

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Vplyv imatinibu na vybrané myšacie mikroRNA**

**Bc. Silvia Heglasová**

**Vedúci diplomovej práce: Doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2019**

## **Pod'akovanie**

Veľká vďaka patrí pani Doc. Ing. Petre Matouškovej, Ph.D. za jej trpezlivosť, cenné rady, pripomienky a odborné vedenie mojej diplomovej práce.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri jej spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, 2019

SILVIA HEGLASOVÁ

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Silvia Heglasová

Školitel: Doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název diplomové práce: Vplyv imatinibu na vybrané myšacie mikroRNA

Imatinib (IMB) patrí medzi nízkomolekulárne tyrozín kinázové inhibítory (TKI). Jeden z nežiadúcich účinkov IMB je kardiotoxicita. Včasná diagnostika poškodenia srdca je dôležitá pre zlepšenie zdravia ľudí. Potenciálnym biomarkerom poškodenia srdca sú mikroRNA (miRNA). Nachádzajú sa nielen intracelulárne, ale aj voľne cirkulujúce v krvnom obeh. MiRNA v plazme sú stabilné, odolné voči opakovanému zmrazovaniu a metódy ich stanovenia sú veľmi citlivé. V mojej diplomovej práci som preto zisťovala zmenu expresie miRNA pri poškodení srdca IMB. Sledovala som cirkulujúce miRNA v plazme a tkanivové miRNA v srdciach myší. Vybrané miRNA boli stanovované kvantitatívnou real-time PCR (qPCR). Bola tiež stanovená hladina Troponínu T v plazme ako klasického biomarkeru kardiotoxicity.

Hladiny Troponínu T v plazmách ovplyvnených IMB boli veľmi variabilné. Tento fakt poukazuje na odlišné reakcie jedincov na IMB. Zmeny expresie pozorovaných miRNA v plazme myší, ktorým bol podávaný IMB neboli významné. Ku štatisticky významnému zníženiu expresie došlo len u miR-205 v srdcovom tkanive. Vhodnosť použitia vybraných cirkulujúcich miRNA sa kvôli nesignifikantným výsledkom nepreukázala. Pre prípadné použitie miRNA ako biomarkerov kardiotoxicity IMB sú potrebné rozsiahlejšie štúdie.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Silvia Heglasová

Supervisor: Doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

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

Imatinib (IMB) belongs to low molecular weight tyrosine kinase inhibitors (TKI). One of the undesirable effects of IMB is cardiotoxicity. Early diagnosis of heart damage is important for improving human health. MicroRNAs (miRNAs) are intensively studied as potential early biomarkers of cardiac damage. They are not only intracellular but also circulating freely in the bloodstream. Plasma miRNAs are stable, resistant to repeated freezing and methods of their detection are very sensitive. In my diploma thesis I have studied changes in the expression of miRNAs in plasma in the IMB induced heart damage. I have analyzed circulating plasma miRNAs and also miRNA levels in mice hearts. Selected miRNAs were measured by quantitative real-time PCR (qPCR). Plasma Troponin T levels were also measured as classical biomarker of cardiotoxicity.

Troponin T levels in the IMB-treated plasma were very variable. This fact points to different responses of individuals to IMB. Changes in expression of observed miRNA in plasma affected by IMB were not significant. Statistically significant reduction in expression occurred only in the level of miR-205 in cardiac tissue. My results did not prove applicability of selected miRNAs due to non-significant differences. More extensive studies are required for using miRNA as biomarkers of IMB cardiotoxicity.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1 MikroRNA	9
2.2 MikroRNA a fyziológia srdca	10
2.3 Molekuly mikroRNA ako biomarkery patológií srdca	12
2.3.1 Akútny infarkt myokardu	13
2.3.2 Zlyhávanie srdca	14
2.3.3 Fibrilácia predsiení	14
2.3.4 Kardiomyopatia	15
2.3.5 Ischemická choroba srdca	15
3. KARDIOTOXICITA .....	16
3.1 Tradičné markery kardiotoxicity	16
3.2 Kardiotoxicita liečiv	17
4. KARDIOTOXICKÉ LIEČIVÁ .....	21
4.1 Doxorubicín	21
4.2 5-Fluorouracil	22
4.3 Trastuzumab	23
4.4 Inhibítory tyrozín kinázy	24
4.4.1 Sunitinib	25
4.4.2 Imatinib	26
5. CIEĽ PRÁCE.....	30
6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	31
6.1 Materiály a prístroje	31
6.1.1 Biologický materiál	31
6.1.2 Použité chemikálie	31
6.1.3 Prístroje	32
6.1.4 Ďalšie pomôcky	33
6.2 Metodika práce	33

6.2.1	Izolácia RNA	33
6.2.2	Izolácia RNA z plazmy pomocou kitu	34
6.2.3	Meranie koncentrácie a čistoty RNA pomocou Nanodropu	35
6.2.4	Odstránenie DNA z RNA vzoriek	36
6.2.5	MikroRNA- reverzná transkripcia	36
6.2.6	Real-time PCR (kvantitatívna PCR, qPCR)	38
6.2.7	Izolácia proteínov	39
6.2.8	Stanovenie koncentrácie bielkovín	40
6.2.9	Elektroforéza	41
6.2.10	Imunobloting	45
6.2.11	Analýza dát	47
7.	VÝSLEDKY.....	48
7.1	Stanovenie Troponínu T v plazme	48
7.2	Stanovenie profilu mikroRNA	49
7.2.1	Veľkokapacitné stanovenie technikou microarray v plazme	49
7.2.2	Stanovenie vybraných mikroRNA v plazme pomocou qPCR	50
7.2.3	Stanovenie vybraných mikroRNA v srdci pomocou qPCR	52
7.3	Stanovenie koncentrácie bielkoviny	53
7.4	Výsledky imunoblotingu	54
8.	DISKUSIA.....	56
9.	ZÁVER .....	59
10.	POUŽITÉ SKRATKY.....	60
11.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	63

# 1. ÚVOD

IMB tiež známy ako “Gleevec” alebo “Glivec” je TKI. Predstavoval revolúciu v liečbe chronickej myeloidnej leukémie (CML) v roku 2001. IMB bol vynájdený v 90-tych rokoch 20. storočia chemikom Nicholasom Lydonom a jeho využitie v liečbe CML objavil onkológ Brian Druker. Prvé klinické testovanie IMB bolo v roku 1998 a overený bol organizáciou Food and Drug Administration v roku 2001. IMB predstavoval veľký pokrok v liečbe nádorových ochorení, pretože je schopný premeniť smrteľný nádor na stav, ktorý sa dá ďalej liečebne zvládať (Iqbal a Iqbal 2014). O 5 rokov od uvedenia IMB na trh bol napriek jeho veľkému úspechu odhalený významný nežiadúci účinok. V roku 2006 Kerkelä et al. objavili kardiotoxický účinok IMB. Za hlavný mechanizmus jeho toxicity označili vznik mitochondriálnej dysfunkcie. Konkrétne potvrdili kolaps membránového potenciálu mitochondrií a následne zníženie tvorby adenosín trifosfátu (ATP) a tiež vymiznutie mitochondriálnych krist (Kerkelä et al. 2006). Zo zdravotného a finančného hľadiska je preto včasné a presné stanovenie poškodenia srdca veľmi významné. Biomarkery kardiotoxicity s veľkým potenciálom pre diagnostiku ochorení srdca sú práve miRNA (Xu et al. 2012). Výskumy za posledných desať rokov ukázali, že tieto evolučne konzervované, malé, nekódujúce ribonukleové kyseliny (RNA) sú dôležitými regulátormi takmer všetkých procesov v bunke. Ich hlavnou úlohou je regulácia génovej expresie. MiRNA sa komplementárne viažu na 3'-koniec RNA, ktorá kóduje proteín a tá sa nazýva mediátorová RNA (mRNA). Toto spojenie vedie k degradácii a inhibícii translácie mRNA do štruktúry proteínu. MiRNA sa však v medicíne stali nielen významnými špecifickými biomarkermi poškodenia tkanív, ale tiež cieľmi pre nové terapeutické prístupy (Kreth et al. 2018).

Hlavnou témou mojej diplomovej práce bolo kvantifikovať v myšacom modeli vybrané miRNA a na základe porovnania vyšetovaných vzorkov s kontrolnými vzorkami tak určiť konkrétne miRNA, ktorých expresia bola významne zmenená po pôsobení IMB na srdcové tkanivo myši.

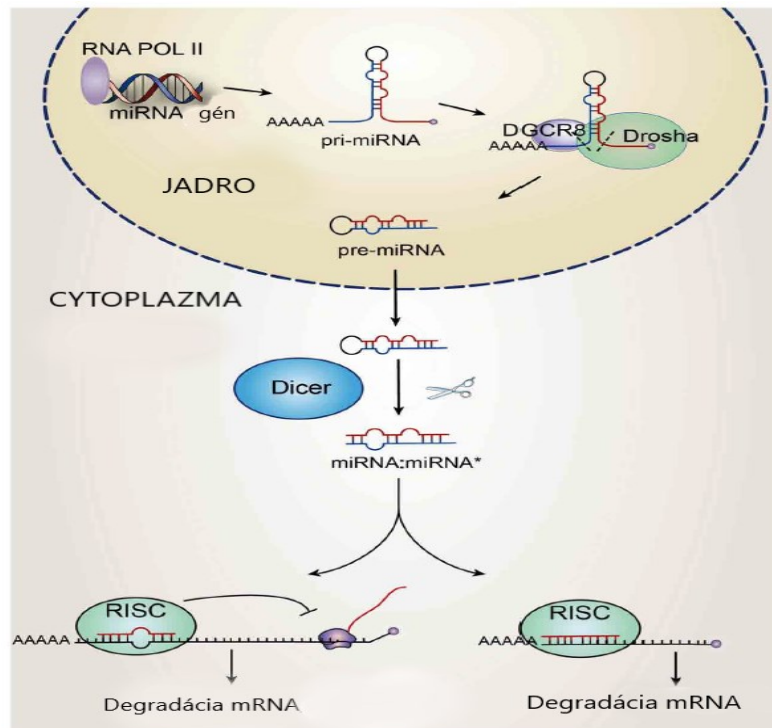


## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 *MikroRNA*

MiRNA sú molekuly RNA dlhé 18-25 nukleotidov. Nenesú informáciu o primárnej štruktúre bielkovín. Ich hlavnou úlohou je regulácia génovej expresie blokáciou translácie mRNA do štruktúry proteínu (Rawal et al. 2014).

Vznik miRNA počína v jadre bunky transkripciou deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) do štruktúry primárnej miRNA (pri-miRNA). Tento proces je katalyzovaný RNA polymerázou II. Pri-miRNA následne vytvára vlásenkovú štruktúru vďaka nedokonalému párovaniu báz. Ďalej je pri-miRNA štiepená endonukleázou Drosha za vzniku prekursorovej miRNA (pre-miRNA). Exportin 5 prenesie pre-miRNA cez membránu jadra do cytoplazmy. V cytoplazme je pre-miRNA štiepená endonukleázou Dicer a vzniká miRNA duplex. Jeden reťazec miRNA duplexu je degradovaný a z druhého vzniká funkčná miRNA. Funkčná miRNA je následne zakomponovaná do tlmiaceho komplexu zvaného RNA induced silencing complex (RISC). Tento komplex rozpozná cieľovú mRNA a zaháji posttranskripčnú modifikáciu génovej expresie. MiRNA môže inhibovať transláciu alebo navodiť degradáciu cieľovej mRNA (Liu a Olson 2010). Popísaný proces znázorňuje Obrázok 1. Okrem hlavnej funkcie intracelulárnych molekúl miRNA, čiže regulácie transkripcie v konkrétnej bunke, majú molekuly miRNA aj ďalšie funkcie. Cirkulujúce miRNA v krvi sú stabilné vďaka ich väzbe na bielkoviny alebo vďaka ich uloženiu v exozómoch alebo lipoproteínových časticiach. MiRNA teda môžu slúžiť ako endokrinné alebo parakrinné signálne molekuly. Cieľovými tkanivami sú miRNA prijaté fagocytózou, endocytózou alebo splynutím membrán. Vnútri cieľových buniek potom účinkujú rovnakým mechanizmom ako v bunkách, z ktorých vzišli. Ako príklad môže slúžiť miR-223 prenášaná v HDL časticiach, ktorá po vstupe do bunky endotelu cievy zastaví expresiu adhézných molekúl (Min a Chan 2015).



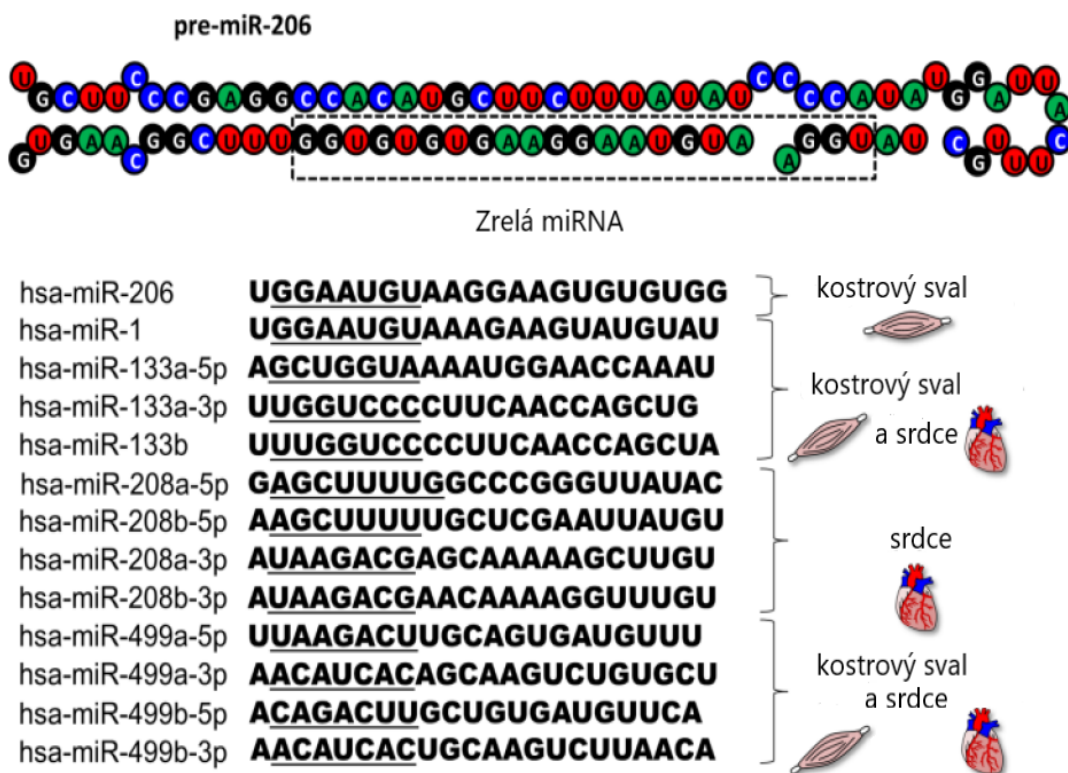
**Obrázok 1: Vznik a spracovanie mikroRNA**

Zdroj: prebraté a upravené z (Barca-Mayo a Lu 2012)

## 2.2 MikroRNA a fyziológia srdca

MiRNA sa nachádzajú v rôznych typoch buniek a sú dôležité pre reguláciu rozličných bunkových procesov. MiRNA sa podieľajú napríklad na diferenciácii embryonálnych buniek, proliferácii kardiomyocytov a regulácii iónových kanálov. Vývoj srdca vyžaduje veľmi precízne a komplexné interakcie rôznych línií buniek. Sú to kardiomyocyty, bunky endokardu a epikardu, bunky ciev, fibroblasty a bunky prevodného srdcového systému. MiRNA má tiež zásadný význam pre vývoj kardiovaskulárneho systému. Po delícii génu pre enzým Dicer, ktorý je nutný pre spracovanie miRNA došlo u embryonálnych buniek myší k ich odumretí (Small a Olson 2011). Príklad prekursorovej vlásenkovej štruktúry miRNA (miR-206) je znázornený na Obrázku 2. Obrázok 2 tiež obsahuje prehľad najčastejších svalových a srdcových miRNA. MiR-206 sa vyskytuje hlavne v bunkách kostrového svalu. Táto miRNA je dôležitá pre migráciu, diferenciáciu a proliferáciu progenitorových buniek kostrového svalstva. MiR-206 tiež podporuje reparáciu poškodeného kostrového svalu. Okrem uvedených funkcií má miR-206 význam pri signalizácii apoptózy v kardiomyocytoch a pri rozvoji dilatáčnej

kardiomyopatie (DCM). Jej zvýšená hladina v tkanive srdca bola zistená po infarkte myokardu u myší a pri zlyhávaní srdca u potkanov (Novák et al. 2014). Ďalšia miRNA znázornená na Obrázku 2 je miR-1. MiR-1 patrí medzi najviac zastúpené miRNA v kardiomyocytoch. Spolu s miR-133 majú spoločný RNA prekursor. V embryu sú však regulované odlišnými promotormi a inými transkripčnými faktormi. Tieto dve miRNA spolupracujú na tom, aby sa embryonálne bunky diferencovali na mesoderm. Neskôr vo vývoji organizmu však majú úlohy opačné. MiR-1 podporuje vznik kardiomyocytov, ale miR-133 mu zabraňuje. *In vivo* ani jedna z uvedených miRNA nie je zásadne dôležitá pre vývoj organizmu. Tento fakt poukazuje na schopnosť organizmu aktivovať aj iné mechanizmy regulujúce jeho vývoj. MiRNA má svoje miesto aj pri vývoji cievneho systému. MiR-126 špecifická pre endotelové bunky je kódovaná intrónom endotelového rastového faktoru, ktorý kontroluje migráciu buniek. Tvorba miR-126 je indukovaná tokom krvi a podporuje vznik ciev, ktoré vychádzajú z aortálneho oblúka stimuláciou signalizácie endotelového rastového faktoru. U myší s deléciou miR-126 sa objavili defekty angiogenézy a tiež krehkosť ciev. MiR-143 a miR-145 so spoločnou pre-miRNA sú špecifické pre bunky hladkého svalu ciev. Tieto miRNA regulujú signálne dráhy aktínu. Pre diferenciáciu hladkých svalových buniek *in vitro* je miR-145 nevyhnutná. Pre ich vývoj *in vivo* u myší však nie je vďaka prítomnosti iných regulačných mechanizmov. Vývoj krvných buniek je tiež závislý na regulácii bunkových procesov v kmeňových bunkách pomocou miRNA (Small a Olson 2011).

