

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakológie a toxikológie



DIPLOMOVÁ PRÁCA

*Charakterizácia rôznych diferenciačných protokolov H9c2
kardiomyoblastov*

**Characterization of different differentiation protocols of H9c2
cardiomyoblasts**

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Eduard Jirkovský, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Anna Gardianová

Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri písaní čerpala sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové 2023

Anna Gardianová

Podakovanie

Ďakujem svojmu vedúcemu práce PharmDr. Eduardovi Jirkovskému, Ph.D. za odborné vedenie, príjemnú spoluprácu, za cenné rady a pripomienky, za ochotu a poskytnuté materiály v priebehu vypracovávaní mojej diplomovej práce. Rovnako ďakujem mojej konzultantke PharmDr. Anne Jirkovskej, Ph.D. za poskytnuté odborné a cenné rady a návrhy, RNDr. Miloslavovi Macháčkovi, Ph.D. za poskytnutý prístroj a pomôcky k práci v laboratóriu, a Barbore Macákovej za pomoc pri práci v laboratóriu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Anna Gardianová

Školiteľ: PharmDr. Eduard Jirkovský, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Charakterizácia rôznych diferenciacných protokolov H9c2 kardiomyoblastov

Bunková diferenciácia je bežný proces vo vývoji mnohobunkového organizmu, kedy dochádza k zmene bunkového vzhľadu a funkcie. Proces diferenciácie zohráva významnú úlohu aj pri oprave poškodených tkanív. Niektoré chemické látky môžu negatívne ovplyvniť tieto procesy, a tým ovplyvniť i ľudské zdravie.

V tejto práci sme sa zamerali na charakterizáciu procesu diferenciácie bunkovej línie H9c2 použitím rôznych publikovaných diferenciacných protokolov, a popísali v čase zmeny v morfológii (výskyt viacjadrových a predĺžených buniek) a expresii mRNA vybraných markerov typických pre fenotyp srdcového (cTnT, Hand2, GATA4) alebo kostrového (myogenín) svalu. Proces diferenciácie sme sledovali po dobu 15 dní a jednotlivé protokoly sa líšili prídavkom fetálneho hovädzieho séra (FBS, 1 % alebo 10 %) a all-trans-retinovej kyseliny (ATRA, 10 nmol/L) do kultivačného média Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

Z pozorovaných výsledkov môžeme povedať, že všetky použité protokoly viedli k diferenciácii buniek, ktorá sa ale kvantitatívne i kvalitatívne menila a menila sa i v čase. Významný efekt mal tiež vek kultúry. Okrem iného, relatívne homogénna zmena bola pozorovaná v génovej expresii srdcového troponínu T a génu pre myogenín. Efekt sérovej deprivácie sa prejavil hlavne na začiatku diferenciacného procesu (do 9. dňa), neskôr boli pozorované významnejšie zmeny u média s vyššou koncentráciou FBS. S ohľadom na homogenitu získaných výsledkov sme sa rozhodli v budúcich experimentoch zamerať na protokol využívajúci médium s 10% FBS s prídavkom ATRA a všetky zmeny detailne potvrdiť.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Anna Gardianová

Supervisor: PharmDr. Eduard Jirkovský, Ph.D.

Title of diploma thesis: Characterization of different differentiation protocols of H9c2 cardiomyoblasts

Cell differentiation is a common process in the development of multicellular organisms leading to an alteration of cell's appearance and function. The process of differentiation plays a significant role in the reparation of damaged tissues too. Some chemicals may have negative effects on these processes and therefore affect human health.

This thesis focuses on characterization of differentiation processes of H9c2 cell line using various published differentiation protocols, and to describe changes over time in the morphology (occurrence of multinucleated and elongated cells) and mRNA expression of selected markers typical for the cardiac (cTnT, Hand2, GATA4) or skeletal (myogenin) muscle phenotype. We monitored the process of the differentiation for 15 days and the individual protocols differed by the addition of fetal bovine serum (FBS, 1 % or 10 %) and all-trans-retinoic acid (ATRA, 10 nmol/L) to the growth medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

From what we have observed, the results show that all of the utilized protocols led to the cell differentiation that changed quantitatively and qualitatively as well as with time. The age of the culture had an important effect as well. Among others, relatively homogenous change was observed in the cardiac troponin T and for myogenin gene expression. The effect of serum deprivation was manifested mainly at the beginning of the differentiation process (up to the 9th day), later on more changes were observed in the medium with the higher FBS concentration. Regarding the homogeneity of the acquired results, we have decided to focus on the protocol which uses the 10% FBS medium with the addition of ATRA in the future experiments and confirm the changes in detail.

Obsah

1	Zoznam skratiek.....	7
2	Úvod.....	8
3	Teoretická časť	9
3.1	Bunkový cyklus	9
3.1.1	Fázy bunkového cyklu	9
3.2	Regulácia bunkového cyklu.....	11
3.2.1	Kontrolné body bunkového cyklu	13
3.2.2	Tvorba komplexov Cdk s cyklínmi	14
3.3	Bunková diferenciácia	15
3.3.1	Proliferácia a diferenciácia	16
3.3.2	H9c2 potkanie kardiomyoblasty a diferenciácia	18
3.3.3	Diferenciačné markery bunkovej línie H9c2	20
3.3.4	Látky ovplyvňujúce diferenciáciu buniek	21
4	Cieľ diplomovej práce.....	22
5	Experimentálna časť	23
5.1	Biologický materiál	23
5.1.1	Bunková línia H9c2.....	23
5.2	Pasáž buniek a nasadenie na proces diferenciácie.....	23
5.3	Zber buniek – lýza pomocou TRIzol/TRIreagentu®.....	25
5.4	Princíp Real–Time PCR (RT–PCR)	25
5.5	Izolácia RNA zo vzoriek.....	26
5.6	Vyhodnotenie čistoty a kvantifikácia RNA	28
5.7	Prepis RNA do cDNA.....	29
5.8	Real–Time PCR (RT–PCR).....	30
5.9	Štatistická analýza dát	31
6	Výsledky	32

6.1	Porovnanie médií DMEM HG a DMEM LG	32
6.2	Mikroskopické vyhodnotenie morfológie buniek H9c2	33
6.3	Vyhodnotenie relatívnej génovej expresie vybraných markerov a transkripčných faktorov.....	39
6.4	Vplyv pravidelnej výmeny média.....	43
7	Diskusia.....	45
8	Záver	49
9	Zoznam obrázkov.....	50
10	Zoznam tabuliek.....	51
11	Literatúra	52

1 Zoznam skratiek

API	Nuclease-free water
Bb	Bunky
BCP	1-bróm-3-chlórpropán
Cdk	Cyklín-dependentná kináza
DMEM HG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose
DMEM LG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	Fetálne hovädzie sérum
HEPES	(4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazin- N'-(2-etansulfonová kyselina))
PBS	Fosfátový pufrovaný fyziologický roztok
RT-PCR	Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (Real-Time PCR)
SAC	Spindle assembly checkpoint

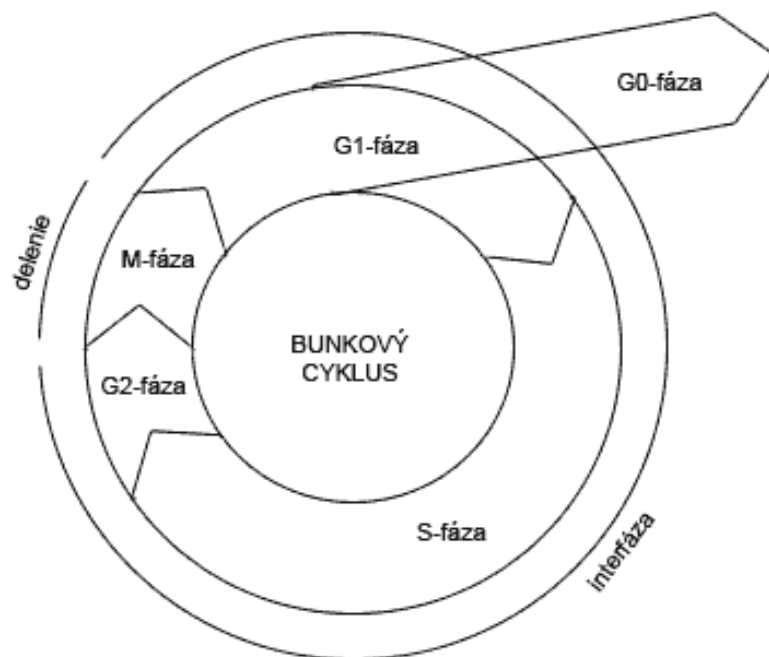
2 Úvod

Bunková diferenciácia je bežný proces, kedy dochádza k zmene bunkového vzhľadu a funkcie. Bunky sa stávajú morfológicky i funkčne špecializovanejšie. Bunky majú rovnaký genóm, ale fenotypovo sa od seba odlišujú. Tento proces je typický pre multipotentné kmeňové bunky, ale môžu diferencovať aj terminálne diferencované bunky, a to vplyvom určitých stimulačných podnetov. Variabilná expresia génov a využitie genetickej informácie sú základnými mechanizmami bunkovej diferenciácie. Podstatou diferenciácie je zapínanie a vypínanie špecifických génov, pôsobením rôznych transkripčných faktorov, pričom sa tu uplatňujú aj epigenetické vplyvy. Proces diferenciácie zohráva významnú úlohu aj pri oprave poškodených tkanív. Niektoré chemické látky môžu negatívne ovplyvniť tieto procesy, a tým ovplyvniť i ľudské zdravie. Aby sme boli schopní takéto látky identifikovať, je potrebné mať vhodný model, na ktorom je možné sledovať zmeny v diferenciácii. Z publikovaných prác je známe, že myoblastová bunková línia H9c2, izolovaná zo srdcového tkaniva potkana, je schopná sa morfológicky diferencovať na fenotyp podobný srdcu alebo fenotyp podobný kostrovému svalstvu, ale medzi jednotlivými výsledkami publikácií sú značné rozdiely. Táto bunková línia je využívaná v rôznych oblastiach kardiovaskulárneho výskumu, vrátane štúdia kardiotoxicity. Bunky diferencované a bunky nediferencované, bunkovej línie H9c2, môžu mať rozdielny metabolizmus a môžu vykazovať rozdielne metabolické zmeny. Diferencované bunky H9c2 môžu byť lepším modelom pre kultivované primárne kardiomyocyty ako nediferencované bunky (Pereira et al. 2011, Repiská et al. 2020).

3 Teoretická časť

3.1 Bunkový cyklus

Cyklus bunky vedie od jedného bunkového delenia k ďalšiemu. Je to synchronizovaný sled udalostí v eukaryotickej bunke, ktorý vedie k následnému rozdeleniu jednej materskej bunky na dve dcérske bunky. Týmto delením sa predpokladá zdvojenie genetického materiálu a ostatných funkčných jednotiek bunky. Výsledkom toho je rozdelenie na viacmenej totožné dcérske bunky. Generačná doba je doba trvania cyklu (Böhmer et al. 2020). Bunkový cyklus má niekoľko fáz. Mikroskopicky ľahko pozorovateľnou hranicou je mitóza. Doba medzi dvoma M-fázami sa nazýva interfáza. Je to obdobie medzi dvoma následnými mitózami. Interfáza zahŕňa niekoľko fáz prípravných, teda pripravuje bunku na samotné delenie. Obr. 1 vyznačuje postupnosť fáz a ilustruje ich relatívne časové trvanie (viď Obr. 1) (Levy et al. 2011).



Obr. 1 Schéma bunkového cyklu eukaryot.

Prevzaté z: BIOpedia (2020)

3.1.1 Fázy bunkového cyklu

Bunkový cyklus je rozdelený na fázu mitózy a interfázu. Vo fáze mitózy dochádza k samotnému deleniu bunky, označuje sa ako M fáza. Niektoré bunky prechádzajú po mitóze do kľudovej fázy nazývanej G0 fáza. Interfáza všeobecne pripravuje bunky na delenie. V interfáze sa bunka nedelí. Jadro a cytoplazma sú v tejto fáze metabolicky aktívne. Bunka metabolizuje, exprimuje

svoje gény, syntetizuje proteíny a zväčšuje svoju veľkosť. Interfáza sa delí na tri fázy: G1 fáza, S fáza a G2 fáza (Otová et al. 2008).

G0 fáza

Je kludová fáza bunky. Bunky z tejto fázy môžu opäť vstupovať do bunkového cyklu po rôznej dlhšej dobe alebo môžu zostať v kludovom stave (Šípek 2010). S touto fázou sa stretávame najmä u diferencovaných buniek. Plne diferencované bunky sa už ďalej nedelia, pretože túto schopnosť stratili, teda ani nevstupujú už do G1 fázy (Alberts 2005).

G1 fáza (postmitotická)

Môže nasledovať po G0 fáze alebo priamo po mitóze. Začína po rozdelení materskej bunky na dve dcérske, kde dcérska bunka získava schopnosť samostatnej existencie. V tejto fáze dochádza k zdvojeniu bunkovej hmoty. Je to prípravná fáza na ďalšie delenie bunky, kde dochádza k syntéze RNA a proteínov, vytvára sa zásoba nukleotidov, syntéza enzýmov potrebných k replikácii DNA, zmnoženie bunkových štruktúr (ribozómy, mitochondrie) a fragmentácia organel (Endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát). G1 fáza končí zahájením replikácie jadrovej DNA. Je tu hlavný kontrolný uzol, ktorý za nevhodných podmienok zastaví bunkový cyklus. Dochádza ku kontrole a opravám DNA (Alberts 2005).

S fáza (syntetická)

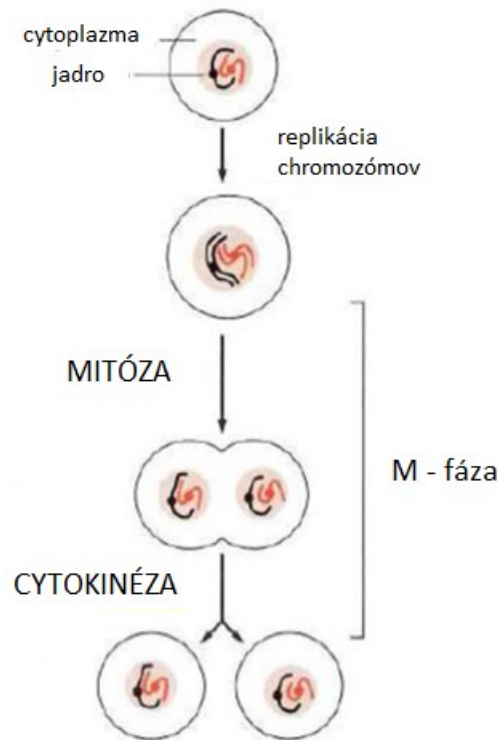
V S fáze dochádza k replikácii DNA (z $2n$ na $4n$ chromozómov). Prebieha syntéza RNA a proteínov (histónov), ktoré sú pri replikácii DNA využité. Replikácia vlákna $3' \rightarrow 5'$ a $5' \rightarrow 3'$ pomocou DNA polymerázy. DNA polymeráza je enzým, ktorý katalyzuje polymeráciu reťazca DNA. Enzým, ktorý slúži na dokončenie replikácie na koncoch chromozómov, teda telomér sa nazýva telomeráza. Na konci tejto fázy sa chromozómy skladajú z 2 chromatid spojených v mieste centroméry (Alberts 2005).

G2 fáza (postsyntetická)

Je posledná fáza v interfáze, predchádza deleniu bunky. Prebieha príprava na mitózu, bunka rastie. Dochádza k syntéze RNA a proteínov (nehistónové proteíny, fosfolipidy, enzýmy, G2 cyklíny, proteíny mitotického aparátu) (Šípek 2010). Súčasťou tejto fázy je druhý kontrolný bod. Kontroluje správny priebeh replikácie DNA. Pri jej poškodení, zabráni vstup do mitózy (Alberts 2005).

M fáza

Je posledná fáza bunkového cyklu. Chromozómy sú zreplikované a sú tvorené sesterskými chromatidami. Bunková hmota je zmnožená a bunka je pripravená na delenie jadra bunky mitózou a delenie vlastných buniek cytokinézou (vid' Obr. 2).



Obr. 2 Schématické znázornenie M- fázy.

Modifikované podľa: Alberts (2005)

Po delení buniek je bunkový cyklus dokončený a bunky sú späť vo fáze G1. Trvanie bunkového cyklu sa vo väčšine cicavčích buniek pohybuje medzi 10 a 30 hodinami. Bunky v G1 fáze môžu opustiť bunkový cyklus a vstúpiť do fázy G0, teda do stavu pokoja, ako je znázornené na Obr. 1 (Wang 2021).

3.2 Regulácia bunkového cyklu

Aby bunka správne fungovala, musí byť prísne kontrolované a regulované delenie buniek. Regulácia bunkového cyklu je riadená bielkovinami dvojakého pôvodu, exogénne a endogénne regulátory. Exogénne regulátory sú mimobunkového pôvodu. Sú to reakcie bunky na vonkajšie

podmienky. Môžu to byť hormóny alebo látky vylučované inými bunkami. Endogénne regulátory vytvárajú vlastné bunky podľa stavu bunkového cyklu. Sú to bielkoviny, ktoré sú kódované protoonkogénmi a tumor–supresorovými génmi. (Repiská et al. 2020)

Endogénna regulácia

Kontrola bunkového cyklu zahŕňa najmä kontrolu integrity genetickej informácie pomocou kontrolných bodov. Medzi produkty protoonkogénov patria cyklíny a cyklín–dependentné kinázy (Cdk). Tieto bielkoviny posúvajú bunkový cyklus do ďalšej fázy a zároveň inhibujú diferenciáciu bunky. Medzi produkty tumor–supresorových génov patria napr. p53 a RB1. Tieto produkty inhibujú bunkový cyklus a podporujú bunkovú diferenciáciu (vid' Tab. 1) (Repiská et al. 2020).

