondrial function. *Am J Transl Res*. [online]. 2019, **11**(3), 1343-1358 [cit. 2021-04-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6456536/>
- [27] DOMINGUEZ, Roberto a Kenneth HOLMES. Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics* [online]. 2011, **40**(1), 169-186 [cit.

2021-04-26]. ISSN 1936-122X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359

- [28] VETTERKIND, Susanne a Kathleen MORGAN. Regulation of Smooth Muscle Contraction. *Muscle* [online]. Elsevier, 2012, , 1173-1180 [cit. 2021-04-26]. ISBN 9780123815101. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-381510-1.00087-9
- [29] RENSEN, S., P. DOEVENDANS a G. VAN EYS. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal* [online]. 2007, **15**(3), 100-108 [cit. 2021-04-26]. ISSN 1568-5888. Dostupné z: doi:10.1007/BF03085963
- [30] CHRISTEN, Thomas, Marie-Luce BOCHATON-PIALLAT, Pascal NEUVILLE, Sander RENSEN, Mireille REDARD, Guillaume VAN EYS a Giulio GABBIANI. Cultured Porcine Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* [online]. 1999, **85**(1), 99-107 [cit. 2021-04-26]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.85.1.99
- [31] CHRISTEN, Thomas, Marie-Luce BOCHATON-PIALLAT, Pascal NEUVILLE, Sander RENSEN, Mireille REDARD, Guillaume VAN EYS a Giulio GABBIANI. Cultured Porcine Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* [online]. 1999, **85**(1), 99-107 [cit. 2021-04-26]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.85.1.99
- [32] HAUDEK, Kevin, Kimberly SPRONK, Patricia VOSS, Ronald PATTERSON, John WANG a Eric ARNOYS. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General*

Subjects [online]. 2010, **1800**(2), 181-189 [cit. 2021-04-26]. ISSN 03044165.

Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.005

- [33] KATAOKA, Yoko, Yasuhiko OHSHIO, Koji TERAMOTO, Tomoyuki IGARASHI, Tohru ASAI a Jun HANAOKA. Hypoxia-induced galectin-3 enhances RhoA function to activate the motility of tumor cells in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports* [online]. 2018 [cit. 2021-04-26]. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2018.6915
- [34] LI, Yumei, Xinghe CHEN, Xixi ZENG, Shaokun CHEN, Xi YANG a Li ZHANG. Galectin-3 mediates pulmonary vascular endothelial cell dynamics via TRPC1/4 under acute hypoxia. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* [online]. 2020, **34**(5) [cit. 2021-04-27]. ISSN 1095-6670. Dostupné z: doi:10.1002/jbt.22463
- [35] INOHARA, Hidenori, Shiro AKAHANI a Avraham RAZ. Galectin-3 Stimulates Cell Proliferation. *Experimental Cell Research* [online]. 1998, **245**(2), 294-302 [cit. 2021-04-29]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1006/excr.1998.4253
- [36] HE, Jingni, Xiaohui LI, Hui LUO, Tangzhiming LI, Lin ZHAO, Qiangqiang QI, Yuwei LIU a Zaixin YU. Galectin-3 mediates the pulmonary arterial hypertension-induced right ventricular remodeling through interacting with NADPH oxidase 4. *Journal of the American Society of Hypertension* [online]. 2017, **11**(5), 275-2892 [cit. 2021-04-29]. ISSN 19331711. Dostupné z: doi:10.1016/j.jash.2017.03.008
- [37] KRUGLUGER, Walter, Luciano FRIGERI, Trevor LUCAS, Michael SCHMER, Othmar FÖRSTER, Fu-Tong LIU a George BOLTZ-

NITULESCU. Galectin-3 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-driven rat bone marrow cell proliferation and GM-CSF-induced gene transcription. *Immunobiology* [online]. 1997, **197**(1), 97-109 [cit. 2021-04-29]. ISSN 01712985. Dostupné z: doi:10.1016/S0171-2985(97)80060-5