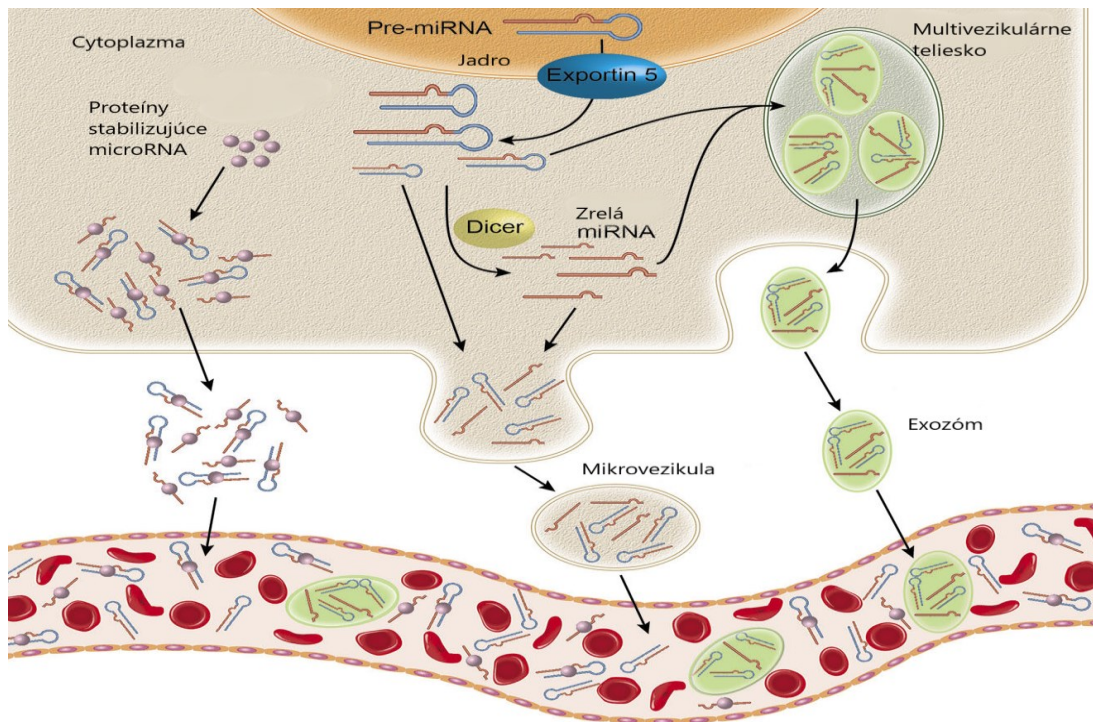


**Obrázok 2: Štruktúra prekurzorovej vlásenkovej miRNA srdca, hsa= homo sapiens**

Zdroj: prebraté a upravené z (Novák et al. 2014)

### 2.3 Molekuly mikroRNA ako biomarkery patológií srdca

Podobne ako fyziologický vývoj kardiovaskulárneho systému sú riadené aj patologické procesy prostredníctvom miRNA. Príkladom môžu byť arytmie, fibróza, metabolické poruchy a remodelácia srdca navodená jeho tlakovým preťažením. Napríklad množstvo miR-29 je po infarkte myokardu znížené. Prirodzenou funkciou miR-29 je inhibovať tvorbu kolagénu a proteínov extracelulárnej matrix. Po infarkte sa jej množstvo zníži a preto je podporená tvorba jaziev a fibróza (Small a Olson 2011). Molekuly miRNA sú uvoľňované do krvného obehu po akútnom infarkte myokardu (AMI), pri zlyhávaní srdca, kardiomyopatii, hypertenzii, fibrilácii predsiení a ischemickej chorobe srdca (CAD). Sú špecifickejšie oproti iným markerom poškodenia myokardu a sú stabilné v telesných tekutinách. Zaistenie stability cirkulujúcich miRNA znázorňuje Obrázok 3. Vďaka týmto vlastnostiam sú považované za vhodné biomarkery pre neinvazívnu molekulárnu diagnostiku poškodenia myokardu. Možno ich teda kvantifikovať pomocou qPCR v plazme alebo sére pacienta (Li a Zhang 2015).



**Obrázok 3: Stabilita miRNA v krvnom obehu**

Zdroj: prebraté a upravené z (Zhou et al. 2018)

### 2.3.1 Akútny infarkt myokardu

Okrem vyššie uvedenej miR-29 sú pri AMI a jeho včasnej diagnostike pozorované aj iné miRNA. Po umelom navodení poškodenia myokardu izoproterenolom u potkanov vzrástla koncentrácia miR-208a priamo úmerne s klasickým biomarkerom kardiotoxicity Troponínom I. Pre vylúčenie možnosti nešpecifity miR-208a bola zameraná koncentrácia miR-208a vo vzorke plazmy od jedinca s poškodenými obličkami. V tomto prípade sa hladina miR-208a nezmenila, čím sa potvrdila jej špecifita. MiR-208a je detekovateľná u 90% pacientov s AMI. Tento fakt dokazuje vysokú senzitivitu molekuly miR-208a a jej možné využitie v diagnostike ochorení srdca (Xu et al. 2012). Zhang et al. vo svojej štúdiu zistili, že miR-499 je výrazne zvýšená u pacientov už po hodine od začiatku príznakov na AMI a to bolesti na hrudi. Oproti štandardnému stanoveniu srdcových Troponínov je jej deekcia o hodinu včasnejšia a jej množstvo koreluje s neskorším stanovením Troponínov. MiR-499 teda môže slúžiť ako potenciálny včasný marker AMI. Tieto zistenia sú tiež podložené výskumom, kde sa potvrdila výrazne zvýšená hladina miR-499 v plazme pacientov s AMI oproti zdravým

kontrolám. Výhodou miR-499 oproti klasickým biomarkerom je, že jej hladina nie je ovplyvnená stavom obličiek a *in vitro* sa vyznačuje vysokou stabilitou (Zhang et al. 2015).

### **2.3.2 Zlyhávanie srdca**

Goren et al. študovali hladiny 186 cirkulujúcich miRNA u 30 pacientov s chronickým zlyhávaním srdca a porovnali ich s hladinami miRNA kontrolných vzorkov. Kvantifikáciu uskutočnili pomocou qPCR. Najväčšie zvýšenie hladín v sére nastalo u miR-423-5p, miR-320a, miR-22 a miR-92b. Navyše boli tieto výsledky porovnané s inými diagnostickými biomarkermi zlyhávania srdca. Zvýšenie hladín vyššie uvedených miRNA korelovalo napríklad so zvýšením hladiny mozgového natriuretického peptidu (BNP), predĺžením intervalu QRS pri elektrokardiografii alebo dilatáciou ľavej srdcovej predsene a komory (Goren et al. 2012).

### **2.3.3 Fibrilácia predsiení**

Fibrilácia predsiení (AF) je jednou z najčastejších arytmií srdca. Hlavné symptómy, ktoré charakterizujú akútnu fibriláciu sú palpitácia, bolesť na hrudi, dychavičnosť, únava a synkopa. Fibriláciou nazývame stav, kedy sa elektrický signál šíri myokardom nekoordinovane a vedie k rýchlemu a nepravidelnému a teda neefektívnemu pumpovaniu krvi (Thompson 2015). Bežné vyšetrovacie metódy používané v diagnostike AF často nie sú dostatočne presvedčivé. Navyše je AF u niektorých pacientov asymptomatická. MiRNA molekuly by tak v budúcnosti mohli slúžiť ako neinvazívne markery AF. da Silva et al. vo svojom prehľadovom článku uviedli miR-21, miR-150 a miR-328 ako spoľahlivé biomarkery AF. Porovnaním hladín uvedených miRNA so zdravými kontrolnými vzorkami došlo k výraznému poklesu ich hladín v cirkulácii pacientov s AF (da Silva et al. 2017).

### **2.3.4 Kardiomyopatia**

Hypertrofická kardiomyopatia (HCM) patrí medzi bežné vrodené choroby srdca. Vznik HCM podmieňuje veľký počet rôznych mutácií. Medzi hlavné znaky HCM patrí remodelácia myokardu charakterizovaná hypertrofiou kardiomyocytov, nepravidelnosťou sarkomér a fibrózou. Roncarati et al. skúmali 21 miRNA z toho 12 miRNA bolo v plazme pacientov s HCM výrazne zvýšených. Boli to miRNA: miR-27a, miR-199a-5p, miR-26a, miR-145, miR-133a, miR-143, miR-199a-3p, miR-126-3p, miR-29a, miR-155, miR-30a a miR-21. Len 3 miRNA však korelovali s hypertrofiou (miR-199a-5p, miR-27a a miR-29a). S fibrózou a hypertrofiou korelovala iba 1 miRNA a to miR-29a (Roncarati et al. 2014).

DCM je nadradeným pojmom pre všetky neischemické kardiomyopatie so zníženou funkciou ľavej komory a je jednou z príčin náhleho srdcového zlyhávania. Je tiež dôležitou indikáciou pre transplantáciu srdca u detí aj dospelých. Klasicky sa diagnostika DCM vykonáva pomocou echokardiografie. Najviac zvýšená hladina sa ukázala u miR-3135b, miR-3908 a miR-5571-5p. Zvýšené hladiny týchto miRNA boli aj u pacientov s miernymi príznakmi kardiomyopatie a to dokazuje dobrú citlivosť miRNA ako biomarkerov (Wang et al. 2017).

### **2.3.5 Ischemická choroba srdca**

MiRNA má svoje miesto aj pri vzniku aterosklerózy. Vyskytuje sa od endoteliálnej dysfunkcie až po ruptúru aterosklerotického plaku. MiRNA preto môžu slúžiť ako biomarkery pre včasnú diagnostiku CAD. Zmeny hladín miRNA sú spojené buď priamo s aterosklerotickým procesom alebo so zápalom, ktorý ho sprevádza. MiR-149, miR-424, miR-155, miR-624 a miR-340 sú u pacientov s CAD znížené. K zníženiu miRNA v cirkulácii dochádza pravdepodobne ich pohltením aterosklerotickým plakom. Naopak miR-765, miR-134, miR-370 a miR-21-5905p sú u pacientov s CAD zvýšené. Závažnosť CAD môže byť teda hodnotená podľa zvýšenia alebo zníženia miRNA. Zvýšené miRNA vedú k ďalšiemu zväčšovaniu plaku a zvyšovaniu jeho nestability a nakoniec k jeho ruptúre (Malik et al. 2017).

## 3. KARDIOTOXICITA

### 3.1 *Tradičné markery kardiotoxicity*

Výsledkom poškodenia kardiomyocytov je porušenie ich membrány a následné uvoľnenie intracelulárnych proteínov, ktoré sa dajú zmerať v krvi. Alanínaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, laktátdehydrogenáza, myoglobín, kreatínkináza sú biochemické markery používané na detekciu nekrózy myokardu. Tieto markery však nie sú dostatočne špecifické pre myokard, pretože sú tvorené a uvoľňované aj inými tkanivami. Medzi novšie a špecifickejšie markery patria srdcové Troponíny, ktoré patria medzi myofibrilárne proteíny. Troponíny tvoria komplex proteínov, ktorý reguluje tvorbu priečných mostíkov medzi aktínom a myozínom počas svalovej aktivity. Tento komplex sa skladá z Troponínu C, T a I. Troponíny T a I sa vyskytujú vo viacerých izoformách a jedna z nich je vždy špecifická pre myokard. Z toho vyplýva, že Troponíny sú špecifickejšími biomarkermi poškodenia myokardu ako ostatné biochemické markery. Srdcové Troponíny sú významné pre stratifikáciu pacientov s akútnym koronárnym syndrómom, ale aj ako markery kardiotoxicity liečiv. Ich výhodami sú: vysoká senzitivita a špecifita, robustnosť a široké diagnostické okno (Adamcová et al. 2007). Okrem Troponínov sa pre rutinnú diagnostiku AMI ako včasný marker stanovuje myoglobín. Jeho hladina sa zvýši už po 2-6 hodinách po AMI. Myoglobín nie je pre myokard špecifický, ale má vysokú negatívnu prediktívnu hodnotu. Pre odhalenie zlyhávania srdca sa v súčasnosti stanovujú natriuretické peptidy (NP). Do obehu sú vylučované v neaktívnej forme. Aktívnymi sa stávajú po odštiepení N-terminálneho fragmentu (NT). Konkrétne BNP a NT-proBNP sú stanovované ako prognostické a diagnostické markery zlyhávania srdca a to z dôvodu ich spôsobu a miesta vzniku. Vznikajú vo zvýšenej miere hlavne v kardiomyocytoch komôr srdca, na ktoré pôsobí zvýšený tlak. Z tohto dôvodu sú kvalitnými ukazateľmi tlakového alebo objemového preťaženia srdca (Beránek et al. 2013).



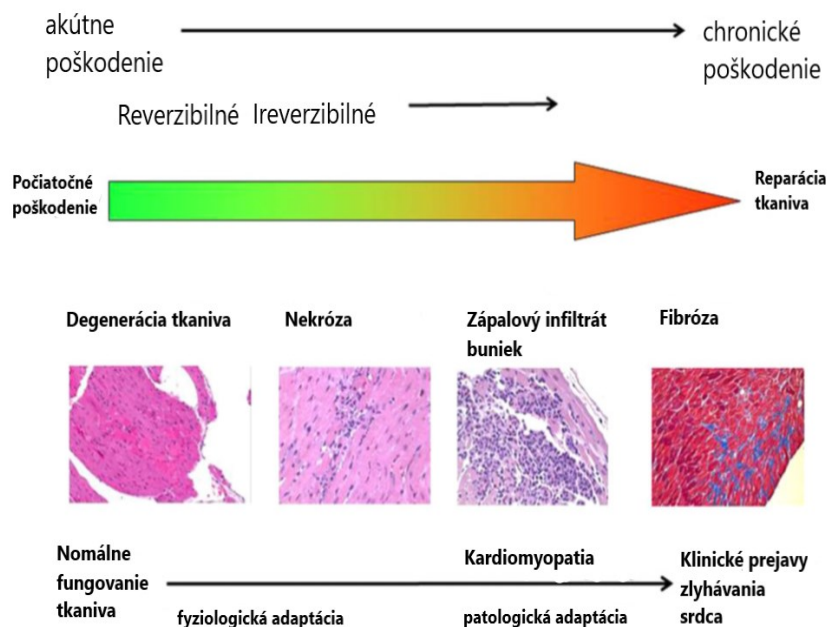
### **3.2 Kardiotoxicita liečiv**

Kardiovaskulárna toxicita navodená liekmi sa môže prejaviť počas liečby alebo po nej. Kardiotoxicita liečiv sa prejavuje napríklad ako ischemia myokardu, zvýšený alebo znížený krvný tlak, predĺženie QT intervalu, arytmia a tromboembólia. Poškodenie kardiomyocytov sa prejaví ako včasná alebo neskorá kardiomyopatia v závislosti na čase po ukončení liečby. Najzákernejším poškodením je postupné zlyhávanie srdca, ktoré je kompenzované podobne ako AMI. Klinicky sa teda prejaví až po rokoch. Medzi prvé príznaky chronickej kardiotoxicity patrí asymptomatická dysfunkcia ľavej komory, ktorá môže viesť až ku kongestívnemu srdcovému zlyhávaniu. Výskyt chronickej kardiotoxicity je ovplyvnený dávkovaním toxického liečiva, vekom pacienta, kardiovaskulárnymi chorobami a u onkologických pacientov taktiež predošlou liečbou. U pacientov liečených antracyklínmi dochádza k poškodeniu srdca v 5%-65% prípadov (Dolci et al. 2008).