Tab. 1 Gény regulujúce bunkový cyklus a ich porovnanie

	Zástupcovia	Bunkový cyklus	Diferenciácia
Protoonkogény	Cyklíny, Cdk	Stimulácia	Inhibícia
Tumor-supresorové gény	p53, Rb1	Inhibícia	Stimulácia

Cyklín-dependentné kinázy

Podstatou regulácie bunkového cyklu je aktivácia a inaktivácia cyklín–dependentných kináz (Cdk) s ich regulačnými cyklínovými podjednotkami. Sú to proteíny, ktoré sú súčasťou regulácie bunkového cyklu. Ide o enzýmy, ktoré katalyzujú fosforyláciu iných proteínov. Spúšťajú prechod do nasledujúcich fáz cyklu (Barnum and O'Connell 2014). Cyklín–dependentné kinázy sú malé serín/threonínové proteínkinázy, ktoré na svoju aktiváciu vyžadujú spojenie s cyklínovou podjednotkou. Cyklínová väzba umožňuje neaktívnym Cdk prijať aktívnu konfiguráciu podobnú monomérnym a aktívnym kinázam (Van den Heuvel 2005).

Gén Rb1

Jeho produkt Rb proteín, je jadrový fosfoproteín, fosforyluje rôzne proteínkinázy, ktorý má dôležitú úlohu pri regulácii bunkového delenia, behom diferenciácie a pri vyvolaní apoptózy (Otová et al. 2008). Viaže sa k veľkému množstvu proteínov, ktoré sa podieľajú na bunkovej diferenciácii a proliferácii a má schopnosť regulovať ich činnosť. Vplyv na priebeh transkripcie má pozitívny i negatívny. Pozitívny regulačný účinok génu sa uplatňuje najmä pri bunkovej diferenciácii a negatívna regulácia sa viaže k bunkovému cyklu. Rb proteín je aktívny

v nefosforylovanom alebo málo fosforylovanom stave. Hlavným cieľom aktívneho pRb sú multifunkčné faktory E2F, ktoré majú rozhodujúcu úlohu v kontrole bunkového cyklu (Van den Heuvel 2005).

Bunkový cyklus sa zastaví v určitom bode, keď je poškodená DNA. Tento koncept kontrolného bodu bunkového cyklu je rozšírený ako sledovacie mechanizmy používané bunkami na kontrolu integrity, presnosti a sekvencií. Medzi sledované body patrí veľkosť bunky a jej rast do vhodnej veľkosti, replikácia a integrita chromozómov a ich presná segregácia pri mitóze (Barnum and O'Connell 2014).

3.2.1 Kontrolné body bunkového cyklu

Ako je zmienené vyššie, v rámci bunkového cyklu existujú kontrolné body, tzv. *checkpointy*, ktoré zaisťujú hladký priebeh bunkového cyklu. Jeho schéma a hlavné kontrolné body sú zobrazené na Obr. 3. Medzi hlavné kontrolné body patrí G1/S hlavný kontrolný bod, S/G2 kontrolný bod, G2/M kontrolný bod a mitotický kontrolný bod.

G1/S hlavný kontrolný bod

Počas fázy G1 zasahujú rôzne signály vrátane environmentálnych, stresových a metabolických podnetov. Tieto podnety ovplyvňujú vývojový program bunky. Na základe týchto signálov sa bunka rozhodne, či bude pokračovať v bunkovom cykle, diferencovať alebo zomrie. Pre vstup do ďalšej fázy musia všetky bunky spĺňať jednu základnú požiadavku, aktiváciu Cdk. Dochádza tu k detekcii a reparácii DNA mutácií. Po oprave je povolený vstup bunky do S fázy. Ak je mutácie nemožné opraviť, bunka je vedená k zániku apoptózou (Wang 2021, Limas and Cook 2019).

S/G2 kontrolný bod

Je tu potrebná prítomnosť komplexu cyklín E–Cdk2. Tento komplex riadi priebeh S fázy a blokuje komplex cyklín B–Cdk1, ktorý je spúšťačom mitózy. Kontroluje progresiu S fázy. Reakcia na poškodenú DNA a iný replikačný stres je inhibícia Cdk2, aby sa zabránilo replikácii poškodenej DNA (Wang 2021, Repiská et al. 2020).

G2/M kontrolný bod

V G2 fáze povoľuje začatie mitózy. Kľúčová je kontrola DNA po replikácii. Oprava dvojvláknových zlomov v DNA. Počas replikácie DNA a po replikácii sa v bunke hromadia zlomy dvojvláknovej DNA. Je potrebné ich opraviť predtým ako sa bunka presunie do ďalšej

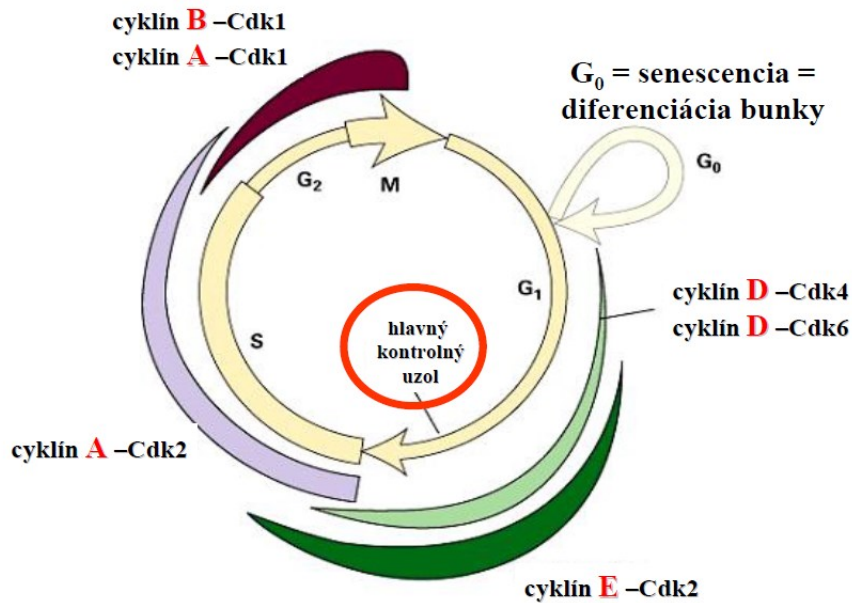
fázy a mohla prejsť kontrolným bodom G2/M. Ak je DNA závažne poškodená aktivuje sa proteín p53, tým sa vytvorí inhibítor p21, alebo môže byť bunka zlikvidovaná apoptózou (Wang 2021, Repiská et al. 2020).

Mitotický kontrolný bod

Nachádza sa v metafáze a má za úlohu zabezpečiť pre obidve dcérske bunky rovnaký objem genetickej informácie. Má dve časti, ktoré navzájom na seba naväzujú. Prvá časť je kontrola dostačujúceho a správneho napojenia mikrotubulov na kinetochory. Druhou časťou je povolenie začatia anafázy. SAC (tzv. spindle assembly checkpoint) a mechanizmus korekcie chýb, opravujú nesprávne pripojenie mikrotubulov deliaceho vretienka ku kinetochorám. SAC je zložitý bunkový mechanizmus, ktorý dohliada na správne pripojenie mikrotubulov deliaceho vretienka ku kinetochorám a zaisťuje tak rovnomernú segregáciu chromozómov do dcérskych buniek (Libichová 2019, Lemmens and Lindqvist 2019, Repiská et al. 2020).

3.2.2 Tvorba komplexov Cdk s cyklínmi

Podľa modelu (vid' Obr. 3) Cdk 4/6 tvoria komplexy s cyklínmi typu D, tým sa aktivujú Cdk 4/6 a iniciujú fosforyláciu retinoblastómového proteínu (rb) v skoréj fáze G1. Tým sa stimuluje uvoľňovanie transkripčného faktora E2F, ktorý ďalej stimuluje transkripciu génov, potrebných na progresiu bunkového cyklu. Medzi tieto gény reagujúce na E2F patria cyklíny typu A a E. V neskorej fáze G1 sa cyklín E viaže a aktivuje Cdk2, čo vedie k úplnej fosforylácii RB a ďalšej aktivácii transkripcie sprostredkovej E2F (Wang 2021). Tieto udalosti riadia prechod bunky cez jej kontrolné body na hranici fázy G1 s S fázou a iniciujú fázu S. Na začiatku S fázy sa syntetizujú cyklíny typu A a tvoria komplex s Cdk2, ktorý fosforyluje proteíny zapojené do replikácie DNA a riadia bunkovú progresiu do fázy G2. V neskorej fáze G2 sa tvorí a aktivuje komplex Cdk1 s cyklínom A, čo je potrebné pre prechod do fázy M a na spustenie profázy. Nakoniec sa vo fáze M tvorí komplex Cdk1 s cyklínom B a riadia dokončenie mitózy (Wang et al. 2016).



Obr. 3 Regulácia progresie bunkového cyklu pomocou cyklín-dependentných kináz a cyklínov.

Prevzaté z: Repiská et al. (2020)

3.3 Bunková diferenciácia

Podľa fyziologického stavu bunky a za prítomnosti určitých extracelulárnych faktorov môže bunka reagovať rôzne a vystúpiť z bunkového cyklu a naštartovať špecifické procesy ako je kviescencia (kludové štádium, *quiescence*), diferenciácia, senescencia alebo apoptóza, či iné typy programovanej bunkovej smrti. Po poslednom rozdelení sa niektoré bunky ďalej nedelia a môžu sa diferencovať a funkčne špecializovať. Z pohľadu bunkového cyklu sa tento stav bunky nazýva kludové štádium alebo kviescencia, kedy sa bunka už ďalej nedelí, označuje sa aj ako G₀ fáza a je reverzibilná. Niektoré bunky vstupujú znova do bunkového cyklu a delia sa (Repiská et al. 2020). Stupeň diferenciácie, funkčný stav bunky a podmienky prostredia rozhodujú o tom, či bude bunka pokračovať v bunkovom cykle. Čím je vyšší stupeň diferenciácie, tým je nižšia pravdepodobnosť návratu bunky do bunkového cyklu (Coffman 2004).

Bunky v G₁ fáze sú náchylnejšie na diferenciáciu ako bunky v S alebo G₂ fáze. Dlhá G₁ fáza bunkového cyklu môže umožniť akumuláciu faktorov potrebných na rozpad diferenciácie a naopak. Krátka fáza G₁ minimalizuje vystavenie signálom podporujúcich diferenciáciu (Sela

et al. 2012). Spontánnej diferenciacii predchádza zastavenie bunkového cyklu v G1 fáze a zahŕňa podskupinu buniek v G1 so zníženou fosforyláciou pRb (Liu et al. 2019).

Schopnosť buniek diferencovať sa nazýva pluripotencia, schopnosť buniek diferencovať sa do niekoľko rôznych typov buniek. Je to stav, kedy majú bunky rovnaký genóm, ale fenotypovo sa odlišujú, teda majú odlišné vlastnosti. Bunky menia svoju veľkosť, tvar, metabolickú aktivitu, membránový potenciál a schopnosť reagovať na podnety počas diferenciacie (Liu et al. 2019).

U viacbunkových organizmov dochádza k diferenciacii, vďaka ktorej sa bunky svojou stavbou prispôbujú role, ktorú majú v organizme vykonávať. V priebehu vývoja organizmu je takáto diferenciacia dôležitá (Alberts 2005). Výrazné odlišnosti medzi bunkovými typmi, ako je veľkosť, tvar a funkcie, vznikajú odlišnosťou génovej expresie. U živočíšnych buniek je proces diferenciacie ireverzibilný a takéto bunky nie je možné spätne dediferencovať, teda previesť ich k prvotnému štádiu (Šípek 2010).

Faktory, ktoré ovplyvňujú bunkovú diferenciaciu: vonkajšie prostredie, vzájomný vplyv jadra a cytoplazmy, vzájomný vplyv zárodočných buniek, rast a delenie, ovplyvňuje vzájomný dotyk buniek, pôsobenie hormónov a signálnych molekúl. Diferenciacia môže prebiehať na niekoľkých úrovniach. Molekulárna úroveň, plazmatické membrány diferencovaných buniek obsahujú rôzne receptorové proteíny, ktoré umožňujú rôzne odpovede. Enzymová – dochádza k produkcii špecifických metabolitov, vznik špecifických metabolických dráh. A morfológická úroveň – zmeny v tvare a štruktúre buniek, bunka stráca schopnosť deliť sa (Alberts 2005).

3.3.1 Proliferácia a diferenciacia

Bunková proliferácia je proces, kedy bunka rastie a delí sa, výsledkom je vznik dvoch dcérskych buniek. Je dôležitá pre vytvorenie ďalších dcérskych buniek, ktoré môžu ďalej proliferovať alebo diferencovať. Môžu diferencovať v priebehu normálneho rastu tkaniva, ale diferencujú najmä pri poškodení a regenerácii tkaniva. Proces proliferácie bunky je riadený génovou reguláciou. Génová expresia hrá kľúčovú úlohu v základných bunkových procesoch, od vývoja organizmu a diferenciacie buniek až po reakcie na bunkový stres, homeostázu tkanív a imunitu. Regulácia génov v mnohobunkových organizmoch poháňa bunkovú diferenciaciu. Vznikajú rôzne typy buniek s rôznymi profilmi génovej expresie z rovnakej genómovej sekvencie. Proces diferenciacie zohráva významnú úlohu nielen pri vývoji každého

mnohobunkového organizmu, ale aj pri oprave poškodených tkanív (Pope and Medzhitov 2018).

Zmeny v bunkovom cykle, vápnik modulujúce alebo metabolické proteíny počas procesu diferenciácie môžu zmeniť citlivosť buniek H9c2 na toxické látky. Diferencované bunky vykazujú vyššiu citlivosť na rôzne kardiotoxické látky. Diferencované bunky majú zvýšený oxidačný mechanizmus a metabolizmus (Branco et al. 2015).

Proces diferenciácie iniciuje (napr. odstránenie rastových faktorov z média) a vyvoláva zastavenie bunkového cyklu a proliferácie. Bunková kultúra H9c2 je proliferatívneho charakteru a v médiu s vysokým obsahom séra (10 % FBS) bunky proliferujú, teda rastú a množia sa. Podľa publikovaných protokolov kultivácia v médiu s nízkou koncentráciou séra (1 % FBS) negatívne ovplyvňuje bunkovú proliferáciu a podporuje bunkovú diferenciáciu. Tieto protokoly hovoria aj o zvýšených transkriptoch pre retinol viažuci proteín 2 (Rbp2), čo môže ovplyvniť dostupnosť alebo signalizačné účinky kyseliny retinovej (ATRA), ktoré vedú k bunkovej diferenciácii (Branco et al. 2015). Diferenciácia na fenotyp podobný srdcovému svalu môže byť tiež podporená špecifickými induktormi ako je TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), trijódtyronín, kyselina retinová (Ménard et al. 1999).

Publikované štúdie uvádzajú význam cAMP (cyklický adenosínmonofosfát) v bunkovej proliferácii a diferenciácii. cAMP je signálna molekula, ktorá zohráva významnú úlohu v regulácii génovej expzie. V procese diferenciácie buniek H9c2 v 1 % FBS intracelulárnej hladiny cAMP progresívne klesajú. Na druhej strane, v bunkách kultivovaných v 10 % FBS, bolo pozorované progresívne zvýšenie intracelulárneho obsahu cAMP. Zvýšenie intracelulárneho cAMP inhibuje diferenciáciu H9c2 buniek do fenotypu „podobného“ kostrovému svalstvu. Ďalej publikované práce uvádzajú, že MAP kináza (mitogenom aktivovaná proteinkináza) sa podieľa na procese diferenciácie. MAP je kináza, ktorá reguluje kyselinu retinovú. V diferencovaných bunkách sú významne zvýšené MAP kinázy, p38, ERK a fosfo-ERK kinázy (Pagano et al. 2004).

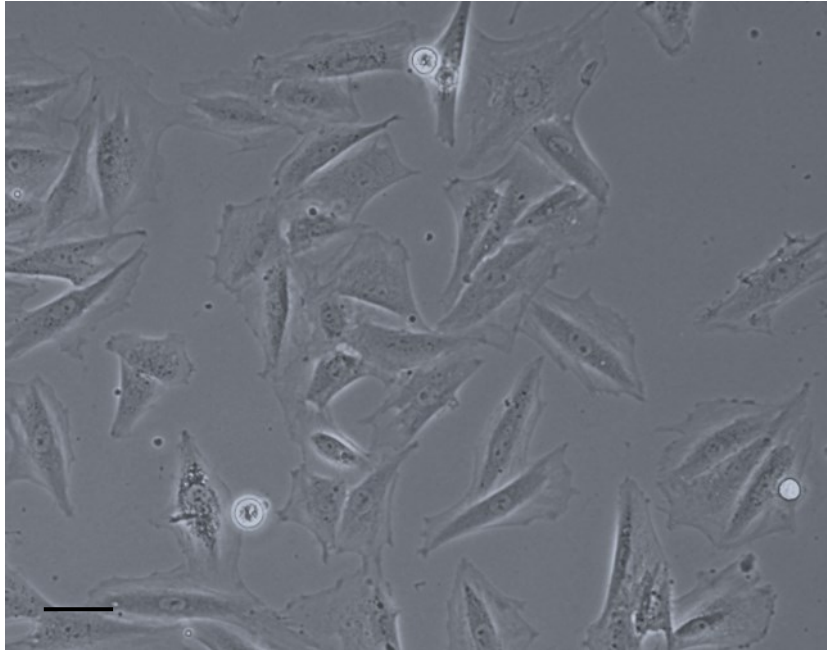
Špecifické Ca^{2+} kanály L-typu sú relevantnými funkčnými markermi diferencovaných srdcových a kostrových myocytov. Bunková línia H9c2 je schopná exprimovať viacero izoforiem Ca^{2+} kanálov typu L. Bunky ošetrované kyselinou retinovou vykazujú zvýšenú expresiu srdcového Ca^{2+} kanála L-typu, ako dôsledok zachovania ich srdcového fenotypu, teda prevláda prítomnosť buniek predstavujúcich fenotyp srdcového svalu. Ca^{2+} kanál je charakteristickým

znakom skorej kardiogenézy. Na rozdiel od toho bunky H9C2, ktoré prešli transdiferenciáciou na myogénny fenotyp, exprimujú Ca^{2+} kanály kostrového svalstva (Ménard et al. 1999).

