

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VIED



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vplyv doxorubicínu na vybrané myšacie mikroRNA

LUCIA DUGASOVÁ

Vedúci diplomovej práce: doc. Ing. PETRA MATOUŠKOVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala vedúcej diplomovej práce pani doc. Ing. Petre Matouškovej, Ph.D. za odborné vedenie, rady, trpezlivosť, čas a pripomienky pri vypracovaní mojej diplomovej práce.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetky literárne diela a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúri a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, 2019

Bc. Lucia Dugasová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických vied

Kandidát: Bc. Lucia Dugasová

Vedúci: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vplyv doxorubicínu na vybrané myšacie mikroRNA

Doxorubicín (DOX) patrí medzi antracyklínové antibiotiká, používajú ho pacienti trpiaci nádorovými ochoreniami. Jeho nežiadúcim účinkom je vznik kardiotoxicity. Prognóza kardiotoxicity závisí na jej včasnom odhalení, a preto mnohé štúdie skúmajú vlastnosti mikroRNA, ktoré by v budúcnosti mohli byť vhodné biomarkery poškodenia srdca. MikroRNA sú zapojené takmer vo všetkých procesoch v ľudskom tele, pri vývoji, diferenciacii, proliferácii a apoptóze. Nachádzajú sa aj v extracelulárnom priestore, sú stabilné a majú mnoho ďalších pozitívnych vlastností.

Moja diplomová práca je zameraná na sledovanie zmien hladín expresie mikroRNA, ktoré môžu vzniknúť pri poškodení srdca doxorubicínom. Ako vzorky boli použité srdcové tkanivá a plazma myší, ktoré boli ovplyvňované doxorubicínom a porovnávané s kontrolnými vzorkami. Vzorky boli spracované a vyhodnotené metódou kvantitatívnu real – time PCR (qPCR). Štatisticky významné zvýšenie expresie vo vzorkách srdcového tkaniva myší nastalo len u miR-34a a zníženie expresie u miR-205. Vzorky plazmy myší poukázali na štatisticky významné zvýšenie expresie u miR-205, miR-34a, miR-133 a miR-1. Aby mohli byť mikroRNA ako biomarkery použité je potrebné ich podrobiť mnohým ďalším štúdiám.

Okrem nových potencionálnych biomarkerov boli pozorované aj koncentrácie tradičných markerov kardiotoxicity, troponínov. Tieto proteíny boli spracované zo vzoriek srdcového tkaniva a plazmy myší. Hladiny koncentracii troponínov T a I zo srdca myší boli zvýšené, rovnako ako aj hladiny troponínu T z plazmy myší ovplyvnených DOX.

Kľúčové slová: doxorubicín, mikroRNA, troponíny, qPCR, imunobloting

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Lucia Dugasová

Supervisor: doc. Ing. Petra Matošková Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of doxorubicin on selected mice microRNAs

Doxorubicin (DOX) belongs to the anthracycline antibiotics used by patients suffering from cancer. Its undesirable effect is cardiotoxicity. Prognostic of cardiotoxicity depends on its early detection, and therefore many studies examine the properties of microRNAs that could be appropriate biomarkers for heart failure in the future. MicroRNAs are involved in almost all processes in the human body, in development, differentiation, proliferation and apoptosis. They are also located in the extracellular space, they are stable and have many other positive properties.

My diploma thesis is focused on monitoring changes in microRNA levels that can occur in heart damage by doxorubicin. The cardiac tissues and plasma of mice treated with doxorubicin were used as samples and compared with control samples. Samples were processed and evaluated by real-time quantitative PCR (qPCR). A statistically significant increase in expression in heart tissue occurred only in miR-34a and decrease in miR-205 level. Plasma mice samples showed a statistically significant increase in expression of miR-205, miR-34a, miR-133 and miR-1. MicroRNAs could be used as a biomarkers, but they need to undergo many further studies.

In addition to new potential biomarkers, concentrations of traditional markers of cardiotoxicity, troponins, have also been observed. These proteins were processed from cardiac and mouse plasma samples. Levels of troponin concentrations T and I were increased in hearts as well as troponin T levels in mouse plasma treated with DOX.

Key words: doxorubicin, microRNA, troponins, qPCR, immunoblotting

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1 Antracyklinové cytostatiká	10
2.1.1 Kardiotoxicita spôsobená antracyklínovými cytostatikami	10
2.1.2 Doxorubicín.....	13
2.2 MikroRNA (miRNA)	17
2.2.1 Názvoslovie mikroRNA.....	17
2.2.2 Definícia a funkcia mikroRNA	19
2.2.3 Biosyntéza mikroRNA a jej regulácia	20
2.2.4 Cirkulujúce mikroRNA.....	20
2.2.5 MikroRNA ako biomarkery	22
2.2.6 Tradičné biomarkery kardiotoxicity	23
2.2.7 Kardišpecifické mikroRNA	25
2.2.7.1 MikroRNA a akútny infarkt myokardu	26
2.2.7.2 MikroRNA a srdcové zlyhanie.....	27
2.2.7.3 MikroRNA a ischemická choroba srdca	28
2.2.7.4 MikroRNA a arytmia, fibróza, hypertrofia, srdcové zlyhanie	28
2.2.7.5 MikroRNA a transplantácia srdca	29
3. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE	30
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	31
4.1 Použité materiály a prístroje	31
4.1.1 Biologický materiál	31
4.1.2 Chemikálie a roztoky.....	31
4.1.3 Prístroje.....	33

4.1.4	Pomôcky	34
4.2	Metodika.....	35
4.2.1	Expresia mikroRNA v srdciach myší	35
4.2.1.1	Izolácia RNA zo srdca myší	35
4.2.1.2	Meranie koncentrácie a čistoty RNA.....	36
4.2.1.3	Ošetrovanie DNazou	37
4.2.1.4	Reverzná transkripcia	38
4.2.1.5	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (qPCR, real – time PCR).....	40
4.2.2	Expresia mikroRNA v plazme myší.....	44
4.2.2.1	Izolácia RNA z plazmy myší.	44
4.2.2.2	Meranie koncentrácie a čistoty RNA.....	45
4.2.2.3	Ošetrovanie DNazou	45
4.2.3	Detekcia proteínov.....	47
4.2.3.1	Stanovenie koncentrácie bielkoviny	47
4.2.3.2	Príprava vzoriek a roztokov na elektroforézu	49
4.2.3.3	Priebeh elektroforézy.....	54
4.2.3.4	Imunobloting	56
4.2.3.5	Detekcia proteínov.....	57
4.2.4	Vyhodnotenie dát	59
5.	VÝSLEDKY	60
5.1	Pozorovanie expresie mikroRNA	60
5.1.1	Pozorovanie expresie mikroRNA v srdciach myší pomocou qPCR	60
5.1.2	Pozorovanie expresie mikroRNA v plazme myší pomocou qPCR.....	61
5.1.3	Pozorovanie expresie mikroRNA v plazme myší pomocou microarray	62
5.2	Pozorovanie hladín troponínu T a troponínu I.....	63

5.2.1	Pozorovanie zmien troponínu T v plazme myší.....	63
5.2.2	Pozorovanie zmien troponínu T a troponínu I v srdciach myší	64
6.	DISKUSIA	67
7.	ZÁVER.....	70
8.	POUŽITÉ SKRATKY	71
9.	ZOZNAM TABULIEK	75
10.	ZOZNAM OBRÁZKOV	76
11.	POUŽITÁ LITERATÚRA	77

1. ÚVOD

Prvá mikroRNA bola objavená v háďatku obecnom, od tohto objavu ubehlo viac ako dvadsať rokov. Dnes je známe, že mikroRNA sa vyskytuje u veľkej časti eukaryotov, ako aj u ľudí. Pravdepodobne až 1 – 5 % ľudského génomu tvorí práve mikroRNA. Jej funkcia spočíva v regulácii zhruba 30 % génov kodujúcich proteíny. Medzi ďalšie dôležité funkcie mikroRNA patrí regulácia génovej expresie, ktorá má za úlohu riadiť rôzne metabolické a bunkové dráhy (MacFarlane a kol. 2010).

MikroRNA (miRNA) sú malé nekódujúce RNA, patria medzi postranskripčné regulátory. Viazú sa na molekuly mRNA, čím zabraňujú ich prekladu do bielkovín. Zrelá mikroRNA sa vytvára prostredníctvom dvojstupňového štiepenia primárnej miRNA, následne prebieha jej začlenenie do efektorového RNA – indukovaného tlmiaceho komplexu. MiRNA sparuje bázy s cieľovou mRNA na negatívnu reguláciu jej expresie. Podľa komplementarity medzi cieľom mRNA a pravdepodobným cieľom sa rozhodne, ktorý spôsob umlčania bude využitý, štiepenie cieľovej mediátorovej RNA s postupnou inhibíciou translácie, či degradácie (MacFarlane a kol. 2010).

Zúčastňujú sa mnohých procesov v ľudskom tele, od regulácie vývoja, diferenciáciu, proliferáciu až po apoptózu a aj patologických procesov (Melo a kol. 2014). MiRNA môžu v dôsledku poškodenia buniek, či ich smrti cirkulovať v krvi, vyskytujú sa teda v extracelulárnom priestore (Valadi a kol. 2017).

MikroRNA sú základom mnohých štúdií, ktoré sledujú ich expresie v rôznych ochoreniach. Z rôznych experimentov vyplýva, že miRNA sú zapojené vo vzniku kardiovaskulárnych ochorení, či rakoviny a mnohých ďalších ochorení. Sledovanie hladín expresie určitých mikroRNA môže poskytnúť informácie o diagnóze, progresii, či výsledkoch ochorení.

Táto diplomová práca bola zameraná na pozorovanie hladín vybraných mikroRNA, ktoré sa sledovali vo vzorkách myši. Myšiam bol dávkovaný doxorubicín, ktorý patrí medzi antracyklínové antibiotiká. Tieto antibiotiká sa podávajú pacientom trpiacim nádorovými ochoreniami. Negatívny účinok antracyklínov spočíva vo vzniku kardiotoxicity, čo sa preukáže na zmenených hladinách mikroRNA. V budúcnosti by mohli byť v klinickej praxi využité ako spoľahlivé biomarkery v diagnostike, ako aj v terapii rôznych ochorení.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Antracyklinové cytostatiká

Antracyklíny patria medzi cytostatické antibiotiká, ktoré sa využívajú pri protinádorovej chemoterapii. Medzi prvé antracyklíny patrí daunorubicín (DNR) a doxorubicín (DOX), ktoré boli izolované z baktérie *Streptomyces peucetius*. DNR a DOX sú podobné, malý rozdiel je v ich štruktúre, ktorý je dôležitý pre ich použitie. Ďalšie antracyklíny, ako napríklad epirubicín (EPI), či idarubicín (IDA), vznikali chemickými modifikáciami DNR a DOX. Antracyklíny sa v ľudskom tele rýchlo distribujú a pomaly eliminujú, eliminácia prebieha prostredníctvom žlče (Visani a kol. 2012).

Likvidácia nádorových buniek, prostredníctvom antracyklínov, prebieha pomocou inhibície topoizomerázy II. Mechanizmus ich pôsobenia spočíva v stabilizácii reakčného medziproduktu, v ktorom sú časti deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) kovalentne pripojené na topoizomerázu II, kvôli čomu je zabránené opätovnému uzatvoreniu DNA. Antracyklínová interkalácia v tejto reakcii zohráva dôležitú úlohu. Tie, u ktorých neprebehla interkalácia pravdepodobne upevňujú komplex medzi topoizomerázou II a DNA (Visani a kol. 2012). Zastavenie rastového cyklu bunky v G1 a G2 fázy a následnú apoptózu spôsobuje komplex DNA s topoizomerázou II a antracyklínmi (Offermanns a kol. 2008).

Medzi ďalšie mechanizmy pôsobenia antracyklínov, ktorých účinok nie je spojený s topoizomerázou II patrí aktivácia neutrálnych sfingomyelináz, spojená s tvorbou ceramidu a aktivácia efektorov bunkovej smrti, mitochondriálna dysfunkcia nasledovaná uvoľnením cytochrómu C a tvorbou apoptozómov alebo indukcia lipidovej peroxidácie a tvorba aduktov malondialdehyd - DNA, čo spôsobí zníženie aktivity cyklínu E, a tak zastavenie rastu buniek. Tieto mechanizmy sú sprostredkované rôznymi druhmi reaktívneho kyslíka, ktoré sú vedľajšími produktmi metabolizmu antracyklínov (Visani a kol. 2012).

2.1.1 Kardiotoxicita spôsobená antracyklínovými cytostatikami

Antracyklínové cytostatiká rovnako ako iné liečivá majú rôzne nežiadúce účinky. Patrí medzi nich napríklad neutropénia, zvracanie, či nauzea, ktoré sa dali ľahko eliminovať použitím hematopoetických rastových faktorov, ako aj antiemetickej liečby. Avšak

závažným nežiadúcim účinkom ich pôsobenia je toxické poškodzovanie tkaniva myokardu. Antracyklíny spôsobujú poškodenia, ktoré sú charakterizované poklesom počtu myofibríl, zvýšením počtu lyzozómov, dilatáciou sarkoplazmatického retikula a ďalšími. U DOX je výskyt kardiomyopatie a zlyhania srdca v priemere pod 5 %. U pacientov s arytmiou, hypertenziou, chlopňovou alebo koronárnou chorobou, či metabolickou poruchou sa vyskytuje poškodenie srdca aj pri bezpečných dávkach antracyklínov. Deti a starší ľudia sú citlivejší na poruchy srdca viac ako mladí ľudia (Visani a kol. 2012).

Pri používaní antracyklínov môžu vznikať rôzne typy kardiotoxicity. Jednou z nich je napríklad akútna kardiotoxicita, ktorá vzniká zvyčajne po dvoch až troch dňoch užívania antracyklínov. Vyskytuje sa zhruba u 11 % pacientov. Medzi najčastejšie príznaky akútnej kardiotoxicity patrí bolesť na hrudi, ktorá môže byť spôsobená vznikom myoperikarditídy alebo tachykardie, či ďalších porúch srdca. Spôsoby vzniku akútnej kardiotoxicity sú nejasné, no pravdepodobne ide o reverzibilný edém myokardu zapríčinený užívaním antracyklínu (Chatterjee a kol. 2010).

Chronická kardiotoxicita sa vyskytuje menej často ako akútna, ide približne o 1,7 % pacientov. Niekedy sa prejavuje do 30 dní od posledného užitia antracyklínu, ale môže vznikať aj po 6, či až po 10 rokoch, vtedy ide o oneskorenú formu kardiotoxicity. Výskyt je závislý od dávky antracyklínu, to znamená, že čím vyššia je dávka, tým vyššie je riziko vzniku kardiotoxicity (Chatterjee a kol. 2010).

Toxicita antracyklínu závisí na bioaktivácii. Kardiomyocyty podliehajú oxidačnému stresu, ktorý vyvoláva degradáciu sarkoméru, narušenie génovej expresie, poškodenie DNA, nekrotickú alebo apoptotickú smrť, čo sa preukázalo aj u myší (Visani a kol. 2012).

Vysoké riziko kardiotoxicity antracyklínov súvisí s ich premenou na metabolity sekundárneho alkoholu. Tieto metabolity sú polárnejšie, a preto sa viac akumulujú v kardiomyocytoch. Sekundárne metabolity alkoholu môžu vyvolávať kardiotoxicitu nie len po chemoterapii, ale aj počas nej. EPI vytvára menšie množstvo alkoholových metabolitov v porovnaní s DOX. DOX tvorí menšie množstvo alkoholových metabolitov ako DNR a IDA, pričom ich kardiotoxicita je považovaná za menej alebo

rovnako závažnu ako u DOX. Tieto rozdiely môžu byť spôsobené v odlišnom postupe podávania DNR alebo IDA u myeloproliferatívnych ochorení (Visani a kol. 2012).

Zabrániť vzniku antracyklínovej kardiotoxicity je možné tým, že namiesto podávania bolusu, teda jednorázovej dávky lieku podanej behom krátkej doby do žily, sa využije pomalé podávanie infúzií, čo spôsobí zníženie hodnoty antracyklínu v plazme, čím sa zmiernuje kardiotoxicita. Trvanie podávania bolusu zaberie približne 5 až 15 minút a podávanie pomalých infúzií trvá od 24 do 48 hodín. Táto náhrada je účinná hlavne u dospelých ľudí (Visani a kol. 2012).

Chelátor železa je jediná zlúčenina, ktorá je považovaná za kardioprotektívnu, jeho použitím by sa zmiernili voľné radikálové reakcie, ktoré spôsobujú kardiotoxicitu (Visani a kol. 2012).

Ďalším spôsobom ako predísť vzniku kardiotoxicity by mohlo byť podávanie liekov na klinickú kardiotoxicitu, na ochranu srdca, ešte pred subklinickou kardiotoxicitou. Avšak tento spôsob bol preskúmaný len v niekoľkých štúdiách pomocou podávania betablokátorov, blokátorov receptora angiotenzínu II, alebo inhibítorov enzýmu konvertujúceho angiotenzín I. Podávanie inhibítorov enzýmu konvertujúceho angiotenzín I, u pacientov podstupujúcich chemoterapiu, spôsobilo zníženie hladín ľavej ventrikulárnej ejekčnej frakcie (Visani a kol. 2012).

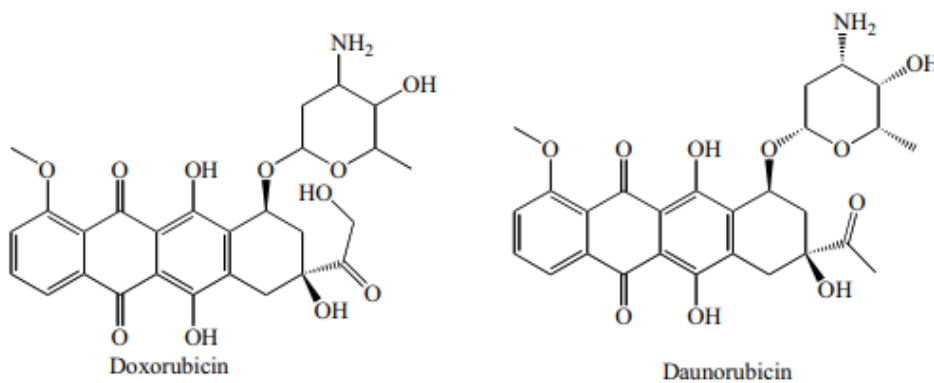
Profylaktické podávanie kardiovaskulárnych liekov sa nevyužíva často, kvôli množstvu rôznych vedľajších účinkov ako napríklad hypotenzia, bradykardia, kašeľ a mnohých ďalších. Na prevenciu kardiotoxicity mala pozitívny účinok látka dexrazoxan. Jeho medziprodukt podlieha hydrolyze za vzniku dialkyldiamidu, ktorý sa svojou štruktúrou podobá etyléndiamíntetraoctovej kyseline (EDTA) a chelátom železa, tie sa viažu ku komplexom antracyklínov. Podávaním pomalou infúziou dexrazoxanu pred podávaním doxorubicínu poklesol výskyt kardiotoxicity. Dexrazoxan neinterferuje s distribúciou, metabolizmom, či elimináciou DOX. V štúdiu, kde ženy s karcinómom prsníka prijímali dexrazoxan pred podaním DOX, bol pozorovaný pokles kardiotoxicity a mohli sa im podať vyššie dávky DOX (Visani a kol. 2012).

Používanie dexrazoxanu má aj svoje nevýhody ako sú napríklad hematologická toxicita, či u detí vznik sekundárnych malignít ako leukémia, alebo myelodysplastický syndróm (Visani a kol. 2012). Iné štúdie poukazujú na možnosť interferencie DOX s dexrazoxanom (Swain a kol. 1997).

Ďalšiu možnosť ochrany proti vzniku kardiotoxicity predstavuje používanie lipozomálnych formulí DOX, tie cirkulujú v tele dlhšie ako normálny DOX, a tak uvoľňujú málo, alebo žiadny antracyklín v krvi. Lipozómy sú dostatočne malé na to, aby sa rozptýlili v endotele nádorov, ale príliš veľké na to, aby sa rozptýlili v tkanivách srdca. Tým predstavujú tieto formule množstvo DOX pôsobiaceho v nádoroch, ale nie v srdci. Odporúča sa používanie hlavne u dospelých ľudí (Visani a kol. 2012).

2.1.2 Doxorubicín

Ako už bolo spomínané medzi prvé izolované antracyklíny patrí doxorubicín a daunorubicín. Obe tieto antracyklíny sú rovnaké, líšia sa iba v tom, že DOX má bočný reťazec zakončený primárnym alkoholom a DNR končí metylovou skupinou (Carvalho a kol. 2009). (vid'. Obrázok 1)



Obrázok 1 Štruktúra DOX a DNR (Carvalho a kol. 2009)

DOX patrí medzi najsilnejšie antineoplastické lieky. Využíva sa na liečbu solídnych, hematologických nádorov, ale aj na liečbu rakoviny prsníkov, žlčových kanálov, prostaty, maternice, vaječníkov, pažeráka, žalúdka, či pečene a tiež na liečbu detských pevných tumorov, Kaposiho sarkómu, ale aj na liečbu akútnej myeloblastickej leukémie, či lymfoblastickej leukémie a ďalších (Carvalho a kol. 2009).