Antineoplastické liečivá ako napríklad antracyklíny a TKI boli po mnoho rokov široko využívané vďaka svojej účinnosti. Ich použitie je však limitované na dávke závislou kardiotoxicitou. Medzi mechanizmy, prostredníctvom ktorých dochádza k poškodeniu a následnému zlyhávaniu srdca patrí mitochondriálna dysfunkcia, tvorba reaktívnych kyslíkových radikálov, peroxidácia lipidov, redukcia sarkoplazmatického retikula a mnohé ďalšie (Grieve a Davidson 2017).

Poškodenie kardiomyocytov je postupné. Postupný vývin poškodenia myokardu znázorňuje Obrázok 4. Začína degeneráciou tkaniva a pokračuje nekrozou, zápalom a končí fibrózou. Fibrózu možno považovať za určitú reparáciu tkaniva, aj keď dané tkanivo nezíska späť svoju funkciu, resp. svoju funkciu stratí. Rozsah poškodenia myokardu je určený množstvom a distribúciou poškodených kardiomyocytov. Degenerácia kardiomyocytov je charakterizovaná výskytom vakuol v cytoplazme. Tvorba vakuol je spôsobená akumuláciou lipidov, zdurením mitochondrií alebo rozšírením sarkoplazmatického retikula. Degenerácia tkaniva je považovaná za reverzibilný stav, avšak prirodzená regeneračná schopnosť srdca je nízka. Preto akákoľvek adaptácia srdca na poškodenie môže byť zdrojom subklinických a okultných zmien v kardiovaskulárnom systéme. Tieto zmeny môžu viesť k zníženej schopnosti

vysporiadať sa napríklad so zvýšeným krvným tlakom alebo liečbou s kardiotoxickými liečivami, čo môže viesť k postupnému zlyhaniu srdca. Výsledkom letálneho poškodenia kardiomyocytov je nekróza. Nekróza je charakterizovaná ireverzibilným poškodením kardiomyocytov, stratou integrity bunkovej membrány a únikom cytozolických proteínov. K týmto proteínom patria napríklad Troponíny a slúžia ako biomarkery poškodenia srdca. Ďalej je pre nekrózu typický zápalový bunkový infiltrát a časti myokardu sú následne nahradené väzivom. Náhrada funkčného tkaniva väzivom vedie k zníženiu kontraktility myokardu a k rozvoji chronickej progresívnej kardiomyopatie. Poškodenie myokardu kardiotoxickým liečivom spôsobuje lézie na viacerých miestach myokardu na rozdiel od poškodenia myokardu infarktom, ktoré sa vyznačuje rozsiahlou nekrózou na jednom mieste (Cross et al. 2015).



**Obrázok 4: Vývoj poškodenia myokardu**

Zdroj: prebraté a upravené z (Cross et al. 2015)

Lieky ako trastuzumab a TKI kam patrí napríklad IMB, spôsobujú dysfunkciu srdca typu II. Tá sa prejavuje poklesom ejekčnej frakcie ľavej komory. To znamená, že objem krvi vypudenej z ľavej komory pri jednom údere srdca je znížený. Pre tieto liečivá je typické, že pri ich podaní spolu s antracyklínmi sa ich toxicita zvyšuje. Po vysadení týchto liečiv je poškodenie organizmu reverzibilné a je možný návrat k fyziologickému

stavu orgánov (Cross et al. 2015). Najväčší rozdiel medzi kardiotoxicitou typu I a II je, že typ II je reverzibilný. Podstatou kardiotoxicity typu I je oxidatívny stres spôsobený reaktívnymi kyslíkovými radikálmi, ktorý pôsobí na kardiomyocyty. Voľné radikály vyvolajú peroxidáciu lipidov v membránach kardiomyocytov a následne influx vápenatých kationov. Tiež boli pozorované morfológické zmeny a dysfunkcia mitochondrií. Kardiotoxicita typu II nie je závislá na dávke, nevyskytuje sa u všetkých pacientov, má rôzne stupne závažnosti a nie je spojená so zmenami ultraštruktúry kardiomyocytov. Kardiotoxicita trastuzumabu, modelové liečivo vyvolávajúce kardiotoxicitu typu II sa zvyšuje, ak je súčasne podávaný s antracyklínmi. Kardiotoxicita typu II postihuje signalizačnú cestu ErbB2. Trastuzumab ako modelové liečivo sa viaže na extracelulárnu doménu receptora pre ľudský epidermálny rastový faktor (HER 2) a tak blokuje signalizáciu dôležitú pre rast, regeneráciu a prežitie kardiomyocytov. Tieto procesy pomáhajú udržiavať kontraktilitu myokardu, jeho funkciu a štruktúru. HER 2 aktivuje transkripčné faktory ako napríklad aktivátorový proteín-1, ktorý reguluje hypertrofiu srdca a jadrový faktor-kappa B, ktorý hrá rolu v odpovedi bunky na stres. Signalizačná dráha ErbB2 v kardiomyocytoch je nevyhnutná pre prevenciu DCM. Ako dôkaz, že je ErbB2 signalizácia dôležitá sa u myši s deléciou ErbB2 v myokarde rozvinula dilatácia komôr, stenšenie steny a znížená kontraktilita myokardu (Ewer a Lippmann 2005).

Pre inšpiráciu pri vývoji protektívnych a liečivých látok na kardiotoxicitu vyvolanú chemoterapeutikami môžu slúžiť rastlinné látky. Sú to napríklad extrakty získané z rastlín *Aronia melanocarpa*, *Allium stivium* alebo *Astragalus polysaccharide*. Nemajú výživovú hodnotu, ale pôsobia preventívne alebo protektívne proti chorobám. Tieto látky sú na rozdiel od liečiv výhodnejšie z hľadiska dostupnosti v bežnej strave a ceny. Mechanizmy ich pôsobenia sú antioxidačná aktivita, protizápalové pôsobenie a antiapoptotická aktivita. Prírodné látky môžu znížiť oxidačný stres viacerými spôsobmi. Prvá možnosť je zníženie tvorby voľných kyslíkových radikálov a peroxidácie lipidov. Druhá je účinné vychytávanie voľných radikálov. Tretia je zvýšenie prirodzenej antioxidačnej aktivity bunky prostredníctvom zvýšenia aktivity superoxididizmutázy, katalázy a glutathionreduktázy. Posledná možnosť je zníženie citlivosti bunky na oxidačný stres. Prírodné látky tiež pôsobia proti zápalu. Znižujú tvorbu

cyklooxygenázy II a lipooxygenázy s následným znížením tvorby mediátorov zápalu, tvorby tumor nekrotizujúceho faktoru- $\alpha$  a adhézných molekúl na endoteli. Nakoniec redukujú ukladanie kolagénu v zápalovom tkanive a tým aj nekrózu navodenú chemoterapeutikami (Abushouk et al. 2017).

Iná možnosť ako predísť kardiotoxicite chemoterapeutík, konkrétne antracyklínov, je uzavrieť ich do lipozómov. Táto úprava modifikuje farmakokinetiku a distribúciu liečiva v tele bez straty účinnosti liečiva. Aktívna molekula liečiva je vo vodnom roztoku vnútri lipozómu udržiavaná rozdielom iónových gradientov. Ukázalo sa, že doxorubicín (DOX) v lipozómoch nepreniká cez stenu kapiláry, ktorá má neporušené tesné spoje, tzv. tight junctions. Tesné spoje tak chránia srdce pred nežiadúcimi účinkami DOX. Avšak nádorové tkanivo má steny ciev krehkejšie a priepustnejšie a preto lipozómy s liečivom cielene prechádzajú do nádorového tkaniva. Účinok liečiva je tak zachovaný a jeho kardiotoxicita znížená (Vejpongsa a Yeh 2014).

## 4. KARDIOTOXICKÉ LIEČIVÁ

Ochorenia kardiovaskulárneho systému patria medzi hlavné príčiny morbidity a mortality vo vyspelých krajinách sveta. Mnohé liečivá môžu výrazne prispievať k zvýšenému výskytu týchto onemocnení. Medzi najznámejšie kardiotoxické liečivá patria antracyklíny, ktoré vyvolávajú kardiotoxicitu I typu. Do tejto skupiny sa radí DOX. Použitie antracyklínov je obmedzené kvôli ich priamemu toxickému účinku na myokard prostredníctvom tvorby reaktívnych kyslíkových radikálov. Ďalšie liečivo škodiace srdcu je trastuzumab. Je to monoklonálna protilátka proti HER 2 receptoru na niektorých rakovinových bunkách. Dôvodom jeho toxicity je pravdepodobne inhibícia nielen patologickej, ale aj fyziologickej signálnej dráhy. Podobne ako trastuzumab sú kardiotoxické aj TKI. V tejto skupine sú z hľadiska kardiotoxicity zaujímavé IMB a sunitinib. Trastuzumab a TKI vyvolávajú kardiotoxicitu II typu. Okrem popísaných liečiv je tiež kardiotoxický 5-fluorouracil (5-FU), ktorý komplexným mechanizmom spôsobuje ischemiu myokardu (Mladěnka et al. 2018).

### 4.1 Doxorubicín

DOX patrí medzi najstaršie a najpoužívanéjšie chemoterapeutiká. Medzi jeho hlavné nežiadúce účinky patrí kardiotoxicita. Patrí medzi antracyklické chinóny a je známy produkciou reaktívnych kyslíkových radikálov, ktoré sú zodpovedné za jeho kardiotoxicitu (Arnold a Das 2018).

Najviac zastúpený cytochróm v myokarde je cytochróm P450 (CYP) 2J2. Jeho úlohou je produkcia protizápalových a vazodilatačných látok. Premieňa tiež arachidónovú kyselinu na epoxyeikosatriénové kyseliny (EETs). EETs redukujú rozsah infarktu myokardu, znižujú ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca a pôsobia preventívne voči arytmií. CYP 2J2 je tiež zodpovedný za metabolizmus kardiotoxických liečiv. Arnold a Das zistili, že DOX ovplyvňuje metabolizmus arachidónovej kyseliny prostredníctvom CYP 2J2. DOX aj arachidónová kyselina sú substrátmi tohto enzýmu a preto súťažia v naviazaní sa na jeho aktívne miesto. V dôsledku tejto kompetície vzniká menšie

množstvo EETs dôležitých pre ochranu srdca pred toxickým pôsobením DOX (Arnold a Das 2018).

Pre včasnú prevenciu a zvrátenie nežiadúcich účinkov DOX sú dôležité biomarkery poškodenia srdca a kardiotoxicity liečiv. MiRNA sa vyznačuje výbornou stabilitou a výskytom v telesných tekutinách a preto môže byť vhodným klinickým biomarkerom poškodenia srdca pri liečbe DOX. Holmgren et al. vo svojom výskume pozorovali zmenu expresie miR-34a, miR-34b, miR-187, miR-199a, miR-199b, miR-146a, miR-15b, miR-130a, miR-214 a miR-424 počas a po ukončení liečby DOX. Ukázalo sa, že hladiny týchto miRNA súvisia s funkciou a poškodením kardiomyocytov a preto môžu potenciálne slúžiť ako biomarkery kardiotoxicity DOX (Holmgren et al. 2016).

## **4.2 5-Fluorouracil**

Syntetický pyrimidín 5-FU je bežne používaný pre liečbu adenokarcinómov a epitelových nádorov. Najpoužívanejší je teda pri liečbe kolorektálneho karcinómu, nádoru prsníka, žalúdka, pankreasu, prostaty a močového mechúra. Mechanizmus účinku 5-FU je, že počas S fázy bunkového cyklu pôsobí ako antimetabolit. 5-FU je postupne aktivovaný na viaceré aktívne formy nukleotidov. 5-fluoro-2'-deoxyuridín-5'-monofosfát je jeden z aktívnych metabolitov, ktoré sa tvoria v nádorových bunkách. Tento metabolit inhibuje tymidylátsyntázu, čo vedie k poškodeniu bunkového rastu a následne k bunkovej smrti v dôsledku nedostatku tymínu. Cytotoxický efekt je tiež podporený inkorporáciou fluorodeoxyuridín trifosfátu do DNA a inkorporáciou fluorouridín-5'-trifosfátu a 5-fluorocytosínu do RNA. Predpokladá sa, že aktívne metabolity 5-FU ovplyvňujú funkciu bunkovej membrány závislú na vápnikových kanáloch, ďalej ovplyvňujú funkciu mitochondrií, poškodzujú kontraktilné proteíny, vyvolávajú oxidačný stres, podporujú uvoľňovanie vazoaktívnych látok ako napríklad histamín a katecholamíny a nakoniec vedú k autoimunitným mechanizmom (Alter et al. 2006).

5-FU je po antracyklínoch druhé najčastejšie liečivo asociované s kardiotoxicitou. Kardiotoxicita 5-FU má dva hlavné mechanizmy a sú to ischemia a priamy toxický účinok na bunky myokardu. Hlavnou príčinou ischemie myokardu, ktorá je vyvolaná

5-FU je vazospazmus koronárnych tepien. Vazospazmus môže súvisieť s endotelovou dysfunkciou. Endotelová dysfunkcia je odpoveďou na poškodenie cievnej výstelky. Druhou možnosťou je priame poškodenie kardiomyocytov. Charakter týchto zmien je spôsobený indukciou apoptózy s neprítomnosťou nekrózy na rozdiel od priamej cytotoxicity pozorovanej u nádorových buniek. Iné študované modely kardiotoxicity 5-FU poukazujú na tvorbu voľných kyslíkových radikálov alebo poškodenie oxidačných procesov v mitochondriách (Sara et al. 2018).

### **4.3 Trastuzumab**

Trastuzumab je monoklonálna protilátka, ktorá slúži na liečbu karcinómu prsníka, rakoviny žalúdka a ďalších onkologických ochorení. Mechanizmus účinku trastuzumabu spočíva v jeho naviazaní sa na receptor HER 2. Účinkuje teda na bunky, kde je HER 2 receptor nadmerne exprimovaný. Týmito bunkami sú najčastejšie rakovinové bunky karcinómu prsníka. Po naviazaní sa na HER 2 receptor spúšťa signálnu dráhu v bunke, ktorá vedie k zvýšenej tyrozín kinázovej aktivite HER 2 a následne k jeho fosforylácii. Fosforylácia HER 2 vedie k jeho agregácii s proteínmi. Toto spojenie zastaví signálnu dráhu HER 2 a tak inhibuje rast rakovinových buniek. Okrem toho trastuzumab aktivuje bunkovú cytotoxicitu závislú na protilátkach, potláča angiogénu a opravné mechanizmy DNA (Mohan et al. 2018).

ElZarrad et al. elektrónovou mikroskopiou potvrdili poškodenie štruktúry kardiomyocytov myší, ktorým bol podávaný trastuzumab. Tiež zistili, že výrazne mení expresiu génov potrebných na opravu DNA a na fungovanie srdca a mitochondrií. V sére týchto myší bola tiež zvýšená hladina ľahkých reťazcov srdcového myozínu, ktoré môžu slúžiť ako marker poškodenia srdca (ElZarrad et al. 2013).

MiRNA nemusí byť iba markerom poškodenia tkaniva, ale môže tiež indikovať rezistenciu nádorových buniek na konkrétnu liečbu. Jung et al. vo svojej štúdií vyzorovali zvýšenú hladinu miR-210 v nádorovej bunkovej línii rezistentnej na liečbu trastuzumabom. Konkrétne sa jednalo o bunky nádoru prsníka s nadmernou expresiou HER 2 receptoru a teda o nádor liečený trastuzumabom. Navyše miR-210 môže slúžiť ako samostatný marker nádoru prsníka alebo ako marker postihnutia lymfatických

uzlín metastázami nádoru prsníka. Markery ako miR-210 sú dôležité z hľadiska personalizovanej liečby. Pacient má potom nasadenú čo najefektívnejšiu liečbu a menej sa u neho prejavujú nežiadúce účinky (Jung et al. 2012).

#### **4.4 Inhibítory tyrozín kinázy**

Proteín tyrozín kinázy (PTK) sú jedny z najviac zastúpených enzýmov, ktoré sa zúčastňujú prenosu signálu v bunke. Ich hlavnou úlohou je prenos fosfátového zbytku z molekuly ATP na bočný reťazec aminokyseliny tyrozínu v cieľovom proteíne. Fosforyláciou je regulovaný bunkový rast, diferenciácia, delenie, smrť a mnohé biochemické procesy. Pri porušení aktivity PTK dochádza k patologickému množeniu buniek následne tvorbe nádoru, metastázam a angiogenéze v nádore. Podľa štruktúry môžeme PTK rozdeliť na receptorové a intracelulárne. Receptorové PTK zahŕňajú receptor pre epiteliálny rastový faktor (EGFR), receptor pre rastový faktor krvných doštičiek (PDGFR), receptor pre rastový faktor cievneho endotelu (VEGFR) a mnohé ďalšie. PTK voľne uložené v cytoplazme alebo asociované s cytoplazmatickou membránou, sú nazývané intracelulárne PTK. Intracelulárne PTK asociované s membránou nemajú extracelulárnu doménu pre naviazanie ligandu. Medzi rodiny intracelulárnych PTK patria Src a Abl kinázy. C-Abl kináza patriaca do rodiny Abl je významná pre tvorbu onkogénneho fúzneho proteínu Bcr-Abl u CML (Jiao et al. 2018).