Publikované štúdie poukazujú dôkaz o novej úlohe sirtuínu 1 (SIRT1) pri regulácii terminálnej diferenciácie kardiomyocytov vo vývoji srdca. SIRT1 priamo podporuje diferenciáciu kardiomyocytov a jeho inhibíciou dochádza k potlačeniu diferenciácie kardiomyocytov. Dokonca k potlačeniu diferenciácie dochádza i u kardiomyocytov ošetrovaných kyselinou retinovou. SIRT1 podporuje prežitie ako obranný mechanizmus na prevenciu stresom indukovanej bunkovej smrti v myoblastoch. Podieľa sa na niekoľkých procesoch, vrátane kardiovaskulárnych ochorení, neurodegenerácie, zápalu, rakoviny a regulácie metabolizmu. Počas vývoja majú myši s deficitom SIRT1 abnormality srdca a ďalších orgánov a zriedka prežívajú po narodení (Shin et al. 2018).

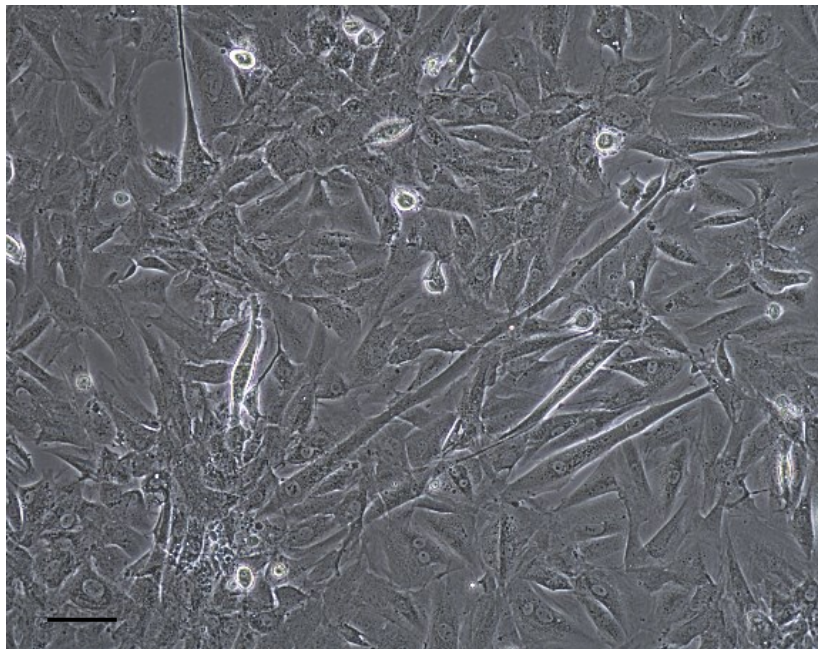
3.3.2 H9c2 potkanie kardiomyoblasty a diferenciácia

Bunková línia H9c2 (2-1 subklon) odvodená od kardiomyocytov je bežne používaná in vitro ako „model srdcového tkaniva“. Nejedná sa ale o kardiomyocyty, línia vykazuje mnoho podobností s bunkami kostrového svalstva (preto „kardiomyoblasty“) (Escarda-Castro et al. 2021). Sú dostupné komerčne a môžu byť tiež získané izoláciou zo srdcového tkaniva potkana. Morfologicky sú charakterizované ako veľké, ploché myoblasty s jedným vretenovitým jadrom (viď Obr. 4) (Kutichová 2012). Táto bunková línia je využívaná v rôznych oblastiach kardiovaskulárneho výskumu, vrátane štúdia kardiotoxicity. Z publikovaných prác je známe, že H9c2 bunky sú schopné sa diferencovať do fenotypu „podobného“ srdcovému alebo kostrovému svalu (Escarda-Castro et al. 2021). Bunky sú relevantným modelom na skúmanie mechanizmov a dôsledkov rôznych srdcových porúch, vrátane srdcovej hypertrofie (Branco et al. 2015).



Obr. 4 Nediferencované H9c2 bunky (úsečka predstavuje 100 μm).

Diferencované H9c2 bunky sa vyznačujú predĺženým tvarom s viacerými jadrami (viď Obr. 5) a nízkou proliferačnou kapacitou. Počas procesu diferenciácie bunky získavajú väčšinou fenotyp „podobný“ kostrovému alebo srdcovému svalu. Podľa publikovaných štúdií závisí od podmienok kultivácie a od pridávania množstva FBS a ATRA (Branko et al. 2015).



Obr. 5 Diferencované H9c2 bunky (úsečka predstavuje 100 μm).

3.3.3 Diferenciačné markery bunkovej línie H9c2

Počas procesu diferenciácie bunky získavajú väčšinou fenotyp srdcového a kostrového svalstva, čo dokazujú diferenciačné markery špecifické pre srdcový a kostrový bunkový typ. Sú to gény súvisiace s procesom diferenciácie na srdcový a kostrový fenotyp. Dobre charakterizované markery srdcovej diferenciácie sú troponín T, troponín I, kalsekvestrín, MLC-2v (myosin light chain 2v) a MLC-2a (myosin light chain 2a). Markery charakterizujúce diferenciáciu do bunky podobnej kostrovému svalu sú myogenín, myomesín 2 a nikotínové receptory (Ménard et al. 1999). Diferencované bunky H9c2 podporené kyselinou retinovou vykazujú zvýšenú expresiu génov súvisiacich s vápnikovými transportérmi (ako je kalciová adenzinotrifosfatáza sarkoplazmatického retikula–SERCA, fosfolamban sarkolipínový a ryanodínový receptor), srdcovými sarkomérnymi proteínmi, ako je troponín T a troponín C a diferenciačné markery, ako je myogenín a transkripčný faktor nevyhnutný pre terminálnu diferenciáciu na myocyty (Branco et al. 2015). Diferencované bunky H9c2 exprimujú niekoľko génov charakteristických pre kostrové svaly, napr. izoformy a-aktínu, ryanodínového receptora-1 (Ryr1) a typ troponínu I1 (TNNI1). Onódi popisuje zase len mierny stupeň diferenciácie H9c2 buniek s kyselinou retinovou (Onódi et al. 2022). V bunkách H9c2 boli ďalej detekované vysoko špecifické proteíny pre fenotyp kontraktilného kostrového svalstva kalponín-1 a smoothelín n. Lenčo opísal, že bunky H9c2 neexprimujú významné množstvá markerov, špecifických pre srdcový sval, a produkujú len malé množstvá markerov charakteristických pre kostrové svaly. Zdôrazňuje prítomnosť nesvalového myozínu II ako dominantnú formu myozínu v bunkách H9c2. V bunkách H9c2 potvrdil výrazný rozdiel v hladinách troponínu T medzi vzorkami proliferujúcich a neproliferujúcich buniek (Lenčo et al. 2015).

V tejto práci boli použité nasledovné markery, ktoré boli prevzaté z práce Escarda-Castro et al. (2021) a ich použiteľnosť bude nutné overiť:

- Diferenciačné markery pre srdcový sval: srdcový troponín T (TnnT2) a srdcové transkripčné faktory (GATA4 a Hand2).
- Diferenciačné markery pre kostrový sval: transkripčný faktor kostrového svalstva myogenín (Myog).

Skupina ďalších transkripčných faktorov, vrátane proteínu Nkx2.5, GATA4, GATA5, GATA6 proteíny, MEF2 faktory a SRF, T-box faktory, vrátane Tbx1, Tbx2, Tbx3, Tbx5, Tbx18, Tbx20 sú rozhodujúce pre vývoj srdca. Tieto transkripčné faktory interagujú navzájom a s radou ďalších transkripčných faktorov sa podieľajú na kontrole vývoja srdca. Hlavné srdcové

transkripčné faktory fungujú vo vzájomne sa posilňujúcej transkripčnej sieti, v ktorej každý z faktorov reguluje expresiu ostatných. Je to komplexná molekulárna a genetická súhra, ktorá riadi viaceré štádiá vývoja srdca a prevodového systému. Preto mutácie v niekoľkých génoch kódujúcich hlavne srdcové transkripčné faktory sú spojené s vrodenou srdcovou chorobou (McCulley and Black 2013).

3.3.4 Látky ovplyvňujúce diferenciáciu buniek

Bisfenoly

Bisfenoly sú chemické látky, ktoré sa vo význačnej miere používajú pri syntéze plastov, nachádzajú sa aj v potravinových obaloch. Bisfenol A (BPA) je jedným z najviac študovaných bisfenolov. Negatívne účinky BPA na zdravie v dôsledku jeho estrogénnej aktivity, (spôsobenie endometriózy, rakoviny prsníka, neplodnosti a vrodených chýb), vedú k rastúcemu požívaniu alternatívnych bisfenolov (Park et al. 2020). Nedávne štúdie ukázali, že BPA svojimi účinkami narúša endokrinný systém (Karrer et al. 2018). Bisfenol AF (BPAF) je derivát BPA, ktorý sa široko používa ako jedna z náhrad BPA, avšak štúdie ukázali, že expozícia BPAF je spojená s hypertrofiou kardiomyocytov v dôsledku zvýšenia produkcie reaktívnych foriem dusíka (RNS) (Yang et al. 2020). Taktiež tento bisfenol sa vyznačuje nadmernou produkciou reaktívnych foriem kyslíka (ROS), čoho následkom môže byť indukcia cytotoxicity podľa publikovaných štúdií (Lei et al. 2019). BPF a BPS, ktoré postupne nahrádzajú BPA, majú vo vyšších koncentráciách podobné estrogénne a antiandrogénne účinky ako BPA, dokonca vykazovali aj negatívny endokrinný účinok (Park et al. 2020).

Vysoké dávky bisfenolu A (BPA), bisfenolu S (BPS) a bisfenolu AF (BPAF) inhibujú diferenciáciu embryonálnych kmeňových buniek na kardiomyocyty a vykazujú slabú embryotoxicitu. Individuálne tieto látky inhibujú expresiu endodermálnych, mezodermových a ektodermových markerov, ale zvyšujú expresiu markerov pluripotencie. A kombinovaná expozícia bisfenolov pri vysokých dávkach má aditívny účinok na diferenciáciu kardiomyocytov a proliferáciu embryonálnych kmeňových buniek. Tieto bisfenoly hrajú úlohu pri ovplyvňovaní vývoja, zvýšením schopnosti sebaobnovy alebo znížením schopnosti diferenciácie kmeňových buniek, počas diferenciácie (Zhou et al. 2021).

Diferenciácia myokardu založená na embryonálnych kmeňových bunkách môže byť vynikajúcim modelom na štúdium kardiotoxicity indukovanej niektorými bisfenolmi na bunkovej a molekulárnej úrovni (Yang et al. 2020).

4 Cieľ diplomovej práce

Náplňou mojej diplomovej práce bola charakterizácia procesu diferenciácie bunkovej línie H9c2, navodenej rôznymi diferenciačnými médiami a dĺžky trvania procesu diferenciácie. Charakterizácia bola vykonaná sledovaním morfológických zmien pomocou svetelnej mikroskopie a pomocou sledovania zmien, v relatívnej génovej expresii vybraných markerov a transkripčných faktorov špecifických, pre srdcový a kostrový sval. Cieľom práce je identifikovať diferenciačný protokol a markery poskytujúce výraznú a čo najjednoduchšiu zmenu, ktorá v ďalšej fáze výskumu umožní študovať látky s potenciálom ovplyvňovať proces diferenciácie.

5 Experimentálna časť

5.1 Biologický materiál

5.1.1 Bunková línia H9c2

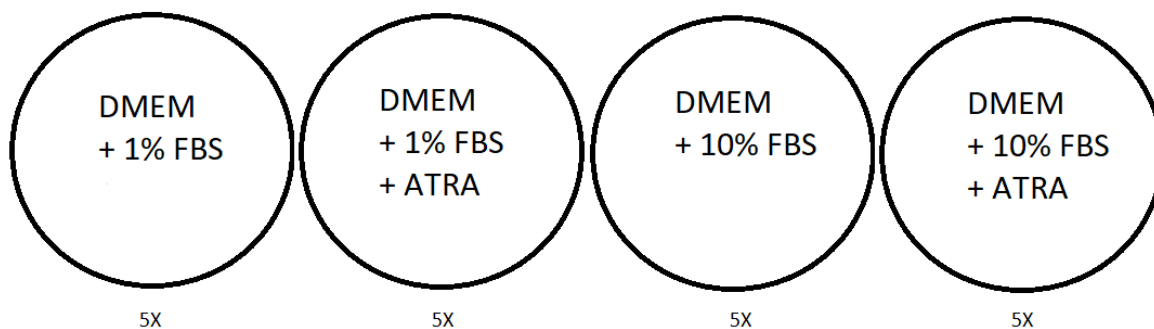
H9c2 bunky sú bunečná línia odvodená od kardiomyocytov. Sú dostupné komerčne a môžu byť tiež získané zo srdcového tkaniva potkana. Morfológicky sú charakterizované ako veľké, ploché myoblasty s jedným vretenovitým jadrom. Táto bunková línia je využívaná v rôznych oblastiach kardiovaskulárneho výskumu, vrátane štúdia kardiotoxicity. Tieto bunky sú schopné sa diferencovať (Kutichová 2012, Escarda-Castro et al. 2021, Kimes and Brandt 1976).

Kultivácia H9c2 buniek

Bunky H9c2 sú adherentného charakteru, boli kultivované v kultivačnej nádobe s dvojpolohovým uzáverom o veľkosti T75 a T150 (TPP, Švajčiarsko). Bunky boli kultivované a pasážované v kultivačnom médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM HG) (Sigma) s pyruvátom doplnené o HEPES, bez antibiotík. Kultivované pri optimálnych podmienkach 37°C a 5% CO₂ a pasážované každých 72 - 96 hodín, pokiaľ sme sa dostali k určitej pasáži a bunky boli ďalej použité na proces diferenciacie.

5.2 Pasáž buniek a nasadenie na proces diferenciacie

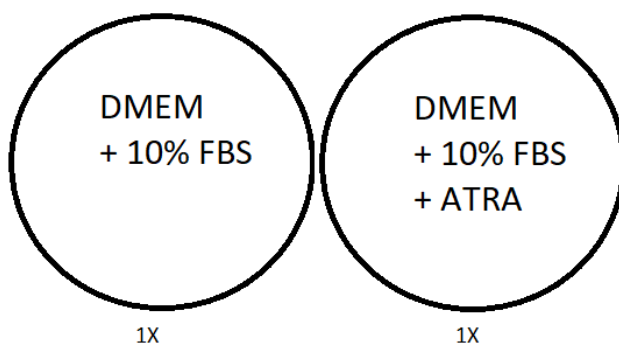
Bunky boli v deň pasážovania a nasadzovania na pokus konfluentné v kultivačnej nádobe na 100 %. Bunky vretenovitého tvaru s mononukleárnym charakterom, rovnomerne prilnuté na povrchu. Po oplachu buniek PBS bola pridaná zmes trypsin/EDTA k bunkám. Používa sa na oddelenie buniek z povrchu nádoby. Boli použité 2 ml na T75 a 3 ml na T150. Časť trypsin/EDTA bola odsatá tak, aby v nádobe zostalo 0,5 ml a inkubovalo sa 5 minút. Po inkubácii dostaneme bunky do suspenzie so základným médiom (tj. DMEM HG + 10% FBS). Zo suspenzie boli bunky spočítané pomocou farbiva trypanovej modrej v Bürkerovej komôrke a množstvo bolo prepočítané na požadovanú koncentráciu. $1 \cdot 10^5$ buniek v 1ml pomocou rovnice $c_1V_1=c_2V_2$. Suspenzia o požadovanej koncentrácii buniek bola napipetovaná po 10 ml (tj. 0,3 ml. bb) do Petriho misiek (TPP, Švajčiarsko) s vnútorným priemerom 87 mm a ploche 60,1 cm². Pre každé jednotlivé diferenciacné médium bolo pre jeden pokus nasadených 5 Petriho misiek (proces diferenciacie bude ukončený v piatich intervaloch, viď ďalej). Druhý deň boli média vymenené za jednotlivé diferenciacné médiá (viď Obr. 6).



Obr. 6 Rozdelenie Petriho misiek podľa druhu pridávaného média v 2. deň.

Médiá boli menené každý druhý deň: d4, d6, d8, d10, d12, d14 a ATRA (100 μ M roztok) bola pridávaná každý deň po 1 μ l na 10 ml média, podľa schémy na obrázku č. 5. V deň 3, 6, 9, 12, 15 bola vždy jedna Petriho miska z každej skupiny použitá pre mikroskopické vyhodnotenie morfológie buniek a následne zberaná lýzou pomocou TRIzol/TRIreagentu® na vyhodnotenie RT – PCR. Proces diferenciácie bol teda sledovaný celkovo 15 dní po 3 opakovaníach (n=3). V každom opakovaní bol sledovaný aj vplyv čísla pasáže, v ktorej dané opakovanie bolo.

Boli nasadené ešte ďalšie dve Petriho misky o veľkosti 87 mm a ploche 60,1 cm² (0,3 mil. bb) s 10% FBS bez ATRA a s ATRA (viď Obr. 7). Proces diferenciácie bol sledovaný 15 dní a médiá neboli počas celej tejto doby menené a ATRA bola pridaná len v 1. deň nasadenia na pokus.



Obr. 7 Rozdelenie Petriho misiek, média nemenené.

Zloženie kultivačných a diferenciacných médií

Zloženie vypočítané na 100 ml:

DMEM HG 1% FBS

99 ml DMEM HG média

1 ml FBS sigma

1 ml HEPES (1M; 0,85% NaCl)

1 ml Pyruvátu sodného,

pokiaľ nie je obsahom média od výroby

DMEM HG 10% FBS

90 ml DMEM HG média

10 ml FBS sigma

1 ml HEPES (1M; 0,85% NaCl)

1 ml Pyruvátu sodného,

pokiaľ nie je obsahom média od výroby

5.3 Zber buniek – lýza pomocou TRIzol/TRIreagentu®

Vždy bola zobrať 1 Petriho miska z každého druhu média. Médium bolo z Petriho misiek odsaté pomocou automatickej pipety. Bunky boli opláchnuté PBS a s PBS následne aj vyfotené na mikroskope Nikon eclipse TS 100 s kamerou Nikon Japan ELWD Model Moticam. Po vyfotení boli bunky zbavené PBS a lyzované pomocou TRIzol/TRIreagentu® pokiaľ sa všetky neodlepili z povrchu kultivačnej misky – lyzovanie priamo v kultivačnej miske. Automatickou pipetou boli bunky zhomogenizované, bunkový lyzáť bol niekoľkokrát prejdený špičkou pipety, a prenesené do uzatvárateľnej skúmavky s objemom 2 ml a zamrazené v hlbokomraziacom boxe pri -80°C.