Účinok DOX sa podľa mnohých štúdií pripisuje jeho schopnosti interkalovať sa do helixu DNA alebo sa kovalentne viazať na proteíny spojené s replikáciou a

transkripciou DNA (Box, 2007). Syntézy deoxyribonukleovej kyseliny, ribonukleovej kyseliny (RNA) a proteínov sú týmito interakciami inhibované, čo môže spôsobiť bunkovú smrť (Carvalho a kol. 2009).

Podľa pokusu vedcov, ktorý použili fluorescenčné farbivo DNA PicoGreen sa ukázalo, že antracyklíny sa interkalujú do jadrovej DNA, ale rovnako aj do mitochondriálnej DNA (Ashley a kol. 2009).

Ďalšie štúdie potvrdzujú to, že DOX inhibuje topoizomerázu II (Swift a kol. 2006).

Proteazóm spôsobuje moduláciu antracyklínov. Zistilo sa, že rakovinou tvorené bunky umožňujú DOX vstup do nich prostredníctvom jednoduchšej difúzie. V cytoplazme sa DOX viaže na proteazóm s vysokou afinitou. Neskôr dochádza k jeho väzbe na proteázovú podjednotku 20S, vďaka čomu vzniká DOX proteázomový komplex. Tento komplex sa pomocou jadrových pórov v adenosíntrifosfátovo (ATP) závislom procese presúva do jadra. V jadre dochádza k oddeleniu DOX od proteázomu a k jeho pripojeniu na DNA, pretože k DNA má DOX vyššiu afinitu ako ku proteázómu (Carvalho a kol. 2009).

V rôznych nádorových bunkách sa môžu prejavovať rozličné metabolické aktivity liekov. Vnútorne faktory ako nedostatok kyslíka, zmeny intracelulárneho pH, či malígna transformácia môžu zmeniť expresiu intracelulárneho nikotínamidadenín dinukleotid fosfátového (NADPH) cytochrómu P450 reduktázy. V štruktúre DOX môže dochádzať k jednoelektrónovej redukcii, ktorá vzniká mnohými bunkovými oxidoreduktázami, medzi ktoré patrí aj nikotínamidadenín dinukleotid (NADH) dehydrogenáza, NADPH cytochrom P450 reduktáza, syntáza oxidu dusnatého, či xantín oxidáza (Carvalho a kol. 2009).

Dochádza k jednoelektronovému prenosu z redukovaných nukleotidov. Tento prenos zmení molekulu antracyklínu na polochinónovú radikálovú formu. Tvorba superoxidu a peroxidu vodíka je spojená s neenzymatickou reoxidáciou semichinónových radikálov molekulárnym kyslíkom. Môže dochádzať k interakcii superoxidu a peroxidu vodíka s rôznymi makromolekulami. Používanie DOX sprevádzajú vážne problémy, ako je napríklad rezistencia v nádorových bunkách, či toxicita v zdravých tkanivách (Carvalho a kol. 2009).

Medzi nežiadúce účinky používania DOX patrí nevoľnosť a zvracanie, teda gastrointestinálne poruchy, alopecia, neurologické poruchy ako napríklad halucinácie, závraty, či kardiotoxicita. Pri používaní DOX môže dochádzať k úbytku kostnej drene, čo znamená, že významným vedľajším účinkom jeho používania je myelosupresia spojená s leukopéniou, hlavne granulocytopéniou, trombocytopéniou aj anémiou (Carvalho a kol. 2009).

Vyskytujú sa tiež horúčky, zimnice, precitlivosť, hyperpigmentácia nechtov a rovnako aj slzenie očí, či konjunktivita. Celulitída, ťažká lokálna nekróza tkaniva, tromboflebitída, lymfangitída, ktoré môžu spôsobiť obmedzenie pohyblivosti susedných kĺbov, vznikajú v dôsledku extravazácie DOX. Pri podávaní DOX do malej žily alebo viackrát do jednej a tej istej žily môže vznikáť fleboskleróza (Carvalho a kol. 2009).

DOX poškodzuje mitochondriá, tým, že disponuje vysokou afinitou ku kardiolipínu. Kardiolipín je vnútorný mitochondriálne membránovo špecifický fosfolipid. DOX a kardiolipín znemožňujú naviazanie kreatínkinázy na vnútornú mitochondriálnu membránu, čím dochádza k poklesu aktivity mitochondriálnych enzýmov, teda enzýmov pre ktorých je kardiolipín nevyhnutný. Pri reakcii DOX s mitochondriami dochádza k vzniku semichinónových radikálových medziproduktov, ide o toxické formy DOX (Carvalho a kol. 2009).

Kardiotoxicita spôsobená DOX sa delí na akútnu a chronickú. Lefrak a ďalší vo svojej štúdiu uvádzajú, že akútna kardiotoxicita sa vyskytuje približne u 11 % pacientov, krátko po začatí liečby a môže byť reverzibilná. Ide hlavne o arytmiu, hypotenziu alebo o zmeny v elektrokardiograme (Lefrak a kol. 1973, Herman a kol. 1971, Van Acker a kol. 1996). Von Hoff a ďalší zistili, že chronická kardiotoxicita sa môže vyskytnúť iba u 1,7 % pacientov užívajúcich DOX a 50 % predstavuje index úmrtnosti. Chronická kardiotoxicita závisí na dávke DOX, môže dochádzať ku kongestívnemu zlyhaniu srdca (Lefrak a kol. 1973, Von Hoff a kol. 1979). Štúdia, v ktorej bolo 630 pacientov s rakovinou prsníka a malobunkovým karcinómom pľúc zistila, že pri dávke 500 mg/m² DOX sa u 26 % pacientov vyskytuje kongestívne zlyhanie srdca (Swain a kol. 2003).

V pokuse, v ktorom sa po dobu 7 dní myšiam podával DOX, sa zistila u myši srdcová hypertrofia (Sun a kol. 2001). Zordosky a El – Kadi poukázali na indukciu génov predsieňového natriuretického peptidu (ANP) ako aj mozgového natriuretického peptidu (BNP), dvoch markerov srdcovej hypertrofie, génov cytochrómu P, či rodinu

monooxygenáz, ktoré sprostredkujú oxidatívny metabolizmus xenobiotík ako aj endogenných látok. Táto indukcia je spôsobená účinkom DOX (Zordoky a kol. 2008). So srdcovou hypertrofiou a so srdcovým zlyhaním je spojený metabolizmus kyseliny arachidonovej, ktorý indukciou spomínaných génov je čiastočne modifikovaný (Carvalho a kol. 2009). Pomocou pokusu na potkanoch, ktorým sa podával DOX sa zistili zmeny v ich kardiomyocytoch, ide napríklad o degeneráciu myokardu, perinukleárnu vakuolizáciu, či intersticiálny edém (Yilmaz a kol. 2006).

V ďalšom pokuse sa v dôsledku podávania DOX potkanom zistili zmeny v mitochondriách, ako sú ukládanie myelínu, membránová a organelová degenerácia (Daosukho a kol. 2007).

Zmeny v kardiomyocytoch závisia od prijímaných koncentrácií DOX, ako sa ukázalo aj v štúdií. Za zmeny v sarkomernom srdcovom myozíne, za mitochondriálnu depolarizáciu, tiež za depolarizáciu, fragmentáciu, blednutie plazmatickej membrány, ktorá vedie až k zmene tvaru buniek sú zodpovedné nízke koncentrácie DOX. A vysoké koncentrácie prijímaného DOX spôsobujú väčšie zmeny buniek, ako sú zmeny jadra, či jadrovej membrány, opuch mitochondrií spojený s vakuolizáciou (Sardao a kol. 2008).

Zo všetkých orgánov srdca je najcitlivejšie na užívanie DOX. Je to spôsobené niekoľkými príčinami, ide napríklad už o spomínaný kardiolipín. Alebo o srdcovú izoformu enzýmu NADH dehydrogenázy, ktorá podporuje tvorbu reaktívnych foriem kyslíka. Antioxidačná obrana srdca je v porovnaní s inými tkanivami nízka. Kardiocyty sú post – mitotické bunky, a tak ak je srdce poškodené užívaním DOX, k jeho obnove dochádza len veľmi ťažko (Carvalho a kol. 2009).

2.2 MikroRNA (miRNA)

Štruktúra DNA slúži na zápis ľudského genómu, ktorého základom sú stavebné a funkčné jednotky, gény. Tie, podliehajú prepisu do formy RNA a v proteosyntéze zohrávajú dôležitú úlohu, pretože slúžia ako matrice pre tvorbu proteínov. Ale iba malá časť génov, 1 – 3 % podlieha tomuto prepisu, nazývajú sa ako protein – kódujúce gény. Pri štúdiu všetkých prepisovaných RNA v bunke, teda transkriptomu, sa zistilo, že až 3/4 genómu podliehajú prepisu (Djebali a kol. 2012).

Mnoho týchto RNA nie je základom pre tvorbu bielkovín, ale má dôležitú regulačnú funkciu, označujeme ich ako nekódujúce RNA. Delíme ich na dlhé a malé nekódujúce RNA. Medzi malé RNA patrí nukleárna RNA, nukleolárna RNA, RNA interagujúce s PIWI proteínmi a mikroRNA (Catalanotto a kol. 2016). (vid'. Tabuľka 1)

Po dlhú dobu nebola známa funkcia malých nekódujúcich úsekov RNA až postupom času došlo k poznaniu, že ich funkcia môže spočívať v diagnostike, či terapii rôznych ochorení a to hlavne kardiologických (Novák, 2016).

2.2.1 Názvoslovie mikroRNA

Ich nomenklatúra je založená na použití skratky miR, v prípade, že ide o zrelú mikroRNA. Ak používame prekursor, prípadne gény, pre dané miRNA je *miR* písaná kurzivou. Číslica, ktorá nasleduje za skratkou miR, slúži na označenie poradia objavenia danej miRNA, čo znamená, že miR-499 bola objavená neskôr ako miR1. Výnimku, v ktorej táto nomenklatúra neplatí tvorí skupina let a lin, ktoré boli pomenované skôr ako vznikla dnes používaná nomenklatúra. MikroRNA sú skoro podobné, ale líšia sa len v určitých častiach a hlavne svojou tkanivovou expresiou a funkciou, a tak sa označujú sa ako miR-133a a miR-133b, teda použitím malého písmena za číslom. Zistilo sa, že väčší počet génov pre určitú miRNA, kóduje rovnakú sekvenciu nukleotidov, čo znamená, že v genóme, jedna miRNA môže byť zakódovaná na viacerých miestach. Rozlišujeme ich použitím pomlčky a čísla, za číselným údajom, teda miR-1-1. Trojpísmenný prefix označuje živočíšny druh, napríklad *hsa* – miR-1, *homo sapiens* sa označuje skratkou *hsa* (Novák, 2016).

Tabuľka 1 Prehľad malých nekódujúcich mikroRNA (Novák, 2016).

Malé nekodujúce RNA	
Nukleárne (jadrové) RNA (snRNA)	<ul style="list-style-type: none"> - základ tvorby mediátorovej RNA - dĺžka približne 150 nukleotidov
Nukleolárne (jadierkové) RNA (snoRNA)	<ul style="list-style-type: none"> - súčasť vzniku ribozomálnej RNA (tá slúži na tvorbu ribozómov a proteosyntézu) - dĺžka 70 – 120 nukleotidov
RNA interagujúce s PIWI proteínmi (piRNA)	<ul style="list-style-type: none"> - spoločne slúžia na reguláciu aktivity transpozómov - dĺžka 24 až 32 nukleotidov
MikroRNA (miRNA)	<ul style="list-style-type: none"> - viažu sa na molekuly mRNA, a tak zabraňujú ich prekladu do bielkovín - dĺžka 21 až 24 nukleotidov
Malé interferujúce RNA (siRNA)	<ul style="list-style-type: none"> - uplatňujú sa v interferencii, teda ovplyvňujú expresiu génu - dĺžka 20 až 25 nukleotidov

2.2.2 Definícia a funkcia mikroRNA

MikroRNA sa zúčastňujú expresie génov rastlín, zvierat, jednobunkových eukaryot a ďalších, kde plnia úlohu posttranskripčných regulátorov génovej expresie (Melo a kol. 2014). Ambros a ďalší pri skúmaní genetických porúch v larválnom vývoji identifikovali v roku 1993 prvý gén mikroRNA *lin-4*, ktorý bol objavený v háďatku obecnom (*Caenorhabditis elegans*) (Lee a kol. 1993). Postupne bolo identifikovaných viac génov miRNA, napríklad v červoch, v octomilkách, ale aj u ľudí (Lagos – Quintana a kol. 2001). Výskumy poukazujú na to, že existuje až 30 000 rôznych druhov miRNA, avšak u ľudí sa nachádza približne len 2000 (Kozomara a kol. 2014). Ďalšie výskumy zistili, že štruktúra jednotlivých mikroRNA sa líši len veľmi málo medzi jednotlivými živočíšnymi druhmi. U živočíšnych druhov, ako aj u človeka, môže byť rovnaký spôsob riadenia vývoja pomocou mikroRNA ako u háďatka obecného (Pasquinelli a kol. 2000).

Podľa genómovej polohy sa mikroRNA delia na medzigénové (intergénové), intronové a exonové. Z celkového počtu mikroRNA génov sa približne 1/3 nachádza v intronoch génov kodujúcich proteíny. MikroRNA u ľudí môžeme nájsť vo všetkých chromozómoch, až na chromozóm Y (Melo a kol. 2014).

MikroRNA plnia dôležitú úlohu v regulácii vývoja, diferenciácie, proliferácie, či apoptózy. MikroRNA je nevyhnutná v ďalších rôznych procesoch, ide napríklad o stanovenie, či smrť buniek. Rôzne biologické procesy, ako imunitná odozva, sekrécia inzulínu, syntéza neurotransmiterov, ale aj vírová replikácia a ďalšie sú procesy, na ktorých sa podieľa mikroRNA (Melo a kol. 2014).

Napríklad mikroRNA *let-7* je dôležitá pre normálny vývoj buniek a má regulovanú expresiu, chýbanie tejto expresie sa spája s rôznymi druhmi rakoviny u ľudí, *miR-196* je nevyhnutná pre normálny vývoj končatín, pre mozog špecifická mikroRNA je *miR-134*, *miR-203* je spojená s kožnou diferenciáciou, *miR-155* je dôležitá pre fyziologickú imunitnú funkciu, správnu sekréciu inzulínu pomocou buniek pankreatických ostrovčekov inhibíciou myotrofinu reguluje *miR-375* (Melo a kol. 2014).

Dôležitosť mikroRNA spočíva nie len v rozvoji prežitia a v diferenciácii embryonálnych kmeňových buniek, ale sú nevyhnutné aj pri prežívaní zrelej neurónov a pre ich funkcie. Napríklad pri Alzheimerovej chorobe je pozorované zníženie hodnoty *miR-20a*. Strata *miR-133b* môže spôsobovať pokles dopaminergných neurónov dôležitých hlavne pri Parkinsonovej chorobe (Herbert a kol. 2008, Kim a kol. 2007).

Zistilo sa, že mutácie v oblasti miR-96 sú príčinou autozomálne dominantnej progresívnej straty sluchu, táto miRNA sa exprimuje vo vlasových bunkách vnútorného ucha (Mencia a kol. 2009). MikroRNA sú významné v mnohých ďalších ochoreniach, ako sú napríklad rakovina, či kardiovaskulárne ochorenia, no predmetom mnohých štúdií zostáva otázka, či pozmenená expresia mikroRNA vyjadruje dôsledok alebo príčinu patologických procesov (Melo a kol. 2014).

2.2.3 Biosyntéza mikroRNA a jej regulácia

Biosyntéza mikroRNA je špecifická tým, že prebieha vo viacerých stupňoch. Začiatok prebieha v jadre bunky, po transkripcii prechádza do cytoplazmy, kde pôsobí ako zrelá mikroRNA. MikroRNA ako aj ostatné súčasti organizmu podliehajú kontrole, vývojevej a tkanivovo špecifickej signalizácii. Pre zachovanie fyziologických funkcií buniek slúži práve kontrola úrovni mikroRNA (Melo a kol. 2014).

Rôzne ochorenia ľudí, ako napríklad rakovina majú súvis s dereguláciou expisie mikroRNA (Jiang a kol. 2009). Regulácia mikroRNA je nevyhnutným procesom v bunke, prebieha na rôznych úrovniach, od stability, spracovania, sekvenčnej identity, či viazania sa na cieľové mRNA. Biogenéza mikroRNA podlieha regulácií spätnej väzby. Tieto regulácie sú významné pre vývoj a ďalší osud buniek. MikroRNA umožňujú potlačiť mRNA, ktoré sprostredkovávajú kódovanie faktorov dôležitých v biogenéze alebo funkcie rovnakých miRNA (Melo a kol. 2014).

2.2.4 Cirkulujúce mikroRNA

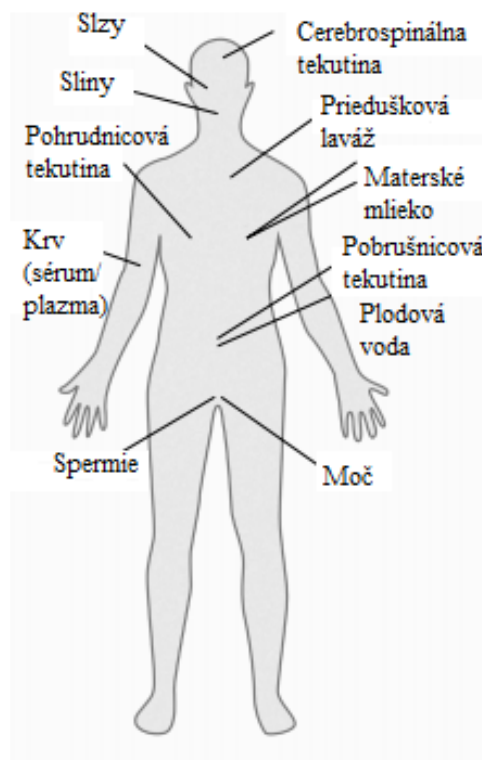
MikroRNA môžeme nájsť v rôznych telesných tekutinách, a to v krvnej plazme a sére, v moči, v slinách, v plodovej tekutine, a taktiež v pleurálnej tekutine aj ďalších (Sandhu a kol. 2014). (vid'. Obrázok 2)

Ribonukleázy môžu spôsobovať degradáciu vylučovaných mikroRNA, ale tieto mikroRNA sú pred nimi ochránené tým, že sa viažu na proteíny. Najdôležitejší proteín na ochranu mikroRNA je Argonautový proteín (Ago), tento proteín slúži na začlenenie mikroRNA vo fyziologickej biogenéze. S komplexmi Ago proteínov je spojená prevažná časť extracelulárnych mikroRNA, ostatné časti mikroRNA sa nachádzajú vo forme vezikúl alebo ako exozómy v ľudskej plazme. Rôzne extracelulárne vezikuly a exozómy cirkulujú v krvnom obeh. Štiepením bunkovej membrány vznikajú

extracelulárne vezikuly a fúzia multivezikulárnych teliesok do plazmatickej membrány spôsobí uvoľňovanie exozómov (Young – Kook, 2015).

Mnoho štúdií skúma rôzne úrovne mikroRNA a poukazujú aj na to, či daná osoba chorobu má alebo nie. Podľa štúdií bolo zistené, že ak sa do krvného obehu myši vloží miRNA vo forme vezikuly dochádza k rozdeleniu miRNA do rôznych tkanív a tieto miRNA dokážu potlačiť cieľové mRNA v bunkách (Bala a kol. 2015). V živých myšiach sa pomocou pokusov zistila priama výmena RNA medzi bunkami vďaka exozómom (Zomer a kol. 2015).

Poškodenie alebo smrť buniek spôsobuje pasívne uvoľňovanie miRNA v cytoplazme, a tak sú extracelulárne miRNA zistené v krvi. Do uvoľňovania mikroRNA sa môže zapájať regulačná dráha, viaceré štúdie zistili, že hodnoty miRNA vo vnútri buniek majú iné hodnoty ako v kultivačných médiách, vďaka čomu dospeli k záveru, že uvoľňovania miRNA sa môže účastniť aj selektívna dráha (Valadi a kol. 2017).



Obrázok 2 Výskyt mikroRNA v ľudskom tele (Young – Kook, 2015)

2.2.5 MikroRNA ako biomarkery

Požiadaviek na ideálne vlastnosti biomarkerov je niekoľko, mali by byť špecifické, citlivé, prediktívne, robustné, prekladateľné a neinvazívne (Sandhu a kol. 2014). Používanie mikroRNA ako biomarkeru má niekoľko výhod, môžu byť namerané rýchlo a presne, rôzne mikroRNA sa exprimujú rôzne v odlišných tkanivách a pri rôznych stavoch bunky. Takže mikroRNA by mohli spĺňať podmienky na ideálne vlastnosti biomarkerov a sú aj výhodnejšie oproti tradične používaným biomarkerom na báze bielkovín (Young – Kook, 2015). (viď. Tabuľka 2)

Sérum pacientov s difúznym veľkobunkovým lymfómom B, bolo prvé sérum, v ktorom sa vyšetřovali cirkulujúce mikroRNA ako biomarkery. Neskôr sa mikroRNA ako biomarkery využívali v hocíjakých ochoreniach. Na zisťovanie cirkulujúcich mikroRNA sa používajú technológie ako polymerázová reťazová reakcia (PCR) v reálnom čase a sekvenovanie novej generácie (NGS) (Wang a kol. 2016).