- [38] LEE, Y. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Experimental Cell Research* [online]. 2003, **288**(1), 21-34 [cit. 2021-04-27]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-4827(03)00211-8
- [39] FILIPOVÁ, Marcela, Pavla BOJAROVÁ, Marina RODRIGUES TAVARES et al. Glycopolymers for Efficient Inhibition of Galectin-3: In Vitro Proof of Efficacy Using Suppression of T Lymphocyte Apoptosis and Tumor Cell Migration. *Biomacromolecules* [online]. 2020, **21**(8), 3122-3133 [cit. 2021-04-28]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.0c00515
- [40] FUKUMORI, Tomoharu, Yukinori TAKENAKA, Tadashi YOSHII, Hyeong-Reh CHOI KIM, Victor HOGAN, Hidenori INOHARA, Susumu KAGAWA a Avaraham RAZ. CD29 and CD7 Mediate Galectin-3-Induced Type II T-Cell Apoptosis. *American Association for Cancer Research* [online]. 2003, **63**(23), 8302-8311 [cit. 2021-05-06]. ISSN 1538-7445. Dostupné z: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/63/23/8302>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: skupiny galektinů a jejich proteinová struktura. Prototypová skupina (prototype) s dvěma identickými doménami rozpoznávajícími sacharid (CRD), skupina tandemových repetitiv (tandem repeat) s dvěma odlišnými CRD a chimérová skupina (chimera) s jednou CRD a jednou neelektinovou doménou (N-terminální řetězec). Obrázek převzat z vědecké studie Wang et al. 2019 [7].14

Obrázek 2: schéma proteinové struktury galektinu-3. Monomer galektinu-3 s doménou rozpoznávající sacharid (carbohydrate recognition domain – CRD), na niž se váže vazebný partner galektinu-3 (galectin-3 binding partner), s doménou připomínající kolagen (collagen-like domain) a s N-terminální doménou (N-terminal domain). Monomer (A) se v kvarterní struktuře skládá do pentameru (B). Obrázek převzat z vědecké studie Fortuna-Costa et al. 2014 [8].15

Obrázek 3: struktura galektinu-3. N-terminální řetězec (N-terminal extension, modrá), skládá se ze 110-130 aminokyselin; 33,5 % řetězce je shodných se sekvencí kolagenu 1 α (II) hovězí chrupavky. Vazebná doména rozpoznávající sacharid (CRD, zelená), se skládá ze 130 aminokyselin, struktura je tvořena 2 antiparalelními β listy z 5-6 β -vláken. Na doménu je navázána laktóza (lactose, červená), která je jejím vazebným partnerem. Obrázek převzat z vědecké studie Hughes, 2001 [10].16

Obrázek 4: vazba galektinu-3 na struktury nacházející se na buněčné membráně, jako jsou receptory (E) – díky nim dochází k navázání cytokinů a růstových faktorů a k buněčné reakci na ně, integriny (D) – pomáhají vazbě s extracelulární matrix, glykosylované molekuly (B) – pomáhají řídit chování buňky a její adhezi (C). Na obrázku je také zobrazena sekrece monomerů galektinu-3 (A), které pak v extracelulárním prostoru oligomerizují. Na obrázku jsou zobrazeny nádorové buňky. Obrázek převzat z vědecké studie Fortuna-Costa et al. 2014 [8].19

Obrázek 5: imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-C) nebo normoxii (D-F). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu (A, D; zelená) a kalponinu (B, E; červená). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé barevné kanály dohromady společně s modře nabarvenými jádry (C, F). Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x20, měřítko 50 μm 36

Obrázek 6: imunofluorescenční barvení markerů hladkého svalu v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-C) nebo normoxii (D-F). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost α -aktinu (A, D; zelená) a myosinu (B, E; červená). Zobrazeny jsou rovněž jednotlivé barevné kanály dohromady společně s modře nabarvenými jádry (C, F). Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x20, měřítko 50 μm 37