5.4 Princíp Real–Time PCR (RT–PCR)

Real – Time PCR je metóda založená na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR), vhodná k analýze génovej expície. Slúži k transkripcii a kvantifikácii DNA. RT – PCR umožňuje meranie amplifikovaného produktu v priebehu reakcie, tzn. v reálnom čase (real time). Ide o enzymatickú amplifikáciu vybranej sekvencie DNA in vitro. Dvojvláknová DNA je najskôr denaturovaná na dve jednovláknové matricové molekuly DNA. Nemusí byť známa nukleotidová sekvencia cieľovej DNA, ale musia byť známe aspoň sekvencie krátkych úsekov na oboch koncoch cieľovej amplifikovanej DNA. Oligonukleotidové sondy, teda primery, hybridizujú na oboch stranách cieľovej DNA a riadia syntézu nových vlákien. Túto syntézu katalyzuje termostabilná DNA polymeráza.

K detekcii produktov reakcie sa využívajú fluorescenčné molekuly, ktoré odrážajú množstvo amplifikovanej DNA v každom cykle. V tejto práci bolo použité fluorescenčné farbivo SYBR®-Green (SG). Je to interkalačná látka, a preto sa naväzuje len na dvojreťazcovú DNA. Pokiaľ je prítomná jednoreťazcová DNA, molekuly Sybergreenu sú v roztoku vo voľnej forme a tým nedochádza k emisii fluorescence. K fluorescencii dochádza až po naviazaní na dvojreťazcovú DNA (Průša 1997, Špaček 2017).

5.5 Izolácia RNA zo vzoriek

Izolácia z diferencovaných buniek, nami zozbieraných pomocou TRIzol/TRIreagentu®, zhomogenizovaných a skladovaných v 2ml skúmavkách v hlbokomraziacom boxe pri -80°C.

Jednotlivé kroky izolácie:

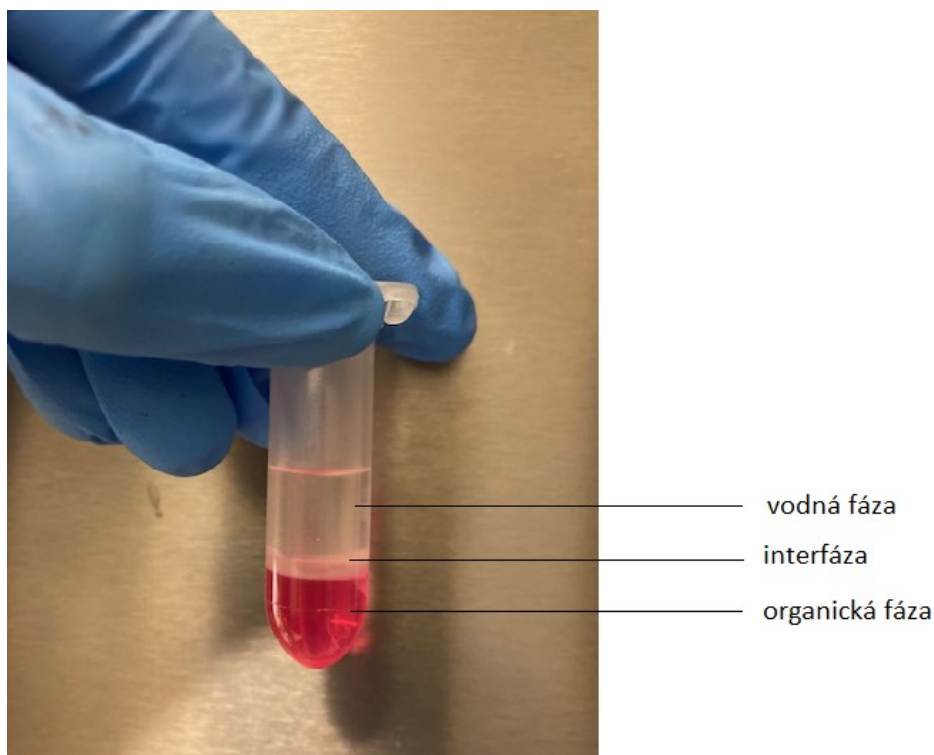
- Fázová separácia
- Precipitácia RNA
- Premývanie RNA
- Solubilizácia RNA

Fázová separácia:

Homogenát sa nechaj svojvoľne rozmraziť a nechaj sa stáť 5 minút pri laboratórnej teplote, aby došlo k úplnej disociácii nukleoproteínových komplexov. K homogenátu bolo pridaných 0,1 ml BCP (1-bróm-3-chlórpropán) na 1 ml TRIzol/TRIreagentu®. BCP je reagent pre fázovú separáciu a mierne zlepšuje kvantitu a kvalitu izolovanej RNA oproti chloroformu. Po pevnom uzatvorení boli vzorky pretrepávané v rukách po dobu 15 sekúnd. Následne sa nechala výsledná zmes 2-3 minúty stáť pri laboratórnej teplote a potom sa scentrifugovala pri 14 000 x g v chladiacej centrifúge Heraeus Biofuge Stratus 15 minút pri teplote 4°C. Centrifugáciou bola zmes rozdelená do 3 fáz (vid' Obr. 8):

- dolná ružová až červená (fenolová) organická fáza obsahujúca proteíny a DNA
- interfáza obsahujúca proteíny a DNA
- horná bezfarebná vodná fáza obsahujúca RNA

BCP je menej toxický ako chloroform a jeho použitie znižuje možnosť DNA kontaminácie RNA. Centrifugáciu na oddelenie fáz je dôležité vykonať práve pri teplote 4 – 10°C. Ak sa uskutočňuje pri zvýšených teplotách, zvyškové množstvo DNA sa môže sekvestrovať vo vodnej fáze (Chomczynski and Mackey 1995, Chomczynski and Sacchi 1987).



Obr. 8 Fázová separácia.

Precipitácia RNA:

Vodná fáza sa odobrala pomocou pipety do novej skúmavky. Z vodnej fázy bola vyvrážaná RNA pridaním 0,5 ml isopropanolu na 1 ml TRIzol/TRIreagentu®, použitého v príprave vzorky. Vzorky boli zvortexované a nechali sa stáť pri laboratórnej teplote po dobu 10 minút. Po uplynutí 10 minút boli vzorky scentrifugované pri 14 000 x g v chladiacej centrifúge 10 minút pri teplote 4°C.

Pomocou isopropanolu dôjde k zrážaniu nukleových kyselín. Precipitát RNA tvorí gélovité alebo biele peletky na boku a dne skúmavky, ktoré sú často pred centrifugáciou neviditeľné. Centrifugácia pri 4°C je dôležitá pre lepšiu a dôkladnejšiu prácu s peletkou. Pokiaľ by bola uskutočnená pri vyššej teplote peletky by voľne plávali v supernatante, ktorý by sa následne zle odoberal a hrozilo by riziko straty peletky RNA (Chomczynski and Mackey 1995, Chomczynski and Sacchi 1987).

Premývanie RNA:

Zo skúmavky s peletkou bol pomocou pipety odstránený supernatant. K peletke bolo pridaného 0,5 ml 75% etanolu, skúmavky boli zvortexované a následne scentrifugované pri 14 000 x g v chladiacej centrifúge 5 minút pri teplote 4°C.

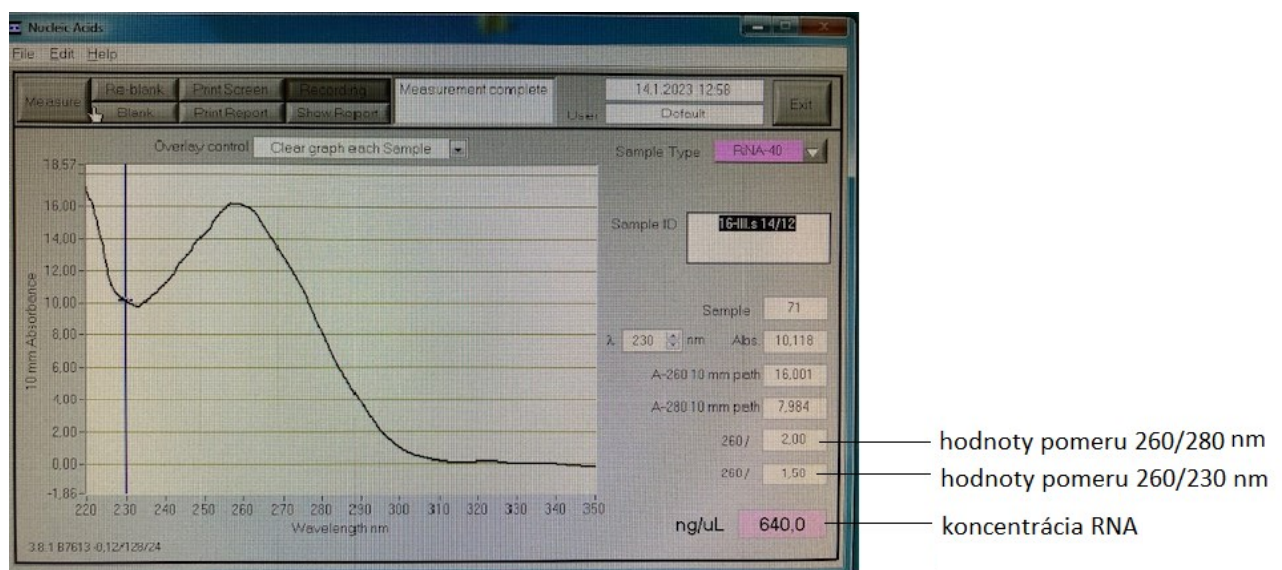
Solubilizácia RNA:

Zo skúmaviek sa odobral etanolový premývací roztok a peletky RNA sa nechali vysušiť po dobu 5 minút na vzduchu. Peletky RNA boli rozpustené pridaním 0,1 ml vody bez RNAzy (RNase free water) a pre lepšie rozpúšťanie boli premiešavané opakovaným pipetovaním s mikropipetou.

Je dôležité vyhnúť sa úplnému vysušeniu peletky RNA, pretože to výrazne znižuje jej rozpustnosť. Peletky RNA musia zostať biele a nie priesvitné. Roztok použitý na solubilizáciu RNA by mal byť zbavený RNAzy pomocou úprav.

5.6 Vyhodnotenie čistoty a kvantifikácia RNA

Kvalita a kvantita takto pripraveného RNA bola meraná pomocou spektrofotometra NanoDrop (Thermo Scientific) (viď Obr. 9). Presnosť spektrofotometrie môže byť nedostatočná pri nízkych koncentráciách RNA. Pre NanoDrop analýzu sú potrebné malé objemy vzoriek 1-2 μ l. Konečný produkt RNA je bez DNA a proteínov. Čistota RNA je určená pomerom absorbancie pri vlnovej dĺžke 260/280 nm a 260/230 nm. Pomer 260/280 nm by mal byť medzi hodnotami 1,9 – 2,1. Pokiaľ by hodnoty klesli pod 1,7 znamenalo by to, že naša vzorka by bola kontaminovaná DNA. Pomer 260/230 nm by mal byť medzi hodnotami 2,0 – 2,2. Ak by hodnota klesla pod 1,5 je potrebné vykonať znova proces čistenia RNA s etanolom. Ideálna koncentrácia RNA pre RT je > 100 ng/ μ l (Masago 2021).



Obr. 9 Ukážka zmerania vzorky na spektrofotometri NanoDrop.

5.7 Prepis RNA do cDNA

Po zmeraní koncentrácie RNA na NanoDrope bolo vypočítané riedenie RNA na množstvo 10 μ l o koncentrácii 100 ng/ μ l. Ku každej vzorke bolo pridaného 10 μ l High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) na syntézu cDNA do PCR stripov (zloženie vid' Tab. 2). Zmes bola premiešaná pipetou a stočená v centrifúge. Celkového objemu reakcie bolo teda 20 μ l (vid' Tab. 3). Po celú dobu bolo pracované s vychladenými vzorkami.

Tab. 2 Zloženie High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Zložky Reverse Transcription Kit	Množstvo v μl
Nuclease-free water (API)	3,2
10X RT Buffer	2,0
10X RT Random Primers	2,0
25X dNTP Mix (100mM)	0,8
Multiscribe Reverse Transcriptase	1,0
Rnase Inhibitor	1,0
Celkové množstvo	10,0

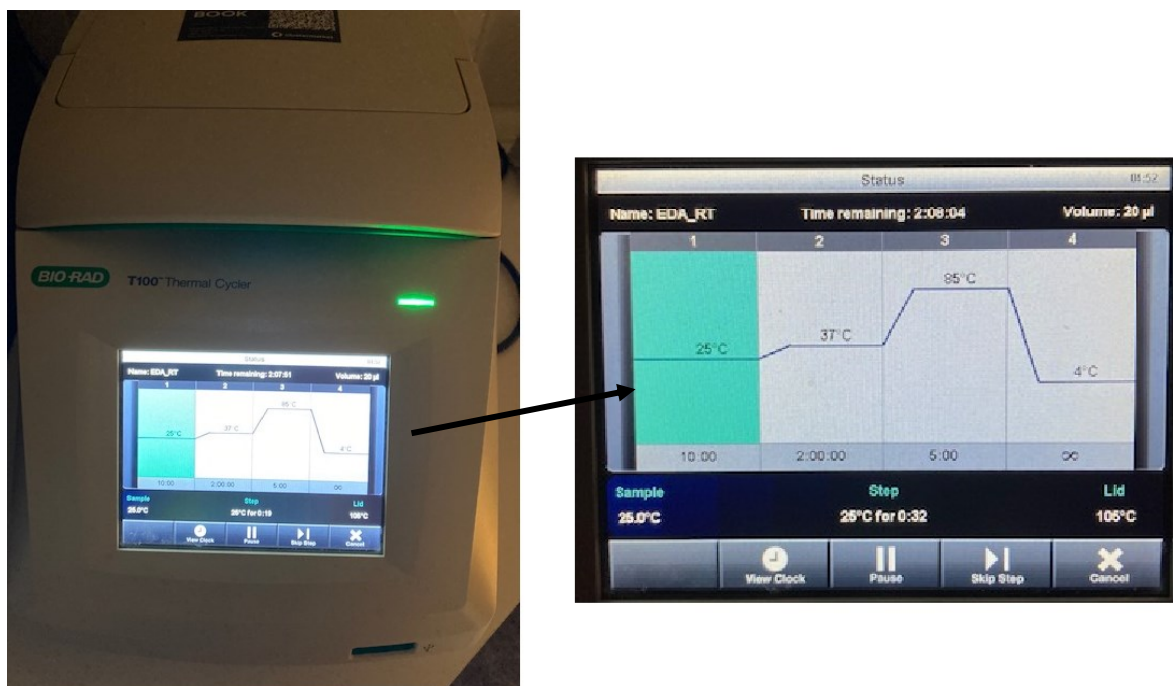
Tab. 3 Obsah PCR stripov

Nariedené vzorky RNA	10,0 μl
Reverse Transcription Kit	10,0 μl
Celkový objem reakcie	20,0 μl

Takto pripravené vzorky boli dané do Thermal cyklieru T100 (BIORAD) a bol zvolený vhodný program (vid' Obr. 10). Teplotný profil Thermal cyklieru:

- 25°C – 10 min
- 37°C – 120 min
- 85°C – 5 min
- 4°C – ∞

Po prepise bolo ku každej vzorke s templátom cDNA napipetovanej 113,3 API. Premiešané pipetou a mierne zvortexované.



Obr. 10 Ukážka Thermal cycleru a jeho teplotného profilu.

5.8 Real-Time PCR (RT-PCR)

Na analýzu expresie génov bola použitá metóda Real-Time PCR v systéme QuantStudio6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) s použitím na mieru navrhnutých primerov a gb SG PCR Master Mix (obidva Generi Biotech) (zloženie vid' Tab. 4) a teplotný profil vid' Tab. 6). Použitie farbivo SYBR®-Green sa interkalačne viaže na dvojreťazcovú DNA.

Tab. 4 Zloženie Master Mixu

Zložky Master Mixu	Množstvo v μl na 1 reakciu
R gb primer	0,20
F gb primer	0,20
Gb SG PCR Master Mix(2X)	5,00
Passive Reference Dye (ROX)	0,07
Nuclease-free water (API)	0,53

V reakcii bolo použitých 30 μl riedenej cDNA a 6 μl Master Mixu. Zloženie Master Mixu (vid' Tab. 5). Každá vzorka bola na dosku pipetovaná v triplikáte. Na analýzu relatívnej génovej expresie boli použité na mieru navrhnuté primery a gb SG PCR Master Mix–SybrGreen Master Mix. Získané hodnoty expresie boli normalizované metódou $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ na geometrický priemer referenčných génov GADPH a HPRT1.

Tab. 5 Riedenie templátu cDNA

Koncentrácia cDNA po RT (ng/ μ l)	50,0
Koncentrácia cDNA po riedení po RT (ng/ μ l)	7,5
Vložené množstvo cDNA do reakcie (ng)	30,0
Finálny objem cDNA pre 1 PCR reakciu (μ l)	4,0

Tab. 6 Teplotný profil RT – PCR cykléru

Krok	Teplota	Dĺžka	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia/aktivácia enzýmov	95°C	3 min	1
Denaturácia	95°C	30 s	
Annealing	60°C	40 s	40
Extenzia	72°C	50 s	
Záverečná extenzia	72°C	10 min	1

5.9 Štatistická analýza dát

V práci nebolo vykonané štatistické vyhodnotenie zmien expresie vybraných génov, pretože charakter práce je čisto pilotný a porovnávané pokusy diferenciácie sú z rôznych pasáží. Teda vnútorná variabilita dát je primárne veľká a získané štatistické dáta by neboli validné.