Napríklad pri skúmaní sér pacientov, ktorí trpeli rakovinou pľúc sa zistilo, že hodnoty miR–10b, miR–141, a miR–155 by mali byť vyššie u pacientov trpiacich malígnym typom rakoviny pľúc ako u pacientov trpiacich benígnym typom tejto rakoviny (Roth a kol. 2011). MiR–1 a miR–133b, nájdené v moči, boli identifikované ako možné markery ochorenia obličiek (Ben – Dov a kol. 2014, Trionfini a kol. 2015). V periférnej krvi boli identifikované exozomálne mikroRNA, a tiež aj v kultivačnom médiu niekoľkých bunkových línií, a tak ich využitie môže súvisieť s adenokarcinomom (Valadi a kol. 2007, Taylor a kol. 2008, Rabinowits a kol. 2009). Vhodnými potencionálnymi biomarkermi pre kardiovaskulárne ochorenia sú exozomálne mikroRNA (Wang a kol. 2016).

Tabuľka 2 Výhody a nevýhody tradičných a nových kardiotoxických biomarkerov (Sandhua a kol. 2014)

Tradičné kardiotoxické biomarkery na báze proteínov	
Výhody	niekoľko ročné skúsenosti s ich používaním potvrdenie ich účinnosti a efektívnosti niekoľkými štúdiami
Nevýhody	nízka senzitivita, nízka špecifita nesprávna diagnostika (krátky počas rozpadu...) oneskorená detekcia vývoja ochorenia, čo vedie k jeho rozvoju niektoré sú invazívne a je nutná biopsia
Nové kardiotoxické biomarkery - mikroRNA	
Výhody	špecifické, citlivé, prognostické a diagnostické, stabilné aj v zlých podmienkach ľahká kvantifikácia, využívanie neinvazívnych metód rýchle zachytenie ochorenia
Nevýhody	nízka hladina RNA v krvi sú drahšie, časovo a prístrojovo náročnejšie

2.2.6 Tradičné biomarkery kardiotoxicity

Medzi tradične používané biomarkery kardiotoxicity patrí napríklad myoglobín, C – reaktívny proteín, troponíny, natriuretické peptidy, či kreatínkináza. Úlohou kreatínkinázy (CK) je katalyzácia reverzibilného prenosu fosfátu medzi ATP a kreatínom. Vyskytuje sa v cytoplazme, vo forme dimeru zloženého z dvoch

podjednotiek, svalu (muscle, M) a mozgu (brain, B). Monoméry sa môžu rôzne kombinovať, vďaka čomu vznikajú tri izoenzýmy CK. Kreatínkináza sa môže vyskytovať v kostrovom svalstve, označuje sa CK – MM, ako CK – MB v myokarde, a v mozgu ako CK – BB. Zvýšené hodnoty CK – MB nastávajú za 4 až 8 hodín po AIM, najvyššie sú za 24 hodín a po 48 hodinách postupne klesajú. Postupne sa stanovenie CK – MB nahradzovalo viac kardiošpecifickým stanovením CK – MB mass. Medzi výhody CK – MB mass patrí zvýšenie jej koncentrácií pri AIM o hodinu skôr ako u CK – MB, má vyššiu analytickú citlivosť, patrí teda medzi vhodnejšie markery reinfarktu (Beránek a kol. 2013).

Natriuretické peptidy (NP) tiež patria medzi markery kardiotoxicity. NP sa tvoria fyziologickým protimechanizmom patologickej aktivácie osy renín – angiotenzín – aldosterón, ktorá vzniká ako dôsledok poškodenia srdca. Rozlišujeme atriálny natriuretický peptid (ANP), mozgový natriuretický peptid (BNP) a natriuretický peptid C (CNP). Hlavným miestom výskytu ANP je myokard sieni, BNP sa vyskytuje hlavne v myokarde komor a CNP v hypofýze, endotele ciev a tkanive obličiek. Napätie spôsobuje zvýšené vylučovanie BNP srdcovými myocytmi. V diagnostike je najviac používaný BNP a N – terminálny fragment prohormónu BNP (NT – proBNP), stanovenie ich koncentrácií je považované za spoľahlivý diagnostický a prognostický biomarker kardiotoxicity (Beránek a kol. 2013).

Ďalšie dôležité a často používané biomarkery kardiotoxicity sú troponíny. Troponín je zložený z troch bielkovín, ktoré sa viažu na tenké filamentum a majú význam v svalovej kontrakcii. Myofibrilárne bielkoviny predstavujú hlavné časti kontraktilného, priečne pruhovaného svalstva. Hrubé filamenta pozostávajú z myozínu a tenké filamenta sú tvorené aktínom, tropomyozínom a troponínom. Reguláciu svalovej kontrakcie zabezpečuje troponínový komplex, obsahuje troponín C (TnC), troponín I (TnI) a troponín T (TnT). Proteín TnT slúži na väzbu troponinového komplexu na tropomyozín. Troponínový komplex tiež reguluje riadenie interakcií aktínu a myozínu, ktoré sú závislé na hladine vápnika. Bielkoviny TnT a TnI, ktoré sa nachádzajú v myokarde a kostrovom svalstve, sa líšia malým rozdielným zložením aminokyselín. Naopak bielkovina TnC má rovnaké zloženie aminokyselín v kostrovom aj v srdcovom svalstve, kvôli čomu nemôže byť pre diagnostiku kardiotoxicity použiteľná (Beránek a kol. 2013).

Troponíny sú rozšírené v používaní pri diagnostike kardiovaskulárnych ochorení, patria medzi najviac používané biomarkery. Narozdiel od srdcových enzýmov majú veľkú výhodu v tom, že môžu zachytiť už aj malé poškodenie srdcového tkaniva. Hladiny koncentrácií TnT stúpajú približne za tri hodiny po AIM a sú zvýšené po dobu 10 až 14 dní. Vylučovanie TnT má bifázický priebeh, najprv sa vylučuje z cytosolu a jeho hladiny rastú v priebehu 12 hodín, nasledujúci vrchol nastáva za 3 až 5 dní a napokon pokles hodnoty za 10 až 14 dní. Doba zvýšenia hodnôt koncentrácií TnT je úmerná rozsahu AIM, pri malom rozsahu AIM sú hladiny TnT zvýšené menej ako 7 dní ale naopak pri veľkom rozsahu AIM môže byť koncentrácia TnT zvýšená aj po dobu 21 dní. Vylučovanie TnI má priebeh s jedným vrcholom, v priebehu 9 až 16 hodín sa zvyšujú jeho hladiny a jeho koncentrácie sú zvýšené po dobu 7 dní (Beránek a kol. 2013).

2.2.7 Kardiošpecifické mikroRNA

MikroRNA, ktorá sa spája s patologickým procesom kardiovaskulárnych ochorení patrí medzi rýchlo sa rozvíjajúcu oblasť výskumu. To, že expresia mikroRNA je rozdielna v rôznych stupňoch kardiovaskulárnych ochorení, môže spôsobovať aj účasť etiologických faktorov, ktoré majú účinok na expresiu mikroRNA. Toxikologicky dôležité enhancerové oblasti sú často súčasťou promotórov RNA polymerázy II, a teda mikroRNA sa vďaka týmto oblastiam môžu účastniť odpovede na bunkové napätie a po vystavení toxickým látkam aj na genetickej zmene (Sandhu a kol. 2014).

Podľa výskumov v tkanivách srdcového svalu by mali byť prítomné miR-208a a miR-499 (Van a kol. 2007, Adachi a kol. 2010). Nie len v srdcovom svale, ale aj v kostrových svaloch by mali byť exprimované miR-1 a miR-133 (Van a kol. 2009, Chen a kol. 2006). Všetky spomínané mikroRNA sú pravdepodobne dôležité pre vývoj a diferenciáciu myocytov (Van a kol. 2007, Chen a kol. 2006, Zhao a kol. 2005, Zhao a kol. 2007). Na základe rôznych zložiek orgánov môže byť pozmenená expresia miRNA. Teda expresia miRNA je v tepnách srdca iná ako v srdci, a tak sú určité miRNA špecifické pre určité typy buniek. Pravdepodobne expresia miR-1, let-7, miR-23, miR-133, miR-125a, miR-125b, miR-145 a aj miR-143 je charakteristická pre koronárne predsieňové hladké svalové bunky (Liu a kol. 2007). MiR-126-3p, miR-30c, miR-26a, miR-1, miR-133 a let-7 sú zrejme charakteristické pre bunky srdcového svalu (Lagos – Quintana a kol. 2002).

Pre fyziologický vývoj srdca je expresia špecifických miRNA nesmierne dôležitá. Štúdie poukázali na miRNA, ktoré by mali zohrávať dôležitú úlohu vo vývoji a správnej funkcii srdca. Veľké množstvo defektov srdca, ako napríklad arytmie, srdcové hypertrofie, či hyperplázie myocytov sú zrejme spojené s abnormálnym nálezom hodnôt miR-1. Arytmie sa pravdepodobne viažu k zmene miR-133 a srdcové hypertrofie k zmene miR-21, miR-133, miR-195 a miR-208 (Van a kol. 2007, Zhao a kol. 2005, Zhao a kol. 2007, Wienholds a kol. 2005).

2.2.7.1 MikroRNA a akútny infarkt myokardu

Pomocou štúdií sa zistilo niekoľko mikroRNA, ktoré by sa mohli podieľať na akútnom infarkte myokardu (AIM). V štúdií podľa Wanga, kde boli použité vzorky plazmy pacientov trpiacich AIM sa zistilo, že miR-208a, miR-499, miR-1 a miR-133a by mohli určovať nástup príznakov, teda počiatočné štádia AIM. Tieto vzorky boli porovnávané s kontrolnými vzorkami a v kontrolných vzorkách miR-208a nebola detekovaná. Spolu s mikroRNA boli skúmané aj vzorky troponínu I (cTnI), u miR-208a bola pozorovaná vyššia a skôr detekovaná hladina ako u cTnI. U všetkých pacientov s AIM bola zvýšená hladina miR-208a a cTnI bol zistený len u 85 % pacientov. Z čoho Wang usúdil, že by mohlo byť výhodnejšie používať miRNA (Wang a kol. 2010).

Ale naopak v ďalšej štúdií neboli zistené zvýšené hladiny miR-208a (D'Alessandra a kol. 2010). Zistilo sa, že rozdiel medzi týmito dvomi štúdiami a ich rozdielnymi výsledkami spočíva v čase, v ktorom bola pacientom odobraná plazma. V štúdií Wanga bola pacientom odobraná plazma po 4 hodinách od nástupu AIM a v ďalšej štúdií po 9 hodinách. Z čoho usúdili, že čas odberu by mohol zohrávať dôležitú úlohu pri detekcii. (Sandhu a kol. 2014). V druhej štúdií, teda po 9 hodinách od počiatočných príznakov AIM, boli v plazme pacientov detekované zvýšené hladiny miR-1, miR-133a, miR-133b a miR-499-5p, podobne ako v štúdií podľa Wanga (Wang a kol. 2010, D'Alessandra a kol. 2010).

V ďalšej štúdií boli pacientom s AIM odobrané vzorky plazmy a znova zistené vysoké hodnoty miR-208a a miR-499. Hladiny cTnI boli rovnaké ako hladiny miR-208a a miR-499. Avšak miR-1 a miR-133a vo vzorkách pacientov neboli zmenené. Čas odobranej plazmy od pacientov v tejto štúdií bol 12 hodín po prvých bolestiach na hrudníku (Corsten a kol. 2010).

V nasledujúcej štúdií sa skúmala práve expresia miR-1 a miR-133 znova z plazmy pacientov s AIM. MiR-133 ostala nezmenená a miR-1 mala vyššie hodnoty. Tieto vzorky sa odobrali po prvých príznakoch poškodenia myokardu (Ai a kol. 2010). Pomocou štúdie, kde sa skúmali miR-1 a miR-133 sa znova zistili ich zvýšené hodnoty ale prišlo sa aj na to, že miestom pôvodu cirkulujúceho miR-133a je pravdepodobne poškodený myokard (Kuwabara a kol. 2011), taktiež sa počas štúdií zistili zvýšené hladiny miR-499 (Adachi a kol. 2010).

Po odobraní krvných vzoriek po 8,5 hodinách po prvých bolestiach na hrudníku bola výrazne zvýšená hladina miR-1. Hodnoty kreatinkinázy typickej pre myokard (CK – MB) korelovali s nárastom miR-1 (Cheng a kol. 2010).

Všetky výsledky zo spomínaných štúdií poukazujú na možný potenciál zmien mikróRNA špecifických pre pacientov s AIM. Okrem týchto mikróRNA sa zistili aj ďalšie potencionálne biomarkery AIM ako napríklad miR-1291, miR-663b, miR-328, miR-21 a miR-29a (Meder a kol. 2011, Wang a kol. 2011, Zile a kol. 2011). Avšak overenie spoľahlivosti všetkých spomínaných mikróRNA je nutné ďalej skúmať (Sandhu a kol. 2014).

2.2.7.2 MikroRNA a srdcové zlyhanie

U pacientov s akútnym srdcovým zlyhaním sa v jednej štúdií zisťovali hodnoty miR-208b, miR-499, miR-1 a miR-133a. Zistilo sa, že expresia týchto mikróRNA bola výrazne zvýšená (Corsten a kol. 2010). Ďalšia štúdiá pacientov so srdcovým zlyhaním sa zamerala na pozorovanie zmien miR-499, miR-122 a miR-126 vo vzorkách plazmy. Hodnoty miR-126 boli zvýšené ale nezmenené ostali hladiny miR-499 ako aj miR-122 (Fukushima a kol. 2011). Vo vzorkách plazmy pacientov s chronickým srdcovým zlyhaním zasiahnutým ischemickou a neischemickou dilatovanou kardiomyopatiou sa zistili znížené hodnoty miR-107, miR-139 a miR-142-5p (Voellenkle a kol. 2010).

Nasledujúca štúdiá poukázala na to, že vo vzorkách od pacientov so srdcovým zlyhaním spôsobeným neischemickou dilatovanou kardiomyopatiou hodnoty miR-142-3p a miR-142-29b vzrástli a vo vzorkách od pacientov s ischemickou kardiomyopatiou miR-125b a miR-497 klesli (Voellenkle a kol. 2010).

Zmeny hladín miR-423-5p, miR-18b, miR-129-5p, miR-622 a miR-654-3p boli pozorované v štúdií, kde sa použili vzorky plazmy pacientov so srdcovým zlyhaním

(Tijssen a kol. 2010). Znížené koncentrácie miR-361-5p sa zistili u pacientov so srdcovým zlyhaním (Chen a kol. 2010). V tejto štúdii hladina miR-361-5p bola zvýšená vo vzorkách pacientov s AIM. Vďaka čomu by v budúcnosti mohla byť využitá táto mikroRNA ako biomarker pre AIM a aj pre chronické srdcové zlyhanie (Chen a kol. 2010). Rovnako aj ďalšie spomínané mikroRNA by mohli byť v budúcnosti využité ako potencionálne biomarkery (Sandhu a kol. 2014).

2.2.7.3 MikroRNA a ischemická choroba srdca

V plazme pacientov s ischemickou chorobou srdca sa v štúdii zistili zvýšené hodnoty miR-133 a miR-208a. Ale miR-155 a miR-145, ktoré sú spojené so zápalom, mali znížené koncentrácie rovnako ako aj miR-126, miR-17 a miR-92a (Fichtlscherer a kol. 2010).

Ďalšia štúdia vzoriek pacientov s ischemickou chorobou srdca poukázala na zmeny hladín miR-135, u tejto miRNA došlo k zvýšeniu a u miR-147 k zníženiu. MiR-134, miR-198 a miR-370 by mohli byť potencionálnymi biomarkermi na odlíšenie nestabilných pacientov trpiacich angínou pectoris od stabilných pacientov (Hoekstra a kol. 2010).

2.2.7.4 MikroRNA a arytmia, fibróza, hypertrofia, srdcové zlyhanie

V štúdii, kde sa skúmali vzorky pacientov trpiacich arytmiami sa zistili zmenené hodnoty miR-1, miR-133 a miR-208a (Yang a kol. 2007, Luo a kol. 2008, Callis a kol. 2009). Vo vzorkách pacientov s fibrózou srdca boli zmenené hodnoty miR-21 a miR-29 (Thum a kol. 2008, Van Rooij a kol. 2008). Pri porovnaní štúdií, kde sa skúmali expresie mikroRNA pri infarkte myokardu a pri hypertrofii sa zistilo, že expresie miR-208, miR-214, miR-320 a miR-351 sa zvýšili pri hypertrofii a znížili pri infarkte myokardu. A hodnoty miR-1, miR-29, miR-30 a miR-181b sa znížili pri hypertrofii a naopak zvýšili pri AIM. (Thum a kol. 2008, Van Rooij a kol. 2006, Perbellini a kol. 2011, Wang a kol. 2012).

Štúdia, ktorá skúmala zmeny mikroRNA pri srdcovom zlyhaní, zistila že hodnoty miR-21, miR-27b, miR-29, miR-126, miR-195 boli zmenené (Thum a kol. 2008, Van Rooij a kol. 2006, Perbellini a kol. 2011, Wang a kol. 2012).

Všetky tieto potencióálne mikroRNA biomarkery by mohli v blízkej dobe výrazne pomôcť s diagnostikou ochorení, avšak na to je nutné ďalej dôkladne skúmať vlastnosti a zmeny všetkých mikroRNA (Sandhu a kol. 2014).

2.2.7.5 MikroRNA a transplantácia srdca

MikroRNA by sa mohli využívať ako biomarkery aj pri transplantácii srdca. V prvých mesiacoch môže dôjsť k odmietnutiu štepu, preto sú pacienti často sledovaní a podstupujú endomyokardiálnu biopsiu, pomocou ktorej sa hodnotí stupeň rejekcie (Berry a kol. 2013). Štúdie poukázali na to, že hladiny určitých mikroRNA, a to miR-27a, miR-101, miR-142-3p, miR-144, miR-326, miR-424, miR-10a, miR-31, miR-92a, miR-155 sa odlišujú u pacientov s rejekciou od pacientov bez rejekcie, čo by mohlo v budúcnosti priniesť určité výhody (Sukma Dewi a kol. 2013, Duong Van Huyen a kol. 2014).

3. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo sledovanie hladín miRNA vo vzorkách srdcového tkaniva a plazmy myši ovplyvnených doxorubicínom a v kontrolných vzorkách, ktoré neboli ovplyvňované. Štatisticky významné hladiny miRNA by mohli slúžiť ako biomarkery kardiotoxicity spôsobenej DOX.

Ciele práce:

1. Izolácia miRNA z biologických vzoriek myšacích srdce a plazmy, reverzná transkripcia, DNase treatment, a ich hodnotenie metódou qPCR.
2. Elektroforéza (ELFO), imunobloting a detekcia vybraných proteínov, markerov kardiotoxicity.
3. Analýza dát, porovnávanie hladín expresie vybraných miRNA a proteínov vo vzorkách ovplyvnených DOX a v kontrolných vzorkách.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité materiály a prístroje

4.1.1 Biologický materiál

V tomto experimente boli použité myši, ktorým boli intravenózne podávané dávky DOX. Dávky boli podávané štyrikrát každý druhý deň a jedna dávka obsahovala DOX v množstve 3 mg/kg. Takto sa DOX podával počas deviatich dní. Myši boli usmrtené v deň poslednej dávky DOX dislokáciou krčnej chrbtice. Ďalšia skupina myší, ktoré boli v experimente použité, slúžili ako kontrolná skupina, ktorej sa podával soľný roztok.

Krv, ktorá sa odobrala z aorty sa uskladnila v skúmavkách s K2EDTA, nasledovala centrifugácia po dobu 5 minút pri 2500 g a teplote 4 °C, následne sa plazma znovu centrifugovala pri rovnakých podmienkach. Cieľom bolo získanie vzoriek bez prítomnosti buniek. Srdcia z myší boli odstránené a rozrezané na malé kúsky a uskladnili sa v skúmavkách, ktoré obsahovali TriReagent alebo lyzačný pufer. Vzorky srdca a plazmy sa skladovali v mraziacom boxe pri teplote – 80 °C.