EGFR je receptor v bunkovej membráne a reguluje prežitie a apoptózu buniek epitelu. Patrí do ErbB rodiny, ktorá sa zahŕňa ErbB1 (EGFR alebo HER 1), ErbB2 (HER 2), ErbB3 (HER 3) a ErbB4 (HER 4). Medzi inhibítory EGFR patrí gefitinib, lapatinib a erlotinib. Rodina VEGFR zahŕňa VEGFR1, VEGFR2 a VEGFR3. VEGFR hrajú významnú úlohu v proliferácii a migrácii endotelových buniek a tak aj v následnej vaskularizácii tkanív. V lymfatickom nádorovom tkanive VEGFR3 navodzuje angiogenézu a tiež podporuje inváziu nádoru do zdravého tkaniva a následne aj metastázovanie nádoru. VEGFR3 podporujú životaschopnosť buniek a blokovaním ich aktivity môže byť navodená autofágia. Inhibítormi sú napríklad sorafenib a sunitinib. PDGFR receptory zahŕňajú okrem PDGFR $\alpha$  a PDGFR $\beta$  aj receptor pre kolónie stimulujúci faktor 1 a receptor pre rast kmeňových buniek. Inhibítormi tejto rodiny je napríklad IMB (Jiao et al. 2018).



Receptory pre cytokíny na povrchu buniek sú schopné po naviazaní konkrétneho cytokínu aktivovať rodiny intracelulárnych tyrozín kináz Src a Abl, ktoré nemajú extracelulárnu doménu. Nadmernou aktiváciou intracelulárnych tyrozín kináz sa spustí signalizačná kaskáda vnútri bunky, ktorá môže viesť k zvýšenej proliferácii daného typu buniek a tvorbe nádoru. Fyziologická signalizácia sprostredkovaná rodinou Src tyrozín kináz zabezpečuje adhéziu, mobilitu a proliferáciu buniek a tiež angiogénu. Rodina Abl tyrozín kináz má dvoch zástupcov: proteíny c-Abl a Arg. C-Abl môže byť prítomný aj v jadre bunky. Fyziologicky c-Abl riadi bunkovú adhéziu a mobilitu. Okrem toho tiež reaguje na poškodenie DNA bunky alebo na poškodenie bunky mikróboom. Zvýšená expresia c-Abl vedie k vzniku nádoru prsníka, hrubého čreva a karcinómu pľúc. Po translokácii časti chromozómu 9 na chromozóm 22 vzniká onkogénny fúzny proteín Bcr-Abl vyvolávajúci vznik CML (Jiao et al. 2018).

Mutácia PTK vedie k nesprávnej signalizácii a môže viesť ku vzniku nádoru a metastázam. Cílená inhibícia kľúčových PTK vedie k úspešnej liečbe nádorov. Existujú dve hlavné kategórie liečiv pre cílenú inhibíciu PTK. Do prvej patria protilátky ako napríklad trastuzumab, rituximab, alantuzumab a pod. Do druhej patria nízkomolekulárne TKI ako napríklad sunitinib, sorafenib, dasatinib, nilotinib, IMB a pod. (Vaitiekus et al. 2017).

Medzi hlavné nežiadúce účinky TKI patrí vysoký krvný tlak, ktorý môže spôsobiť cievnu mozgovú príhodu, AMI a zlyhanie srdca. Krvný tlak výrazne zvyšujú inhibítory VEGFR prostredníctvom zníženia tvorby oxidu dusného a zvýšením odporu ciev po poškodení endotelu. Ďalším nežiadúcim účinkom pri dlhodobej terapii s TKI je zlyhávanie srdca a systolická dysfunkcia ľavej komory. Ich molekulárny mechanizmus však nie je úplne pochopený. Zlyhávanie srdca môže byť spôsobené sunitinibom alebo trastuzumabom. Tieto liečivá neblokujú len patologické procesy, ale aj tie fyziologické (Lenihan a Kowey 2013).

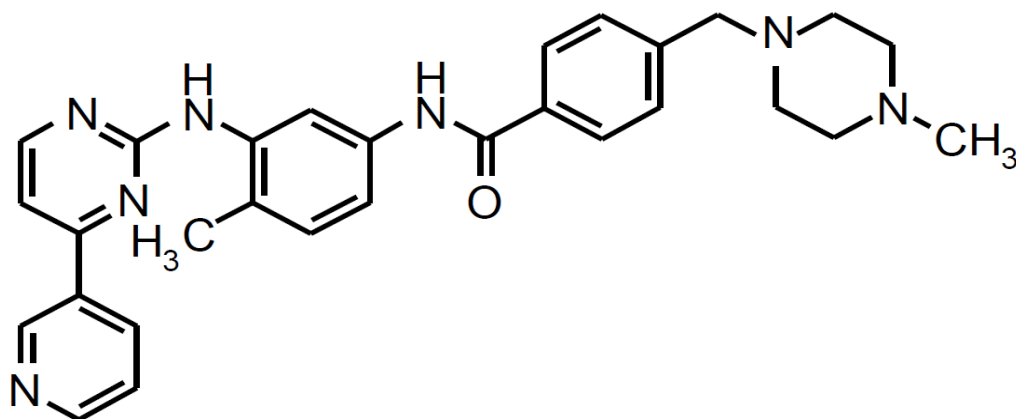
#### **4.4.1 Sunitinib**

Sunitinib sa vyznačuje schopnosťou inhibovať viac cieľových PTK. Inhibuje VEGFR 1-3, PDGFR $\alpha$  a mnohé ďalšie receptory. Používa sa na liečbu nádorov gastrointestinálneho traktu a karcinómu obličiek. Sunitinib zastavuje rast a navodzuje apoptózu nádorových

buniek. U nádoru prsníka tiež blokuje parakrinné a autokrinné účinky PDGFR a tak inhibuje angiogénu. Najčastejší nežiadúci účinok sunitinibu je zvýšený tlak a kongestívne srdcové zlyhávanie. Výskyt zlyhávania srdca sa pohybuje od 2,7%-15%. Výskyt zvýšeného tlaku je 17%-43%. Zvýšený tlak je dokonca považovaný za marker účinnosti sunitinibu pri liečbe karcinómu obličiek. Pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie boli tiež pozorované abnormality membrány mitochondrií (Vaitiekus et al. 2017).

#### 4.4.2 Imatinib

IMB je látka, ktorá účinne lieči CML, ale aj nádory gastrointestinálneho traktu. Molekula IMB inhibuje tyrozín kinázovú aktivitu produktu fúzneho génu Bcr-Abl a tak blokuje patologické signálne dráhy v bunke (Chambers et al. 2017). Jeho chemická štruktúra je znázornená na Obrázku 5.



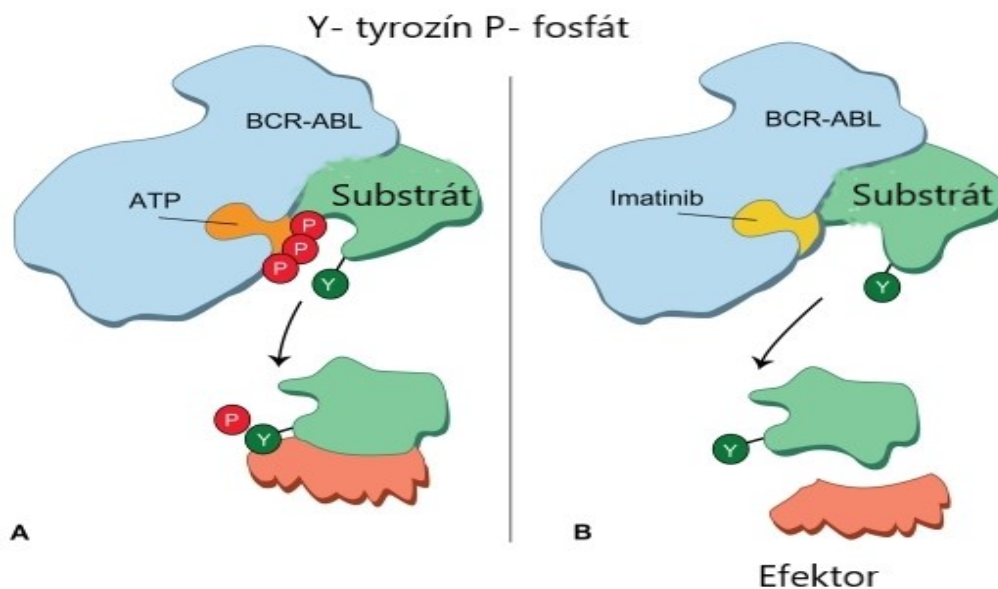
**Obrázok 5: Štruktúra imatinibu**

Zdroj: (Manley et al. 2002)

Fúzny proteín Bcr-Abl je ideálnym cieľom pre ciele terapiu na molekulárnej úrovni, pretože je prítomný vo všetkých maligných bunkách CML a naopak v zdravých bunkách chýba. IMB sa viaže na aminokyseliny aktívneho miesta Bcr-Abl tyrozín kinázy, ktoré viaže molekulu ATP. Schematické znázornenie mechanizmu účinku IMB je na Obrázku 6. Týmto spôsobom sa stabilizuje inaktívna forma Bcr-Abl proteínu a tým sa zabráni autofosforylácii tyrozínových zbytkov Bcr-Abl. Následne sa teda zastaví aj

fosforylácia substrátov Bcr-Abl tyrozín kinázy. Tento proces vedie k zastaveniu patologickej signálnej dráhy v bunke, ktorá podporuje tvorbu CML. Preklinické *in vitro* aj *in vivo* štúdie ukázali vysoko selektívny účinok IMB na bunky exprimujúce Bcr-Abl tyrozín kinázu (Marcucci et al. 2003).

IMB je tiež používaný pre liečbu gastrointestinálneho stromálneho tumoru, akútnej lymfoblastickej leukémie s prítomnosťou Bcr-Abl proteínu, chronickej eozinofilnej leukémie, systémovej mastocytózy, malígnych melanómov a iných nádorov. Gastrointestinálny stromálny tumor je definovaný prítomnosťou PTK c-Kit. IMB má hlavné využitie pri liečbe metastáz tohto nádoru alebo v situáciách, kedy sa nedá odstrániť chirurgicky. U pacientov s chronickou eozinofilnou leukémiou sa vyskytuje fúzny proteín obsahujúci okrem iného aj PDGFR $\alpha$ . Tento proteín zároveň potvrdzuje danú diagnózu. U všetkých pacientov s touto diagnózou došlo po trojmesačnej liečbe s IMB ku kompletnému vymiznutiu patologického klonu eozinofilov, ktoré obsahovali tento fúzny proteín. IMB je tiež účinný v liečbe malígnych melanómov, ktoré sú zapríčinené mutáciou alebo amplifikáciou PTK Kit (Iram et al. 2016).



**Obrázok 6: Mechanizmus účinku imatinibu**

Zdroj: prebraté a upravené z (Mughal a Schrieber 2010)

Liečbu s IMB pacienti dobre znášajú. V niektorých prípadoch sa však môžu vyskytnúť nežiadúce účinky. Medzi ne patrí neutropénia, trombocytopenia, nauzea alebo

podráždenie pokožky. Medzi závažnejšie nežiadúce účinky IMB patrí kardiotoxicita. Potenciálny kardiotoxický účinok IMB spočíva v poškodení mitochondrií (Chambers et al. 2017).

IMB bol schválený organizáciou Food and Drug Administration pre jeho klinické použitie v roku 2001. Napriek svojim nežiadúcim účinkom predstavuje revolučnú liečbu CML s pozitívnym chromozómom Philadelphia. U viac ako dvoch tretín pacientov vyvoláva kompletnú cytogenetickú odpoveď a tak zvyšuje ich šancu na prežitie. Prvé zmienky o kardiotoxicite IMB sú z roku 2006 (Kerkelä et al. 2006). Podľa kritérií New York Heart Association bolo zaznamenané zlyhávanie srdca triedy III a IV u niektorých pacientov, ktorí boli asi 7 mesiacov liečení IMB. Analýza ultraštruktúry bunkovej membrány kardiomyocytov odhalila jej rozsiahle zmeny. Ukázala tiež zvýšený počet mitochondrií a rôzny tvar mitochondrií so zníženým počtom krist. Tieto zmeny svedčia o zvýšenej tvorbe mitochondrií, čo je jedným zo znakov poškodenia tvorby energie v mitochondriách. *In vitro* štúdie na izolovaných kardiomyocytoch ukázali, že IMB spôsobuje v závislosti na dávke kolaps potenciálu mitochondriálnej membrány. Inhibícia Abl kinázy sa prejaví zvýšenou aktiváciou PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) a následnou fosforyláciou eukaryotického iniciačného faktoru-2 (eIF-2). PERK ovplyvňuje rovnováhu proteínov v mitochondriách prostredníctvom blokovania translácie transportného proteínu, ktorý sa nachádza na vnútornej membráne mitochondrií zvaný translocase of the inner membrane (TIM). Proteín s veľkosťou 23 kDa (TIM 23) je nevyhnutnou súčasťou veľkého komplexu prenášačov, ktoré zabezpečujú prenos látok do matrix mitochondrií. Po fosforylácii eIF-2 je TIM 23 degradovaný a preto sa v priestore medzi vonkajšou a vnútornou membránou mitochondrií hromadia nezložené proteíny, ktoré následne indukujú smrť mitochondrií. Poškodený transport proteínov v mitochondriách ovplyvňuje syntézu mitochondriálnej DNA, Krebsov cyklus a  $\beta$  oxidáciu. Zmeny v endoplazmatickom retikule spôsobené IMB teda vedú k poškodeniu funkcie mitochondrií a následnej kardiotoxicite (Varga et al. 2015).

Účinok IMB v liečbe rakoviny je obmedzený jeho kardiotoxicitou a preto Marslin et al. pozorovali zníženie kardiotoxicity u IMB, ktorý bol uzavretý v nanočasticiach. Pozorovali tiež vplyv tejto úpravy na jeho účinnosť v liečbe oproti voľnému IMB.

Myšiam bol podávaný enkapsulovaný IMB a následne z nich boli pripravené histologické rezy. Oproti kontrolným vzorkám neboli na srdciach myší pozorované žiadne patologické zmeny. Enkapsulácia tiež zvyšuje citlivosť nádorových tkanív na IMB a teda zvyšuje jeho účinnosť. Uzavretie liečiva do nanočastice sa osvedčilo aj u iných kardiotoxických liečiv ako napríklad DOX, gemcitabíne alebo erlotinibe. Nanočastice sa skladajú z biologicky odbúrateľného kopolyméru kyseliny mliečnej a glykolovej. Jedna z najdôležitejších charakteristík je veľkosť nanočastíc, pretože ovplyvňuje osud liečiva v tele, jeho farmakokinetiku a farmakodynamiku. Priemerná veľkosť nanočastíc je 250-300 nm (Marslin et al. 2015).

## 5. CIEĽ PRÁCE

Cieľom mojej diplomovej práce bolo zistiť, ktoré miRNA boli deregulované pri kardiotoxicite navodenej IMB. Na stanovovanie miRNA slúžili plazma a srdcové tkanivo myší, ktorým bol podávaný IMB *in vivo*.

Jednotlivé ciele práce:

1. Izolácia molekúl miRNA z plazmy a srdcového tkaniva myší a ich následná kvantifikácia pomocou qPCR.
2. Kvantifikácia vyizolovaných proteínových markerov kardiotoxicity pomocou imunoblotingu s následnou chemiluminiscenčnou detekciou.
3. Vyhodnotenie zmeny expresie vybraných miRNA pri poškodení srdca IMB.

## 6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 6.1 *Materiály a prístroje*

#### 6.1.1 Biologický materiál

V tejto práci je použitá myšacia RNA izolovaná zo srdcového tkaniva a plazmy myší. Myšiam bol per orálne podávaný IMB v dávke 100 mg/kg telesnej váhy po dobu 9 dní. Kontrolnej skupine myší bol podávaný len soľný roztok. Tretej skupine myší boli každý druhý deň aplikované 4 dávky DOX (každá dávka v množstve 3 mg/kg telesnej váhy). Táto skupina slúžila ako pozitívna kontrola a v tejto diplomovej práci bola využitá len pri sledovaní koncentrácií miRNA v plazme.