6 Výsledky

6.1 Porovnanie médií DMEM HG a DMEM LG

V tejto práci sme sa zamerali na charakteristiku procesu diferenciácie bunkovej línie H9c2 použitím rôznych diferenciačných médií a podmienok diferenciácie. Porovnávali sme stav diferenciácie v nízkoglukózovom a vysokoglukózovom médiu. Pracovali sme s dvoma médiami, vysokoglukózovým DMEM (DMEM HG; 25 mM glukózy) a nízkoglukózovým DMEM (DMEM LG; 5,5 mM glukózy).

Porovnávanie procesu diferenciácie v DMEM HG a DMEM LG bolo vykonané po jednej sérii (n=1). Výsledky nevykazovali výrazné rozdiely, ale rozhodli sme sa pracovať s vysokoglukózovým médiom aj napriek tomu, že nízkoglukózové médium má fyziologickú koncentráciu glukózy. Bunkové línie sú z časti mortalizované, potrebujú byť dostatočne zásobované glukózou, aby mali zdroj energie, keďže samé si glukózu netvorí. Pre vytvorenie úplnej konfluencie buniek na Petriho miskách pred diferenciáciou, bolo vhodnejšie použiť vysokoglukózové médium so sérom. Preto sme sa z časového hľadiska rozhodli ďalej pracovať len s jedným médiom, ale aj pre jednoduchšie prevedenie pokusu a ľahšiu interpretáciu výsledkov.

Všetky nasledujúce výsledky boli teda vykonané v DMEM HG a ako kontrolný stav bol použitý deň 3 v DMEM HG + 10 % FBS bez ATRA (DMEM HG ďalej označované ako DMEM).

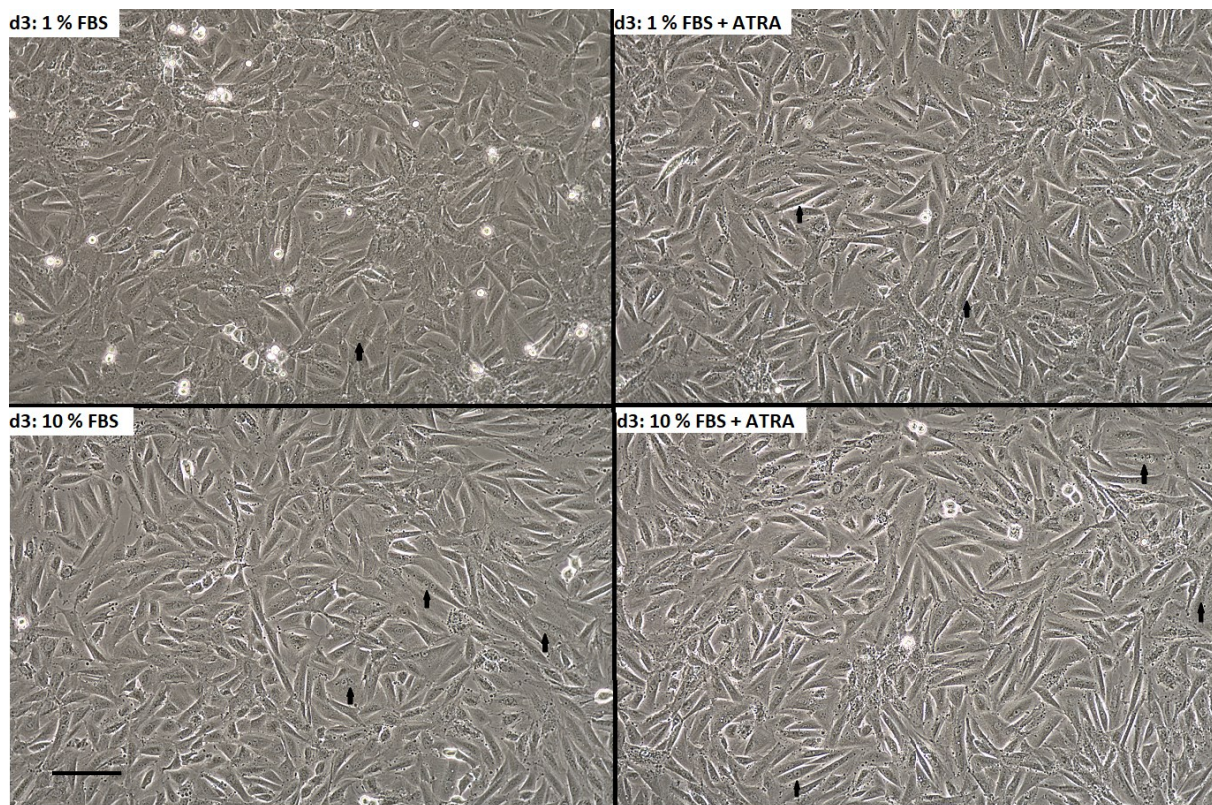
6.2 Mikroskopické vyhodnotenie morfológie buniek H9c2

Porovnávali sme morfológické zmeny buniek diferencovaných oproti nediferencovaným a morfológické zmeny v daných diferenciačných protokoloch. Zmeny sme potvrdili aj na úrovni relatívnej génovej expresie pomocou RT-PCR markerov a transkripčných faktorov.

Z časových dôvodov bola diferenciácia sledovaná na troch rôznych pasážach. Avšak neboli zaznamenané významné rozdiely medzi staršími bunkami (pasáž +38) a mladšími (pasáž +20 a +24).

Popis a fotografie buniek:

3. deň (d3) (mikroskopický prehľad vid' Obr. 11)



Obr. 11 Fotografie buniek v tretí deň (d3) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μ m).

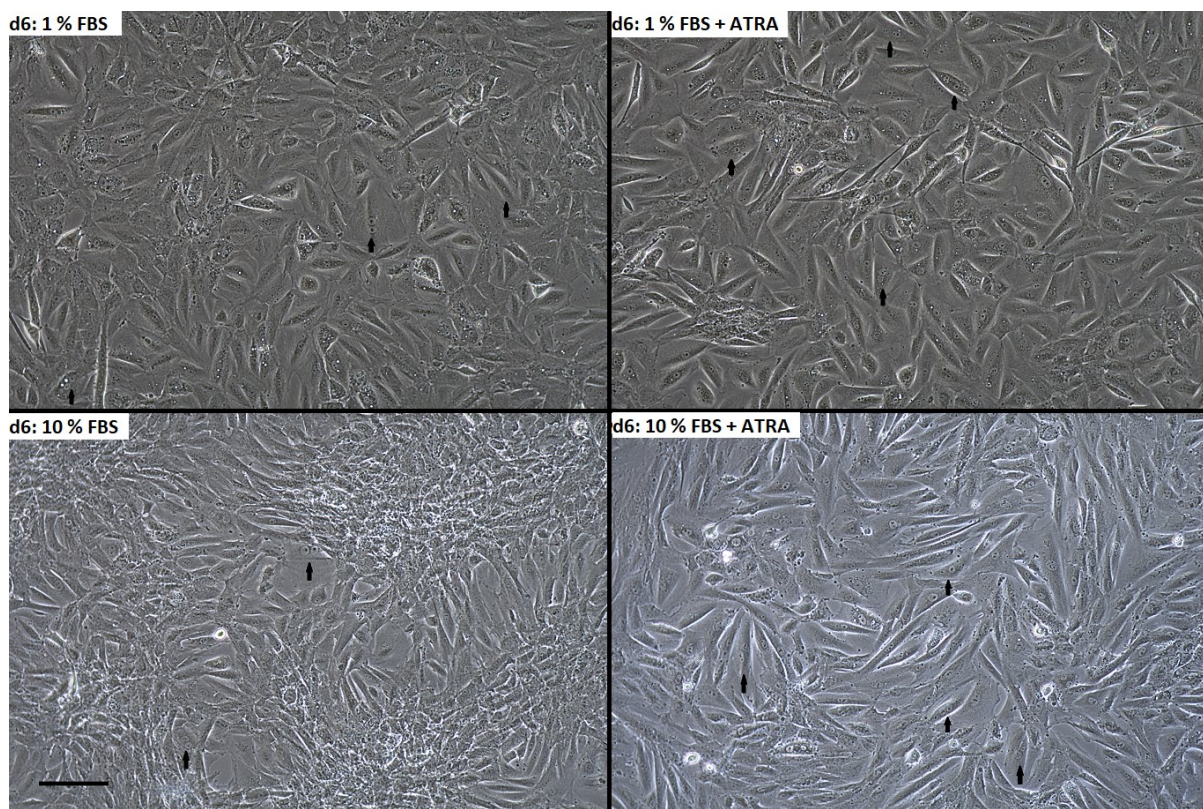
Bunky s viacerými jadrami vid' čierne šípky na obrázku.

DMEM + 1 % FBS: Povrch Petriho misky konfluentný na 100 %, bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, viac buniek s mononukleárnym charakterom.

DMEM + 1 % FBS + ATRA: Povrch Petriho misky konfluentný na 100 %, bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, viac buniek s jedným jadrom. Sem-tam

bunka predĺžená s dvomi jadrami. **DMEM + 10 % FBS:** Povrch Petriho misky konfluentný na 100%, bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, viac buniek s jedným jadrom, bunky sa začínajú prerastať. **DMEM + 10 % FBS + ATRA:** Povrch Petriho misky konfluentný na 100%, bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, viac buniek s jedným jadrom. Sem-tam bunka predĺžená s dvomi jadrami.

6. deň (d6) (mikroskopický prehľad vid' Obr. 12)



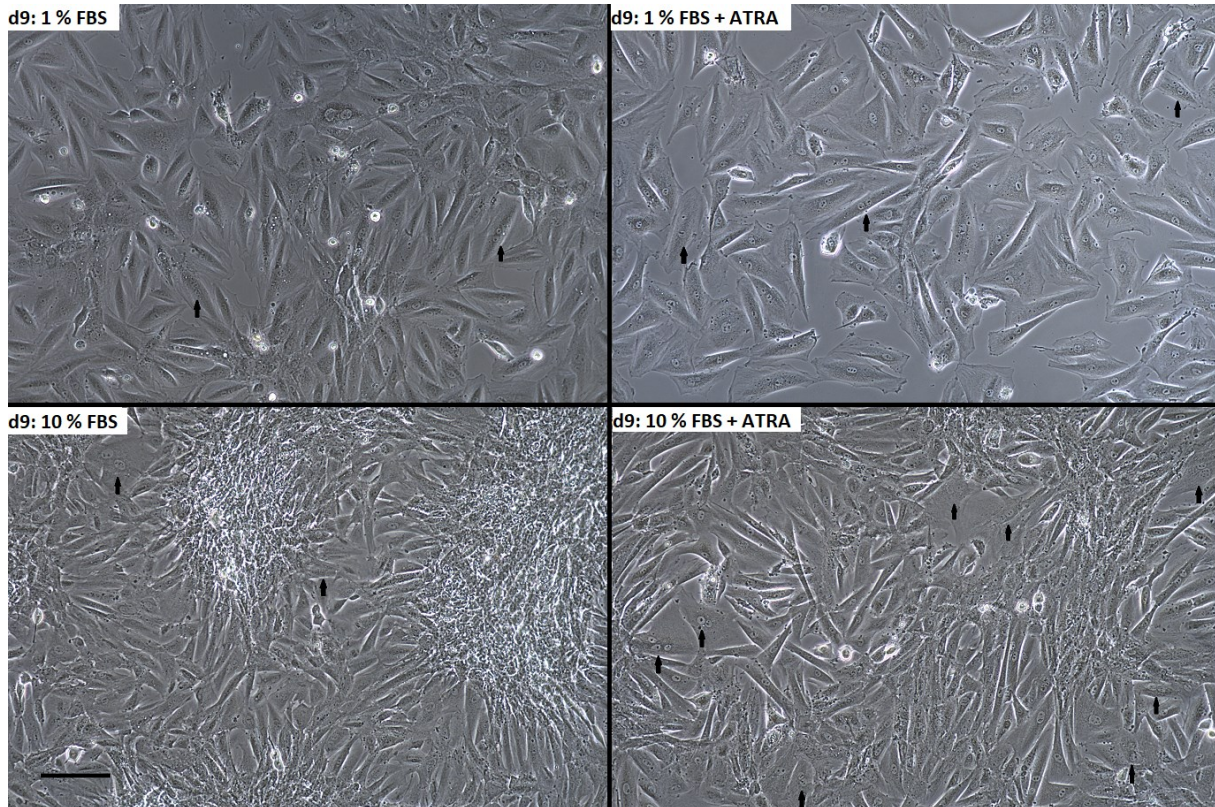
Obr. 12 Fotografie buniek v šiesty deň (d6) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μ m).

Bunky s viacerými jadrami vid' čierne šípky na obrázku.

DMEM + 1 % FBS: Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené krátke vretenovité s jedným jadrom, ale aj bunky predĺžené s viacerými jadrami. **DMEM + 1 % FBS + ATRA:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, ale aj bunky predĺžené s viacerými jadrami. **DMEM + 10 % FBS:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, bunky poprerastané, na Obr. 12 môžeme vidieť ako tvoria zhluky. **DMEM + 10 % FBS + ATRA:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky

nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami ale aj predĺžené bunky s viacerými jadrami.

9. deň (d9) (mikroskopický prehľad vid' Obr. 13)

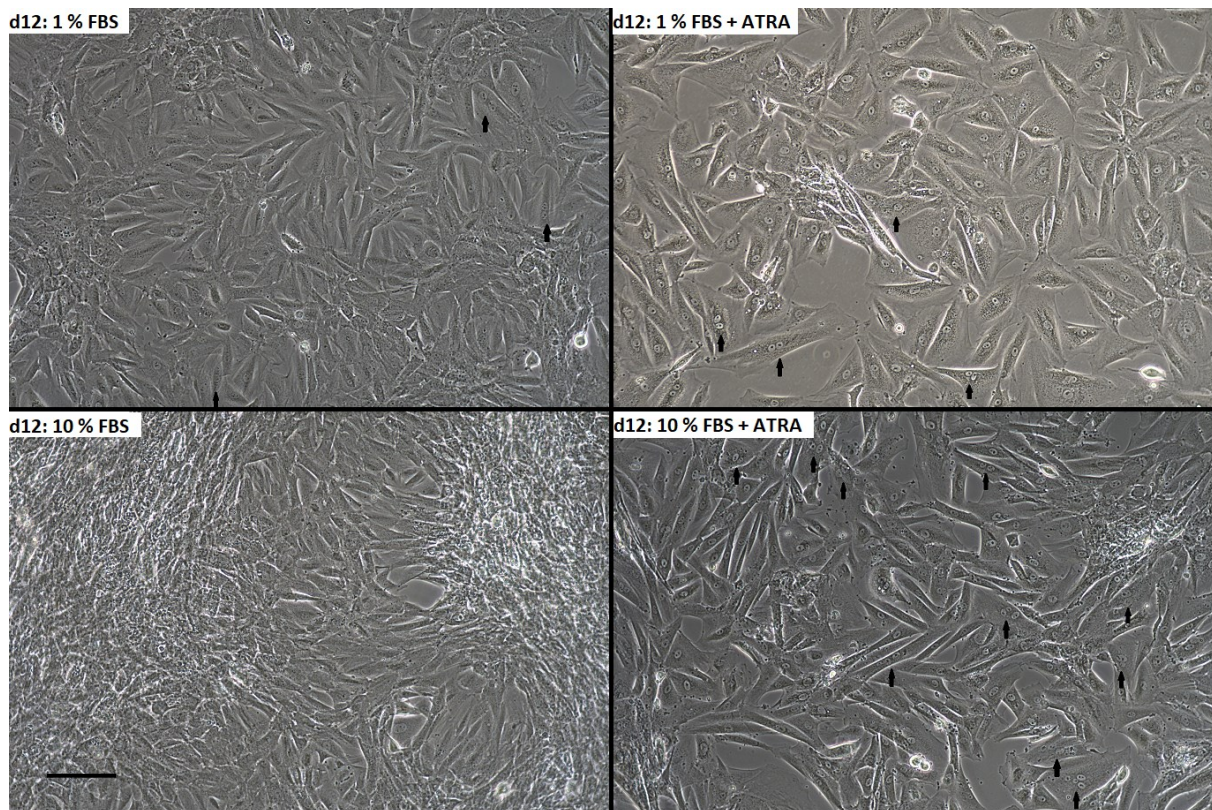


Obr. 13 Fotografie buniek v deviaty deň (d9) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μ m).

Bunky s viacerými jadrami vid' čierne šípky na obrázku.

DMEM + 1 % FBS: Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené krátke vretenovité s jedným jadrom, ale aj bunky predĺžené s viacerými jadrami. **DMEM + 1 % FBS + ATRA:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky predĺžené s viacerými jadrami, ale aj bunky krátke vretenovité s jedným jadrom. **DMEM + 10 % FBS:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, bunky popraskané, na Obr. 13 môžeme vidieť ako tvoria veľké zhľuky. **DMEM + 10 % FBS + ATRA:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Mnoho buniek predĺžených s viacerými jadrami (vid' čierne šípky na Obr. 13). Ale aj bunky vretenovité s jedným jadrom.