4.1.2 Chemikálie a roztoky

- Amersham ECL Prime Western Blotting detekčné činidlo
- Ditiotritol (DTT) - Sigma Aldrich
- DNAza I - New England BioLabs
- Dodecylsulfát sodný (SDS) - Sigma Aldrich
- Etanol (100%) - Sigma Aldrich
- Etyléndiamíntetraoctová kyselina (EDTA) - Sigma Aldrich
- Fenylmethansulfonylfluorid (PMSF) - Sigma Aldrich
- Hovädzí sérový albumín (BSA) - Sigma Aldrich
- Hydroxid sodný (NaOH) - Sigma Aldrich

- Chloroform - Sigma Aldrich
- Izobutanol - Sigma Aldrich
- Izopropanol - Sigma Aldrich
- Kyselina chlorovodíková (HCl) - Sigma Aldrich
- Persíran amonný (APS) - Sigma Aldrich
- Primery - Generi Biotech
- qPCR kit SYBR Green I - xCEED-Biotech
- Redestilovaná voda (ddH₂O)
- Reverzná transkriptáza (RT) - ProtoScript II - New England BioLabs
- RNAza Inhibitor - Sigma Aldrich
- RNaza – Free Water
- Set na stanovenie bielkovín (s BCA) - Thermo Scientific
- Súprava QIAGEN kit – kolóny RNeasy MinElute, QIAzol lyzačné činidlo, pufer RWT a RPE, Spike – In kontrola - Qiagen
- Sušené mlieko - Fluka analytical
- Tetrametyletyléndiamín (TEMED) - Sigma Aldrich
- TRIzol (TriReagent) Molecular Research Centre
- Zásobný roztok akrylamidu (AA) a bisakrylamidu (bisAA)
- Zmes dNTP - Eurogentec

4.1.3 Prístroje

- Automatické pipety - Research Plus, Eppendorf
- Blotovacie zariadenie Bio – Rad, Trans - Blot Turbo
- Centrifuga – Biofuge Stratos Heraeus, Thermo Scientific
- Detekčný prístroj – ChemiDoc MP Imaging System, BioRad
- Digestor
- Guľôčkový homogenizátor – FastPrep24, M. G. P.
- Hlbokomraziaci box – Vxe Series Jouan, Thermo Scientific
- Chladiaci box - Frigera
- Kývačka - Mythic BLOOD MIXER, Orphée S. A.
- Laminárny box – UVC/T – AR, BioSan
- Magnetická miešačka - IKA color squid, Sigma Aldrich
- Minicentrifuga – Sprout, Heathrow Scientific
- PCR cyklér – Mj mini, Bio – Rad
- Prístroj pre Real – time PCR QuantStudio6 – Applied Biosystems
- Spektrofotometer a spektrofluorimeter - Tecan NanoQuant infinite M200 pro
- Spektrofotometer NanoDrop 2000 – Thermo Scientific
- Termomixér - Thermomixer comfort eppendorf MTP
- Vortex V – 1 plus – BioSan
- Zdroj energie pre elektroforézu
- Zdroj napätia – Power Pac 200, Bio – Rad

4.1.4 Pomôcky

PCR - Automatické pipety Eppendorf research rôzneho rozsahu, pipetovacie špičky rôzneho rozsahu, mikroskúmavky rôzneho rozsahu, laboratórne sklo, rukavice, PCR mikrotitračné dosičky, mikrohomogenizátory, dávkovač gulôčok, pinzeta, sklenené gulôčky, sklenené pasteurové pipety hrubšia a tenšia, PCR stripy, kolóny RNase MinElute, stojany na mikroskúmavky, buničina.

ELFO - nalievací stojan, sklo so spacerom, spony, hrebeň, gumová podložka, parafilm, špičky na dávkovanie vzoriek na elfo, hrubý filtračný papier, stojan na elektroforézu, vanička, rezátko gélu, plastová krabička, nitrocelulozová membrána, plastové nádoby s vekom (falkonky), nožnice, fólia.

4.2 Metodika

4.2.1 Expresia mikroRNA v srdciach myší

Zmeny hladín mikroRNA v srdciach myší boli zisťované pomocou kvantitatívnej polymerázovej reakcie (qPCR), postupnými metódami, od izolácie RNA, merania koncentrácie RNA, ošetrenia DNazou, reverznej transkripcie, pri ktorej sa RNA previedla do cDNA, ktorá bola využitá pri qPCR.

4.2.1.1 Izolácia RNA zo srdca myší

RNA je veľmi citlivá, a tak jej izolácia musí prebiehať v laminárnom boxe, pretože RNázy, ktoré sa nachádzajú všade okolo nás by mohli poškodiť vzorky. Pri izolácii je nutné používať rukavice, práca musí byť rýchla a čistá. K rozrezanému srdcovému tkanivu s hmotnosťou asi 50 až 100 mg sme pridali 1 ml TRIzol. TRIzol je zmes fenolu a guanidín izothiokyanátu, slúži na selektívnu izoláciu celkovej RNA z malého množstva tkaniva alebo buniek. Použitím guľôčkového homogenizátora prebiehala homogenizácia. Guľôčky sme pridali dávkovačom do skúmaviek, cieľom bolo čo najviac homogenizovať tkanivo, behom homogenizácie integrita RNA zostáva zachovaná. Vzorky sme približne 5 minút nechali stáť pri laboratórnej teplote.

Ďalším krokom bolo pridávanie 200 μ l chloroformu a pretrepávanie v ruke zhruba 15 sekúnd. Znovu sme vzorky nechali stáť pri laboratórnej teplote 2 až 3 minúty. Takto pripravené vzorky sme dali centrifugovať po dobu 15 minút pri 4 °C a pri 12 000 g. Chloroform a centrifugácia spôsobila rozdelenie zmesi na vodnú a organickú fázu, RNA sa nachádza hlavne v hornej vodnej fáze. Túto fázu sme odpipetovali do novej 1,5 ml skúmavky, išlo zhruba o 400 μ l. Práca musí byť veľmi opatrná, špička pipety sa nesmie dotknúť dolnej organickej fázy ani medzifázy, pretože by mohla spôsobiť kontamináciu genómovou DNA a proteínmi.

Následne sme k odpipetovanej časti pridali 500 μ l izopropanolu, premiešali a nechali asi 15 minút stáť pri laboratórnej teplote. Skúmavky sme preniesli do centrifugy, kde sme ich uložili, tak aby všetky boli otvaraním ku stredu. Počas centrifugovania sa vytvorí peleta RNA, ktorá môže byť neviditeľná, a preto je vhodné rovnaké uloženie všetkých vzoriek, aby pri odstraňovaní supernatanu nedošlo aj k jej odstráneniu. Vzorky sme centrifugovali pri 4 °C po dobu 10 minút a pri 12 000 g. Po centrifugácii sme odstránili

supernatant pomocou hrubšej sklenenej pipety, odstránenie supernatanu nemusí byť úplne do sucha. Počas centrifugovania sme si zo 100 % etanolu pomocou redestilovanej vody pripravili 75 % etanol. Týmto etanolom v množstve 1 ml umyjeme peletu. Etanol slúži na prečistenie a umytie pelety RNA. Miešame vzorky na vortexe, preklopujeme vzorky najprv v ruke a potom stočíme v chladenej centrifuge 5 minút, pri 4 °C a pri 7 500 g znovu otvaraním ku stredu.

Po skončení centrifugácie znovu odstránime supernatant tenšou sklenenou pipetou s vytiahnutým koncom, odstránenie supernatanu musí byť úplne, teda do sucha. Práca musí byť veľmi opatrná, aby nedošlo k jej odsatiu, pretože peleta slabo drží na dne skúmavky. Približne po dobu 10 minút necháme peletu osušiť na vzduchu, ak by začala peleta spriehľadňovať musíme ju rozpustiť skôr. Rozpúšťame ju v 20 až 100 μ l redestilovanej vody, podľa jej veľkosti. My sme použili 30 μ l vody, skúmavky sme premiešali a nechali postáť asi 5 minút pri laboratórnej teplote, potom je vhodné vzorky premiešať ešte raz, aby sa peleta poriadne rozpustila. Ak sa peleta rozpustila uložíme vzorky na ľad, a ak ešte nie, môžeme počas 10 minút pri teplote 60 °C vzorky inkubovať. Počas inkubácie je potrebné vzorky premiešavať, a následne ich môžeme uložiť na ľad. Takto pripravené vzorky môžeme skladovať v mrazničke pri teplote – 70 °C.

4.2.1.2 Meranie koncentrácie a čistoty RNA

Po skončení izolácie RNA nasleduje meranie koncentrácie získanej RNA prostredníctvom NanoDrop spektrofotometru. Predpokladali sme, že koncentrácia získanej RNA bude väčšia ako 1 μ g/ μ l, a preto sme si vzorky 10 x nariedili. Pripravili sme si skúmavky, do ktorých sme pipetovali 3 μ l rozpustenej RNA a k nej sme pridali 27 μ l ddH₂O, následne sme vzorky premiešali.

NanoDrop je potrebné najprv vynulovať pomocou slepej vzorky. Ako slepú vzorku alebo blank sme použili ddH₂O v množstve 2 μ l, s buničinou sme otreli horný aj dolný hrot prístroja, a následne sme zmerali koncentráciu všetkých našich vzoriek, tiež v množstve 2 μ l, po každom meraní je nutné horný aj dolný hrot prístroja utrieť buničinou.

Výsledky vzoriek z NanoDropu sú zobrazené v tabuľke 3. Medzi dôležité údaje patrí hlavne červeným písmom znázornený stĺpec, ktorý zobrazuje koncentráciu RNA v ng/ μ l, tieto vzorky sú zriedené 10 x. Čistotu I a aj kontamináciu proteínmi znázorňuje

modrý stĺpec. V tomto stĺpci by pomer absorbancie A 260 (DNA)/A 280 (proteíny) mal dosahovať hodnoty väčšie ako 1,8. Čistotu II a aj možnú kontamináciu fenolom zobrazuje zelený stĺpec, táto hodnota by mala byť približne 2, ale častejšie je okolo 1.

Vzorky môžeme nechať na ľade v prípade, že s nimi ešte ten istý deň budeme pracovať. Ak plánujeme v práci pokračovať iný deň, vzorky uložíme do mrazničky pri – 70 °C.

Tabuľka 3 Prehľad výsledkov z NanoDropu zo srdc myší

Sample	User ID	Date	Time	ng / μ l	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor Abs.	340 Raw
DOX1	Default	04.04.2018	15:45	920,44	23,011	11,401	2,02	1,82	40	230	12,616	0,12
DOX2	Default	04.04.2018	15:46	753,68	18,842	9,476	1,99	1,23	40	230	15,34	0,115
DOX3	Default	04.04.2018	15:46	1378,17	34,454	17,163	2,01	1,37	40	230	25,227	0,105
K1	Default	04.04.2018	15:47	1108,81	27,72	13,651	2,03	1,69	40	230	16,377	0,148
K2	Default	04.04.2018	15:48	1807,98	45,2	22,352	2,02	1,69	40	230	26,759	0,162
K3	Default	04.04.2018	15:48	997,89	24,947	12,265	2,03	1,49	40	230	16,716	0,184

4.2.1.3 Ošetrovanie DNazou

Vzorky po izolácii RNA a zmeraní koncentrácie podliehajú ošetrovaniu. Tento krok ošetruje vzorky RNA DNazou I, ktorá spôsobuje štiepenie iba DNA, tým dochádza k odstráneniu možnej kontaminácie vzoriek genómovou DNA.

Najprv je nutné spočítať v koľkých μ l vzorky budeme mať 5 μ g RNA a aké množstvo vody musíme pridať. Pomocou zmeranej koncentrácie RNA každej vzorky v ng/ μ l spravíme výpočet. Tabuľka 4 zobrazuje aj dopočítané množstvo vody do 26 μ l celkového objemu.

Tabuľka 4 Koncentrácie RNA, výpočet množstva RNA a vody

Sample ID	ng/ μ l	5 μ g RNA	ddH ₂ O
DOX1	920,4	5,4	20,6
DOX2	753,7	6,6	19,4
DOX3	1378,2	3,6	22,4
K1	1108,8	4,5	21,5
K2	1808,0	2,8	23,2
K3	997,9	5,0	21,0

Podľa tabuľky sme do skúmaviek napipetovali príslušné množstvo RNA a ddH₂O. Následne sme pripravili zmes DNAzy I s pufrom v pomere 1 : 3, čo znamená, že pre našich 6 vzoriek sme pipetovali 6,5 μ l DNAzy a 19,5 μ l pufru, zmes sme dôkladne premiešali na vortexe. Do každej skúmavky s RNA a ddH₂O sme z takto pripravenej zmesi sme pipetovali 4 μ l. Vzorky boli znovu zmiešané na vortexe a následne 25 minút pri 37 °C inkubované v termomixere Eppendorf s trepaním 500 rpm. Po inkubácii bola k vzorkám pridaná 0,1 M EDTA v množstve 1,5 μ l a potom nasledovala znovu inkubácia 10 minút ale pri zvýšenej teplote pri 75 °C, tento krok spôsobil inaktiváciu DNAzy. Vzorky sa po inkubácii umiestnili do ľadu, po ochladení sme ku každej vzorke pridali 18,5 μ l ddH₂O a zamiešali na vortexe. Koncentrácia oštrenej RNA v našich takto pripravených vzorkách bola 0,1 μ g/ μ l. Táto RNA je pripravená na reverznú transkripciu, ak v reverznej transkripcii nepokračujeme ten istý deň, vzorky uložíme do mrazničky s teplotou -70 °C.

4.2.1.4 Reverzná transkripcia

Princíp reverznej transkripcie spočíva v prevedení RNA na jednoreťazovú cDNA (complementary DNA), využíva sa enzým reverzná transkriptáza (RT, RNA dependentná DNA polymeráza). Syntéza jednoreťazovej cDNA by nemohla prebehnúť bez použitia primerov, teda krátkych oligonukleotidových reťazcov, ktoré sú komplementárne k určitému úseku templátovej jednoreťazovej RNA, a tak prebehne ich naviazanie na tento úsek. Náhodné hexamery slúžia ako primery ak je templátom mRNA, ale ak je templátom miRNA ako primery sa používajú špecifické RT primery.

V našej práci bolo zmiešaných viac primerov naraz, využili sme zmes multiplex, a tak vzniknutá cDNA bola v podstate zmes niekoľkých sekvencií. Pôsobením RT a naviazaním primerov postupne vzniká hybridná molekula RNA – DNA, nový reťazec DNA sa nazýva cDNA.

Reverzná transkripcia miRNA:

Množstvo multiplexu, teda zmesi 10 RT primerov, sa dopočíta podľa množstva vzoriek, 2 µl sú potrebné na každú reakciu. Pripraví sa aj zmes 2,5 µl RNA zriedenej na 0,1 µg/µl a pridáme 2 µl multiplexu. V PCR cyklére zahrejeme túto zmes na 5 minút pri 65 °C, prebieha denaturácia RNA, a tak dochádza k nasadnutiu primerov, vzorky sa potom uložia na ľad a po ochladnutí stočia, na cyklére stlačíme pauzu. K zmesi sme pridali 5,5 µl mastermixu, ktorého zloženie zobrazuje tabuľka 5. Množstvo zložiek mastermixu je násobené 13x, rovnako ako pri príprave u reverznej transkripcie mRNA, 6 z nich obsahuje RT, 6 slúži na kontrolu bez RT a 1 vzorka sa pripravuje navyiac.

Tabuľka 5 Zloženie mastermixu pre miRNA:

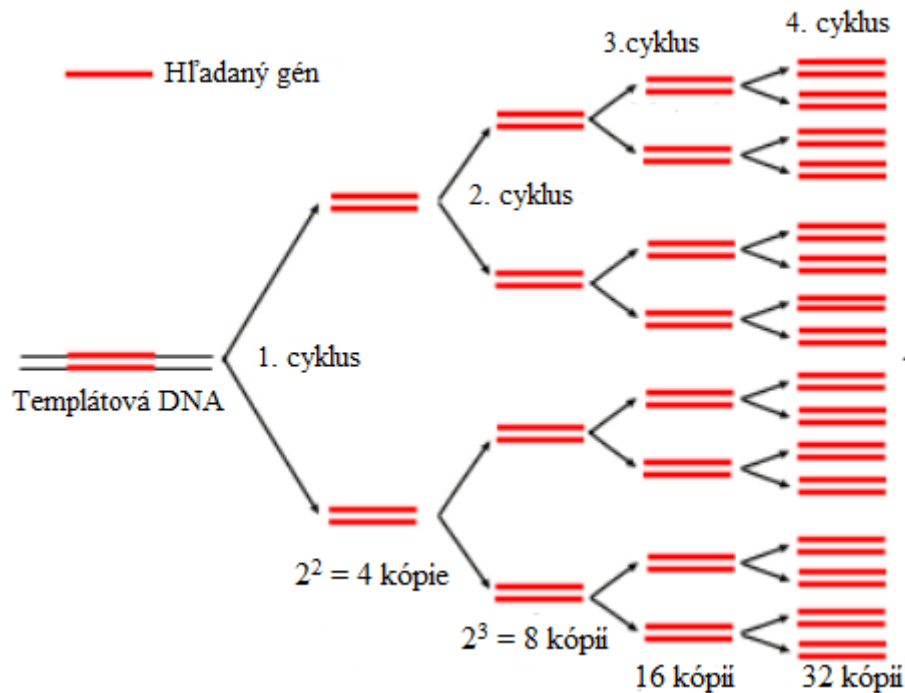
	RT	noRT
13x	2 µl pufr 5x	2 µl pufr 5x
13x	1 µl DTT	1 µl DTT
13x	2 µl dNTPs	2 µl dNTPs
13x	0,3 µl RT	0,3 µl ddH ₂ O
13x	0,2 µl RNAza IN	0,2 µl RNAza IN

Takto pripravené vzorky sa znovu zahrievajú v PCR cyklére pri teplote 16 °C po dobu 30 minút, dochádza k nasadeniu primerov, ďalší krok trvá 30 minút pri teplote 42 °C a nastáva syntéza cDNA a posledný krok trvá 5 minút pri 95 °C, kedy dochádza k denaturácii RT. Po vybratí, ochladení a stočení vzoriek sme k nim pridali ešte 190 µl ddH₂O, takto sa cDNA zriedi 20x. Do PCR pridávame 5 µl cDNA.

4.2.1.5 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase

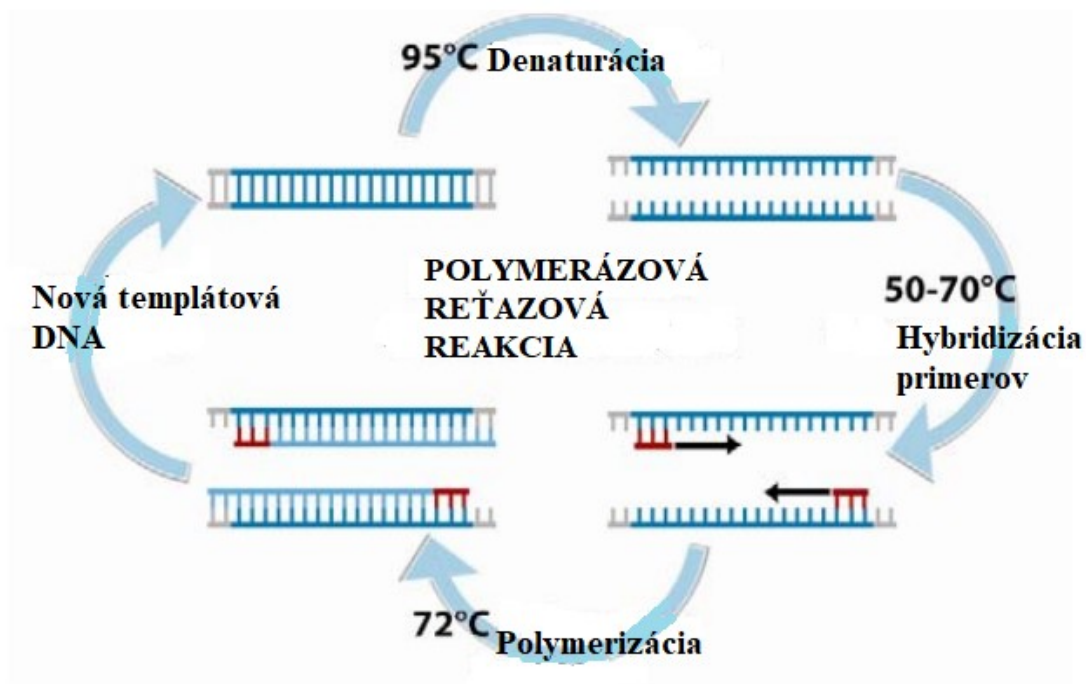
(qPCR, real – time PCR)

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) spočíva v množení (amplifikácii) jednej alebo niekoľkých kópií fragmentov DNA. Amplifikácia môže prebiehať aj z malého množstva DNA materiálu alebo aj z málo kvalitného materiálu DNA. Z DNA pomocou amplifikácie vznikajú najprv dve kópie, potom štyri, osem, a tak sa neustále zmnožujú (viď. Obrázok 3). Množenie produktu umožňuje použitie špecifických proteínov polymeráz, ide o enzýmy, ktoré predlžujú DNA, a tak vznikajú dlhé molekulové vlákna. Syntéza prebieha v sekvencii, ktorá je vymedzená pomocou krátkych oligonukleotidových syntetických úsekov, ktoré sa nazývajú primery (Joshi a kol. 2011).



Obrázok 3 Množenie produktov PCR (Hakhverdyan, 2015)

PCR prebieha v troch krokoch, denaturácia, hybridizácia a polymerizácia. DNA podlieha denaturácii pri teplote 90 až 95 °C. Druhá fáza prebieha pri nižšej teplote, pri 45 až 65 °C, dochádza k hybridizácii primerov s templátovou DNA na určených úsekoch. Pri zvýšení teploty na 72 °C prebieha polymerizácia (viď. Obrázok 4). Taq polymeráza syntetizuje komplementárne vlákno DNA z voľných dNTP. Pochádza z termostabilnej baktérie *Thermus aquaticus*, tento enzým vydrží opakované zahrievanie, teplotné optimum má približne 72 °C (Joshi a kol. 2011).