Obrázek 7: imunofluorescenční barvení galektinu-3 v buněčných kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A, B) nebo normoxii (C, D). V buněčných kulturách byla vizualizována přítomnost galektinu-3 (zelená) v nepermeabilizovaných buňkách na povrchu buněčné membrány (A, C) a v permeabilizovaných buňkách v oblasti jádra buňky (B, D). Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x20, měřítko 50 μm 38

Obrázek 8: hladké svalové buňky inkubované v médiu s 10% FS s různými koncentracemi galektinu-3. U buněk byla měřena metabolická aktivita (A) a kvantifikovány počty jader v mikroskopických zorných polích pomocí programu ImageJ a přepočítány na povrch jamky (B). Průměr \pm směrodatná odchylka ze tří jamek. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. *- vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem v daném dni bez přídatku galektinu-3..... 40

Obrázek 9: fluorescenční barvení cytoskeletu hladkých svalových buněk v kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-F) nebo normoxii (G-L). V buněčných kulturách v DMEM s 10% FS byl vizualizován aktinový cytoskelet phalloidinem (červená) a jádra Hoechstem 33258 (modrá) v různých koncentracích galektinu-3. Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x10, měřítko 100 μm41

Obrázek 10: hladké svalové buňky inkubované v médiu s 0,5% FS s různými koncentracemi galektinu-3. U buněk byla měřena metabolická aktivita (A) a kvantifikovány počty jader v mikroskopických zorných polích pomocí programu ImageJ a přepočítány na povrch jamky (B). Průměr \pm směrodatná odchylka ze tří jamek. One-Way ANOVA, Holm-Šidákův test, $p \leq 0,05$. * - vzorek se statisticky významně liší ve srovnání s kontrolním vzorkem v daném dni bez přídatku galektinu-3..... 43

Obrázek 11: fluorescenční barvení cytoskeletu hladkých svalových buněk v kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-F) nebo normoxii (G-L). V buněčných kulturách v DMEM s 0,5% FS byl vizualizován aktinový cytoskelet phalloidinem (červená) a jádra Hoechstem 33258 (modrá) v různých koncentracích galektinu-3. Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x10, měřítko 100 μm 44

Obrázek 12: fluorescenční barvení apoptózy hladkých svalových buněk v kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii. V buněčných kulturách byla vizualizována raná apoptóza (zelená buněčná membrána), pozdní apoptóza (červená jádra a zelená buněčná membrána) a nekróza (červená jádra). Živé buňky jsou zobrazeny modrým barvením jader. Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x10, měřítko 100 μm 47

Obrázek 13: procentuální zastoupení mrtvých buněk v závislosti na koncentraci Gal-3 v médiu a přídatku laktózy. Procentuální zastoupení mrtvých buněk ve vzorku bylo vypočítáno jako poměr mrtvých buněk (červená

fluorescence jader) k celkovému počtu buněk v zorných polích (modrá fluorescence jader)..... 48

Obrázek 14: kvantifikace apoptózy hladkých svalových buněk v kulturách izolovaných z plicních arterií potkanů vystavených hypoxii (A-F) nebo normoxii (G-L) průtokovou cytometrií. Ctrl Pi+A – kontrolní vzorek bez inkubace s galektinem-3 (A, D, G, J), Gal3 Pi+A: buňky inkubované s galektinem-3 (B, E, H, K), Gal3+L Pi+A: buňky inkubované s galektinem-3 s inhibítorem laktózou (C, F, I, L). Q-1: nekrotické buňky (pouze červená jádra), Q-2 buňky v pozdní apoptóze (červená jádra a zelená buněčná membrána), Q-3 živé buňky (neobarvené), Q-4 buňky v rané apoptóze (pouze zelená buněčná membrána). Mikroskop IX71 Olympus, digitální kamera DP71, zvětšení objektivu x10, měřítko 100 μm 50

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: příprava směsí pro barvení resazurinem.....	30
---	----