#### 6.1.2 Použité chemikálie

Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent

Ditiotreitol (DTT) - Sigma Aldrich

DNAza I - New England BioLabs

Dodecylsulfát sodný (SDS) - Sigma Aldrich

Etanol (100%) - Sigma Aldrich

Etyléndiamíntetraoctová kyselina (EDTA) - Sigma Aldrich

Hovädzí sérový albumín (BSA) - Sigma Aldrich

Chloroform - Sigma Aldrich

Izopropanol - Sigma Aldrich

miRNeasy Serum/Plasma Kit - Qiagen

Persíran amonný (APS) - Sigma Aldrich

Primery - Generi Biotech

qPCR kit SYBR Green I - xCEED-Biotech

Redestilovaná voda

Reverzná transkriptáza (RT) - ProtoScript II - New England BioLabs

Set na stanovenie bielkovín (s BCA) - Thermo Scientific

Sušené mlieko - Fluka analytical

Tetrametyletyléndiamín (TEMED) - Sigma Aldrich

TRIzol (TriReagent) Molecular Research Centre

Zmes dNTP - Eurogentec

Dalšie chemikálie čistoty p.a.

### **6.1.3 Prístroje**

Automatické pipety - Research Plus, Eppendorf

Centrifúga - Biofuge Stratos Heraeus, Thermo Scientific

Detektor chemiluminiscencie - ChemiDoc MP Imaging System, BioRad

Gulôčkový 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

Minicentrifúga - Sprout, Heathrow Scientific

PCR cyklér - MJ mini, Bio-Rad

Prístroj na blotovanie - BioRad Trans Blot Turbo



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

#### **6.1.4 Ďalšie pomôcky**

Mikroskúmavky Eppendorf, rukavice, PCR stripy, stojany na mikroskúmavky, pipetovacie špičky, sklenené pasteurove pipety, kadičky, mikrohomogenizátory, magnetické miešadlo, hrubý filtračný papier, nitrocelulózoová membrána, sklenené guľôčky, buničina, odmerné banky, nádoba na ľad, hrebienky, klinky, sklá so spacerom, parafilm, stojany, elektroforetická vaňa s viečkom, zdroj napätia.

### **6.2 Metodika práce**

#### **6.2.1 Izolácia RNA**

TRIzol je veľmi toxická látka (kvôli obsahu fenolu), preto je nutné pracovať s ním v rukaviciach a špeciálnom boxe určenom na prácu s RNA. Okrem toho je RNA veľmi náchylná na degradáciu ribonukleázami, ktoré sú všade v okolí. K dodanému tkanivu srdca myši sa pripipetuje 1 ml TRIzolu. Následne sa dávkovačom do vzoriek pridajú sklenené guľôčky. Všetky vzorky sú umiestnené v safelock skúmavkách. Vzorky sú homogenizované na guľôčkovom homogenizátore FastPrep24, M.G.P. podľa tuhosti tkaniva. Po homogenizácii necháme vzorky 5 minút stáť. Po odstáti sa pridá 200 µl chloroformu a 15 sekúnd sa vzorky ručne pretrepávajú. Potom sa nechajú stáť 3 minúty. V centrifúge vychladenej na 4°C sa vzorky nechajú stáčať 15 minút pri 12000 g. Prídavok chloroformu s následujúcim stočením rozdelí zmes na vodnú a organickú fázu. Po stočení sa odpipetuje horná vodná fáza obsahujúca RNA ideálne 400 µl do nových skúmaviek s objemom 1,5 ml. Do takto pripravených vzoriek sa pripipetuje 500 µl izopropanolu, premiešajú sa a nechajú stáť 10 minút pri laboratórnej

teplote. Izopropanol zaistí vyzrážanie RNA zo vzoriek. Následne sa vzorky stočia v centrifúge vychladenej na 4°C počas 10 minút pri 12000 g. Skúmavky do centrifúgy musia byť vložené otváraním do stredu. Toto uloženie zabezpečí, že peletky budú v každej skúmavke na približne rovnakom mieste a tak sa zníži riziko ich odpipetovania v ďalších fázach spracovania vzoriek. Po stočení sa opatrne odsaje supernatant sklenenými pasteurovými pipetami a peletky sa premyjú čerstvo pripraveným roztokom 75% etanolu v DEPC vode. Vzorky sa zamiešajú preklápaním a dajú stočiť opäť otváraním ku stredu na 5 minút do centrifúgy vychladenej na 4°C pri 7500 g. Po stočení sa odsaje supernatant a peletky sa nechajú vysušiť. Keď sa začnú peletky spriehľadňovať, treba ich rozpustiť pripipetovaním 20-100 µl DEPC vody (v závislosti na veľkosti peletky) a následne sa vzorky premiešajú a nechajú stáť 5 minút pri laboratórnej teplote, kým sa peletky nerozpustia a opäť sa premiešajú. DEPC voda je redestilovaná voda upravená prídavkom dietylpyrokarbonátu (DEPC), ktorý inaktívuje ribonukleázy. Takto pripravené vzorky sa uložia na ľad. V prípade, že sa peletky nerozpustia do 5 minút, nechajú sa vzorky inkubovať 10 minút pri teplote 60°C.

### **6.2.2 Izolácia RNA z plazmy pomocou kitu**

Izolácia RNA pomocou kitu umožňuje izolovať RNA pohodlne a rýchlo. Tento spôsob izolácie je oproti vyššie uvedenému spôsobu jednoduchší a je vhodný najmä pre izoláciu RNA z malých vzoriek. V tejto práci sme použili kit s názvom miRNeasy Serum/Plasma Kit od firmy Qiagen. Kit obsahuje kolonku, ktorá zachytí molekuly RNA. Tento kit je vhodný aj pre izoláciu krátkych RNA, ako sú napríklad miRNA. Ďalej obsahuje QIAzol Lysis Reagent a sadu pufrov na premývanie kolonky. Kit neobsahuje spike-in kontrolu. Tá sa zakúpi samostatne. Ako spike-in kontrola slúži miRNA pochádzajúca z hlístice *Caenorhabditis elegans* označovaná ako cel-miR-39, ktorá sa u stavovcov nevyskytuje. Pridáva sa na začiatku izolácie ku každej vzorke plazmy. Významom tejto kontroly je monitorovanie účinnosti izolácie a tiež normalizácia výsledku.

Ku vzorkám plazmy s objemom 200 µl sa pripipetuje 1 ml QIAzol Lysis Reagent. Táto zmes sa premieša na vortexe a inkubuje sa 5 minút pri laboratórnej teplote. Po inkubácii sa k zmesi pridá 3,5 µl miRNeasy spike-in kontroly. Potom sa pripipetuje

200  $\mu$ l chloroformu a táto zmes sa ručne pretrepáva 15 sekúnd a nechá sa inkubovať 2-3 minúty pri laboratórnej teplote. Po inkubácii sa vzorky stočia pri 12000 g vo vychladenej centrifúge na 4°C po dobu 15 minút. Po centrifugácii sa opatrne odpipetuje horná vodná fáza do novej mikroskúmavky. K získanej vodnej fáze sa pridá 100% etanol. Objem pridaného etanolu je vždy 1,5-násobkom objemu získanej vodnej fázy. Následne sa zmes pipetovaním premieša. Z takto pripravených vzoriek sa prepipetuje 700  $\mu$ l do extrakčných koloniek RNeasy MinElute spin column, ktoré sú umiestnené v zberných skúmavkách s objemom 2 ml. Viečko na kolonkách sa pevne uzavrie. Takto pripravené kolonky sa stočia pri 8000 g po dobu 15 sekúnd. Po centrifugácii sa eluát vyleje do odpadu. So zbytkom vodnej fáze s etanolom sa postupuje rovnako. Po centrifugácii zbytku vodnej fázy sa eluát opäť vyleje do odpadu. Následne sa pripipetuje 700  $\mu$ l pufru RWT do extrakčnej kolonky a centrifuguje sa 15 sekúnd pri 8000 g. Po centrifugácii sa eluát vyleje do odpadu. Tento postup opakujeme s 500  $\mu$ l RPE pufru a potom s 500  $\mu$ l 80% etanolu. Po tomto kroku sa umiestni extrakčná kolonka do novej zbernej skúmavky a centrifuguje sa počas 5 minút s otvoreným viečkom pri plnej rýchlosti, aby sa kolonka vysušila. Po centrifugácii opäť vymeníme zbernú skúmavku za novú s objemom 1,5 ml. Potom priamo na stred membrány extrakčnej kolonky napipetujeme 14  $\mu$ l RNase-free water. Viečko kolonky sa jemne priklopí a takto pripravená kolonka sa centrifuguje po dobu 1 minúty pri plnej rýchlosti. Počas tohto procesu dochádza k elúcii vyizolovanej RNA do zbernej skúmavky s viečkom. Izolovaná RNA sa skladuje v mraziaku.

### **6.2.3 Meranie koncentrácie a čistoty RNA pomocou Nanodropu**

Pred samotným meraním sa vzorky RNA vyizolované zo srdcového tkaniva nariedia. Do 0,2 ml skúmaviek sa napipetuje 27  $\mu$ l DEPC vody a 3  $\mu$ l rozpustenej RNA. (RNA vyizolovaná z plazmy sa meria priamo.) Tak sa získa roztok RNA nariedený 10-krát a je pripravený na meranie. Na počítači sa zapne program NanoDrop a nastaví sa na meranie nukleovej kyseliny. V prvom kroku sa odmeria absorbancia slepého vzorku (blanku). Ako blank slúži DEPC voda. Opatrne sa odklopí páčka a nanesú sa 2  $\mu$ l DEPC vody na kovový hrot a po priklopení páčky na kovový hrot sa odmeria blank. Po ukončení merania sa kovový hrot jemne očistí buničinou. Potom sa program nastaví na

meranie vzoriek a pokračuje sa meraním vzoriek RNA. Po ukončení merania sa výsledky exportujú do Excelu.

#### **6.2.4 Odstránenie DNA z RNA vzoriek**

Na prípravu vzoriek RNA sa pipetuje 5 µg RNA do 0,5 ml skúmaviek Eppendorf. Musí sa teda vypočítať objem, v ktorom sa toto množstvo RNA nachádza. Na odstránenie DNA zo vzoriek RNA, tzv. DNase treatment, sa používa DNAza I riedená DNAza pufrom v pomere 1:3. Pripraví sa 4 µl riedenej DNAzy I na každú vzorku plus 4-8 µl navyše, kvôli pipetovacej chybe. Nakoniec sa musí dopočítať objem DEPC vody do konečného celkového objemu reakčnej zmesi 30 µl. Takto pripravené zmesi DEPC vody, 5 µg RNA a 4 µl riedenej DNAzy I sa zamiešajú, stočia a inkubujú pri 37°C počas 25 minút v termomixéri Thermomixer comfort eppendorf MTP určenom na Eppendorf skúmavky. Po inkubácii sa do každej vzorky pridá 1,5 µl EDTA s koncentráciou 0,1 mol/l a inkubuje sa 10 minút pri teplote 75°C. Potom sa vzorky z termomixéru vyberú a na chvíľu sa postaví do ľadu. Nakoniec sa pridá 18,5 µl DEPC vody ku každej vzorke na doplnenie do celkového objemu 50 µl. Výsledná koncentrácia RNA v každom vzorku je 0,1 µg/µl.

#### **6.2.5 MikroRNA- reverzná transkripcia**

Pomocou metódy zvanej reverzná transkripcia sa nestabilná RNA prevedie do štruktúry stabilnej jednoreťazcovej DNA, tzv. komplementárnej DNA (cDNA). Tento prepis umožňuje enzým zvaný reverzná transkriptáza (RT). Je to v podstate RNA-dependentná DNA polymeráza. Reverzná transkripcia sa vykonáva v dvoch sadách vzoriek. K prvej sade sa pridáva mastermix s obsahom RT a k druhej sade rovnaký mastermix pre reverznú transkripciu, ale bez RT. Druhá sada teda slúži ako kontrola čistoty vzoriek RNA, teda či nie sú tieto vzorky kontaminované genómovou DNA. Ďalej sú potrebné primery. Primery sú krátke oligonukleotidové sekvencie s daným poradím nukleotidov, ktoré nasadnú na študovaný úsek nukleovej kyseliny. Pre mikroRNA reverznú transkripciu, kde je templátom miRNA sa používajú špecifické RT primery. Multiplexné usporiadanie reakcie znamená, že sa zmieša viac primerov do jednej zmesi. Výsledná cDNA je teda zmesou sekvencií, ktoré vznikli vďaka vybraným špecifickým RT

primerom. Výhodou multiplexného usporiadania reverznej transkripcie je úspora materiálu. Zmes špecifických RT primerov sa pripraví nasledovne. Pre každú reakciu sú potrebné 2  $\mu\text{l}$  zmesi primerov. Každý z piatich použitých primerov má koncentráciu 5  $\mu\text{mol/l}$ . Pre 12 vzoriek sa zmieša 6  $\mu\text{l}$  z každého z piatich primerov a tak vznikne 30  $\mu\text{l}$  zmesi primerov, kde každý primer má koncentráciu 1  $\mu\text{mol/l}$ . Vzorky RNA po DNase treatment zriedené DEPC vodou majú koncentráciu 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pre reverznú transkripciu sa pripraví zmes: 2  $\mu\text{l}$  zmesi primerov („multiplex“ zmes) a taký objem vzorky RNA, ktorý obsahuje 250 ng RNA. Pre vzorky RNA s koncentráciou 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  je to objem 2,5  $\mu\text{l}$ . Táto zmes sa dá zahriať do PCR cykléru na 5 minút pri teplote 65°C. Počas tejto fázy dochádza k denaturácii RNA. Po uplynutí 5 minút sa na PCR cykléri stlačí PAUSE. Následne sa skúmavky na krátky čas postavia do řadu a potom sa stočia. Každá vzorka sa doplní do objemu 10  $\mu\text{l}$  RT+ alebo RT- mastermixom. RT mastermix má pre každú vzorku zloženie podľa Tabuľky 1.

**Tabuľka 1: Objemy jednotlivých zložiek mastermixu pre reverznú transkripciu**

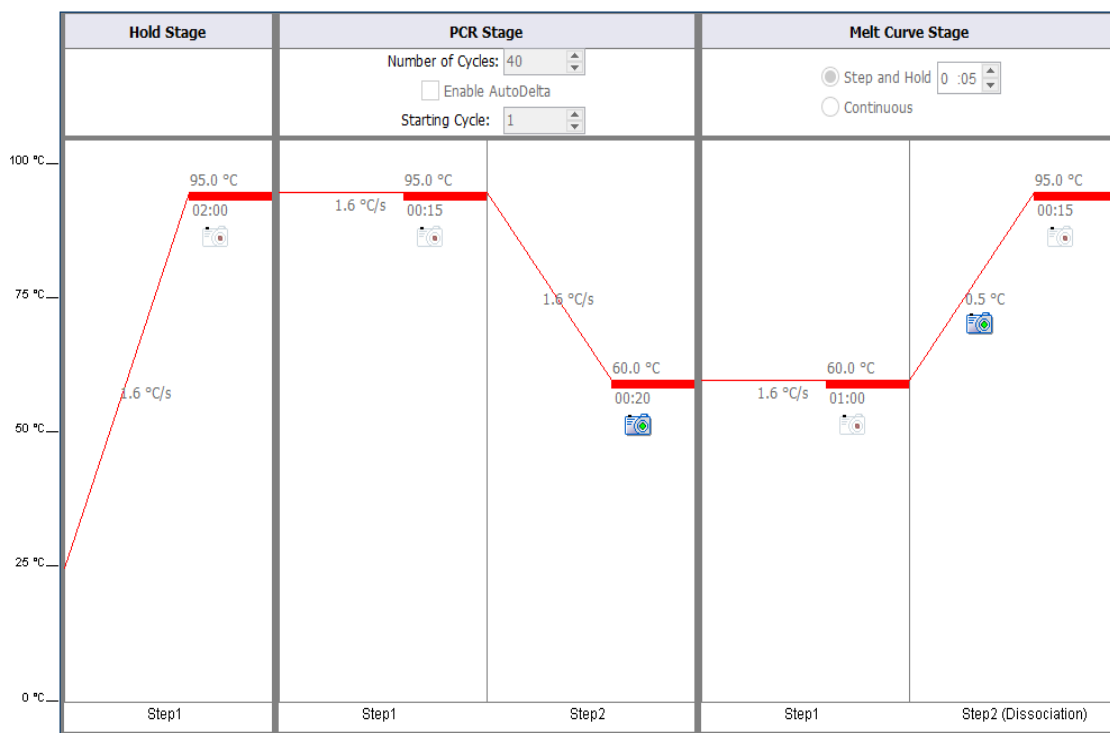
RT+	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	RT-	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
Pufor 5x	2,0	Pufor 5x	2,0
DTT	1,0	DTT	1,0
dNTPs	2,0	dNTPs	2,0
RT	0,3	redestilovaná H <sub>2</sub> O	0,3
RNaseIN	0,2	RNaseIN	0,2

Objemy v Tabuľke 1 sa vynásobia počtom vzoriek plus 0,5 až 2 vzorky navyše kvôli pipetovacej chybe. Takto pripravená zmes sa vloží do PCR cykléru - MJ mini, Bio-Rad na 30 minút pri teplote 16°C. Toto zahrievanie zaisťuje, aby si primery nasadli na templátovú miRNA. V nasledujúcej fáze sa syntetizuje cDNA pri 42°C po dobu 30 minút. V poslednej fáze dochádza k denaturácii RT pri 95°C po dobu 5 minút. Po ukončení reverznej transkripcie sa ku vzorkám s objemom 10  $\mu\text{l}$  pridá 90  $\mu\text{l}$  redestilovanej vody. Získaná cDNA sa tak nariedi 10-krát. Takto pripravená cDNA sa uchováva pri -20°C pre následnú qPCR. Do následujúcej qPCR sa pipetuje 5  $\mu\text{l}$  riedenej cDNA čo odpovedá množstvu 2,5 ng RNA. Zriedením cDNA sa zmenší chyba pri pipetovaní väčšieho množstva templátu na qPCR.