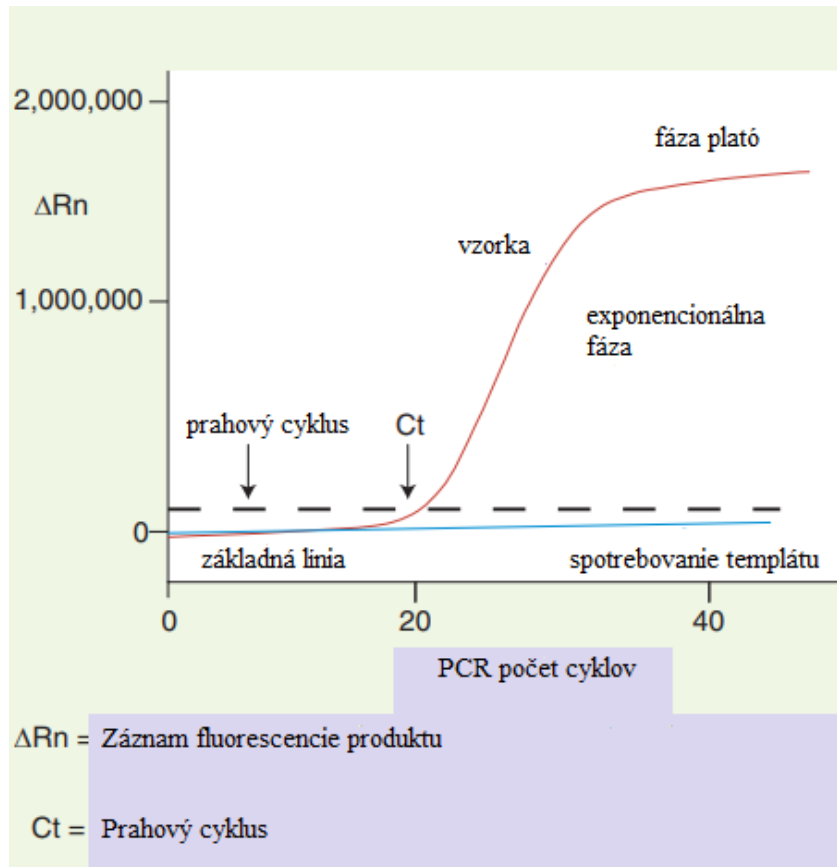
Obrázok 4 Priebek PCR (Lui a kol. 2009)

Pri polymerázovej reťazovej reakcii v reálnom čase dochádza k amplifikácii a súčasnej kvantifikácii cieľového DNA materiálu, pomocou použitia rôznych fluorescenčných farbív, ktoré interagujú s produktom. Oproti klasickej PCR má niekoľko výhod, je rýchlejšia, pretože produkt je detekovaný počas reakcie a nie až na konci, ako je to pri klasickej PCR. Má vyššiu citlivosť, poskytuje kvantitatívne výsledky počtu molekúl, klasická PCR hodnotí produkty kvalitatívne, na základe veľkosti (Shergill a kol. 2005).

Cyklus reakcie PCR pozostáva zo záznamov fluorescencie, ktorá môže vznikáť pomocou farbiva alebo sondy. Intenzita fluorescencie je väčšia, čím je väčšie množstvo produktu DNA. Základná línia (baseline) predstavuje cykly PCR, v ktorých sa stupňuje fluorescencia, ale neprekračuje hranice detekcie prístroja. Signál, ktorý sa zaznamenáva nad prahom baseline je definovaný ako prahový cyklus (threshold, Ct) (viď. Obrázok 5). Platí, že čím väčšie je množstvo materiálu DNA, tým je nižšia Ct. Hodnota Ct sa vyskytuje v exponenciálnej fáze amplifikačného kroku PCR reakcie. Pri lineárnej fáze nastáva spomalenie reakcie, spotrebúvajú sa zložky reakcie PCR a môže dochádzať aj k degradácii produktu. Reakcia je zastavená vo fáze plateau, produkt sa už nesyntetizuje, ale tiež môže dochádzať k jeho degradácii (Shergill a kol. 2005).

Na vyhodnocovanie výsledkov slúžia dve metódy, absolútna a relatívna kvantifikácia. Pri absolútnej kvantifikácii sa využíva kalibračná krivka, zostavená z PCR signálu

vzorky a počtu kopii vybraného štandardu. Pri relatívnej kvanifikácii sa sledujú zmeny expresie cieľových génov a porovnávajú sa s kontrolnými expresiami referenčných génov (Shergill a kol. 2005).



Obrázok 5 Záznam PCR cyklu (Shergill a kol. 2005)

Príprava vzorkov na PCR reakciu zahŕňala zmiešanie MasterMixu s cDNA, ktorú sme získali v predchádzajúcom kroku reverznou transkripciou použitím multiplexu tvoreného 10 RT primermi. Zloženie MasterMixu je zobrazené v tabuľke 6. SYBR Green mix obsahuje DNA polymerázu, dNTPs, pufer a fluorescenčné farbivo Syber Green I. Forward (F) a reverse (R) primery sú riedené na koncentráciu 5 μ M. MasterMix v množstve 15 μ l spolu s 5 μ l cDNA sme pipetovali do špeciálnych stripov alebo 96 jamkových doštičiek pre qPCR.

Vzorky sme znovu pripravili v duplikátoch, pre každý primer, a tiež bola pripravená aj negatívna kontrola, v ktorej sa namiesto cDNA použila ddH₂O. Pripravených bolo 12 vzoriek a 2 vzorky negatívnej kontroly. MasterMix sa vynásobil 14x. Do stripov sme najprv pipetovali MasterMix, potom cDNA a do dvoch miest stripu voda, takýto postup

sa opakoval pre každú sledovanú miRNA. Celý strip sme dali na chvíľu stočiť do centrifugy a potom nasledovala analýza v prístroji pre qPCR (OuantStudio 6).

Tabuľka 6 Zloženie MasterMixu pre PCR reakciu

Komponenty:	1x
voda	4,20 μ l
SYBR Green mix 2x koncentrovaný	10,00 μ l
F Primer	0,4 μ l
R Primer	0,4 μ l
Spolu	15 μ l
cDNA	5 μ l
Celkom	20 μ l

4.2.2 Expresia mikroRNA v plazme myši

Sledovanie zmien expresie génov sme pozorovali okrem srdca aj v plazme myši. Postup bol rovnaký, líšil sa iba v izolácií RNA. Meranie koncentrácie a čistoty RNA, ošetrenie DNazou, reverzná transkripcia a qPCR prebiehali rovnako ako pri srdciach myši.

4.2.2.1 Izolácia RNA z plazmy myši.

Izolácia RNA z plazmy myši sa líši postupom aj využitím iných reagensí ako pri izolácii RNA zo srdca myši. Celú izoláciu je potrebné vykonávať pri izbovej teplote pri 15 – 25 °C. Práca musí prebiehať rýchlo a musia sa používať rukavice. Používajú sa reagenty a postup špeciálne od firmy QIAGEN. Súprava QIAGEN kit obsahovala kolóny RNeasy MinElute, ktoré sa musia uskladňovať pri teplote 2 až 8 °C, QIAzol lyzačné činidlo, pufer RWT a pufer RPE sa uskladňujú pri izbovej teplote.

Vzorky plazmy necháme pri izbovej teplote rozmraziť. Pridali sme QIAzol lyzačné činidlo k rozmrazenej plazme v pomere 1 : 5. Plazmy sme použili 200 µl, a tak pridávame 1 ml lyzačného činidla QIAzol. Vzorky s činidlom v skúmavkách premiešame na vortexe alebo použitím pipety a následným pipetovaním v smere nahor a nadol. Tento vzniknutý roztok necháme inkubovať po dobu 5 minút pri izbovej teplote 15 – 25 °C. K tejto zmesi pridáme 3,5 µl Spike – In kontroly. Potom sme pridali chloroform v pomere 1 : 1, pridáme 200 µl chloroformu. Vzniknutý roztok po dobu 15 sekúnd pretrepeme a potom necháme inkubovať 2 – 3 minúty pri izbovej teplote. Nasleduje centrifugácia po dobu 15 minút pri teplote 4 °C pri 12 000 g.

Po centrifugácii sa fázy vo vzorke rozdelili, opatrne odpipetujeme hornú vodnú fázu do mikroskúmavky, pri pipetovaní nesmieme zasiahnuť do medzifázy. Potom sa pridáva 100 % etanol, k 600 µl vodnej fázy pridávame 900 µl etanolu, dôkladne premiešame pipetou.

Do novej skúmavky RNeasy MinElute v objeme 2 ml, ktorá obsahuje kolónu, prepipetujeme 700 µl vzorku a centrifugujeme pri izbovej teplote po dobu 15 sekúnd pri 8 000 g, po centrifugácii skúmavku vyprázdňujeme. Potom znovu opakujeme tento krok so zvyškom vzorky a znovu po centrifugácii vyprázdňujeme skúmavku. V ďalšom kroku pripipetujeme 700 µl RWT pufru a znovu centrifugujeme 15 sekúnd pri izbovej teplote a pri 8 000 g. Po skončení centrifugácie skúmavku vyprázdňujeme. Pripipetujeme 500 µl RPE pufru, zatvoríme veko centrifugy a znovu centrifugujeme 15 sekúnd pri izbovej

teplote pri 8 000 g, po centrifugácii skúmavku vyprázdňime. Týmto postupom znovu premývame kolonu.

Ďalej sa pridáva do skúmavky s kolonou 500 μ l 80 % etanolu, centrifugujeme po dobu 2 minúty pri 8 000 g, skúmavka sa znovu po centrifugácii musí vyprázdniť. Po tomto kroku premiestňime kolonu do novej 2 ml skúmavky. Centrifugujeme pri plnej rýchlosti po dobu 5 minút s otvoreným vekom skúmavky, tento krok je dôležitý pre vysušenie membrány. Po centrifugácii znovu vyprázdňime skúmavku. V poslednom kroku znovu premiestňime kolonu do novej 1,5 ml skúmavky a pridáme 14 μ l RNaze – Free Water priamo do stredy kolony, zatvoríme veko centrifugy a centrifugujeme pri plnej rýchlosti 1 minútu, aby sa nám uvoľnila RNA. Takto pripravené vzorky RNA môžeme skladovať v mrazničke pri teplote – 70 °C.

4.2.2.2 Meranie koncentrácie a čistoty RNA

Meranie koncentrácie a čistoty RNA získanej po izolácii z plazmy myší prebiehalo rovnako ako po izolácii zo srdca myší. Zmerané koncentrácie RNA sú zobrazené v tabuľke 7. Ako už bolo spomenuté v kapitole 4.2.1.2., červený stĺpec znázorňuje koncentráciu RNA, modrý stĺpec zobrazuje čistotu a kontamináciu proteínmi, tento stĺpec by mal mať hodnoty vyššie ako 1,8 a zelený stĺpec znázorňuje čistotu a kontamináciu fenolom.

4.2.2.3 Ošetrovanie DNazou

Tento krok prebieha takisto rovnako ako pri srdciach myší. Po spočítaní v kolíkách μ l vzorky budeme mať 40 ng RNA, dopočítame aj množstvo vody potrebné k dosiahnutiu objemu 3,5 μ l. Výpočty sú zobrazené v tabuľke 8.

Tabuľka 7 Výsledky koncentrácie a čistoty z NanoDropu z plazmy myší

Sample	User ID	Date	Time	ng / μ l	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor Abs.	340 Raw
K1	Default	19.04.2018	14:00	13,97	0,349	0,17	2,05	0,04	40	230	8,492	0,188
K2	Default	19.04.2018	14:01	10,97	0,274	0,152	1,8	0,06	40	230	4,422	0,181
K3	Default	19.04.2018	14:02	17,16	0,429	0,186	2,31	0,07	40	230	6,34	0,079
DOX1	Default	19.04.2018	14:03	13,15	0,329	0,193	1,7	0,3	40	230	1,088	0,146
DOX2	Default	19.04.2018	14:04	71	1,775	1,078	1,65	0,95	40	230	1,862	0,376
DOX3	Default	19.04.2018	14:05	17,36	0,434	0,249	1,74	0,2	40	230	2,216	0,159

Tabuľka 8 Koncentrácie RNA, výpočet množstva RNA a vody z plazmy myší

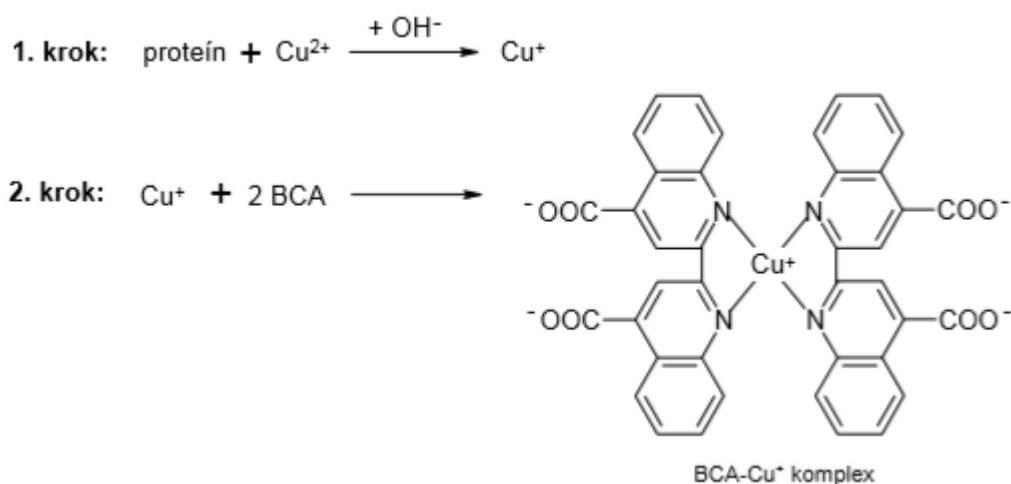
Sample ID	ng/ μ l	40 ng RNA	ddH ₂ O
K1	14,0	2,5	1,0
K2	11,0	3,2	0,3
K3	17,2	2,0	1,5
DOX1	13,2	2,7	0,8
DOX2	71,0	0,5	3,0
DOX3	17,4	2,0	1,5

4.2.3 Detekcia proteínov

Medzi metódy, ktoré predchádzajú detekcii proteínov patrí stanovenie koncentrácie bielkoviny, elektroforéza proteínov na polyakrylamidovom géle a imunobloting.

4.2.3.1 Stanovenie koncentrácie bielkoviny

Na stanovenie koncentrácie bielkoviny sme využili spektrofotometrickú metódu, pomocou detekčného činidla kyseliny bicinchoninovej (BCA). Proteíny reagujú s Cu^{2+} v alkalickom prostredí. Meďnaté ionty podliehajú redukcii a prechádzajú na meďné ionty, ktoré v prostredí s pH 10 vytvárajú stabilný modrofialový komplex s kyselinou bicinchoninovou (vid'. Obrázok 6). Platí, že intenzita zafarbenia tohto komplexu je priamo úmerná množstvu bielkoviny. Absorbancia sa meria na prístroji NanoQuant pri 562 nm.



Obrázok 6 Redukcia meďnatých iontov a vznik komplexu meďných iontov s kyselinou bicinchoninovou (Brady a kol. 2015)

Najprv je potrebné si pripraviť roztoky. Roztok A obsahuje NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH, tento roztok je bezfarebný. Roztok B obsahuje 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a jeho sfarbenie je modré. Roztok C si pripravíme zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 50 : 1, tento roztok bude mať zelené sfarbenie.

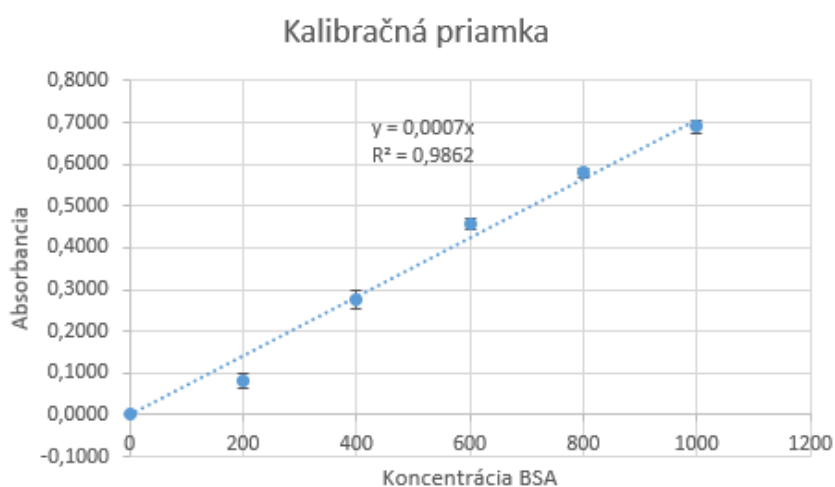
Následne je nutné si pripraviť kalibračnú krivku, ktorá pomohla určiť množstvo bielkoviny v každej vzorke. Na vznik kalibračnej krivky je potrebný 0,1 % roztok hovädzieho sérového albumínu (BSA). Množstvo napipetovaného BSA je zobrazené v tabuľke 9, na pipetovanie sme použili 6 mikroskúmaviek.

Potom sme použili vzorky po izolácii RNA zo srdca myši, tie sme si nariedili 50x, pipetovali sme 5 μ l a 245 μ l H₂O do mikroskúmaviek, roztok sme premiešali na vortexe.

Tabuľka 9 Kalibračná krivka BSA

	Koncentrácia	0,1 % roztok BSA	Destilovaná voda
1	0 μ g/ml	0 μ l	50 μ l
2	200 μ g/ml	10 μ l	40 μ l
3	400 μ g/ml	20 μ l	30 μ l
4	600 μ g/ml	30 μ l	20 μ l
5	800 μ g/ml	40 μ l	10 μ l
6	1000 μ g/ml	50 μ l	0 μ l

Do doštičky sme naniesli 10 μ l vzorky a kalibračných roztokov a k nim 200 μ l roztoku C. Celú doštičku sme premiešali a dali inkubovať pri teplote 37 °C po dobu 30 minút. Pripravili sme aj slepú vzorku, kde sme namiesto našich vzoriek použili vodu. Meranie absorbancie prebiehalo pri 562 nm. Z výsledkov absorbancie sa spravil priemer, priemer slepých vzoriek bol odpočítaný od našich vzoriek, následne sme spravili priemer všetkých vzoriek a z neho pomocou kalibračnej priamky určili koncentrácie vzoriek (viď. Obrázok 7).



Obrázok 7 Kalibračná priamka

4.2.3.2 Príprava vzoriek a roztokov na elektroforézu

Po zistení koncentrácie bielkoviny každej vzorky bolo potrebné vzorky nariediť, tak aby ich koncentrácia mala hodnotu 1 µg/µl. Pre riedenie 10 µl vzoriek sa použil lyzačný pufer (viď. Tabuľka 10) a 4 x SDS (viď. Tabuľka 11), tak aby SDS tvorilo ¼ celého objemu, množstvo pridávaného SDS je zobrazené v tabuľke 12. Tabuľka 12 obsahuje aj vypočítané koncentrácie vzoriek a množstvo pridávanej vody.

Tabuľka 10 Zloženie lyzačného pufru

Zložka (finálna koncentrácia)	Koncentrácia zásobného roztoku	Pipetované množstvo
50 mM Tris/HCl pH 7,4	1 M	50 ml
150 mM NaCl	Prášok	8,766 g
10 % glycerol	85 %	117,65 ml
1 % Triton X – 100	100 %	10 ml
2 mM EDTA	Prášok	0,58 g
2 mM EGTA	Prášok	0,76 g
40 mM β – glycerolfosfát	Prášok	8,52 g
50 mM flourid sodný	Prášok	2,09 g
10 mM pyrofosfát sodný	Prášok	4,46 g
2 mM dithiotreitol	Prášok	0,3085 g
200 µM vanadičnan sodný	Prášok	0,03678 g
H ₂ O		Doplniť do 1 litra

Pred používaním lyzačného pufru je potrebné k nemu pridať roztoky inhibitorov. K množstvu 13 ml lyzačného pufru sme pridali 130 μ l zmesi inhibitorov a 130 μ l 100 mM PMSF (fenylmethansulfonylfourid), ktorý sa najprv musí rozpustiť v 17,42 mg/ml etanole.