12. deň (d12) (mikroskopický prehľad vid' Obr. 14)

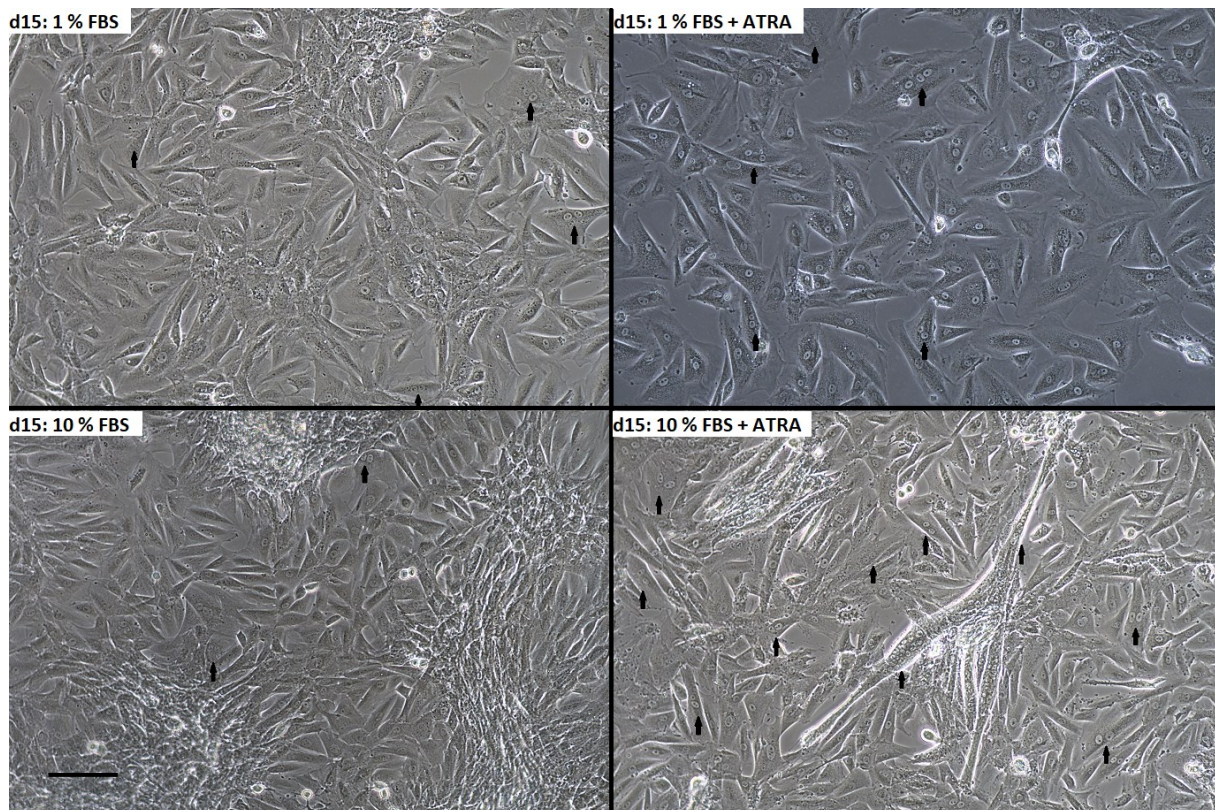


Obr. 14 Fotografie buniek v dvanásty deň (d12) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μm).

Bunky s viacerými jadrami vid' čierne šípky na obrázku.

DMEM + 1 % FBS: Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené krátke vretenovité s jedným jadrom, ale aj bunky predĺžené s viacerými jadrami. **DMEM + 1 % FBS + ATRA:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky predĺžené s viacerými jadrami, ale aj bunky krátke vretenovité s jedným jadrom. **DMEM + 10 % FBS:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, bunky extrémne popraskané. **DMEM + 10 % FBS + ATRA:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Mnoho buniek predĺžených s viacerými jadrami, viac ako v 1 % FBS + ATRA. Ale aj bunky vretenovité s jedným jadrom.

15. deň (d15) (mikroskopický prehľad vid' Obr. 15)



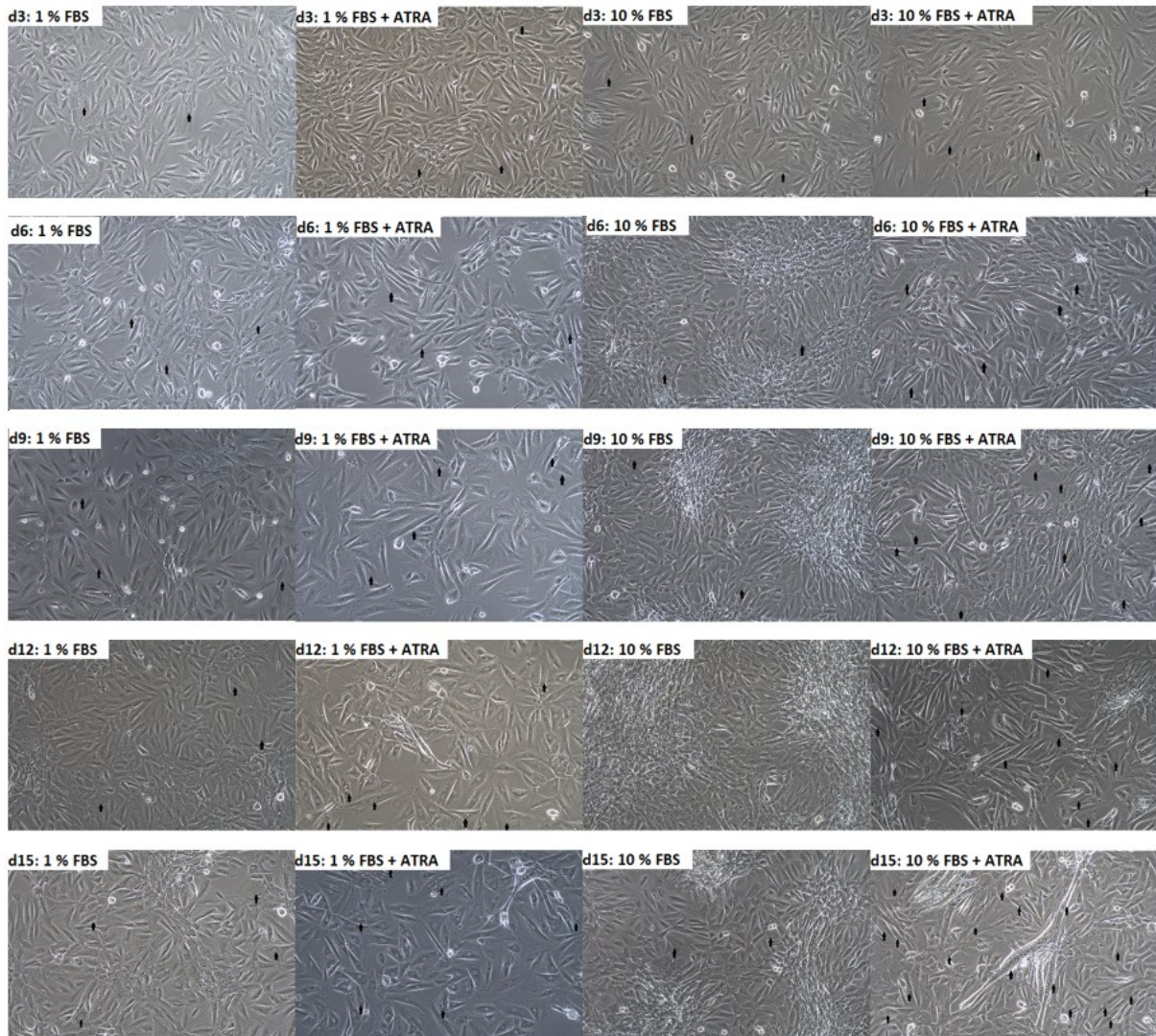
Obr. 15 Fotografie buniek v pätnásty deň (d15) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μ m).

Bunky s viacerými jadrami vid' čierne šípky na obrázku.

DMEM + 1 % FBS: Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené krátke vretenovité s jedným jadrom, ale aj bunky predĺžené s viacerými jadrami. Nie je tu veľká zmena oproti tretiemu dňu (d3). **DMEM + 1 % FBS + ATRA:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky predĺžené s viacerými jadrami, ale aj bunky krátke vretenovité s jedným jadrom. **DMEM + 10 % FBS:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Bunky nepredĺžené, krátke vretenovité s jedným alebo viacerými jadrami, bunky extrémne poprerastané, tvoria zhľuky (vid' Obr. 15). **DMEM + 10 % FBS + ATRA:** Bunky priľnuté na povrchu Petriho misky. Mnoho buniek predĺžených s viacerými jadrami, viac ako v 1 % FBS + ATRA. Ale aj bunky vretenovité s jedným jadrom. Na Obr. 15 je pekne vidieť väčšiu predĺženú mnohojadrovú bunku.

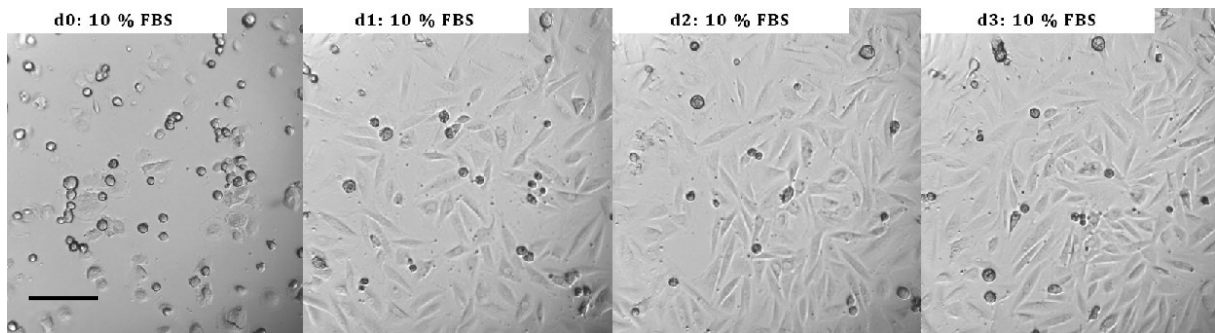
Celkový mikroskopický prehľad všetkých dní je na Obr. 16. Od tretieho dňa (d3) po pätnásty deň (d15). Sérová deprivácia (1 % FBS prvé dva stĺpce) a pridanie ATRA (druhý a štvrtý stĺpec) zvýšili tendenciu buniek zmeniť morfológiu na predĺžený tvar s viacerými jadrami (vid' čierne

šípky) do 9. dňa (d9), potom sa predĺžený tvar buniek viac vyskytoval v 10 % FBS s ATRA. Každý deň predstavuje inú bunkovú populáciu. Šípka na ľavom boku obrázka znázorňuje časovú postupnosť buniek.



Obr. 16 Celkový mikroskopický prehľad všetkých dní.

Zobrazenie buniek kultivovaných v normálnom kultivačnom médiu pred diferenciáciou odo dňa 0 (d0) do 3. dňa (d3). Bunky majú vretenovitý tvar a mononukleárny charakter (viď Obr. 17). Obrázky predstavujú rovnakú bunkovú populáciu.

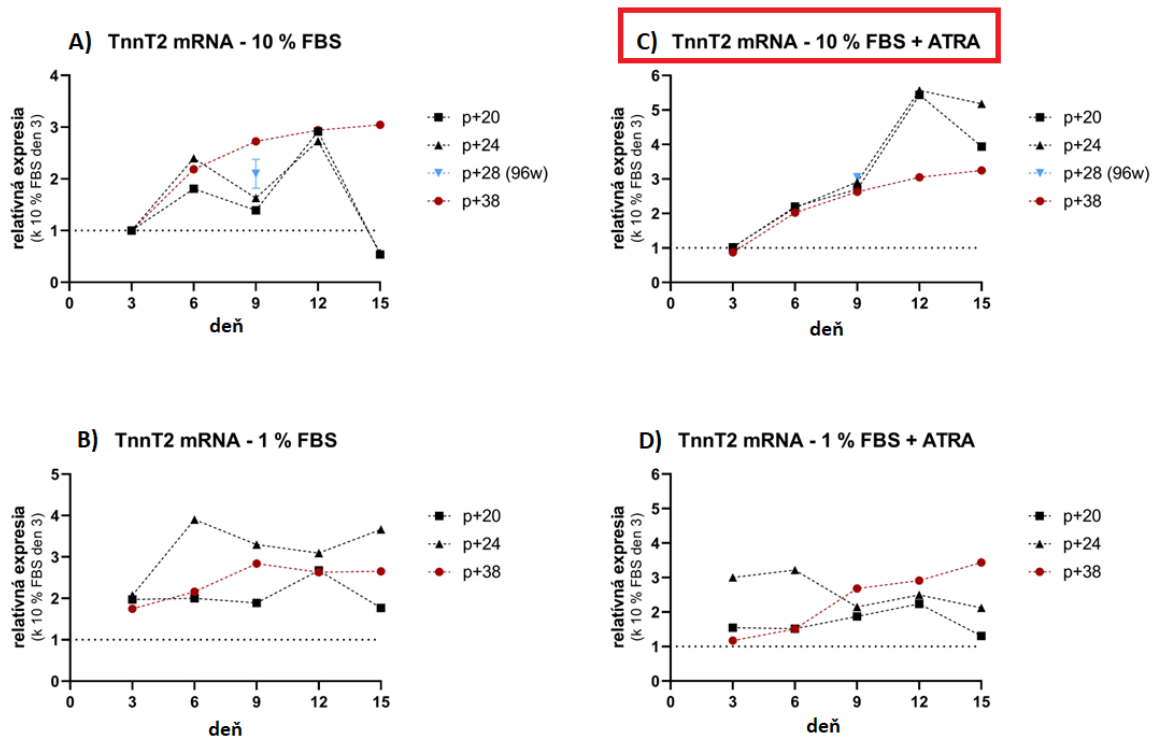


Obr. 17 Zobrazenie buniek H9c2 v normálnom kultivačnom médiu (úsečka predstavuje 100 μm).

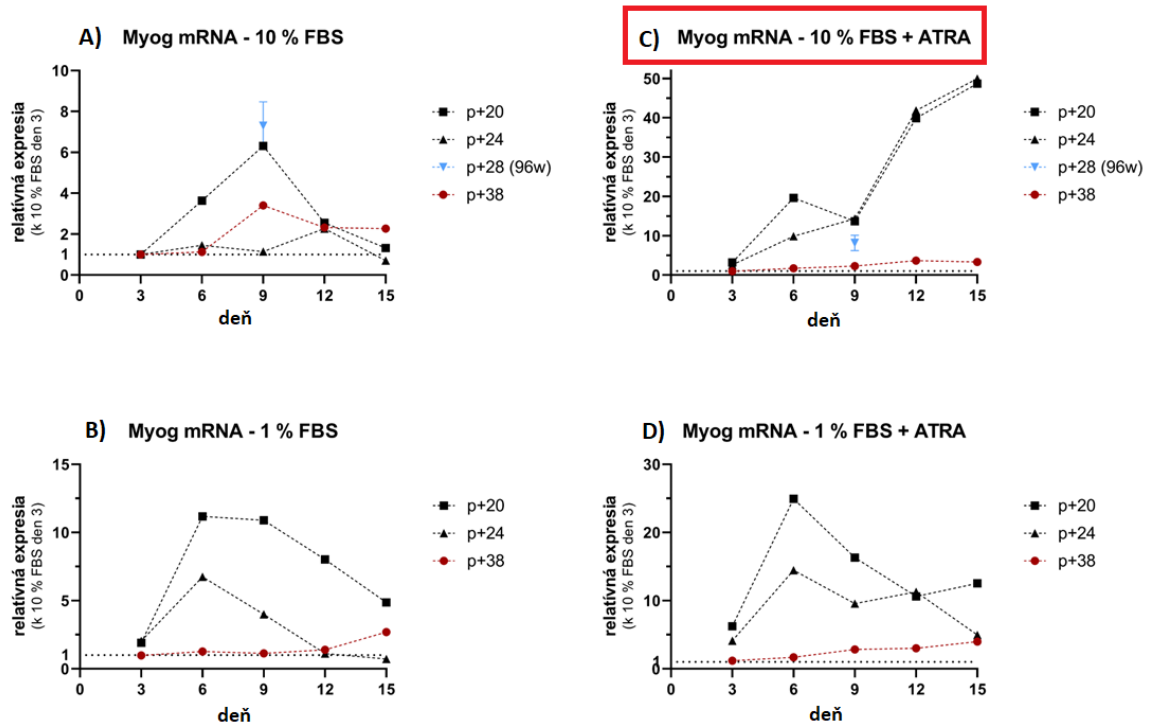
Primárne boli bunky nasadené na proces diferenciácie na Petriho miskách, ale skúšali sa nasadiť aj na 96j. a 12j. formát, kde bunky vykazovali rovnaký stupeň diferenciácie. Spotreba buniek pri nasadzovaní na Petriho misky je niekoľkokrát väčšia ako na 96j. a 12j. formát. Znamenalo by to menšiu spotrebu buniek na pokus, a tým zase reálnejšie použitie buniek v nižších pasážach. Ďalej by sa dala urobiť koncentračná škála pre kyselinu retinovú, čím by sme mohli zistiť ideálnejšiu koncentráciu pre diferenciáciu. Aj keď koncentrácia, ktorú sme použili v tejto práci (10 nM) sa ukázala, že relatívne dobre indukuje bunky k diferenciácii, ale možno by nižšie koncentrácie vykazovali rovnaký stupeň diferenciácie, alebo naopak vyššia koncentrácia by mohla podporiť bunky sa diferencovať ešte viac.