## 6.2.6 Real-time PCR (kvantitatívna PCR, qPCR)

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) slúži na zmnoženie cDNA získanej reverznou transkripciou. Modifikácia PCR zvaná real-time slúži na kvantifikáciu templátovej DNA v reálnom čase. Na rozdiel od klasickej PCR, dochádza u real-time PCR ku určeniu množstva DNA už počas procesu amplifikácie. Iný názov pre real-time PCR je kvantitatívna PCR (qPCR).

Do jamiek mikrotitračnej doštičky sa pipetuje MasterMix s objemom 15  $\mu$ l. MasterMix pre jednu vzorku obsahuje 4,2  $\mu$ l vody, 2-krát koncentrovanú zmes SYBR Green I (SGI) s objemom 10  $\mu$ l, F (forward) a R (reverse) primery. Obidva s objemom 0,4  $\mu$ l a koncentráciou 5  $\mu$ mol/l. Zmes SGI obsahuje DNA polymerázu, dNTPs, pufor a SYBR Green I. Reverznou transkripciou získaná cDNA nariadená v pomere 1:9 sa v objeme 5  $\mu$ l pripipetuje ku MasterMixu. Vzorky a kontroly v podobe zriedenej cDNA boli pre qPCR pipetované a zmerané v duplikátoch. Celkový objem reakčnej zmesi MasterMixu a vzorky cDNA v jednej jamke mikrotitračnej doštičky je teda 20  $\mu$ l. Súčasne s vyšetrovanými vzorkami sa pipetuje aj no template control (NTC), kde reakčná zmes namiesto cDNA obsahuje 5  $\mu$ l vody. NTC kontrola slúži na vylúčenie falošnej positivity qPCR, čiže odhaľuje kontamináciu vzoriek inou DNA. Takto pripravená doštička sa uzavrie fóliou a vloží sa do PCR cykléru a spustí sa program QuantStudio 6 Flex Software. Po úvodnom zahriatí zmesi na 95°C na dobu 2 minút nasleduje 40 dvojfázových cyklov. V prvej fáze, ktorá prebieha pri 95°C dochádza počas 15 sekúnd k denaturácii templátovej cDNA. Prvá fáza je označovaná ako fáza denaturačná. V druhej fáze je vďaka optimalizácii rekombinantnej DNA polymeráze skombinovaná fáza zvaná annealing a fáza extenzie pri teplote 60°C, kedy počas 20 sekúnd dochádza k nasadnutiu primerov na komplementárnu jednoreťazcovú templátovú cDNA a syntéze nového vlákna DNA. Tento cyklus sa 40-krát opakuje. Následuje fáza stanovenia disociačnej krivky topenia, kedy je postupne zvyšovaná teplota, pre určenie špecificity vzniknutého produktu. Po ukončení kvantifikácie DNA sa hodnoty Ct exportujú do Excelu. Priebeh jednotlivých krokov qPCR je znázornený na Obrázku 7.



**Obrázok 7: Priebeh a nastavenia jednotlivých krokov qPCR**

## 6.2.7 Izolácia proteínov

Tento postup sa vykonáva v rukaviciach. Na izoláciu proteínov sú použité nastrihané kúsky srdcového tkaniva myši, ktorým bol podávaný IMB a kontrolné vzorky tkaniva. Zo vzorkov ovplyvnených IMB aj z kontrol sú použité po 3 vzorky v 1,5 ml skúmavkách Eppendorf a v každej z nich je 200 µl lyzačného pufru s inhibítormi proteáz. Lyzačný pufr s inhibítormi proteáz má zloženie podľa Tabuľky 4. Následne sa mikrohomogenizátormi mierne rozrušia a potom sa pripipetuje 200 µl lyzačného pufru. Mikrohomogenizátorom sa všetky roztoky dôkladne homogenizujú. Do vopred vychladenej centrifúgy na 4°C sa dajú takto pripravené vzorky stočiť na 5 minút pri 12000 otáčkach. Po stočení je vidieť na dne skúmavky usadené nerozpustné proteíny a zbytky nehomogenizovaného tkaniva. Na povrchu sú tukové zbytky tkaniva a medzi týmito vrstvami je supernatant obsahujúci požadované proteíny. Špičkou pipety sa prerazí tuková vrstva na povrchu a supernatant sa opatrne odpipetuje do nových, označených, 1,5 ml skúmaviek Eppendorf. Potom sa vzorky zmrazia a tak sa uchovávajú na ich ďalšiu manipuláciu.

## 6.2.8 Stanovenie koncentrácie bielkovín

Koncentrácia bielkovín vo vzorkách sa stanoví pomocou bicinchonínovej metódy. Je to metóda, kde  $\text{Cu}^{2+}$  katióny a proteíny spolu reagujú v zásaditom prostredí a zároveň dochádza k redukcii  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ . Pracovný roztok C obsahuje kyselinu bicinchonínovú (BCA). Po pridaní roztoku C ku vzorkám, tvorí táto kyselina s  $\text{Cu}^+$  kationmi stabilný modrofialový produkt, ktorý má pri vlnovej dĺžke 562 nm absorbančiu priamo úmernú koncentrácii proteínu vo vzorke.

Vzorky vyizolovaných proteínov sa nechajú rozmraziť. Zásobný roztok BSA o koncentrácii 0,2 mol/l sa nariedi redestilovanou vodou tak, aby výsledný roztok mal objem 150  $\mu\text{l}$  a koncentráciu 0,1 mol/l. Následne sa do mikrotitračnej doštičky s oblým dnom pipetujú objemy pripraveného roztoku BSA a destilovanej vody podľa Tabuľky 2. Toto riedenie je pripravené v štyroch radách. Vzorky proteínov a k nim príslušné kontrolné vzorky sa nariedia 20-krát a 50-krát. Potom sa z každého vzorku, kontroly a riedenia pipetujú 4 paralelné rady. Takto sa zabezpečí, aby každá vzorka bola premeraná 4-krát. Získané hodnoty sa pri výpočte spriemerujú.

**Tabuľka 2: Koncentračná rada roztokov BSA**

Mikroskúmavka	Koncentrácia BSA [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,1% roztok BSA [ $\mu\text{l}$ ]	Destilovaná voda [ $\mu\text{l}$ ]
1	0	0	50
2	200	10	40
3	400	20	30
4	600	30	20
5	800	40	10
6	1000	50	0

Potrebné množstvo pracovného roztoku C sa pripraví zmiešaním roztoku A a B v pomere 50:1 (14,5 ml roztoku A a 290  $\mu\text{l}$  roztoku B). Pracovný roztok A má zloženie  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a BCA v NaOH s koncentráciou 0,1 mol/l. Pracovný roztok B má zloženie 4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ . Potom sa pripravený pracovný roztok C pripipetuje multikanálovou pipetou v objeme 200  $\mu\text{l}$  ku každej vzorke v mikrotitračnej doštičke. Takto pripravená doštička sa dá inkubovať na 30 minút do termomixéru pri teplote



37°C. Po inkubácii sa zmeria absorbanca (pri 562 nm) na spektrofotometre Tecan NanoQuant infinite M200 pro v jednotlivých jamkách so vzorkami a výsledky sa uložia do programu Excel. Po zostrojení kalibračnej krivky a vypočítaní rovnice krivky sa vypočítajú koncentrácie bielkovín v jednotlivých vzorkách.

## 6.2.9 Elektroforéza

### Zásobné roztoky

**4 mol/l HCl:** 88 ml koncentrovanej HCl sa prileje do 150 ml redetilovanej vody a následne doplníme vodou do 250 ml. Pripravený roztok sa skladuje v chladničke.

**Akrylamid + bis-akrylamid (AA+bis-AA):** Pri príprave tohto roztoku sa pracuje v rukaviciach kvôli toxicite akrylamidu. Najprv sa naváži 30 g akrylamidu a 0,8 g bis-akrylamidu. Navážky sa rozpustia v malom množstve vody pomocou miešačky. V odmernej banke sa ich roztok doplní do objemu 100 ml a následne sa uchováva v chladničke pod argónovou atmosférou.

**1,5 mol/l Tris-HCl pufor s pH 8,8:** Naváži sa 18,5 g Trisu a pridá sa 75 ml redetilovanej vody, v ktorej sa Tris rozpustí. Pomocou 4 mol/l HCl sa upraví pH na pH-metre na hodnotu 8,8. V odmernej banke sa doplní objem na 100 ml. Takto pripravený roztok sa uchováva v chladničke.

**0,5 mol/l Tris-HCl pufor s pH 6,8:** Naváži sa 6 g Trisu k tomu sa pridá 75 ml redetilovanej vody a nechá sa rozpustiť. Pomocou 4 mol/l HCl sa upraví pH na pH-metre na hodnotu 6,8. V odmernej banke sa doplní objem na 100 ml. Takto pripravený roztok sa uchováva v chladničke.

**10% SDS:** Naváži sa 10 g SDS. Rozpustí sa v 80 ml redetilovanej vody. V odmernej banke sa doplní na objem 100 ml a uchováva sa v chladničke.

**Koncentrovaný elektródový pufor:** Naváži sa 72 g glycínu, 15 g Trisu a 5 g SDS. Tieto navážky sa rozpustia v 900 ml redetilovanej vody. Pomocou 4 mol/l HCl sa upraví pH na pH-metre na hodnotu 8,3. V odmernej banke sa doplní na objem 1000 ml. Následne sa rozleje do plastových nádob s objemom 100 ml a zamrazí sa.

## Zásobné roztoky na riedenie vzoriek

**Tabuľka 3: 4x SDS pufo**

Zložka (konečná koncentrácia)	Koncentrácia zásobného roztoku	Pipetované množstvo
200 mmol/l Tris-HCl pH 6,8	1 mol/l	4 ml
40% glycerol	85%	9,41 ml
6% SDS	prášok	1,2 g
0,2 mol/l DTT	prášok	0,617 g
0,1 g bromfenolovej modrej	prášok	Štipka
redistilovaná H <sub>2</sub> O		20 ml

**Tabuľka 4: Lyzačný pufo**

Zložka (konečná koncentrácia)	Koncentrácia zásobného roztoku	Pipetované množstvo
50 mmol/l Tris-HCl pH 7,4	1 mol/l	50 ml
150 mmol/l NaCl	Prášok	8,766 g
10% glycerol	85%	117,65 ml
1% Triton X-100	100 %	10 ml
2 mmol/l EDTA	Prášok	0,58 g
2 mmol/l EGTA	Prášok	0,76 g
40 mmol/l β-glycerolfosfát	Prášok	8,52 g
50 mmol/l fluorid sodný	Prášok	2,09 g
10 mmol/l pyrofosfát sodný	Prášok	4,46 g
2 mmol//l DTT	Prášok	0,3085 g
200 μmol/l vanadičnan sodný	Prášok	0,03678 g
voda		doplniť do 1 l

Pred použitím sa lyzačný pufo upraví pridaním roztokov inhibítorov proteáz. K 13 ml lyzačného pufru sa pridá 130 μl inhibítorov proteáz a 130 μl fenylmetansulfonylfluoridu. Takto pripravený roztok sa skladuje v chladničke. Nesmie sa skladovať v mraziaku!

**Vodou nasýtený izobutanol:** Čistý izobutanol sa zmieša s redistilovanou vodou. Izobutanol nasýtený vodou je v hornej vrstve. Takto pripravený roztok sa uchováva v chladničke.

## Pracovné roztoky

**10% Persíran amonný (APS):** Naváži sa 25 mg APS a nechá sa rozpustiť v 250  $\mu$ l redestilovanej vody. Tento roztok sa pripravuje tesne pred jeho použitím.

**Tabuľka 5: Zloženie separačného elektroforetického gélu (uvedené objemy slúžia pre prípravu 2 gélov)**

	2 gély 1,5 mm 12,5%
redestilovaná voda	8,55 ml
pufor 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5,00 ml
roztok AA+bis-AA (40%)	6,25 ml
10% SDS	0,20 ml
Iniciácia polymerácie	
roztok APS	200 $\mu$ l
TEMED	16 $\mu$ l

**Tabuľka 6: Zloženie zaostrovacieho elektroforetického gélu (uvedené objemy slúžia pre prípravu 2 gélov)**

	2 gély 1,5 mm 4%
redestilovaná voda	6,42 ml
pufor 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,50 ml
roztok AA+bis-AA (40%)	0,98 ml
10% SDS	0,10 ml
Iniciácia polymerácie	
roztok APS	200 $\mu$ l
TEMED	16 $\mu$ l

**Elektródový pufor:** Pripraví sa zmiešaním 70 ml zásobného elektródového pufru a zmieša sa s 280 ml redestilovanej vody.

Pomocou elektroforézy sa rozdelia stanovované proteíny podľa veľkosti. Stanovujeme marker poškodenia srdcového tkaniva a Pan-Aktín ako referenčný proteín. Vzhľadom k odlišnej veľkosti testovaných proteínov sa môžu niektoré proteíny stanoviť využitím

jedného gélu. Koncentrácia gélu sa určuje podľa veľkosti separovaných proteínov. Pre naše stanovenie sa pripraví akrylamidový gél s koncentráciou 12,5%. Začína sa prípravou separačného gélu, ktorý slúži na vlastnú separáciu proteínov. Príprava gelu musí prebiehať v digestore a s použitím rukavíc, kvôli toxicite akrylamidu a TEMED. Do kadičky s miešadlom postavenej na elektrickej miešačke sa postupne pipetujú príslušné objemy redestilovanej vody, pufru Tris-HCl, roztoku akrylamidu a bisakrylamidu a nakoniec sa pripipetuje roztok SDS. Pipetované objemy a koncentrácie sú uvedené v Tabuľke 5. Pre zahájenie polymerácie monomérneho akrylamidu sa do tejto zmesi pripipetuje roztok čerstvo pripraveného 10% APS a roztoku TEMED. Do pripravenej aparatury na tuhnutie gélu sa pomaly a plynule pipetuje pripravený roztok tak, aby medzi sklíčkami čo najmenej vznikali bubliny. Následne sa na povrch separačného gelu pripipetuje izobutanol 300  $\mu$ l. Izobutanol nasýtený vodou slúži na odstránenie bublín z gelu. Tiež zabezpečuje, aby gél počas tuhnutia nevyschol a dorovnáva povrch gelu. Po hodine gelovania sa izobutanol zleje a opatrne sa vysušia jeho zvyšky filtračným papierom.

Zaostrovací gél má koncentráciu 4%. Pripravuje sa obdobne ako gél separačný, ale používajú sa iné objemy jednotlivých zložiek. Jednotlivé objemy sú uvedené v Tabuľke 6. Slúži na zakoncentrovanie proteínov z napipetovaného objemu vzorku a tým zvyšuje rozlíšenie separačného gélu. Po odstránení izobutanolu sa zaostrovací gél napipetuje na separačný gél, zastokne sa do neho hrebeň a nechá sa polymerovať 30 minút alebo sa na noc uloží do chladiaceho boxu.

Vzorky vyizolovaných proteínov sa nariedia na koncentráciu 1  $\mu$ g/ $\mu$ l roztokom SDS, ktorý tiež obsahuje lyzačný pufr s inhibítormi proteáz. Roztok každého vzorku musí byť nariedený tak, aby štvrtinu z jeho celkového objemu tvoril SDS. Zloženie 4-krát koncentrovaného SDS pufru je uvedené v Tabuľke 3. Výsledky z merania koncentrácie bielkoviny vo vzorkách sú uvedené vo výsledkovej časti práce. Takto nariedené vzorky sa denaturovali pri 95°C počas 5 minút. Po zostavení elektroforetickej aparatury umiestnenej v ľadovom kúpeli sa do vnútorného elektródového priestoru naleje elektródový pufr tak, aby v ňom bol ponorený celý gél. Potom sa skontroluje, či pufr nepodteká. Do vonkajšieho elektródového priestoru sa tiež naleje elektródový pufr tak, aby bola elektróda ponorená. Ak je gél hrubý 1,5 mm tak sa do každej jamky

nanesie 25 µl nariadenej vzorky. Do jednej z jamiek sa nanesie 5 µl molekulárneho štandardu. Ak je jamiek viac ako vzoriek tak sa do krajných jamiek nanesie 1-krát koncentrovaný SDS zriedený vodou. Celá aparatura sa zhora uzavrie viečkom a pripojí sa k zdroju napätia. Na začiatok elektroforetického procesu sa nastaví konštantné napätie 90 V a vzorky sa pomaly pohybujú zaostrovacím gélom ku anóde. Keď vzorky dorazia k separačnému gélu prenasťaví sa napätie na 150 V. Zdroj napätia sa vypne vtedy, keď čelo vzoriek dorazí na spodný okraj gélu.