Tabuľka 11 Zloženie 4 x SDS

Zložka (finálna koncentrácia)	Koncentrácia zásobného roztoku	Pipetované množstvo
200 mM Tris/HCl pH 6,8	1 M	4 ml
40 % glycerol	85 %	9,41 ml
6 % SDS	Prášok	1,2 g
0,2 M DTT	Prášok	0,617 g
0,1 g bromfenolová modř	Prášok	Kúsok
Redestilovaná voda		20 ml

Tabuľka 12 Množstvo pridavaného SDS ku vzorkám po zmeraní koncentrácie bielkoviny

Koncentrácia	31,4 μ g/ μ l	37,1 μ g/ μ l	37,8 μ g/ μ l	41,4 μ g/ μ l	43,6 μ g/ μ l	43,1 μ g/ μ l
Celkom	313,6 μ l	371,4 μ l	377,9 μ l	414,3 μ l	436,4 μ l	430,7 μ l
4xSDS	78,4 μ l	92,9 μ l	94,5 μ l	103,6 μ l	109,1 μ l	107,7 μ l
Voda	225,2 μ l	268,6 μ l	273,4 μ l	300,7 μ l	317,3 μ l	313,0 μ l

Ďalej používané roztoky:

1. 4 M HCl
 - 150 ml redestilovanej vody spolu s 88 ml koncentrovanej HCl
 - Doplniť vodou do 250 ml
 - Odporúčané uchovávanie v chladničke
2. Zásobný roztok AA + bisAA
 - Použili sme predpripravenú zmes
3. 1,5 M Tris – HCl pufer, pH 8,8
 - Odvážiť 18,5 g Trisu
 - Pridať 75 ml redestilovanej vody a rozpustiť pomocou miešania
 - Upraviť pH na pH – metre pomocou 4 M HCl (približne 5 – 6 ml)
 - Doplniť v odmernej banke na 100 ml
 - Odporúčané uchovávanie v chladničke
4. 0,5 M Tris – HCl pufer, pH 6,8
 - Odvážiť 6 g Trisu
 - Pridať 75 ml redestilovanej vody a rozpustiť pomocou miešania
 - Upraviť pH na pH – metre pomocou 4 M HCl (približne 7 – 8 ml)
 - Doplniť v odmernej banke na 100 ml
 - Odporúčané uchovávanie v chladničke
5. 10 % SDS
 - Odvážiť 10 g SDS
 - Rozpustiť v 80 ml redestilovanej vody
 - Doplniť v odmernej banke na 100 ml

- Skladovať pri laboratórnej teplote

6. Koncentrovaný elektródový pufer

- Odvážiť 72 g glycínu, 15 g Trisu, 5 g SDS
- Rozpustiť v 900 ml redestilovanej vody
- Upraviť na pH metru na pH 8,3 s pomocou 4 M HCl
- Doplniť v odmernej banke do 1000 ml
- Rozdeliť po 100 ml do plastových nádob a zamraziť

7. Izobutanol

- Zmiešať čistý izobutanol s redestilovanou vodou
- V hornej vrstve sa nachádza izobutanol nasýtený vodou
- Odporúčané uchovávanie v chladničke

8. 10 % APS

- 25 mg persíranu amonného sa rozpustí v 250 μ l redestilovanej vody
- Pripravuje sa krátko pred použitím

9. Elektródový pufer

- Zmieša sa 70 ml zásobného elektrodového pufru s 280 ml redestilovanej vody

Príprava gélov: práca musí prebiehať v rukaviciach. Postupne si pripravíme všetky pomôcky, ktoré sa týkajú prípravy gélov. Sklá a hrebene je dôležité pred používaním, ako aj po používaní umyť saponátom, opláchnuť redestilovanou vodou a lihomethanolom. Sklá k sebe pripevníme použitím parafilmu, podložíme na gumovú podložku a sponami zopneme do stojana. Nasleduje príprava spodného gélu, zmiešame všetky komponenty zobrazené v tabuľke 13 a opatrne pomaly ho nalievame pipetou medzi sklá do výšky približne 4,5 cm od sponého okraja. Na spodný gél pipetou prilievame izobutanol, v množstve zhruba 300 μ l. Izobutanol nevysúša, odstraňuje bubliny a vyrovnáva povrch spodného gélu. Takto pripravený spodný gél s izobutanolom necháme polymerovať po dobu približne 30 – 60 minút.

Po uplynutí tejto doby, zlejeme izobutanol a sklá vysušíme filtračným papierom, ktorý sa nesmie dotknúť gélu. Podľa tabuľky 14 pripravujeme horný gél, premiešame všetky zložky a pipetou nalievame vrchný gél na spodný gél až po horný okraj. Do vrchného gélu vložíme hrebeň až po drážky. Polymerácia vrchného gélu trvá približne 30 minút. V prípade pokračovania v práci nasledujúci deň môžeme gél nechať v stojane v chladničke.

Tabuľka 13 Separáčny gél (spodný)

Zloženie	12,5 % - 2 gély, 1,5 mm
Redestilovaná voda	8,55 ml
Pufer 1,5 M Tris – HCl pH 8,8	5 ml
40 % roztok AA + bisAA	6,25 ml
10 % SDS	0,2 ml
Priebeh iniciácie polymerácie	
Roztok APS	200 μ l
TEMED (používať digestor)	16 μ l

Tabuľka 14 Zaoštrovací gél 4 % (horný)

Zloženie	2 gély, 1,5 mm
Redestilovaná voda	6,42 ml
Pufer 0,5 M Tris – HCl pH 6,8	2,5 ml
40 % roztok AA + bisAA	0,98 ml
10 % SDS	0,1 ml
Priebeh iniciácie polymerácie	
Roztok APS	200 µl
TEMED (používať digestor)	16 µl

4.2.3.3 Priebeh elektroforézy

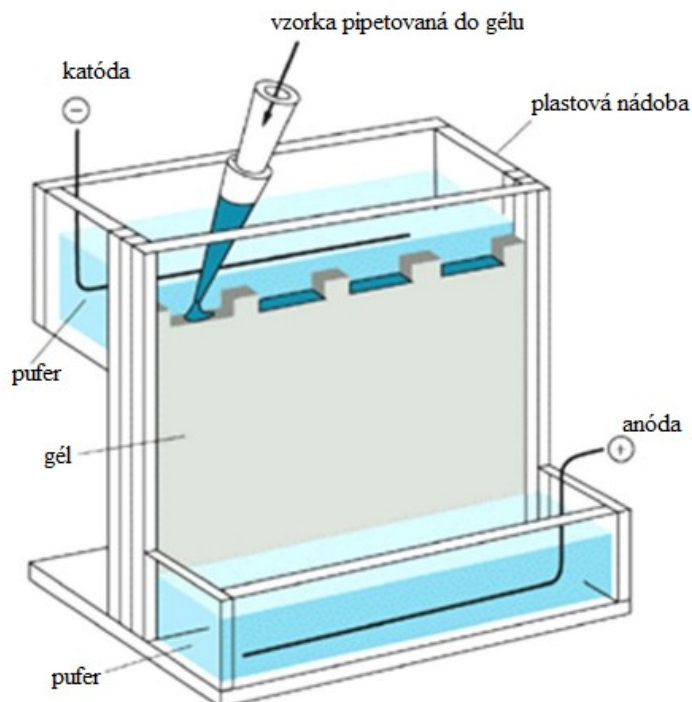
Princíp elektroforézy spočíva v separácii, identifikácii a pufikácii proteínov. Separácia sa uskutočňuje vďaka rôznym pohybom proteínov v jednosmernom elektrickom poli. Proteíny po aplikácii do separačného gélu a zapojení prúdu putujú ku kladnej elektróde (anóde). Ich rýchlosť závisí na ich veľkosti a konformácii, teda priestorovému usporiadaniu, je im priamo úmerná. Vznik polyakrylamidového gélu (PAG) je založený na polymerácii akrylamidu a bisakrylamidu za prítomnosti persulfátu amonného, ktorý predstavuje zdroj voľných radikálov, a tetrametyléndiaminu, jeho úlohou je stabilizovať radikálovú reakciu. Výhodou polyakrylamidových gélov je schopnosť rozlišovať fragmenty proteínov, ktoré môžu byť rozdielne aj o jednu aminokyselinu (Beránek, 2016).

Stanovovali sme markery srdcového poškodenia, troponín T a troponín I. Ako referenčný proteín sme použili Pan Aktín. Vzorok sa musia pred elektroforézou zahriať v predhriatom termobloku po dobu 5 minút pri 95 °C. Gély v skle je nutné opláchnuť pod vodou a vybrať z nich hrebeň. Pripravili sme stojan na elektroforézu, skla s gélom sme pritlačili z každej strany na tesnenie, vnútornú časť sme vložili do vonkajšej časti stojanu na elektroforézu a pritiahli sponami. Celý stojan aj s gélmi sme vložili do vaničky s ľadom. Elektrodový pufer sme naliali do vnútorného elektrodového priestoru, v množstve približne 125 ml, musí byť ponorený celý gél. Pufer nesmie pretekať. Do

vnútornej časti elektroforetickej aparatúry sme naliali nový elektrodový pufer. Do vonkajšej časti elektrodového priestoru sme naliali elektrodový pufer, ktorý nemusí byť nový, môže sa používať opakovane, jeho hladina musí byť nad drôtikom, ide približne o 200 ml. Pipetou so špeciálnymi špičkami sme do každej jamky naniesli 25 μ l vzorky, ktorý obsahuje 25 μ g proteínu. Jedna jamka obsahovala 5 μ l molekulového štandardu. Posledná krajná jamka bola určená pre 1 x SDS pufer zriedený vodou, posledná jamka by nemala ostať prázdna, využíva sa na to, aby proteíny v elektroforéze neputovali šikmo (viď. Obrázok 8).

Takto poskládanú elektroforetickú aparatúru sme po zakrytí vekom pripojili ku zdroji. Nastavili sme konštantné napätie 90 V a spustili. Po prestupe do separačného gélu zo zaostrovacieho, môžeme zvýšiť napätie na 150 V. Ak sa čelo vzoriek presunie až na spodný okraj gélu môžeme vypnúť zdroj.

Rozložíme aparatúru, stojan vyberieme z vaničky, elektrodový pufer z vnútornej časti sa vylieva do výlevky a elektrodový pufer z vonkajšej časti sa uchováva na ďalšie použitie. Vyberieme skla s gélom, roztvoríme sklá a odrežeme gél od spacerov a celú časť zaostrovacieho gélu, zo separačného gélu je potrebné odrezat' spodnú časť s modrým farbivom.



Obrázok 8 Zostavenie elektroforézy, nanášanie vzoriek (Hartfelder a kol. 2013)

4.2.3.4 Imunobloting

Princíp imunoblotingu spočíva vo využití protilátok alebo iných ligandov na identifikáciu cieľových proteínov, ktoré sa môžu nachádzať v zmesi s ďalšími proteínmi. Identifikácia týchto proteínov prebieha vďaka spojeniu protilátky s antigénom (Beránek, 2016).

Nitrocelulózo­vá membrána je priepustná pre pufer vďaka kapilárnym silám a slúži na zachytávanie všetkých proteínov. Pri správnom zostavení aparatury membrána presne kopíruje výsledok elektroforézy proteínov (Beránek, 2016).

Imunobloting nasleduje hneď po elektroforéze. Pri práci je nutné používať rukavice, ako zásobný roztok sa využíva blotovací pufer.

Zásobné roztoky:

1. Blotovací pufer

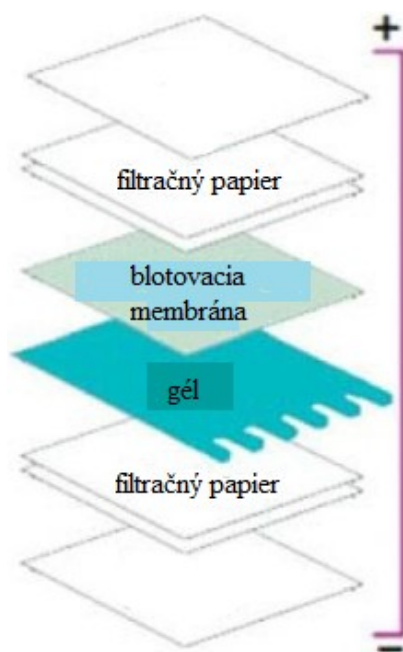
- Navážiť 6,06 g TRIS (25 mM), 28,8 g glycínu (192 mM)
- Rozpustiť v približne 500 ml redistilovanej vody
- Pridať 400 ml methanolu
- Doplniť v odmernej banke do 2000 ml
- Preliat' do 1000 ml fľaše
- Odporúčané uchovávanie v chladničke

Do pripravených plastových nádob, ktoré obsahovali blotovací pufer sme vložili separačný gél, do ďalších plastových nádob s blotovacím pufrom sme ponorili nitrocelulózo­vu membránu a hrubý filtračný papier. Pre jeden gél sa využívajú dva kusy filtračného papiera. Pred ponorením membrány a filtračných papierov do pufru bolo potrebné ich nastrihať podľa rozmerov gélu. Takto sa všetky tieto zložky imunoblotingu inkubovali v blotovacom pufre po dobu 20 minút.

Na blotovanie sme využili blotovaciu kazetu prístroja Bio Trans Blot Turbo. Do blotovacej kazety sa ukladá najprv jeden filtračný papier, na ňo sa uloží membrána, nasleduje gél, ktorý je potrebné rukami uhladiť, aby medzi membránou a gélom neboli žiadne bubliny a nakoniec druhý filtračný papier, ktorý je tiež nutné kvôli bublinám

uhľadiť rukami, bubliny by mohli rušit' proces prenosu (vid'. Obrázok 9). Takýto spôsob ukladania zložiek imunoblotingu je dôležitý, pretože prúd smeruje zhora smerom dole, a tak dôjde k prenosu separovaných proteínov z gélu na membránu. Blotovacia kazeta sa vloží do zásuvky a spustí sa prístroj, blotovanie prebieha po dobu 20 minút.

Po skončení sa znovu vyberie blotovacia kazeta a opatrne sa nadvihne filtračný papier s gélom a skontroluje sa, či sa farba z markeru preniesla na membránu. Na membránu je vhodné si vyznačiť najvýraznejšie pružky markeru, to sú hlavne 25, 50 a 75 kDa, prípadne ešte 37 kDa.



Obrázok 9 Usporiadanie imunoblotingu (Mahmood a kol. 2012)

4.2.3.5 Detekcia proteínov

Zásobné roztoky:

1. 0,1 M TRIS pufer, pH 8,0
 - Odvážit' 12,11 g TRIS
 - Toto množstvo rozpustiť v 800 ml redistilovanej vody
 - Upraviť pH na 8,0 s pomocou 4 M HCl
 - Doplniť redistilovanou vodou v odmernej banke do 1000 ml
 - Odporúčané uchovávanie v chladničke

2. TBST

- Odvážiť 8,77 g NaCl
 - Rozpustiť v približne 300 ml redestilovanej vody
 - Pridať 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufre, pH 8,0
 - Doplniť redestilovanou vodou v odmernej banke do 1000 ml
 - Odporúčané uchovávanie v chladničke
3. Primárna protilátka: zásobná protilátka sa musí nariediť v pomere 1 : 2 000 pomocou 2 % roztoku BSA alebo mlieka v TBST pufre. Pre potrebné množstvo 15 ml riedenej protilátky pipetujeme 7,5 μ l zásobnej protilátky a 15 ml 2 % roztoku BSA.
4. Sekundárna protilátka: zásobná protilátka sa musí nariediť 2 % roztokom BSA alebo mlieka, podľa odporučaní výrobcov.

Princíp detekcie spočíva v reakcii primárnej protilátky s proteínmi, a tiež v reakcii primárnej protilátky so sekundárnou protilátkou.

Membránu po imunoblotingu je nutné trikrát opláchnuť redestilovanou vodou. Po oplachovaní sa membrána, ktorú sme si nastrihali, inkubuje vo falkonkách, do ktorých sa naleje 5 % roztok mlieka v TBST pufre. Blokované prebieha za neustáleho premiešavania v kývačke po dobu 2 hodín. Po uplynutí tejto doby sa mlieko zleje, membrána opláchnie redestilovanou vodou. Ďalším krokom je inkubácia membrány s primárnou protilátkou. Inkubácia prebieha v tých istých falkonkách. Inkubácia s primárnou protilátkou prebieha cez noc, protilátka sa musí naviazať na požadovaný proteín.

Na druhý deň sa zlejú primárne protilátky späť do falkoniek pre opakované použitie a nasleduje oplachovanie membrány TBST pufrom štyrikrát po dobu 10 minút. Po tomto kroku sa membrána nechá inkubovať so sekundárnou protilátkou počas 1 hodiny. Po uplynutí tejto doby sa znovu oplachuje membrána TBST pufrom štyrikrát po dobu 10 minút.

Nasledovala vizualizácia, používa sa Amesham ECL Prime Western Blotting detekčné činidlo. Na jeho prípravu bolo potrebné zmiešať roztok A (luminol solution) a B (peroxide solution) z detekčného systému v pomere 1 : 1. Na vizualizáciu sa použil detekčný prístroj ChemiDoc MP Imaging System, BioRad. Membrána sa vložila do toho prístroja, pipetou sa na ňu namiesol zmiešaný detekčný roztok, prebehla päť minútová inkubácia. Membrána sa potom prikryla fóliou, prístroj sa zavrel a spustil. Takto prebehla vizualizácia každej nastrihanej membrány.

4.2.4 Vyhodnotie dát

Dáta, ktoré sme získali metódou qPCR boli hodnotené v programe Excel. Následne prebehlo ich štatistické vyhodnotenie doc. Ing. Petrou Matouškovou, Ph.D., pomocou programu GraphPad Prism v8 (GraphPad Software, Inc.) a na základe neparametrického testu Kruskal-Wallis test a potom Dunn's *post hoc* testu. Dáta pri $P < 0,05$ boli považované za štatisticky významné.

5. VÝSLEDKY

Táto diplomová práca je zameraná na sledovanie zmien miRNA v srdciach a plazme myší, ktoré boli vystavené kardiotoxickému účinku DOX. Zmeny hladín expresie miRNA boli zmerané pomocou metódy qPCR. Vzorky srdca a plazmy museli byť najprv podrobené izolácií RNA, ošetrovaní DNazou a reverznej transkripcii.

Druhá časť práce je zameraná na sledovanie hladín koncentrácie proteínových markerov poškodenia srdca. Vo vzorkách srdca myší, ktoré boli ovplyvnené DOX sa sledoval troponín T a troponín I pomocou imunoblotingu. Takisto koncentrácie troponínu T boli zmerané aj v plazme myší.

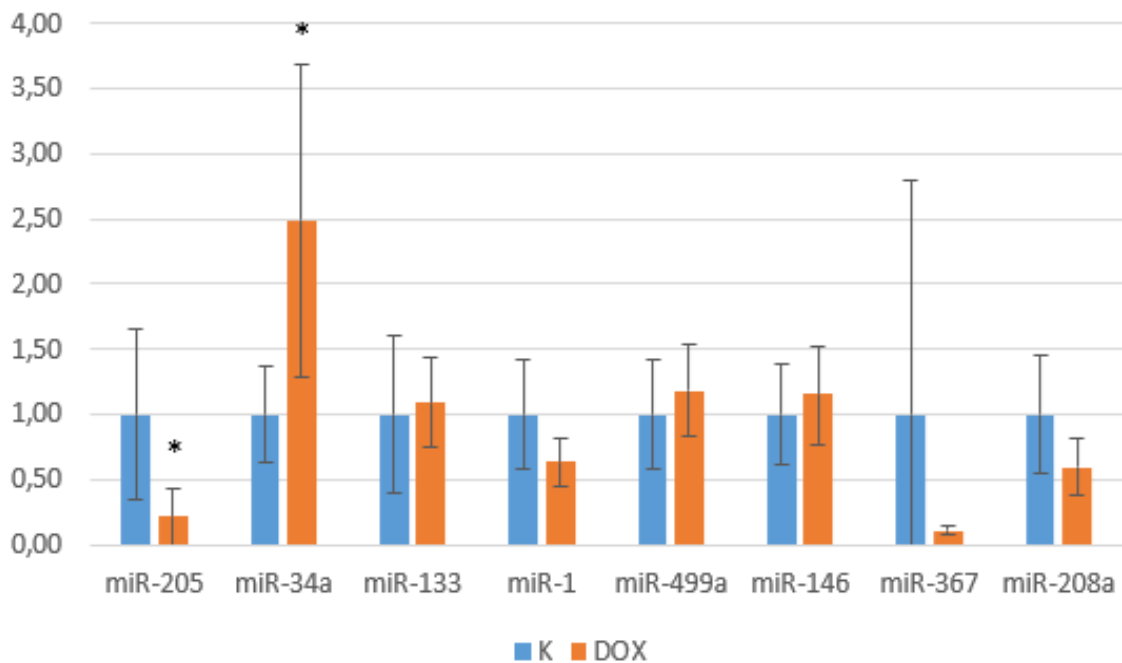
5.1 Pozorovanie expresie mikroRNA

5.1.1 Pozorovanie expresie mikroRNA v srdciach myší pomocou qPCR

Vzorky srdca myší boli použité k detekcii vybraných mikroRNA. Ako kontrolná mikroRNA sa pri vzorkách srdca myší použila miR-16. Sledovanie zmien hladín expresie mikroRNA prebiehalo vo vzorkách kontrolných a vo vzorkách ovplyvnených DOX. V kapitole 4.2.1. je opísaná príprava vzoriek zo srdca myší. Princíp použitej metódy qPCR bol spomenutý v kapitole 4.2.1.5.

V tomto hodnotení výsledkov bola využitá relatívna kvantifikácia. Hodnoty hladín expresie miRNA sa počítali pomocou Ct, ktorá je používaná v metóde qPCR. Ct je hodnota, v ktorej sa fluorescencia pretína s líniou detekcie. Ako bolo spomínané platí, že čím má Ct nižšiu hodnotu, tým viac množstva cDNA sa vo vzorkách vyskytuje. Kontrolná miR-16 bola použitá ako vnútorný štandard, ktorý neovplyvňuje žiadne iné faktory, jeho hodnoty sú stále. Pomocou tohto vnútorného štandardu boli určené hladiny ostatných miRNA. Výsledok sa počíta pomocou rovnice $2^{-\Delta Ct}$, ΔCt sa vypočíta ako rozdiel Ct zisťovaných génov a Ct referenčného génu.