6.3 Vyhodnotenie relatívnej génovej expresie vybraných markerov a transkripčných faktorov

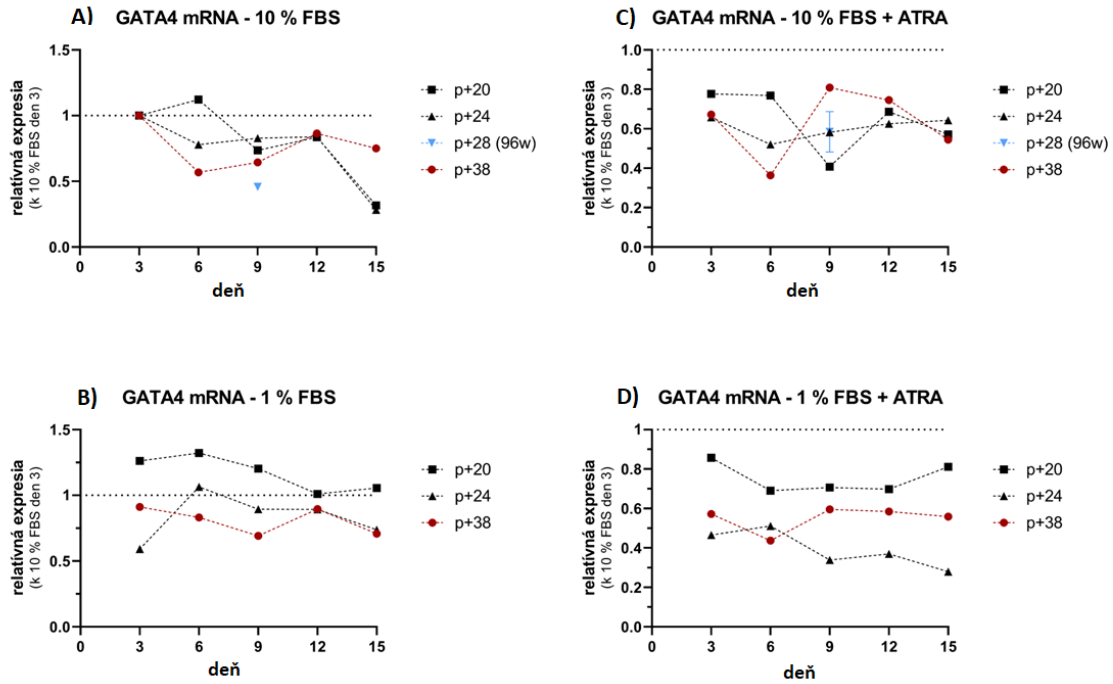
Vyhodnotenie relatívnej génovej expresie na vybrané markery: srdcového troponínu T (cTnT), srdcových transkripčných faktorov (GATA4 a Hand2) a transkripčného faktora kostrového svalstva myogenínu (Myog).



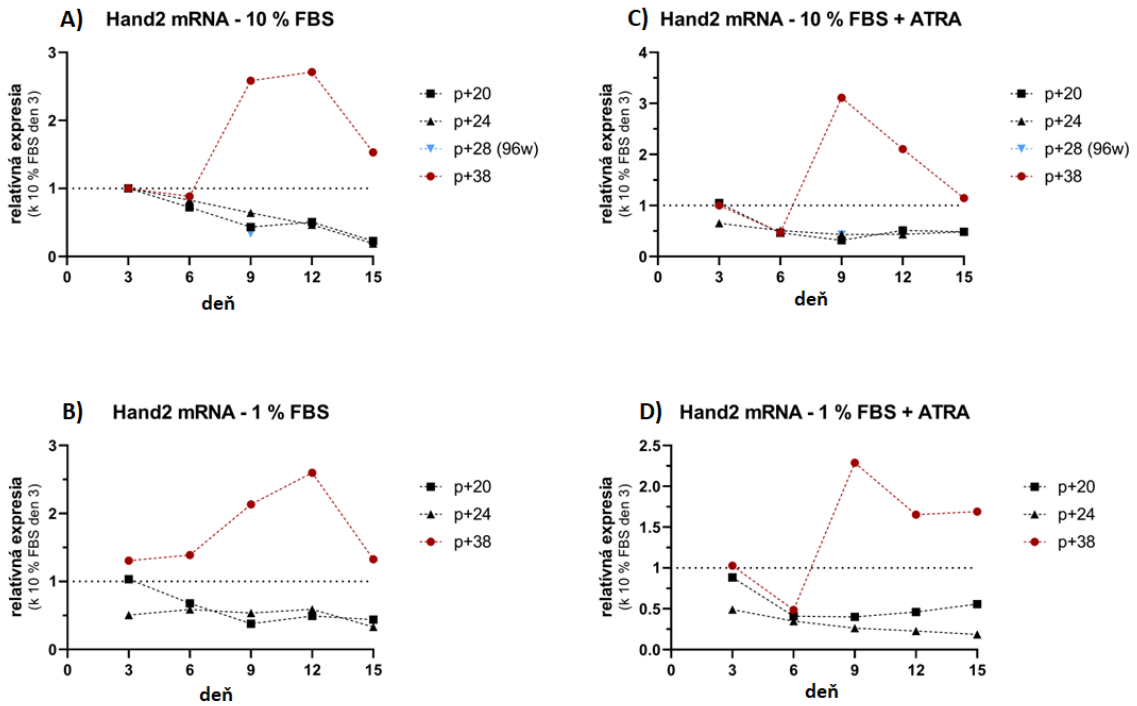
Obr. 18 Relatívna génová expresia špecifického srdcového troponínu T.



Obr. 19 Relatívna génová expresia transkripčného faktora kostrového svalstva myogénínu.



Obr. 20 Relatívna géňová expresia srdcového transkripčného faktora GATA4.



Obr. 21 Relatívna géňová expresia srdcového transkripčného faktora Hand2.

Z grafov môžeme pozorovať, že nie všetky výsledky vykazovali jednoduchú a jednotnú odozvu, pričom významné zmeny trendu boli pozorované v 9. dni. Významná a dobre pozorovateľná zmena bola u génu TnnT2 a Myog v médiu DMEM s 10 % FBS + ATRA (viď Obr. 18C a Obr. 19C), kde došlo k zvýšeniu génovej expresie. Tento efekt bol extrémne viditeľný hlavne v nižšej pasáži, prídanie ATRA tento efekt zvýraznilo, kyselina retinová teda mala vplyv na zvýšenie diferenciácie u oboch koncentrácií séra. Dokonca 5-násobná zmena bola pri 10 % FBS + ATRA u génu Myog v pasáži p+20 a p+24 oproti pasáži p+38. Myogenín pekne reagoval aj pri sérovej deprivácii (1 % FBS). Naopak GATA4 mal minimálnu zmenu, ktorá bola nejednotná, napr. pri 1 % FBS bol mierny nárast pri p+20 a zase pri p+24 génová expresia mierne klesla. (viď Obr. 20B). Hand2 reagoval zaujímavo v súvislosti s vyššou pasážou buniek, jeho génová expresia najskôr klesala a potom prudko stúpala. (viď Obr. 21). Tento výsledok je však neštandardný. V nižších pasážach bola zmena génu Hand2 minimálna.

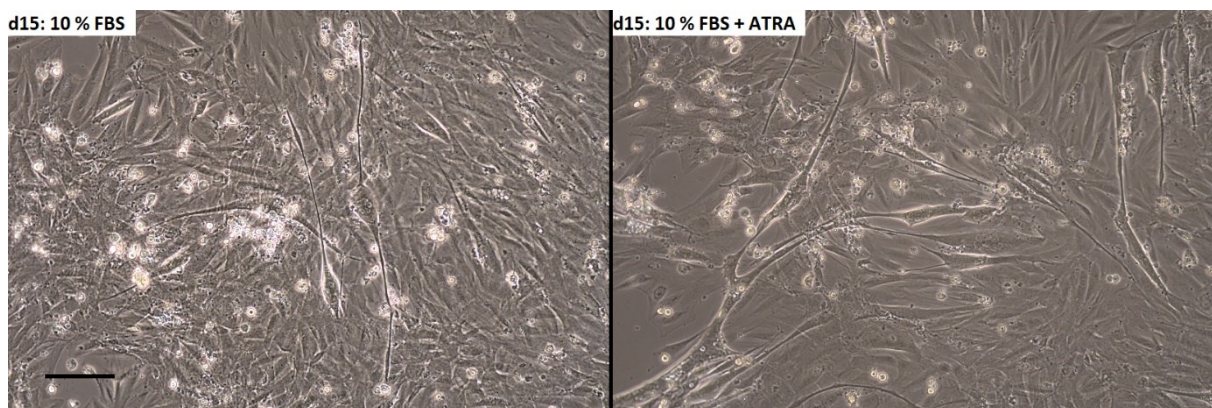
Dôsledkom niektorých nejednotných výsledkov mohlo byť práve vykonanie nášho pokusu v 3 opakovaníach s rôznou pasážou, čo by sa dalo potvrdiť novým prevedením pokusu za zjednodušených podmienok. Keďže sme skúšali vplyv pravidelnej výmeny média a každodenného pridávania ATRA na diferenciáciu buniek. Napr. gén GATA4 by bolo možné vyskúšať na ešte mladšej bunkovej kultúre H9c2 (nižšia ako p+20), práve preto, že táto pasáž vykazovala mierny nárast v génovej expresii.

Z našich výsledkov môžeme určiť, že vek buniek, teda stupeň pasáže, má tiež vplyv na génovú expresiu vybraných markerov. Gény TnnT2 a Myog reagovali veľmi dobre najmä v nižších pasážach, teda pri mladších bunkách, jedno opakovanie s vyššou pasážou môže výsledky skresľovať, preto by bolo dobré ešte raz urobiť pokus s mladšími bunkami, ideálne v rovnakej pasáži. Taktiež tieto dva gény dobre reagovali v médiu s 10 % FBS + ATRA a Myog aj pri sérovej deprivácii v médiu s 1 % FBS s aj bez ATRA. Protokol s 10 % FBS bez ATRA by sa teda nemusel používať a bunky by mohli byť nastavené na proces diferenciácie len v 3 médiách, a to so sérovou depriváciou 1 % FBS s/bez ATRA a 10 % FBS s ATRA. Naopak, zase gén Hand2 reagoval zaujímavo, jeho relatívna génová expresia stúpala hlavne vo vyššej pasáži, čo teda limituje náš pokus a pre tento gén by boli vhodnejšie pokusy na starších bunkách, teda vo vyššej pasáži. Gén GATA4 vykazoval minimálnu zmenu, zato ale nejednotnú. Dôsledkom opäť môže byť nerovnaká pasáž buniek.

6.4 Vplyv pravidelnej výmeny média

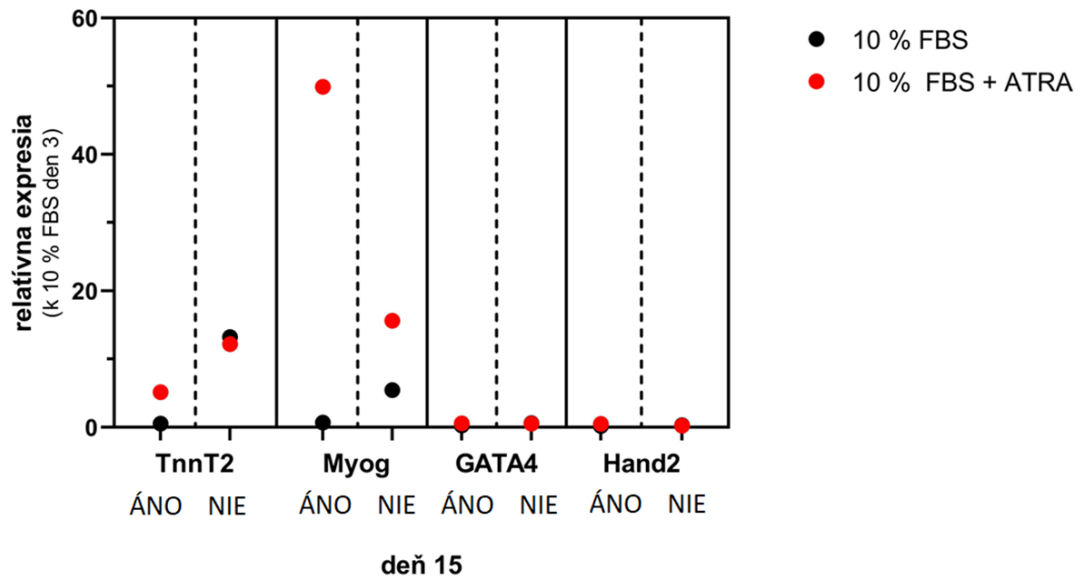
Boli sledované dve série s/bez výmeny DMEM 10 % FBS a s 10 % FBS + ATRA. Boli kultivované 15 dní bez výmeny média a ATRA bola pridaná len v 1.deň (vid' Obr. 22). Sledovali sme vplyv pravidelnej výmeny média a každodenného pridávania ATRA na génovú expresiu vybraných génov (vid' Obr. 23).

Publikované protokoly sú založené na každodennom pridávaní kyseliny retinovej, keďže je považovaná za nestabilnú látku a rýchlo degraduje. Pomocou nášho pokusu, sme zistili, že proces diferenciácie sa naštartuje už pri prvom podaní kyseliny retinovej k bunkovej kultúre a nie je potrebné ju pridávať každý deň. Bez pravidelnej výmeny média a každodenného pridávania ATRA diferenciácia prebehne, tým pádom by sa prevedenie pokusu diferenciácie na bunkovej kultúre H9c2 dalo zjednodušiť. Tým pádom by bolo prevedenie pokusu jednoduchšie a časovo menej náročné. Taktiež by bol jednoduchšie dosiahnuteľný pokus v troch opakovaniach s rovnakou pasážou buniek.



Obr. 22 Fotografie buniek v pätnásty deň (d15) bez výmeny média a ATRA pridaná len v 1.deň (úsečka predstavuje 100 μ m).

Vplyv pravidelnej výmeny médií



Obr. 23 Graf vplyvu pravidelnej výmeny médií

7 Diskusia

V rámci tejto diplomovej práce boli študované a porovnané štyri rôzne, už publikované postupy, vedúce k navodeniu diferenciacie bunkovej línie H9c2 potkaních kardiomyoblastov. Tieto postupy sa odlišujú množstvom séra v kultivačnom médiu (1 % vs 10 %) a v pridávaní retinovej kyseliny. Významným prínosom tejto práce je to, že dané protokoly sledujeme po dobu 15 dní, čo sa odlišuje od referenčných prác citovaných ďalej, z ktorých sme vychádzali, ktoré pracujú s dobou diferenciacie 5-6 dní. Táto bunková línia je často používaná ako *in vitro* model srdcového tkaniva, a často nesprávne označovaná ako kardiomyocyty. Bunky H9c2 sú odvodené zo srdcového tkaniva potkana, majú proliferatívny a relatívne nediferencovaný fenotyp, teda fenotyp neodpovedajúci kardiomyocytom. Napriek tomu, že sa bunky dokážu dobre diferencovať na dospelé svalové bunky, väčšina toxikologických štúdií, zahŕňajúcich túto bunkovú líniu, uskutočňuje experimenty s nediferencovanými myoblastmi. Publikované štúdie dokazujú, že stav diferenciacie srdcovej bunky ovplyvňuje jej citlivosť na toxické látky (Branco et al. 2015). Diferencované a nediferencované bunky H9c2 môžu mať rozdielny metabolizmus a môžu vykazovať rozdielne metabolické zmeny. Teda látky a zlúčeniny, modulujúce bunkový metabolizmus, by mohli mať rozdielne účinky podľa stavu diferenciacie na metabolizmus (Pereira et al. 2011). Hlavným cieľom tejto práce je vybrať čo najreprodukovateľnejší diferenciačný protokol H9c2 buniek, ktorého priebeh a výsledok by bol jasne definovateľný a detekovateľný pomocou zmien v génovej expresii vybraných markerov srdcového tkaniva (srdcový troponín T -TnnT2), kostrového svalu (myogenín) a transkripčných faktorov spojených s vývojom srdca (GATA4, Hand2), ktoré boli pilotne vybrané na základe práce Escarda-Castro et al. (2021).

Výsledky nedávno publikovaných štúdií porovnávajúce proteomické a transkriptomické profily potvrdili fakt, že ani po diferenciaci nie sú H9c2 bunky porovnateľné s primárnymi potkaními kardiomyocytmi či ľudskými iPSC bunkami (Lenčo et al 2015, Onódi et al 2022).

Bunková diferenciacia prebiehajúca pri sérovej deprivácii, teda v našom prípade v médiu s 1 % obsahom séra, a v prítomnosti kyseliny retinovej sa vyznačovala v práci Branco a kol. (2015) zvýšenou expresiou srdcového špecifického markeru troponínu T, čo je potvrdené v tejto práci na úrovni mRNA špecifického srdcového markeru troponínu T. Časový profil expresie mRNA TnnT2 navyše ukázal, že mRNA postupne narastala a v protokole bez ATRA bol nárast minimálne obdobný. Zvýšené hladiny markeru myogenézy (najmä kostrového svalu) myogenínu boli taktiež popísané ako našou, tak aj prácou Branco a kol. V oboch prípadoch bol

popísaný nárast väčší než v prípade troponínu T. Expresia myogenínu spolu s troponínom T svedčí o zmiešanom fenotype H9c2 buniek popisovaným často ako myotubuly. Časový profil mRNA myogenínu vykazuje pri sérovej deprivácii vrchol okolo 6. dňa s následným poklesom.(viď. Obr. 19). Gata4, transkripčný faktor exprimovaný v srdcových bunkách, nevykazoval žiadne významné zmeny po diferenciacii buniek H9c2 s ATRA, čo odpovedá výsledkom citovaných prác. Minimálna zmena bola v médiu so sérovou depriváciou (1 % FBS), avšak bola nejednotná. Mohol by sa vyskúšať ďalší transkripčný faktor z rodiny GATA, a to GATA6, popisovaný v štúdiu od Onódiho a kol. (Onódi et al 2022). Veľmi nejednotnú odpoveď na nízkosérovú diferenciaciu vykazoval transkripčný faktor pre vývoj srdca Hand2, ktorý ale bohužiaľ nebol stanovovaný v žiadnej z tu citovaných prác. U mladších buniek mierne klesal, zatiaľ čo u starších postupne stúpal s vrcholom v 12. dni.

V práci Branco a kol. bola okrem TnnT2 a myogenínu ďalej potvrdená i expresia ďalších génov ako je troponín I a srdcový kalvestrín na úrovni srdca a Myom 2 na úrovni kostrového svalu (Branco et al. 2015). Ménard a kol. a Pereira a kol. uvádza, že myogénna transdiferenciácia buniek H9c2 je potlačená pridaním kyseliny retinovej k diferenciálnemu médiu. Je dôležité zohľadniť fakt, že bunky študovali len počas šiestich dní (Ménard et al. 1999, Pereira et al. 2004). V našom protokole došlo k zmenám práve po 6. dni.