### **6.2.10 Imunobloting**

Metóda zvaná imunobloting v sebe zahŕňa metódu Western blot s následnou detekciou proteínov na membráne pomocou protilátok a detekčného činidla.

#### **6.2.10.1 Western blot**

Western blot je metóda umožňujúca prenesenie proteínov rozdelených na elektroforetickom géli na nitrocelulóзовú membránu pôsobením elektrického prúdu.

#### **Zásobný roztok**

**Blotovacie pufor:** Naváži sa 6,06 g Trisu (25 mmol/l) a 28,8 g glycínu (192 mmol/l). Tieto navážky sa rozpustia v 500 ml redestilovanej vody. Potom sa pridá 400 ml metanolu. Následne sa roztok v odmernej banke doplní do 2000 ml a skladuje sa v chladničke.

Po ukončení elektroforézy sa pomocou klinku oddelí vrchné sklo od gélu. Potom sa odstráni zaostrovací gél a tiež dolná časť gélu s bromfenolovou modrou. Bromfenolová modrá je farbička, ktorá sa pridáva do vzoriek za účelom ich zviditeľnenia počas pipetovania a elektroforetického procesu. Opatrne sa od gélu odstráni aj spodné sklo a gél sa preniesie do vaničky s blotovacím pufrom a zakryje sa viečkom. Podobne sa do blotovacieho pufru namočí aj hrubý filtračný papier a nitrocelulóзовá membrána. Na každý gél sú potrebné 2 filtračné papiere a 1 membrána. Všetko sa nechá v blotovacom pufri 20 minút. Po uplynutí tohto času následuje samotné prenesenie proteínov z elektroforetického gélu na nitrocelulóзовú membránu. Príprava na blotovanie sa vykonáva v rukaviciach. Na zásuvku prístroja na blotovanie BioRad Trans Blot Turbo sa uložia jednotlivé komponenty smerom zdola nahor v poradí hrubý filtračný papier,

membrána, gél, hrubý filtračný papier. Poradie komponent závisí na tom, v akom smere cez ne prechádza elektrický prúd. V tomto prípade prechádza elektrický prúd zhora nadol. Medzi jednotlivými vrstvami, hlavne medzi gélom a membránou sa odstránia vzduchové bublinky, ktoré by mohli blotovanie rušiť. Takto pripravená zásuvka sa sa zakryje viečkom a napevno uzavrie. Potom sa vloží do prístroja na blotovanie a nastaví sa protokol, podľa ktorého sa bude prístroj po zapnutí riadiť a zapne sa. Na hrúbke gélu závisí dĺžka blotovania. Po dokončení blotovania sa zásuvka vyberie, otvorí a skontroluje sa prenesenie farby markeru na membránu.

### **6.2.10.2 Chemiluminiscenčná detekcia proteínov**

Princípom je reakcia primárnej protilátky proti vyšetrovanému proteínu a následná reakcia primárnej protilátky s enzýmovo značenou sekundárnou protilátkou. K enzýmu sa potom pridá substrát, ktorý sa vďaka enzýmu premieňa na produkt, ktorého signál sa dá zmerať. Medzi množstvom proteínu a množstvom vzniknutého produktu je priama úmera.

#### **Zásobné roztoky**

**0,1 mol/l Tris pufor, pH 8,0:** Pripraví sa navážením 12,11 g Trisu. Navážka sa rozpustí v 800 ml redistilovanej vody. Pomocou 4 mol/l HCl sa upraví pH na 8,0. V odmernej banke sa potom doplní na objem 1000 ml. Takto pripravený roztok sa uchováva v chladničke.

**TBST:** Pripraví sa navážením 8,77 g NaCl. Navážka sa rozpustí v 300 ml redistilovanej vody. Pridá sa 3 ml Tweenu 20 a 100 ml Tris pufru o koncentrácii 0,1 mol/l s pH 8,0. V odmernej banke sa doplní do 1000 ml. Takto pripravený roztok sa uchováva v chladničke.

**Primárne protilátky:** Zásobná protilátka sa nariedi v pomere 1:2000 pomocou 2% roztoku BSA alebo mlieka v TBST pufru. Pre prípravu 15 ml riedenej protilátky sa pipetuje 7,5 µl protilátky a 15 ml 2% roztoku BSA.

**Sekundárne protilátky:** Zásobný roztok protilátok sa nariedi 2% roztokom BSA alebo mlieka podľa odporúčaní výrobcu. Nariedené protilátky sa skladujú v mraziaku.

Membrána sa pinzetou preniesie do 50 ml falconovej skúmavky, tak aby sa proteíny na membráne nedotýkali stien skúmavky a boli tak prístupné pre roztok blokovacieho mlieka. Blokovacie mlieko obsahuje proteíny, ktoré sa počas 2 hodinovej inkubácie na

kývačke naviažu na časti membrány, ktorá neobsahuje prenesené proteíny. Na blokovanie sa pripraví roztok mlieka v TBST pufre s koncentráciou 5%. Po blokovaní membrány sa mlieko vyleje, naleje sa primárna protilátka a nechá sa cez noc inkubovať. Na druhý deň sa primárna protilátka zleje späť do falconovej skúmavky a skladuje sa zamrazená na ďalšie použitie. Potom sa membrána premýva TBST pufrom 4-krát po 10 minút. Po premývaní sa naleje sekundárna protilátka, ktorá reaguje s protilátkou primárnou a nechá sa inkubovať 1 hodinu. V našom experimente sme použili sekundárne protilátky značené chrenovou peroxidázou. Potom sa zas membrána premýva TBST pufrom 4-krát po 10 minút.

Pre detekciu chrenovej peroxidázy sa použije Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent. Ten sa pripraví zmiešaním roztoku A (luminol solution) a roztoku B (peroxide solution) v pomere 1:1. Takto pripravený roztok sa nakvapká na celý povrch membrány a nechá sa inkubovať 5 minút v tmavom priestore. Po inkubácii sa proteíny na membráne odfotia a vyhodnotia pomocou prístroja ChemiDoc MP Imaging System, BioRad.

### **6.2.11 Analýza dát**

Získané dáta boli spracované v programe Excel a potom boli štatisticky vyhodnotené programom GraphPad Prism v8 (GraphPad Software, Inc.) s použitím neparametrického testu zvaného Kruskal-Wallis test a následne Dunn's *post hoc* testu. Za štatisticky významné boli považované dáta pri  $P < 0,05$ .

## 7. VÝSLEDKY

Vo svojej práci som pozorovala kardiotoxický efekt IMB prostredníctvom zmeny expresie miRNA v srdcovom tkanive myší. Sledovali sme tiež zmenu hladín vybraných cirkulujúcich miRNA v plazme myší. Vybrané miRNA by potencionálne mohli slúžiť ako biomarkery kardiotoxicity liečiv, preto v celkovom projekte nebol pozorovaný len účinok IMB, ale aj DOX. DOX je známy svojou kardiotoxicitou a bol použitý ako pozitívna kontrola, pretože je v súvislosti s miRNA omnoho viac preštudovaný. Zmena expresie miRNA bola zmeraná pomocou qPCR. Príprava vzoriek zahŕňala izoláciu RNA, DNase treatment a mikroRNA reverznú transkripciu.

Okrem miRNA sme pozorovali proteínové markery poškodenia srdca. Nechala sa zmerať koncentrácia Troponínu T v plazme myší a ako doplnok sme sledovali hladiny Troponínu I a T vo vzorkách srdcového tkaniva pomocou imunoblotingu.

### 7.1 Stanovenie Troponínu T v plazme

**Tabuľka 7: Koncentrácia Troponínu T v plazme**

Vzorky	Kontrolné vzorky	IMB	DOX
Koncentrácia Troponínu T [ng/l]	4,60	7,87	9,53
Smerodajná odchýlka	0,72	3,51	1,29

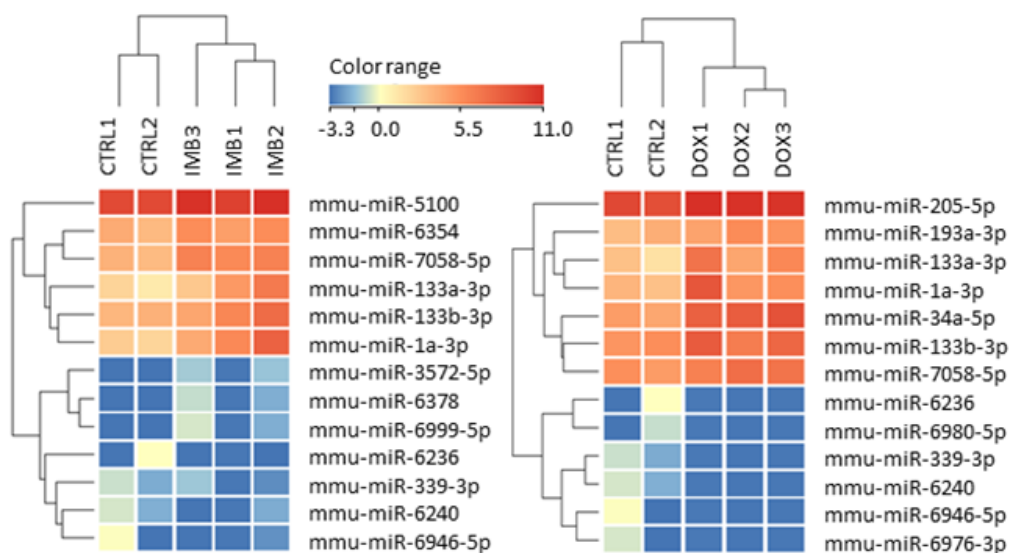
IMB - vzorky ovplyvnené imatinibom, DOX - vzorky ovplyvnené doxorubicínom

Troponín T je klasickým markerom poškodenia srdca. Hodnoty v Tabuľke 7 sú priemerné hodnoty Troponínu T namerané v plazme 4 myší. Celkový počet myší bol 9. Koncentrácia Troponínu T sa dala zmerať v ÚKBD vo FN HK. Veľká smerodajná odchýlka pri IMB vzorkách znázorňuje variabilitu odpovedí rôznych jedincov na IMB. To znamená, že každý jedinec reaguje na liečbu IMB odlišne. Kontrolné vzorky plazmy sú od myší, ktoré neboli ovplyvnené IMB. U vzoriek ovplyvnených doxorubicínom došlo k významnému vzostupu Troponínu T v porovnaní so vzorkami kontrolnými.



## 7.2 Stanovenie profilu mikroRNA

### 7.2.1 Veľkokapacitné stanovenie technikou microarray v plazme



**Obrázok 8: Porovnanie expresie deregulovaných miRNA v plazme myší**

CTRL - kontrolné vzorky, IMB - vzorky ovplyvnené imatinibom, DOX - vzorky ovplyvnené doxorubicínom

Zo vzoriek plazmy myší sa na čipe (SurePrint G3 Mouse miRNA Microarrays (8×60k, Release 21.0, Design ID 070155; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) vyšetrili zmeny hladín miRNA kontrolných aj ovplyvnených vzoriek. Tieto dáta sme získali zo spolupráce so Státním zdravotným ústavom. Iba u vzoriek ovplyvnených DOX boli zmeny miRNA signifikantné. Naopak u vzoriek ovplyvnených IMB neboli hladiny miRNA štatisticky významne zmenené. Z profilu pozmenených miRNA (Obrázok 8) je zrejmé, že aj IMB pôsobí na podobné miRNA ako DOX. Napríklad zvýšené hladiny miR-133a, miR-133b a miR-1 pozorujeme u IMB aj DOX vzoriek.

## 7.2.2 Stanovenie vybraných mikroRNA v plazme pomocou qPCR

Kvantita vybraných miRNA sa počítala z hodnôt Ct meraných pomocou qPCR. Hodnota Ct (threshold cycle) udáva cyklus, v ktorom fluorescencia pretne líniu detekcie. Platí, že čím je hodnota Ct vzorky menšia, tým viac templátu cDNA vzorka obsahuje. Pre vyhodnotenie množstva počiatočného templátu je použitá relatívna kvantifikácia. Množstvo miRNA sa vypočíta podľa Rovnice 1. Priemerná hodnota Ct referenčného génu miR-16 a spike-in kontroly cel-miR-39 slúži ako vnútorný štandard, ktorý koriguje množstvo vstupného templátu vzorky. Pre referenčný gén platí, že jeho expresia je nezávislá na vonkajších faktoroch a je stála. Hodnoty kontrolných vzoriek sú nastavené na hodnotu 1. Vzhľadom na túto hodnotu je posudzovaná expresia pozorovaných miRNA.

### Rovnica 1

$$2^{-\Delta Ct} \text{ (} \Delta Ct \text{ vyšetrovaného vzorku} - \Delta Ct \text{ kontrolného vzorku)}$$

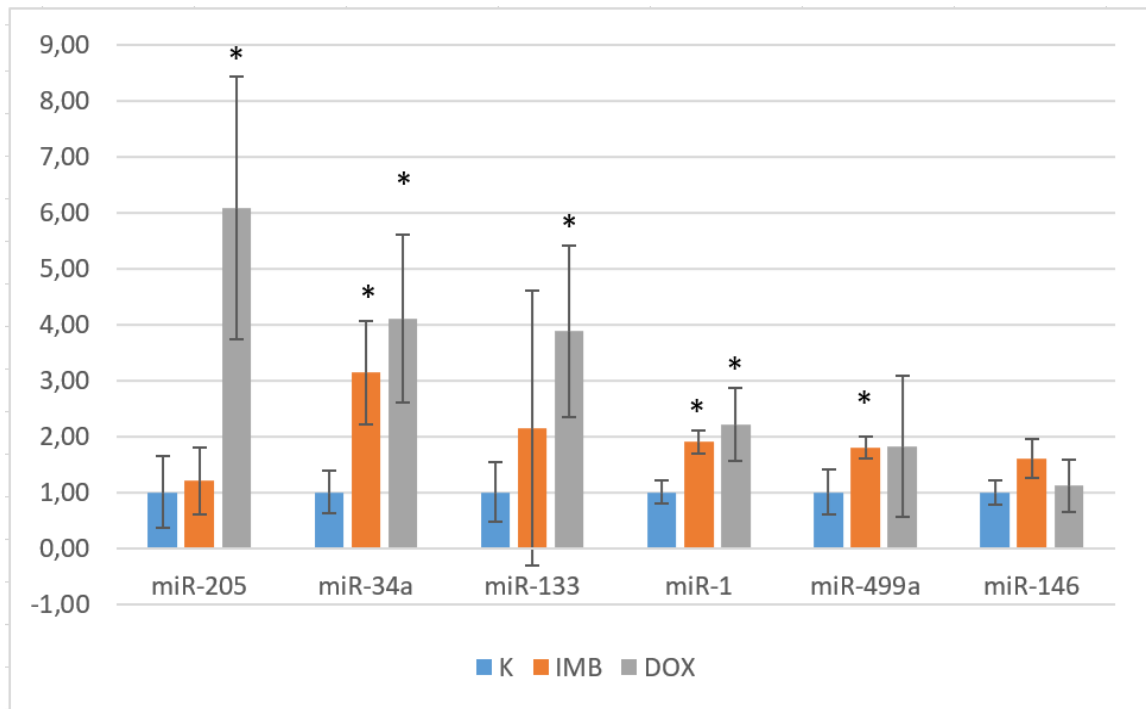
**Tabuľka 8: Koncentrácia RNA v plazme myší**

Vzorky	Koncentrácia RNA [ng/μl]	Čistota RNA (260/280)
IMB 1	50,76	1,61
IMB 3	25,39	1,71
IMB 7	21,18	1,83
DOX 4	20,02	1,48
DOX 5	27,84	1,55
DOX 6	24,00	1,66
K 1	18,33	1,59
K 2	16,34	1,61
K 3	28,39	1,48

K - kontrolné vzorky, IMB - vzorky ovplyvnené imatinibom, DOX - vzorky ovplyvnené doxorubicínom

Z celkového množstva 9 testovaných myší pre IMB, DOX a kontrolu sme vybrali 3 myši z každej skupiny. Z plazmy vybraných jedincov sme izolovali RNA pomocou izolačného kitu. Tabuľka 8 znázorňuje celkovú koncentráciu vyizolovanej RNA zo vzoriek plazmy.

Pomer absorbancie vzoriek pri 260 a 280 nm udáva znečistenie vzoriek RNA bielkovinami. Pri vlnovej dĺžke 260 nm je žiarenie absorbované RNA a pri 280 nm bielkovinami. Ideálna hodnota pomeru by mala byť blízka hodnote 2. Avšak pri takých nízkych koncentráciách RNA aké sú uvedené v Tabuľke 8 je bežné, že tento pomer nedosiahne ideálnej hodnoty.