Všetky výsledné hodnoty hladín expresie miRNA zo vzoriek srdca boli zavedené do grafu (viď. Obrázok 10). Porovnávané boli vzorky kontrolné aj vzorky ovplyvnené DOX, hviezdikou sú vyznačené štatisticky významné zmeny expresií. V tomto grafe bolo signifikantne zvýšené miR-34 a naopak signifikantne znížené miR-205. Ostatné testované miRNA neboli zmenené.



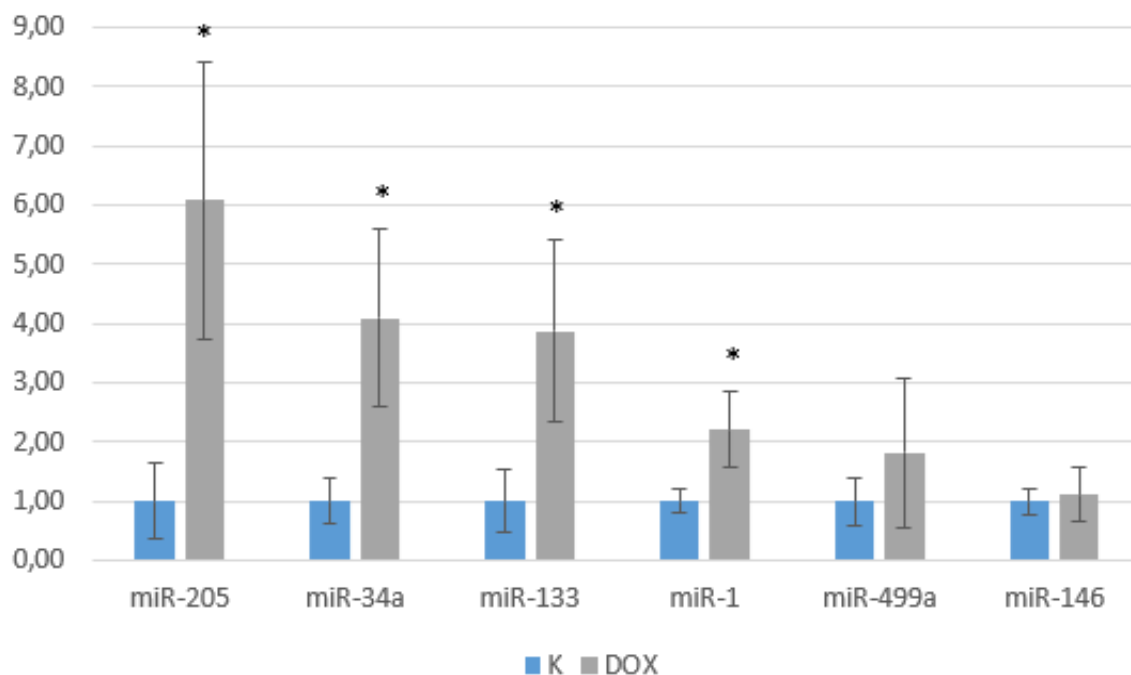
Obrázok 10 Expresia vybraných mikroRNA zo srdca myši

DOX – vzorky srdca myši ovplyvnené doxorubicínom, K – kontrolné vzorky srdca myši, označenie * - štatisticky signifikantné zmeny $P < 0,05$

5.1.2 Pozorovanie expresie mikroRNA v plazme myši pomocou qPCR

Stanovenie expresie vybraných mikroRNA plazme myši prebiehalo vo vzorkách kontrolných a vo vzorkách ovplyvnených DOX. Postup prípravy vzoriek z plazmy myši bol opísaný v kapitole 4.2.2. Princíp použitej metódy qPCR bol spomenutý v kapitole 4.2.1.5. Ako kontroly slúžili miR-16 a *C. elegans* miR-39.

Všetky hodnoty vzoriek ovplyvnených DOX a kontrolných vzoriek boli spracované v obrázku (viď. Obrázok 11). Štatisticky signifikantné zmeny sú v grafe označené hviezdíčkou. Významné zvýšenie hladín génovej expresie nastalo u vzoriek miR-205, miR-34a, miR-133 a aj miR-1. Výskyt miR-367 a miR-208a, ktoré boli tiež testované, vykazujú hodnoty pod hranicu detekcie.



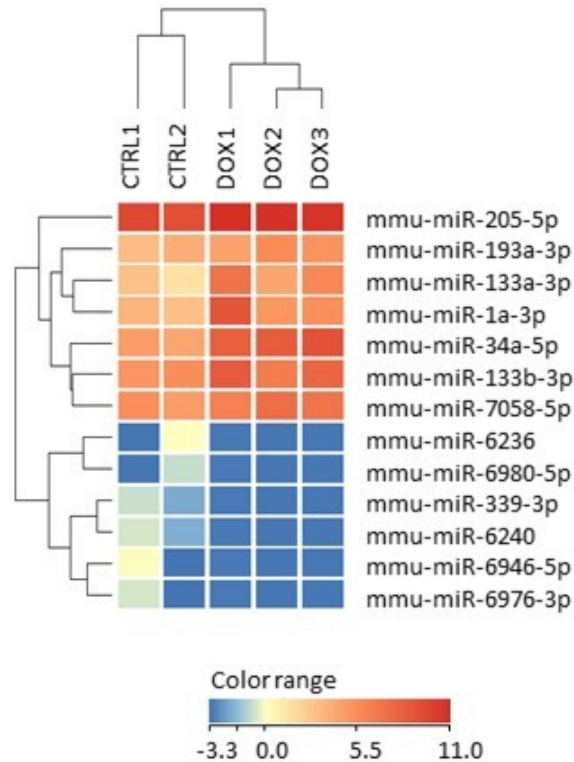
Obrázok 11 Expresia vybraných mikroRNA z plazmy myší

DOX – vzorky plazmy myší ovplyvnené doxorubicínom, K – kontrolné vzorky plazmy myší, označenie * - štatisticky signifikantné zmeny $P < 0,05$

5.1.3 Pozorovanie expresie mikroRNA v plazme myší pomocou microarray

Významné výsledky hodnôt expresie mikroRNA v plazme myší nám poskytla najprv technológia microarray. Výsledky sme získali s pomocou Státného zdravotného ústavu. Použitím čipu (SurePrint G3 Mouse miRNA Microarrays (8×60k, Release 21.0, Design ID 070155; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) sa vyšetřovali zmeny expresie kontrolných vzoriek a aj vzoriek ovplyvnených DOX, získaných z plazmy myší.

Na obrázku 12 môžeme vidieť vybrané zmenené hodnoty, ktoré boli overené metódou qPCR v plazme, napríklad u miR-133a, miR-133b alebo aj u miR-1.



Obrázok 12 Prehľad zmien expresie miRNA z plazmy myší

DOX – vzorky plazmy myší ovplyvnené doxorubicínom, CTRL – kontrolné vzorky plazmy myší

5.2 Pozorovanie hladín troponínu T a troponínu I

5.2.1 Pozorovanie zmien troponínu T v plazme myší

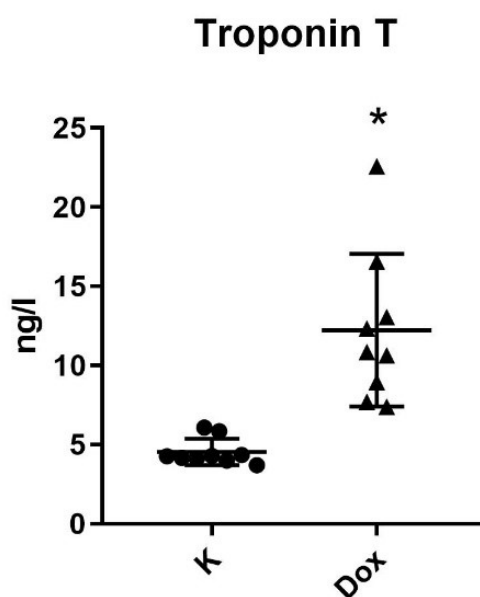
Troponín T je dôležitý marker poškodenia srdca. Zmerané hladiny troponínu T zobrazuje tabuľka 15. Hladina troponínu T bola priemerovaná zo získaných hodnôt troponínu T z plazmy myší z kontrolných vzoriek a vzoriek ovplyvnených DOX.

Koncentrácie troponínu T boli zmerané Ústavom klinickej biochémie a diagnostiky vo fakultnej nemocnici v Hradci Králové.

Tabuľka 15 Priemerné hladiny troponínu T v plazme myší

	K	DOX
Hladina troponínu T	4,53 ng/l	12,23 ng/l
Smerodajná odchýlka	0,79	4,54

Vzorky, ktoré boli použité pri zisťovaní hodnoty troponínu T v plazme myší, a ktoré boli rozdelené na kontrolné vzorky a na vzorky ovplyvnené DOX sú zobrazené v obrázku 13. Z obrázka vyplýva, že väčšia variabilita u vzoriek ovplyvnených DOX môže byť spôsobená rôznou reakciou myší na DOX.



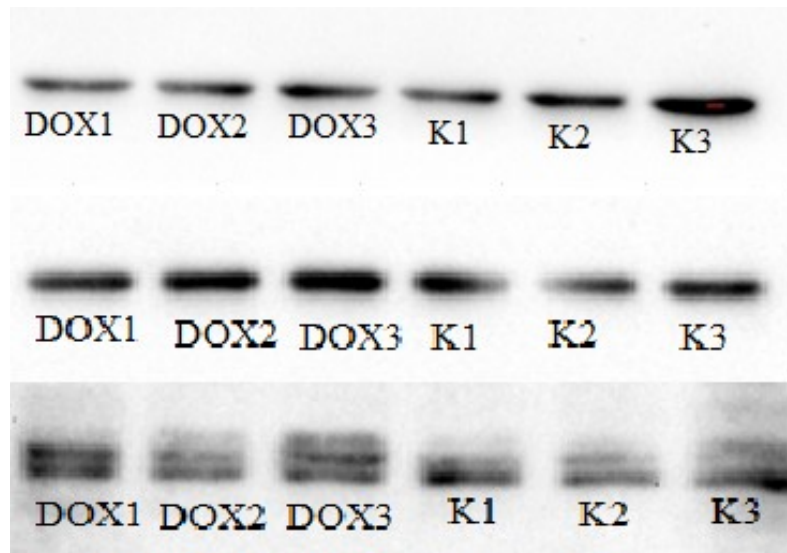
Obrázok 13 Hodnoty troponínu T vo vzorkách plazmy myší

DOX – vzorky plazmy myší ovplyvnené doxorubicínom, K – kontrolné vzorky plazmy myší, označenie * - štatisticky signifikantné zmeny $P < 0,05$

5.2.2 Pozorovanie zmien troponínu T a troponínu I v srdciach myší

Detekcia troponínov prebiehala od elektroforézy po imunobloting. Pomocou protilátok a detekčného činidla prebehla detekcia a kvantifikácia proteínov prenesených z gélu na nitrocelulóзовú membránu. Podrobný postup a princíp metód je už spomenutý

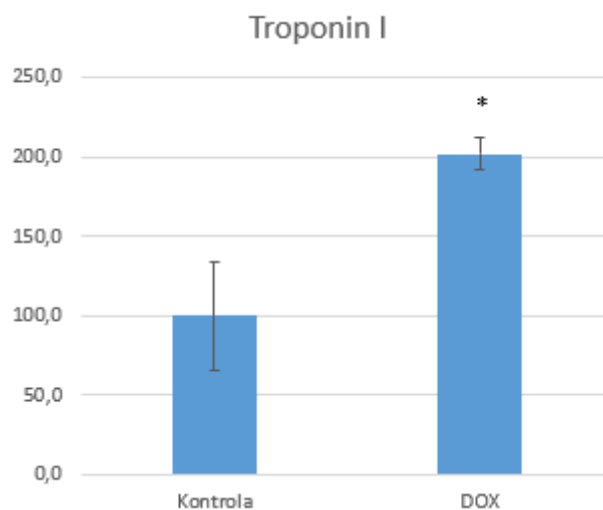
v kapitole 4.2.3. Proteíny, teda troponíny pochádzali zo srdcového tkaniva myší. Troponín T a troponín I boli stanovované vo vzorkách kontrolných a vo vzorkách ovplyvnených DOX. Na relatívnu kvantifikáciu, a teda ako referenčný proteín bol použitý Pan Aktín. Detekcia prítomných proteínov vo vzorkách kontrolných a vo vzorkách ovplyvnených DOX je zobrazená na obrázku 14.



**Obrázok 14 Výsledok imunoblotingu Pan Aktínu, Troponínu I a Troponínu T
(zhora nadol)**

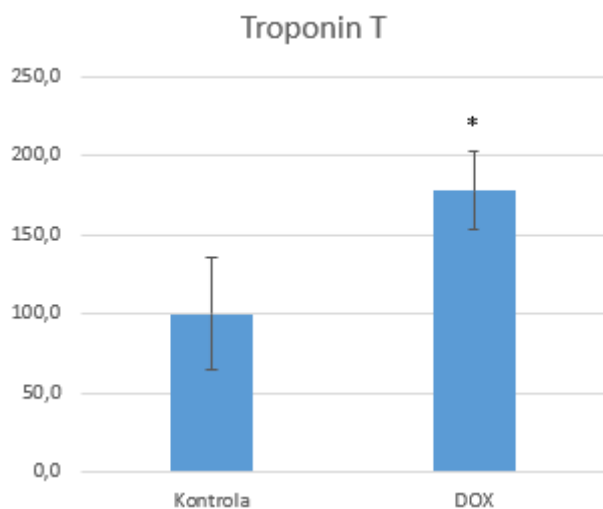
Priemer vyhodnotenia denzity detekovaných proteínov odpovedajúci koncentrácií troponínu I vo vzorkách kontrolných a vzorkách ovplyvnených DOX zobrazuje graf (viď. Obrázok 15). Vzorky ovplyvnené DOX majú signifikantne vyššie hodnoty troponínu I ako vzorky kontrolné.

Rovnako ako vo výsledkoch troponínu I, tak aj zmeranie hladín koncentrácií troponínu T vo vzorkách kontrolných a vzorkách ovplyvnených DOX, zobrazilo vyššie hodnoty troponínu T vo vzorkách ovplyvnených DOX, ako vo vzorkách kontrolných (viď. Obrázok 16).



Obrázok 15 Hladiny troponínu I v kontrolných vzorkách a vzorkách ovplyvnených DOX

DOX – vzorky srdce myši ovplyvnené doxorubicínom, K – kontrolné vzorky srdce myši, označenie * - štatisticky signifikantné zmeny $P < 0,05$



Obrázok 16 Hladiny troponínu T v kontrolných vzorkách a vzorkách ovplyvnených DOX

DOX – vzorky srdce myši ovplyvnené doxorubicínom, K – kontrolné vzorky srdce myši, označenie * - štatisticky signifikantné zmeny $P < 0,05$

6. DISKUSIA

Ochorenia srdca patria medzi závažné civilizačné ochorenia. V tejto práci sa skúma vplyv užívania liečiv, určených na liečbu nádorových ochorení, na poškodzovanie srdca. Rovnako ako pri niektorých iných ochoreniach, tak aj pri ochoreniach srdca je veľmi dôležitá včasná diagnostika a zahájenie liečby.

Táto diplomová práca je zameraná na nové potencionálne diagnostické markery, mikroRNA. Tieto krátke nekódujúce úseky RNA majú mnoho rôznych funkcií, podieľajú sa na vývoji, proliferácií, diferenciácií, regulácií, či apoptóze. Cirkulujú v krvi, odolávajú vysokým teplotám, extrémnemu pH, sú citlivé, špecifické, prognostické, diagnostické, ľahko sa kvantifikujú, rýchlo zachytia rôzne ochorenia. Na ich odber sa využívajú neinvazívne metódy, a tak sa považujú za nové, pravdepodobne vhodné markery ochorenia srdca. Sú predmetom mnohých štúdií a ich využitie musí byť naďalej skúmané.

V tejto práci bolo pozorované liečivo doxorubicín, ktoré sa využíva na liečbu nádorových ochorení, ale jeho nežiadúcim účinkom je vznik kardiotoxicity. Prognóza vzniku poškodenia srdca závisí na jej včasnom odhalení, a tak sú mnohé výskumy zamerané na miRNA, ako potencionálne vyhovujúce biomarkery poškodenia srdca. Na výskum boli použité myši, ktorým sa podával DOX a druhú skupinu tvorili myši, ktoré neboli ovplyvňované DOX. Následne sa z nich vyzolovali srdcové tkanivá a odobrala sa plazma.

V prvej časti práce sme skúmali hladiny vybraných mikroRNA pomocou metódy qPCR. Sledovali sme tieto mikroRNA: miR-205, miR-34a, miR-133, miR-1, miR-146, miR-499, miR-367 a miR-208a.

Naše výsledky poukazujú na vyššie hladiny miR-133 a miR-1 v plazme myší vo vzorkách ovplyvnených DOX oproti vzorkám kontrolným. Vyššiu hodnotu týchto mikroRNA potvrdili aj výsledky získané technikou microarray. V štúdií podľa Wang a jeho kolektívu sa takisto potvrdili zvýšené hladiny expresie týchto mikroRNA (Wang a kol. 2010).

Hladiny expresie miR-34a boli v našej štúdií zvýšené aj v plazme aj v srdcových tkanivách myší. Táto mikroRNA vykazovala vyššie hodnoty aj vo výsledkoch

poskytnutých technikou microarray. A taktiež vysoké hodnoty miR-34a potvrdila aj štúdia, ktorá skúmala plazmu a srdcia myší (Gioffré a kol. 2019).

Hladiny expresie miR-146 v našich vzorkách srdca a plazmy myší neboli zvýšené, potvrdili to aj výsledky získane pomocou microarray. Avšak v štúdií, kde sa skúmala plazma pacientov, ktorí užívali DOX, sa zistili zvýšené hladiny miR-146 (D'Alessandra, Y. 2017).

Sledovanie miR-205 v našich vzorkách poukázalo na zvýšené expresie tejto mikroRNA v plazme myší ale naopak jej hladiny boli znížené v srdciach myší. Zvýšenie hladín miR-205 potvrdili aj výsledky plazmy získané z čipu. Toto zistenie by bolo vhodné ďalej preskúmať, pretože môže ísť o zvýšenie tejto mikroRNA v plazme v dôsledku jej vyliatia zo srdcového tkaniva v dôsledku poškodenia srdcového tkaniva alebo cieľným exportom do krvného riečišťa.

V štúdií podľa Corstena a jeho kolektívu vyšli zvýšené hodnoty expresie miR-499, miR-367, miR-208a v plazme pacientov (Corsten a kol. 2010). Ďalšia štúdia potvrdila výsledok predchádzajúcej štúdie zvýšenými hodnotami miR-499 v plazme pacientov s AIM (Adachi a kol. 2010). Štúdia podľa Wanga a jeho kolektívu potvrdila výsledky štúdie Corsten, obe tieto štúdie mali zvýšené hladiny miR-208a v plazme pacientov (Wang a kol. 2010, Corsten a kol. 2010). Avšak štúdia podľa D'Alessandra poukázala na nízke hodnoty expresie miR-208a v plazme pacientov (D'Alessandra a kol. 2010). Naše výsledky zvýšené hladiny v srdci ani v plazme myší posôbením DOX nepotvrdili. Ďalej miR-208a a rovnako aj miR-367 boli v plazme myší pod hranicou detekcie.

Okrem mikroRNA sme sa v experimentálnej časti práce zamerali aj na proteíny, troponíny. Troponíny sú považované za tradičné markery poškodenia srdca. Ako bolo spomínané v teoretickej časti medzi výhody týchto proteínov patria hlavne skúsenosti s ich používaním a ich overená účinnosť. Vyznačujú sa aj negatívnymi vlastnosťami, ako sú napríklad nízka senzitivita a špecifita, krátky polčas rozpadu, neskorá detekcia, ktorá môže spôsobiť rýchlejší vývoj ochorenia a invazívnosťou ich odberu.

Zisťovanie hladín troponínu T a troponínu I pomocou imunoblotingu, v srdcových tkanivách myší v našich vzorkách, ktoré boli ovplyvnené DOX, poukázalo na ich zvýšené hladiny, oproti vzorkám kontrolným. Hladiny troponínu T boli zvýšené aj vo

vzorkách plazmy myší ovplyvnených DOX, ktoré nám boli zmerané na UKBD vo FNHK.

V štúdiu, kde sa pozorovali hladiny troponínov zvierat liečených antracyklínmi zistili, že troponín I je citlivejší na nižšie hladiny antracyklínov ako troponín T (Wang a kol. 2017). Ďalšia štúdia, ktorá pozorovala hladiny troponínu I a hladiny miR-208a a miR-499, zistila, že tieto biomarkery majú rovnako vysoké hodnoty expresie (Corsten a kol. 2010). Štúdia, v ktorej sa skúmal troponín T a miR-1 u pacientov s akútnym infarktom myokardu, taktiež poukázala na ich rovnako vysoké hladiny expresie. Avšak miR-1 mohli diagnostikovať skôr ako troponín T, keďže troponíny sa v tele človeka uvoľňujú až po patologických zmenách spôsobených počiatočnými štádiami AIM (Li – ming a kol. 2014).