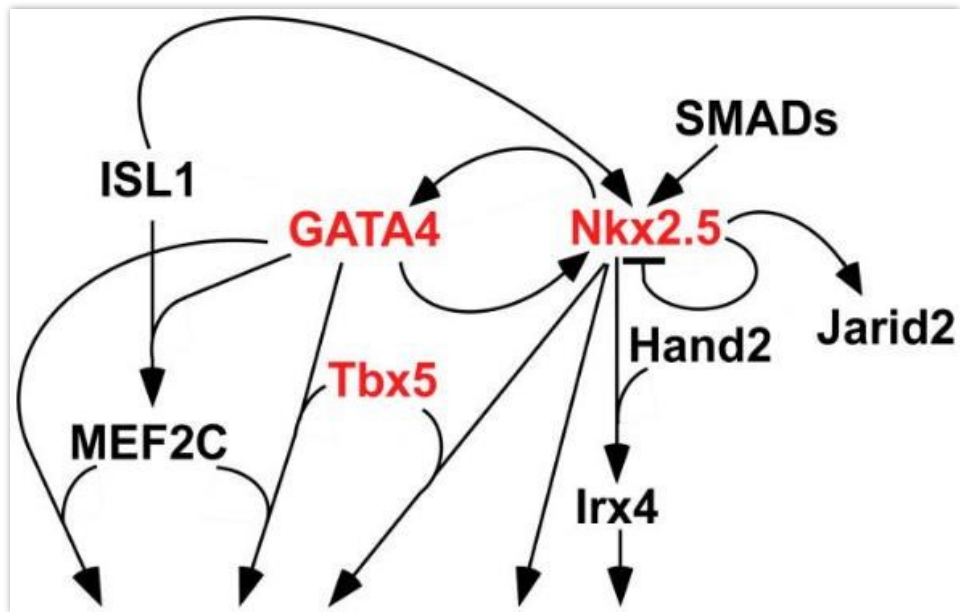
Ďalšou sadou skúšaných diferenciálnych protokolov boli médiá s nezmenenou koncentráciou séra (10 % FBS) s a bez kyseliny retinovej. Bunky v týchto médiách preukazujú výraznú schopnosť proliferovať a bol u nich očakávaný minimálny náznak diferenciácie smerom k srdcovému fenotypu, na rozdiel od tvorby myotubúl. Je nutné doplniť, že médium bez ATRA bolo v citovaných prácach použité ako kontrolné médium (Ménard et al. 1999, Pereira et al. 2004). Experimenty s týmto médiom prebehli kvôli tomu, aby bolo porovnanie výsledkov kompletné. Avšak, z mikroskopických snímok, tak i z časového profilu zmien mRNA sledovaných markerov je zrejmé, že k istej diferenciacii aj tak došlo a najväčšie zmeny boli zaznamenané u myogenínu, kde bol u mladších buniek pozorovaný až 50násobný nárast jeho mRNA. To je v súlade so všeobecne známym poznatkom, že „prerastené“ H9c2 bunky pri dlhodobejšej kultivácii strácajú svoj fenotyp a diferencujú sa smerom k myotubulom, teda k fenotypu svalových buniek.

Pokiaľ by sme porovnali výsledky diferenciácie prevedené v nízkosérovom médiu s normálnym médiom, tak naše výsledky potvrdzujú, že génová expresia myogenínu bola väčšia v médiu s nízkym obsahom séra ako v referenčnom médiu. Z výsledkov je viditeľné, že kultúra s nízkym obsahom séra podporuje bunky viac k diferenciacii na bunky podobné

kostrovému svalu. Dokonca táto odpoveď pretrvávala po 15. deň, ale po 9. dni mierne klesala, no stále bola génová expresia myogenínu väčšia ako génová expresia špecifického srdcového troponínu T (viď Obr. 18, Obr. 19). Pagano a kol. popisuje, že génová expresia myogenínu v médiu so sérovou depriváciou bola podstatne vyššia ako v médiu s 10 % FBS, po dobu kultivácie 6 dní. A že kultúra s nízkym obsahom séra podporuje bunky k diferenciácii na bunky kostrového svalstva a súčasne obmedzuje diferenciáciu na bunky srdcového svalu (Pagano et al. 2004).

Naše výsledky poukazujú na najväčšiu génovú expresiu pri kultivácii buniek v médiu bez sérovej deprivácie s kyselinou retinovou (10 % FBS + ATRA). Génová expresia výrazne stúpala v tomto diferenciačnom médiu a zmena bol výrazná u markerov TnnT2 a Myog (viď Obr. 18C, Obr. 19C), príslušný graf vyznačený červeným štvorcom. Zdá sa, že tento protokol by mohol byť najvhodnejším na sledovanie zmien v génovej expresii pri štúdiu možného toxického pôsobenia bisfenolov. Publikované práce opisujú najvyšší stupeň diferenciácie H9c2 buniek v médiu so sérovou depriváciou všeobecne, ale aj s pridaním kyseliny retinovej do média so sérovou depriváciou. Popisujú proces diferenciácie len po dobu 6 dní (Ménard et al. 1999, Pereira et al. 2004). Môže to byť krátka doba pre sledovanie zmien, pretože v našich protokoloch boli výrazné zmeny najviac pozorovateľné v 9. dni.

Pre sledovanie stavu diferenciácie by bolo možné použiť len TnnT2 a Myog z vybraných génov, najlepšie v troch sériách s rovnakou, ideálne nižšou pasážou. Je nutné však vyskúšať aj ďalšie gény. Pre kompletizáciu výsledkov by bolo vhodné ešte potvrdiť génovú expresiu, na úrovni proteínov na vybrané gény, pomocou metódy western blot a imunofluorescencie. Z iných publikácií je možné nájsť ďalšie markery, ktoré sú popisované v diferenciačných procesoch. Detailný prehľad markerov a transkripčných faktorov je uvedený v review o regulácii vývoja srdca, autorov McCulley a Black, v ktorom je vidieť komplexnosť celého procesu (viď Obr. 24). Z daného obrázku sú zrejmé určité kľúčové regulátory (GATA4, Nkx2.5 a Tbx5), upstream regulátory (rodina SMAD proteínov a ISL1) a downstream regulátory, ktoré sú vzájomne veľmi poprepletané. Ďalší z rodiny GATA je GATA6, ktorý popisuje Onódi (Onódi et al. 2022).



Obr. 24 Dráhy transkripčných faktorov, ktoré sa podieľajú na vývoji myokardu a morfogénéze srdca

Prevzaté z: McCulley a Black (2012)

8 Záver

V tejto práci boli porovnávané časové profily zmien v expresii vybraných markerov pre srdcové alebo kostrové svalové bunky, v štyroch rôznych diferenciacných protokoloch. Cieľom bolo vybrať najlepšie reprodukovateľný protokol a markery s robustnou génovou expresiou, aby bolo možné študovať v následnej fáze toxické pôsobenie látok na proces diferenciácie, či už smerom k srdcovému, alebo kostrovému svalu. Všetky protokoly viedli k istej diferenciácii, zatiaľ najslubnejším protokolom pre ďalšie experimenty sa javí normálne kultivačné médium s kyselinou retinovou (10 % FBS a ATRA) (a to tiež z čisto praktických dôvodov) a ako doba diferenciácie 6 alebo 9 dní.

9 Zoznam obrázkov

Obr. 1 Schéma bunkového cyklu eukaryot.....	9
Obr. 2 Schématické znázornenie M- fázy.....	11
Obr. 3 Regulácia progresie bunkového cyklu pomocou cyklín-dependentných kináz a cyklínov.	15
Obr. 4 Nediferencované H9c2 bunky (úsečka predstavuje 100 μm).....	19
Obr. 5 Diferencované H9c2 bunky (úsečka predstavuje 100 μm).	19
Obr. 6 Rozdelenie Petriho misiek podľa druhu pridávaného média v 2. deň.....	24
Obr. 7 Rozdelenie Petriho misiek, média nemenené.....	24
Obr. 8 Fázová separácia.	27
Obr. 9 Ukážka zmeraného vzorku na spektrofotometri NanoDrop.....	28
Obr. 10 Ukážka Thermal cycleru a jeho teplotného profilu.	30
Obr. 11 Fotografie buniek v tretí deň (d3) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μm).....	33
Obr. 12 Fotografie buniek v šiesty deň (d6) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μm).....	34
Obr. 13 Fotografie buniek v deviaty deň (d9) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μm).	35
Obr. 14 Fotografie buniek v dvanásť deň (d12) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μm). 36	
Obr. 15 Fotografie buniek v pätnásť deň (d15) diferenciácie (úsečka predstavuje 100 μm)..	37
Obr. 16 Celkový mikroskopický prehľad všetkých dní.....	38
Obr. 17 Zobrazenie buniek H9c2 v normálnom kultivačnom médiu (úsečka predstavuje 100 μm).	39
Obr. 18 Relatívna génová expresia špecifického srdcového troponínu T.	40
Obr. 19 Relatívna génová expresia transkripčného faktora kostrového svalstva myogenínu. .	40
Obr. 20 Relatívna génová expresia srdcového transkripčného faktora GATA4.....	41
Obr. 21 Relatívna génová expresia srdcového transkripčného faktora Hand2.	41
Obr. 22 Fotografie buniek v pätnásť deň (d15) bez výmeny média a ATRA pridaná len v 1.deň (úsečka predstavuje 100 μm).....	43
Obr. 23 Graf vplyvu pravidelnej výmeny médií	44
Obr. 24 Dráhy transkripčných faktorov, ktoré sa podieľajú na vývoji myokardu a morfogénéze srdca	48

10 Zoznam tabuliek

Tab. 1 Gény regulujúce bunkový cyklus a ich porovnanie	12
Tab. 2 Zloženie High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	29
Tab. 3 Obsah PCR stripov	29
Tab. 4 Zloženie Master Mixu	30
Tab. 5 Riedenie templátu cDNA	31
Tab. 6 Teplotný profil RT – PCR cykléru.....	31

11 Literatúra

Alberts B. Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad labem. 2005.

Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2014 [cit 12. máj 2023];1170:29–40. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990352/>

Böhmer D, Danišovič L, Repiská V. *Lekárska biológia a genetika 1*. Univerzita Komenského, Bratislava. 2020

Branco AF, Pereira SP, Gonzalez S, Gusev O, Rizvanov AA, Oliveira PJ. Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype. *PLoS One* [Internet]. 29. jún 2015 [cit 12. máj 2023];10(6):e0129303. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4485408/>

Bunkový cyklus. In: *BIOpedia.sk*.2020. Dostupné na URL: <https://biopedia.sk/bunka/bunkovy-cyklus>. Prístup: 16.02.2023

Coffman JA. Cell Cycle Development. *Developmental Cell* [Internet]. 01. marec 2004 [cit 12. máj 2023];6(3):321–7. Available at: [https://www.cell.com/developmental-cell/abstract/S1534-5807\(04\)00067-X](https://www.cell.com/developmental-cell/abstract/S1534-5807(04)00067-X)

Escarda-Castro E, Herráez MP, Lombó M. Effects of bisphenol A exposure during cardiac cell differentiation. *Environmental Pollution* [Internet]. 01. október 2021 [cit 12. máj 2023];286:117567. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749121011490>

Chomczynski P, Mackey K. Substitution of Chloroform by Bromochloropropane in the Single-Step Method of RNA Isolation. *Analytical Biochemistry* [Internet]. 01. február 1995 [cit 12. máj 2023];225(1):163- 4. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269785711268>

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* [Internet]. 01. apríl 1987

[cit 12. máj 2023];162(1):156- 9. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269787900212>

Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res.* 15. marec 1976;98(2):367–81.

Kutichová Martina. Studium fenotypu H9c2 buněk odvozených od potkaních srdečních myoblastů. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2012: 13 s.

Kuznetsov AV, Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S, Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. február 2015 [cit 12. máj 2023];1853(2):276– 84.

Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4388199/>

Lemmens B, Lindqvist A. DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *J Cell Biol* [Internet]. 02. december 2019 [cit 12. máj 2023];218(12):3892–902.

Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6891093/>

Levy A, Albiges-Sauvin L, Massard C, Soria JC, Deutsch É. Cycle cellulaire, mitose et applications thérapeutiques. *Bulletin du Cancer* [Internet]. 01. september 2011 [cit 12. máj 2023];98(9):1037- 45. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007455115305841>

Libichová Lenka. Kontrolní mechanismy sestavení dělicího vřeténka u savčích oocytů. Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Brno, 2019: 26, 27 s.

Limas JC, Cook JG. Preparation for DNA Replication: The Key to a Successful S phase. *FEBS Lett* [Internet]. október 2019 [cit 12. máj 2023];593(20):2853–67. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6817399/>

Liu L, Michowski W, Kolodziejczyk A, Sicinski P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol* [Internet]. september 2019 [cit 12. máj 2023];21(9):1060–7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7065707/>

Masago K, Fujita S, Oya Y, Takahashi Y, Matsushita H, Sasaki E, et al. Comparison between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 17. december 2021 [cit 12. máj 2023];57(12):1375. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8709233/>

Ménard C, Pupier S, Mornet D, Kitzmann M, Nargeot J, Lory P. Modulation of L-type Calcium Channel Expression during Retinoic Acid-induced Differentiation of H9C2 Cardiac Cells *. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 08. október 1999 [cit 14. apríl 2023];274(41):29063–70. Available at: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)51944-5/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)51944-5/abstract)

Otová B, Kohoutová M, Panczak A. *Lékařská biologie a genetika*. Karolinum, Praha. 2008

Pereira SL, Ramalho-Santos J, Branco AF, Sardão VA, Oliveira PJ, Carvalho RA. Metabolic Remodeling During H9c2 Myoblast Differentiation: Relevance for In Vitro Toxicity Studies. *Cardiovasc Toxicol* [Internet]. 01. jún 2011 [cit 12. máj 2023];11(2):180–90. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12012-011-9112-4>

Průša R. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii. Lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED*. 1997. Dostupné na URL: <http://stary.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/pdf/skripta.pdf>. Prístup: 19.03.2023

Repiská V, Böhmer D, Braxatorisová T, Malová J. *Lekárska biológia a genetika 2*. Univerzita Komenského, Bratislava. 2020

Sela Y, Molotski N, Golan S, Itskovitz-Eldor J, Soen Y. Human Embryonic Stem Cells Exhibit Increased Propensity to Differentiate During the G1 Phase Prior to Phosphorylation of Retinoblastoma Protein. *Stem Cells* [Internet]. 01. jún 2012 [cit 12. máj 2023];30(6):1097–108. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.1078>

Šípek A. Cytogenetika. In: *Genetika-biologie*. 2010. Dostupné na URL: <http://www.genetika-biologie.cz/cytogenetika>. Prístup: 19.03.2023

Špaček Petr. Stanovení markerů epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT) u buněk *in vitro*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2017: 29, 30 s.

Van den Heuvel S. Cell-cycle regulation. WormBook [Internet]. 21. september 2005 [cit 12. máj 2023];1–16. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4781127/>

Wang XQ, Lo CM, Chen L, Ngan ESW, Xu A, Poon RY. CDK1-PDK1-PI3K/Akt signaling pathway regulates embryonic and induced pluripotency. Cell Death Differ [Internet]. január 2017 [cit 12. máj 2023];24(1):38- 48. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5260505/>

Wang Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. Cells [Internet]. 26. november 2021 [cit 12. máj 2023];10(12):3327. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8699227/>

Pope SD, Medzhitov R. Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. Molecular Cell [Internet]. 02. august 2018 [cit 11. apríl 2023];71(3):389–97. Available at: [https://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765\(18\)30586-0](https://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765(18)30586-0)

Zhou R, Xia M, Zhang L, Cheng W, Yan J, Sun Y, et al. Individual and combined effects of BPA, BPS and BPAF on the cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. Ecotoxicology and Environmental Safety [Internet]. 01. september 2021 [cit 11. apríl 2023];220:112366. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651321004784>

Karrer C, Roiss T, von GN, Gramec SD, Peterlin ML, Hungerbühler K. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of the Bisphenols BPA, BPS, BPF, and BPAF with New Experimental Metabolic Parameters: Comparing the Pharmacokinetic Behavior of BPA with Its Substitutes. Environmental Health Perspectives [Internet]. [cit 11. apríl 2023];126(7):077002. Available at: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/full/10.1289/EHP2739>

Park C, Song H, Choi J, Sim S, Kojima H, Park J, et al. The mixture effects of bisphenol derivatives on estrogen receptor and androgen receptor. Environmental Pollution [Internet]. 01. máj 2020 [cit 11. apríl 2023];260:114036. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749119348511>

Yang S, Cheng W, Li X, Liang F, Zhou R, Wang H, et al. Use of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes to study cardiotoxicity of bisphenol AF via the GPER/CAM/eNOS pathway. *Toxicology* [Internet]. 28. február 2020 [cit 11. apríl 2023];432:152380. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X20300196>

McCulley DJ, Black BL. Transcription Factor Pathways and Congenital Heart Disease. *Curr Top Dev Biol* [Internet]. 2012 [cit 11. apríl 2023];100:253–77. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3684448/>

Shin AN, Han L, Dasgupta C, Huang L, Yang S, Zhang L. SIRT1 increases cardiomyocyte binucleation in the heart development. *Oncotarget* [Internet]. 03. január 2018 [cit 24. apríl 2023];9(8):7996–8010.

Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5814276/>

Pagano M, Naviglio S, Spina A, Chiosi E, Castoria G, Romano M, et al. Differentiation of H9c2 cardiomyoblasts: The role of adenylate cyclase system. *Journal of Cellular Physiology* [Internet]. 2004 [cit 13. apríl 2023];198(3):408–16. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.10420>

Onódi Z, Visnovitz T, Kiss B, Hambalkó S, Koncz A, Ágg B, et al. Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [Internet]. 01. apríl 2022 [cit 06. máj 2023];165:19–30. Available at: [https://www.jmcc-online.com/article/S0022-2828\(21\)00234-0/fulltext](https://www.jmcc-online.com/article/S0022-2828(21)00234-0/fulltext)

Lenčo J, Lenčová-Popelová O, Link M, Jirkovská A, Tambor V, Potůčková E, et al. Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model. *Experimental Cell Research* [Internet]. 10. december 2015 [cit 06. máj 2023];339(2):174–86. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482715301257>

Lei B, Sun S, Zhang X, Feng C, Xu J, Wen Y, et al. Bisphenol AF exerts estrogenic activity in MCF-7 cells through activation of Erk and PI3K/Akt signals via GPER signaling pathway. *Chemosphere* [Internet]. 01. apríl 2019 [cit 12. máj 2023];220:362–70. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518324573>