MikroRNA by v budúcnosti mohli byť využité ako potencionálne diagnostické markery pre detekciu kardiotoxicity, nasvedčujú tomu výsledky tejto diplomovej práce a mnohých ďalších experimentálnych prác. Avšak v budúcnosti je ešte nutné overovať mnoho výsledkov, opakovať pokusy, skúšať nové experimenty, a predovšetkým zhromažďovať výsledky meraním klinických vzoriek.

7. ZÁVER

V tejto diplomovej práci sme pozorovali hladiny expície vybraných miRNA vo vzorkách srdca a plazmy myši. Myšiam bol dávkovaný DOX, ktorý patrí medzi antracyklínové antibiotiká.

Zaoberali sme sa týmito miRNA: miR-1, miR-133, miR-205, miR-34a, miR-499a, miR-146, miR-367 a miR-208a vybraných na základe štúdia literatúry a výsledkov hodnotenia hladín mikroRNA v plazme pomocou microarray. Hladiny expície týchto miRNA sa merali metódou qPCR. Výsledky zo vzoriek srdca myši poukázali na štatisticky významne zvýšené hladiny miR-34 a na znížené hladiny miR-205. Štatisticky signifikantné zvýšenie hladín vzoriek z plazmy myši nastalo u miR-205, miR-34a, miR-133, miR-1. Tieto výsledky potvrdili zmeny v hladinách mikroRNA, ktoré boli spracované metódou microarray.

Okrem sledovania hladín vybraných miRNA, sme sa zamerali aj na hladiny klasických markerov poškodenia srdca, troponínov. Vzorky srdca myši, ktoré boli ovplyvnené DOX a kontrolných vzoriek srdca myši, boli spracovávané elektroforézou a imunoblotingom. Hladiny koncentrácie troponínu I a troponínu T boli štatisticky signifikantne zvýšené oproti vzorkám kontrolným. Koncentrácie troponínu T v plazme myši boli rovnako štatisticky významne zvýšené.

8. POUŽITÉ SKRATKY

	VÝZNAM SKRATKY	SLOVENSKÝ VÝZNAM
A	Absorbance	Absorbancia
AA	Acrylamide	Akrylamid
Ago proteín	Argonaute protein	Argonautový proteín
AIM	Acute myocardial infarction	Akútny infarkt myokardu
ANP	Atrial natriuretic peptide	Atriálny natriuretický peptid
APS	Ammonium Persulfate	Persulfát amonný
ATP	Adenosin triphosphate	Adenosíntrifosfát
B	Brain	Mozog
BCA	Bicinchoninic acid	Bicinchonínová kyselina
BNP	Brain natriuretic peptide	Mozgový natriuretický peptid
BSA	Bovine serum albumin	Hovädzí sérový albumín
cDNA	Complementary DNA	Komplementárna DNA
CK	Creatine kinase	Kreatínkináza
CK – BB	Creatine kinase brain band	Kreatínkináza – mozog
CK – MB	Creatine kinase myocardial band	Kreatínkináza – myokard
CK – MM	Creatine kinase muscle band	Kreatínkináza – sval
ct	Cycle threshold	Prahový cyklus

Cu ²⁺	Cuprum	Meď
CuSO ₄	Copper sulfate	Síran meďnatý
ddH ₂ O	Double - distilled water	Redestilovaná voda
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DNR	Daunorubicin	Daunorubicín
DOX	Doxorubicin	Doxorubicín
DTT	Dithiothreitol	Ditiotreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Etyléndiamíntetraoctová kyselina
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid	Etylénglykoltetraoctová kyselina
ELFO	Electrophoresis	Elektroforéza
EPI	Epirubicin	Epirubicín
F primer	Forward primer	Forward primer
FNHK		Fakultní nemocnice Hradec Králové
HCl	Hydrochloric acid	Kyselina chlorovodíková
IDA	Idarubicin	Idarubicín
K/CTRL	Control sample	Kontrolná vzorka
K ₂ EDTA	Dipotassium Ethylenediaminetetraacetic acid	Didraselná soľ kyselina etyléndiamín tetraoctovej
M	Muscle	Sval
miR	MircoRNA	MikroRNA
mRNA	Messenger RNA	Mediátorová RNA
Na ₂ CO ₃	Sodium carbonate	Uhličitan sodný

NADH	Nicotinamideadeninedinucleotide	Nikotínamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamideadeninedinucleotide phosphate	Nikotínamidadeníndinukleotidfosfát
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate	Hydrogénuhličitan sodný
NaOH	Sodium Hydroxide	Hydroxid sodný
NGS	Next-Generation Sequencing	Sekvenovanie novej generácie
NP	Natriuretic peptide	Natriuretické peptidy
NT – pro BNP	N - terminal fragment in the prohormone BNP	N – terminálny fragment prohormónu BNP
PAG	Polyacrylamide gel	Polyakrylamidový gél
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázova reťazová reakcia
pH	Potential of hydrogen	Potenciál vodíku
piRNA	Piwi – interacting RNA	RNA interferujúce s PIWI proteínmy
PIWI	P – element induced wimpy testis in Drosophila	P – elementom indukované wimpy semeníky u Drosophila
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	Fenylmetánsulfonylfluorid
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	Kvantitatívna polymerázova reťazová reakcia
R primer	Reverse primer	Reverse primer
Rn	Emission fluorescence	Záznam floescencie
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RT	Reverse transcriptase	Reverzná transkriptáza

SDS	Sodium dodecyl sulphate	Dodecylsulfát sodný
siRNA	Small – interfering RNA	Malé interferujúce RNA
snRNA	Small nuclear RNA	Nukleárne (jadrové) RNA
TBST	Tris buffered saline with Tween-20	Tris pufrovaný fyziologický roztok s Tween-20
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Tetrametyletyléndiamín
TnC	Troponin C	Troponín C
TnI	Troponin I	Troponín I
TnT	Troponin T	Troponín I
V	Volt	Volt

9. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Prehľad malých nekódujúcich mikroRNA (Novák, 2016).....	18
Tabuľka 2 Výhody a nevýhody tradičných a nových kardiotoxických biomarkerov (Sandhua a kol. 2014).....	23
Tabuľka 3 Prehľad výsledkov z NanoDropu zo srdca myši.....	37
Tabuľka 4 Koncentrácie RNA, výpočet množstva RNA a vody.....	38
Tabuľka 5 Zloženie mastermixu pre miRNA:	39
Tabuľka 6 Zloženie MasterMixu pre PCR reakciu	43
Tabuľka 7 Výsledky koncentrácie a čistoty z NanoDropu z plazmy myši	46
Tabuľka 8 Koncentrácie RNA, výpočet množstva RNA a vody z plazmy myši.....	46
Tabuľka 9 Kalibračná krivka BSA.....	48
Tabuľka 10 Zloženie lyzačného pufu.....	49
Tabuľka 11 Zloženie 4 x SDS.....	50
Tabuľka 12 Množstvo pridavaného SDS ku vzorkám po zmeraní koncentrácie bielkoviny	50
Tabuľka 13 Separačný gél (spodný).....	53
Tabuľka 14 Zaoštrovací gél 4 % (horný)	54
Tabuľka 15 Priemerné hladiny troponínu T v plazme myši.....	64

10. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Štruktúra DOX a DNR (Carvalho a kol. 2009)	13
Obrázok 2 Výskyt mikroRNA v ľudskom tele (Young – Kook, 2015).....	21
Obrázok 3 Množenie produktov PCR (Hakhverdyan, 2015)	40
Obrázok 4 Priebeh PCR (Lui a kol. 2009).....	41
Obrázok 5 Záznam PCR cyklu (Shergill a kol. 2005).....	42
Obrázok 6 Redukcia meďnatých iontov a vznik komplexu meďných iontov s kyselinou bicinchoninovou (Brady a kol. 2015).....	47
Obrázok 7 Kalibračná priamka	48
Obrázok 8 Zostavenie elektroforézy, nanášanie vzoriek (Hartfelder a kol. 2013)	55
Obrázok 9 Usporiadanie imunoblotingu (Mahmood a kol. 2012)	57
Obrázok 10 Expresia vybraných mikroRNA zo srdca myší	61
Obrázok 11 Expresia vybraných mikroRNA z plazmy myší	62
Obrázok 12 Prehľad zmien expresie miRNA z plazmy myší.....	63
Obrázok 13 Hodnoty troponínu T vo vzorkách plazmy myší	64
Obrázok 14 Výsledok imunoblotingu Pan Aktínu, Troponínu I a Troponínu T (zhora nadol).....	65
Obrázok 15 Hladiny troponínu I v kontrolných vzorkách a vzorkách ovplyvnených DOX	66
Obrázok 16 Hladiny troponínu T v kontrolných vzorkách a vzorkách ovplyvnených DOX	66

11. POUŽITÁ LITERATÚRA

ADACHI, T. a kol. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry*, 2010, vol. 56, s. 1183 – 1185.

AI, J. a kol. Circulating microRNA – 1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, vol. 391, s. 73 – 77.

ASHLEY, N. a kol. Mitochondrial DNA is a direct target of anticancer anthracycline drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, vol. 378, s. 450 – 455.

BALA, S. a kol. Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Scientific Reports*, 2015, vol. 5,

BEN – DOV, I. T. a kol. Urine microRNA as potential biomarkers of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: Description of miRNA profiles at baseline. *Public Library of Science ONE*, 2014, vol. 9,

BERÁNEK, M. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 2016. 194 s. ISBN 978 – 80 – 246 – 3224 – 7. Kapitola 7: Elektroforéza nukleových kyselin, s. 52 – 56. Kapitola 9: Hybridizační metody v molekulární genetice, s. 63 – 70.

BERÁNEK, M. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie*. 2013. 197 s. ISBN 978 – 80 – 246 – 2186 – 9. Kapitola 19: Biochemické markery poškození myokardu, s. 129 – 132.

BERRY, G. J. a kol. The International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the Standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody – mediated rejection in heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2013, vol. 32, no. 12, s. 1147 – 1162.

BOX, V. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomycin. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2007, vol. 26, s. 14 – 19.

BRADY, P. N. a kol. Evaluation of Colorimetric Assays for Analyzing Reductively Methylated Proteins: Biases and Mechanistic Insights. *Analytical Biochemistry*, 2015,

- CALLIS, T. E. a kol. MicroRNA - 208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of clinical investigation*, 2009, vol. 119, s. 2772 – 2786.
- CARVALHO, C. a kol. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curret Medicinal Chemistry*, 2009, vol. 16, no.25, s. 3267- 3285.
- CATALANOTTO, C. a kol. MicroRNA in control od gene expression: an overview of nuclear functions. *International journal of molecular sciences*, 2016, vol. 17,
- CORSTEN, M. F. a kol. Circulating microRNA - 208b and microRNA - 499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 2010, vol. 3, s. 499 – 506.
- D’ALESSANDRA, Y. Early diagnosis of doxorubicin-induced cardiotoxicity: The miRNA way. *Cardiovascular Disorders and Medicine*, 2017, vol. 2, s. 1 – 3.
- D’ALESSANDRA, Y. a kol. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *The European Heart Journal*, 2010, vol. 31, s. 2765 – 2773.
- DAOSUKHO, C. a kol. Phenylbutyrate, a histone deacetylase inhibitor, protects against adriamycin – induced cardiac injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, vol. 42, s. 1818 – 1825.
- DJEBALI, S. a kol. Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 2012, vol. 489, s. 101 – 108.
- DUONG VAN HUYEN, J. P. a kol. MicroRNAs as non – invasive biomarkers of heart transplant rejection. *European Heart Journal*, 2014, vol. 35, no. 45, s. 3194 – 3202.
- FICHTLSCHERER, S. a kol. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation Research*, 2010, vol. 107, s. 677 – 684.
- FUKUSHIMA, Y. a kol. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circulation Journal*, 2011, vol. 75, s. 336 – 340.
- GIOFFRÉ, S. a kol. Plasmatic and chamber-specific modulation of cardiac microRNAs in an acute model of DOX-induced cardiotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, vol. 110, s. 1 – 8.

- HAKHVERDYAN, M. Basics of the Polymerase Chain Reaction. *Pedagogic Basic Course*, 2008, s. 1 – 16.
- HARTFELDER, K. a kol. Standard methods for physiology and biochemistry research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 2013, vol. 52, no. 1, s. 1 – 48.
- HEBERT, S. S. a kol. Loss of microRNA cluster miR - 29a / b – 1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1 / beta – secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, vol. 105, no. 17, s. 6415 – 6420.
- HERMAN, E. a kol. A comparison of the cardiovascular actions of daunomycin, adriamycin and N-acetyldaunomycin in hamsters and monkeys. *Pharmacology*, 1971, vol. 6, s. 230 – 241.
- HOEKSTRA, M. a kol. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, vol. 394, s. 792 – 797.
- CHATTERJEE, K. a kol. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology*, 2010, s. 155 – 162.
- CHEN, C. a kol. Plasma microRNA – 361 – 5p as a biomarker of chronic heart failure. *Heart*, 2010, vol. 96,
- CHEN, J. F. a kol. The role of microRNA - 1 and microRNA - 133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*, 2006, vol. 38, s. 228 – 233.
- CHENG, Y. a kol. A translational study of circulating cell - free microRNA - 1 in acute myocardial infarction. *Clinical Science*, 2010, vol. 119, s. 87 – 95.
- JIANG, Q. a kol. MiR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Research*, 2009, vol. 37,
- JOSHI, M. a kol. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2011, vol. 2, no. 1, s. 81 – 97.
- KIM, J. a kol. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*, 2007, vol. 317, s. 1220 – 1224.

- KOZOMARA, A. a kol. MiRbase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, s. 68 – 73.
- LAGOS – QUINTANA, M. a kol. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, vol. 294, s. 853 – 858.
- LAGOS – QUINTANA, M. a kol. Identification of tissue - specific microRNAs from mouse. *Current Biology*, 2002, vol. 12, s. 735 – 739.
- LEE, R. C. a kol. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, vol. 75, no. 5, s. 843 – 854.
- LEFRAK, E. A. a kol. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, 1973, vol. 32, s. 302 – 314.
- LI – MING, L. a kol. Comparison of plasma microRNA – 1 and cardiac troponin T in early diagnosis of patients with acute myocardial infarction. *World Journal of Emergency Medicine*, 2014, vol. 5, no. 3, s. 182 – 186.
- LIU, N. a kol. An intragenic MEF2 - dependent enhancer directs muscle - specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, vol. 104, s. 20844 – 20849.
- LUI, C. a kol. Nucleic Acid – based Detection of Bacterial Pathogens Using Integrated Microfluidic Platform Systems. *Sensors*, 2009, vol. 9, s. 3713 – 3744.
- LUO, X. a kol. Down - regulation of miR – 1 / miR – 133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, s. 20045 – 20052.
- MACFARLANE, L. a kol. MicroRNA: Biogenesis, function and role in cancer. *Current Genomics*, 2010, vol. 11, no. 7, s. 537 – 561.
- MAHMOOD, T. a kol. Western Blot: Technique, Theory and Trouble shooting. *The North American Journal of Medical Sciences*, 2012, vol. 4, no. 9, s. 429 – 434.
- MEDER, B. a kol. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology*, 2011, vol. 106, s. 13 – 23.

MELO, C. a kol. *Non – coding RNAs and cancer*. New York: Springer, 2014. 284 s. ISBN 978 – 1 – 4614 – 8443 – 1. Kapitola 2: Biogenesis and Physiology of MicroRNAs, s. 5 – 24.

MENCIA, A. a kol. Mutations in the seed region of human miR – 96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nature Genetics*, 2009, vol. 41, no. 5, s. 609 – 613.

NOVÁK, J. MikroRNA v kardiologii – přehled pro klinickou praxi. *Kardiologická revue – Interní medicína*, 2016, vol. 18, no. 4, s. 258 – 267.

OFFERMANN, S. a kol. *Encyclopedic of Molecular Pharmacology*. 2. vydanie. Berlin: Springer, 2008. 1505 s. ISBN 978-3-540-38916-3. Anthracyclins, s. 91-95.

PASQUINELLI, A. E. a kol. Conservation of the sequence and temporal expression of let – 7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000, vol. 408, s. 86 – 89.

PERBELLINI, R. a kol. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular Disorders*, 2011, vol. 21, s. 81 – 88.

RABINOWITS, G. a kol. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 2009, vol. 10, s. 42 – 46.

ROTH, C. a kol. Screening for circulating nucleic acids and caspase activity in the peripheral blood as potential diagnostic tools in lung cancer. *Molecular Oncology*, 2011, vol. 5, s. 281 – 291.

SANDHU, H. a kol. Molecular basis of cancer – therapy – induced cardiotoxicity: introducing microRNA biomarkers for early assessment of subclinical myocardial injury. *Clinical Science*, 2014, vol. 126, s. 377 – 400.

SARDAO, V. A. a kol. Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial and cytoskeletal targets. *Cell Biology and Toxicology*, 2008, vol. 25, s. 227 – 243.

SHERGILL, I. a kol. Basic principles of real – time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2005, vol. 5, no. 2, s. 209 – 219.

- SUKMA DEWI, I. a kol. Altered serum miRNA profiles during acute rejection after heart transplantation: potential for non – invasive allograft surveillance. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2013, vol. 32, no. 4, s. 463 – 466.
- SUN, X. a kol. Attenuation of doxorubicin chronic toxicity in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. *Cancer Research*, 2001, vol. 61, s. 3382 – 3387.
- SWAIN, S.M. a kol. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1997, vol. 15, s. 1318 – 1332.
- SWIFT, L. a kol. Doxorubicin - DNA adducts induce a non-topoisomerase II mediated form of cell death. *Cancer Research*, 2006, vol. 66, s. 4863 - 4871.
- TAYLOR, D. D. a kol. MicroRNA signatures of tumor - derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 2008, vol. 110, s. 13 – 21.
- THUM, T. a kol. MicroRNA – 21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 2008, vol. 456, s. 980 – 984.
- TIJSEN, A. J. a kol. MiR423 – 5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circulation Research*, 2010, vol. 106, s. 1035 – 1039-
- TRIONFINI, P. a kol. MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 2015, vol. 11, s. 23 – 33.
- VALADI, H. a kol. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 2007, vol. 9, s. 654 – 659.
- VALADI, H. a kol. Mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 2007, vol. 9, s. 654 – 672.
- VAN ACKER, S. A. a kol. Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. A new model to test potential protectors. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 1996, vol. 38, s. 95 – 101.

VAN ROOIJ, E. a kol. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, vol. 103, s. 18255 – 18260.

VAN ROOIJ, E. a kol. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR – 29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, vol. 105, s. 13027 – 13032.

VAN, R. E. a kol. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental Cell*, 2009, vol. 17, s. 662 – 673.

VAN, R. E. a kol. Control of stress – dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 2007, vol. 316, s. 575 – 579.

VISANI, G. a kol. *Cardiomyopathies From Basic Research to Clinical Managment*. 2012. 814 s. ISBN 978 – 953 – 307 – 834 – 2. Kapitola 27: Anthracycline Cardiotoxicity, s. 621 – 644.

VOELLENKLE, C. a kol. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiological Genomics*, 2010, vol. 42, s. 420 – 426.

VON HOFF, D.D. a kol. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Annals of Internal Medicine*, 1979, vol. 91, s. 710 – 717.

WANG, G. K. a kol. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *The European Heart Journal*, 2010, vol. 31, s. 659 – 666.

WANG, J. a kol. Cardiomyocyte overexpression of miR – 27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. *Cell Research*, 2012, vol. 22, s. 516 – 527.

WANG, J. a kol. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *Journal of Cellular Physiology*, 2016, vol. 231, s. 25 – 30.

WANG, R. a kol. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Internal Medicine*, 2011, vol. 50, s. 1789 – 1795.

- WANG, W. a kol. Early detection of the cardiotoxicity induced by chemotherapy drug through twodimensional speckle tracking echocardiography combined with high – sensitive cardiac troponin T. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2017, vol. 39, s. 835 – 840.
- WIENHOLDS, E. a kol. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 2005, vol. 309, s. 310 – 311.
- YANG, B. a kol. The muscle – specific microRNA miR – 1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature Medicine*, 2010, vol. 13, s. 486 – 491.
- YILMAZ, S. a kol. Protective effect of lycopene on adriamycin – induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 2006, vol. 218, s. 164 – 171.
- YOUNG – KOOK a kol. Extracellular microRNAs as Biomarkers in Human Disease. *Chonnam Medical Journal*, 2015, vol. 51, s. 51 – 57.
- ZHAO, Y. a kol. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA – 1 – 2. *Cell*, 2007, vol. 129, s. 303 – 317.
- ZHAO, Y. a kol. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 2005, vol. 436, s. 214 – 220.
- ZILE, M. R. a kol. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 2011, vol. 4, s. 614 – 619.
- ZOMER, A. a kol. In Vivo imaging reveals extracellular vesiclemediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell*, 2015, vol. 161, s. 1046 - 1057.
- ZORDOKY, B. N. M. a kol. Induction of several cytochrome P450 genes by doxorubicin in H9c2 cells. *Vascular Pharmacology*, 2008, vol. 49, s. 166 – 172.