**Obrázok 9: Expressia vybraných miRNA v plazme myší**

K - kontrolné vzorky, IMB - vzorky ovplyvnené imatinibom, DOX - vzorky ovplyvnené doxorubicínom, symbol \* znamená štatistickú významnosť pri  $P < 0,05$

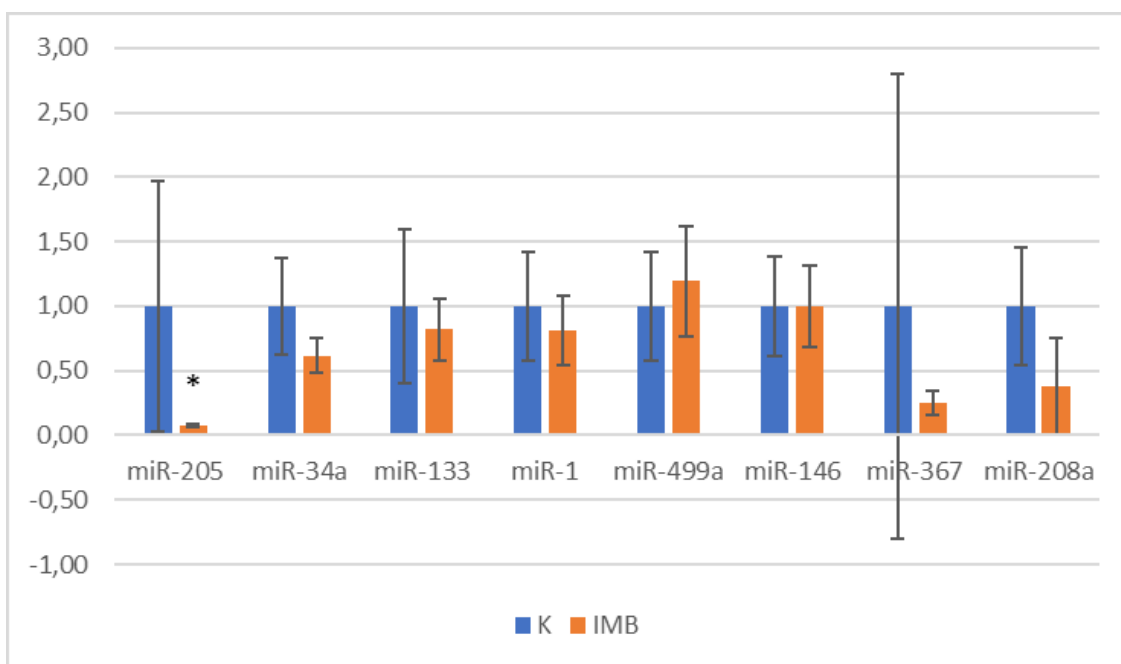
Na Obrázku 9 vidíme u DOX vzoriek zvýšenie expresie miR-133, miR-1 a miR-34a. Najvýraznejšie sa u DOX vzoriek zvýšila expresia miR-205. Na Obrázku 8 tiež pozorujeme zvýšenie miR-205, miR-34a, miR-133 a miR-1 u DOX vzoriek. U vzoriek ovplyvnených IMB na Obrázku 9 pozorujeme zvýšenie expresie u miR-34a, miR-1, miR-499a a miR-133. MiR-133 má však veľkú variabilitu medzi jednotlivcami a preto nemôžeme toto zvýšenie považovať za významné. Podobne ako na čipe sa hodnoty expresie miR-146 pôsobením IMB či DOX významne nezmenili. Testovali sme tiež miR-208a a miR-367, avšak ich hladina vyšla pod medzou detekcie.

### 7.2.3 Stanovenie vybraných mikroRNA v srdci pomocou qPCR

Tabuľka 9 znázorňuje koncentráciu a čistotu vyizolovanej RNA zo srdcového tkaniva myší. Z celkového súboru myší boli vybrané 3 ovplyvnené IMB a 3 slúžiace ako kontrola.

**Tabuľka 9: Koncentrácia RNA v srdciach myší**

Vzorka	Koncentrácia RNA [ng/μl]	Čistota RNA 260/280
IMB 1	175,73	1,90
IMB 2	312,33	1,90
IMB 3	262,28	1,89
K 1	351,85	1,93
K 2	450,31	1,99
K 3	991,20	2,02



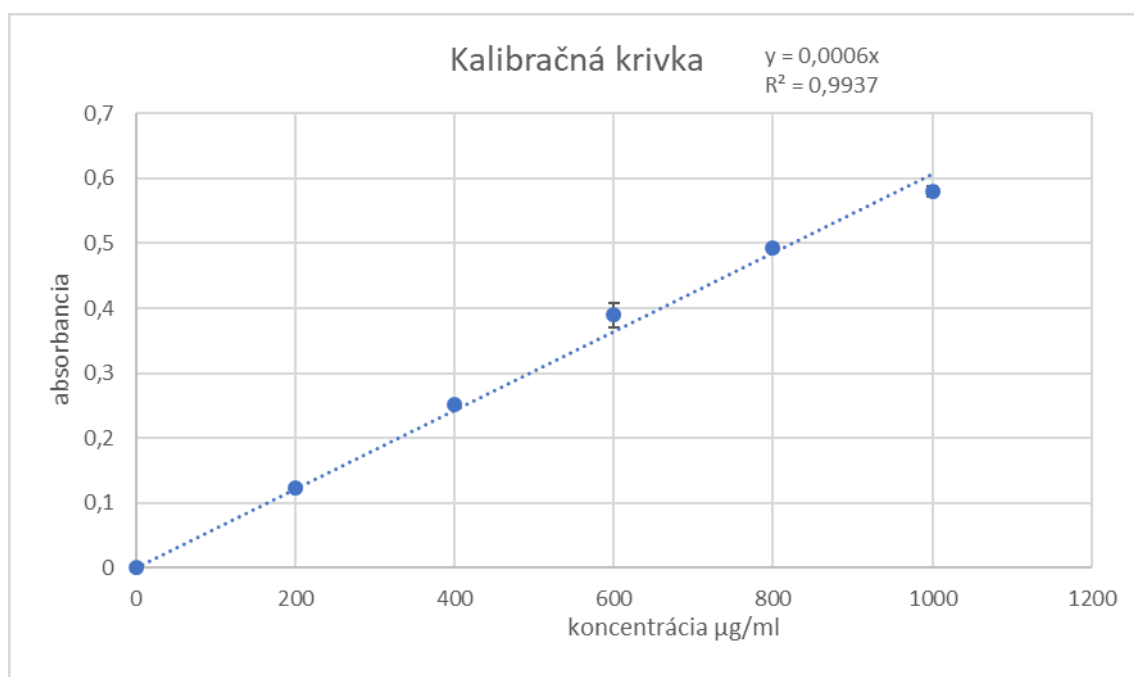
**Obrázok 10: Expresia vybraných miRNA v srdciach myší**

K - kontrolné vzorky, IMB - vzorky ovplyvnené imatinibom, symbol \* znamená štatistickú významnosť pri  $P < 0,05$

Na Obrázku 10 vidíme štatisticky významný pokles expresie miR-205 u vzoriek ovplyvnených IMB pri porovnaní s veľkou variabilitou kontrolných vzoriek. Expresia ostatných miRNA sa štatisticky významne nemení.

### 7.3 Stanovenie koncentrácie bielkoviny

V srdcovom tkanive myši boli okrem hladín vybraných miRNA stanovované tiež vybrané markery na úrovni proteínov. Boli vybrané 3 myši, ktorým bol podávaný IMB a 3 myši, ktoré slúžili ako kontrola. Z týchto myši potom boli vyizolované proteíny. Pre stanovenie koncentrácie celkového množstva bielkoviny vo vzorkách sa musela zostaviť kalibračná závislosť zo vzoriek kalibračnej rady. Následne sa premerali izolované vzorky a vypočítala sa koncentrácia bielkoviny podľa rovnice kalibračnej krivky. Kalibračná krivka je znázornena na Obrázku 11.



**Obrázok 11: Kalibračná krivka pre stanovenie koncentrácie bielkoviny**

**Tabuľka 10: Koncentrácia celkovej bielkoviny vo vzorkách**

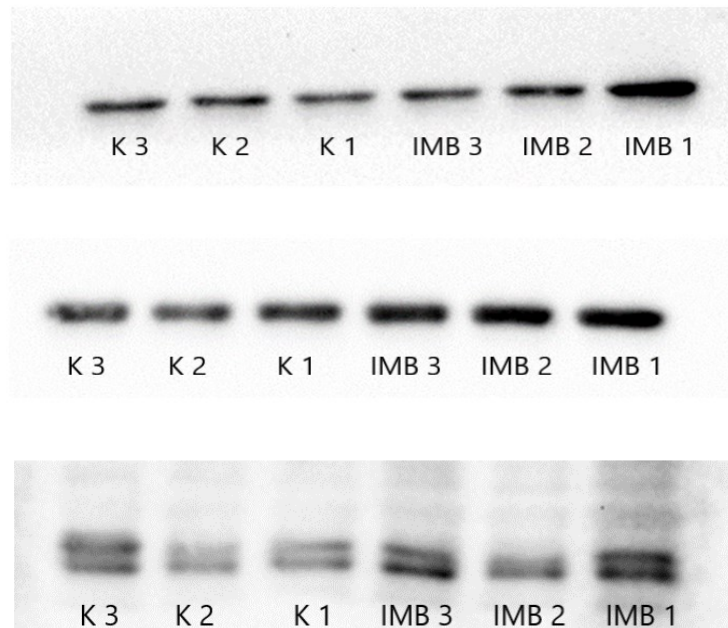
Vzorky	IMB 1	IMB 2	IMB 3	K 1	K 2	K 3
Absorbancia	0,368	0,506	0,471	0,256	0,550	0,417
Koncentrácia [µg/µl]	30,7	42,2	39,2	21,3	45,8	34,7

K - kontrolné vzorky, IMB - vzorky ovplyvnené imatinibom

Pre výpočet výslednej koncentrácie bielkoviny sa použilo riedenie vzoriek ovplyvnených IMB a kontrolných vzoriek 50-krát, pretože absorbancia vzoriek tohto riedenia bola v rozsahu kalibračnej krivky. Tabuľka 10 znázorňuje celkovú koncentráciu vyizolovaných proteínov v jednotlivých vzorkách.

## **7.4 Výsledky imunoblotingu**

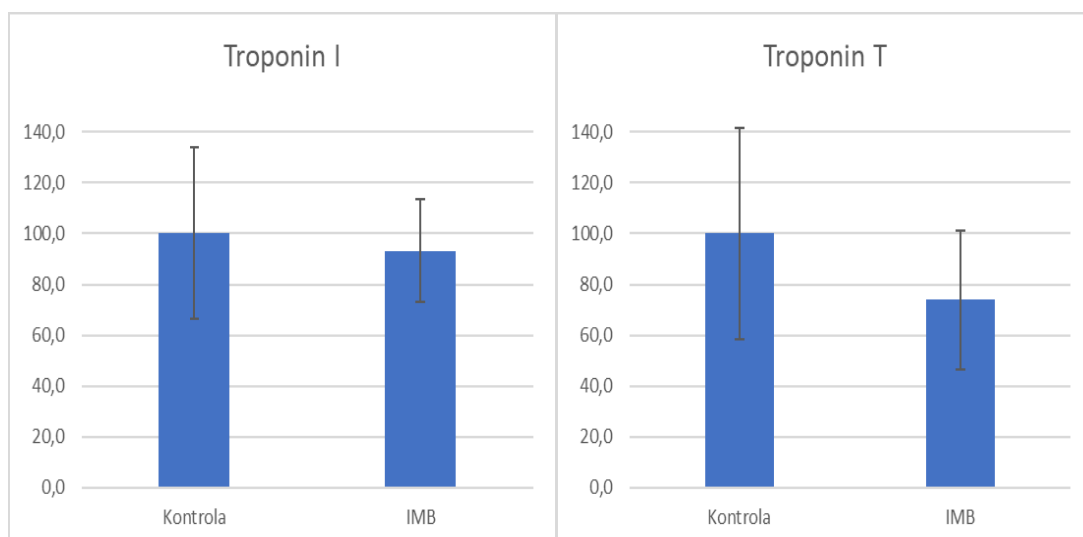
Imunobloting je metóda, pomocou ktorej prostredníctvom špecifických protilátok a detekčného činidla môžeme detekovať a prípadne kvantifikovať proteíny prenesené z gélu na nitrocelulóзовú membránu. Metóda prenosu proteínov z gélu na membránu sa nazýva Western blot. Western blotu predchádza gélová elektroforéza, ktorá rozdelí proteíny podľa ich veľkosti. Kvantifikácia proteínov v tejto práci bola relatívna. Relatívna kvantifikácia znamená, že denzita pruhov študovaných proteínov je vzťahnutá k denzite pruhov proteínu referenčného. Materiálom pre štúdium proteínových markerov poškodenia srdca v tejto práci boli proteíny vyizolované zo srdcového tkaniva myší. Konkrétnymi sledovanými proteínmi boli Troponín T a I vo vzorkách ovplyvnených IMB aj vo vzorkách kontrolných. Ako referenčný proteín pre relatívne stanovenie denzity proteínových markerov slúžil Pan-Aktín, ktorý detekuje všetky formy aktínu.



**Obrázok 12: Densita pruhov (zhora nadol) Pan-Aktínu, Troponínu I a Troponínu T**

K - kontrolné vzorky, IMB - vzorky ovplyvnené imatinibom

Zo srdcového tkaniva myší boli vyzolované proteíny. Potom boli rozdelené pomocou gélovej elektroforézy a prenesené na membránu. Chemiluminiscenčná detekcia umožnila zviditeľnenie pruhov rozdelených proteínov a následne stanovenie ich denzity. Densita pruhov študovaných proteínov je na Obrázku 12.



**Obrázok 13: Relatívne množstvo Troponínu T a Troponínu I**

Z grafov uvedených na Obrázku 13 vyplýva, že k štatisticky významnej zmene Troponínov T a I v srdcovom tkanive myší nedochádza.

## 8. DISKUSIA

IMB je liečivo, ktoré patrí medzi TKI. Jeho objavenie stojí za mnohými liečebnými úspechmi nádorových ochorení. Medzi najvýznamnejšie úspechy patrí liečba CML (Iqbal a Iqbal 2014). Avšak onedlho od uvedenia IMB na trh, bol odhalený jeho významný nežiadúci účinok a tým je kardiotoxicita (Kerckelä et al. 2006). Kardiovaskulárne ochorenia sú bremenom, ktoré zaťažuje ľudí vo vyspelých krajinách. K vzniku týchto ochorení prispievajú aj liečivá s kardiotoxickým účinkom (Mladěnka et al. 2018). Včasné odhalenie a prevencia poškodenia srdca liečivom môže zlepšiť kvalitu zdravia populácie. Cirkulujúce miRNA sa vyznačujú vlastnosťami vhodnými pre potenciálne biomarkery poškodenia srdca, preto sú v posledných rokoch intenzívne študované (Holmgren et al. 2016).

Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť zmenu expresie vybraných miRNA (miR-1, miR-34a, miR-133, miR-146, miR-205, miR-208a, miR-367 a miR-499) ako odpoveď organizmu na kardiotoxicitu IMB. Sledované miRNA boli vybrané podľa dostupných štúdií zaoberajúcich sa kardiotoxicitou liečiv. Väčšina štúdií sa venovala kardiotoxicite DOX, preto bol súčasne s IMB tiež sledovaný účinok DOX, ktorý slúžil ako pozitívna kontrola. Materiálom pre tento experiment boli srdcia a plazma myší, ktorým bol podávaný IMB a DOX. Pre porovnanie zmien hladín miRNA s klasickými biomarkermi poškodenia srdca bol použitý Troponín T meraný v plazme myší. Na začiatku pri stanovení hladín miRNA bola izolovaná RNA z plazmy a tkaniva. V následnom kroku sa pomocou DNase treatment odstránila zo vzoriek RNA nepotrebná DNA. Reverznou transkripciou získaná cDNA bola potom využitá pre stanovenie hladín miRNA pomocou qPCR. Výsledky qPCR sme porovnávali s výsledkom veľkokapacitného stanovenia miRNA technikou microarray. Poškodenie srdca bolo potvrdené klasickým markerom a tým je stanovenie hladín Troponínu T v plazme. Ako doplnok k tomuto stanoveniu sme sledovali hladiny Troponínov T a I priamo vo vzorkách zo srdcového tkaniva myší.

Zvýšenie Troponínu T u vzoriek plazmy získaných z myší, ktorým bol podávaný DOX bolo štatisticky významné. U vzoriek ovplyvnených IMB tiež došlo k zvýšeniu hladiny Troponínu T v plazme. Avšak veľké rozdiely v odpovedi jednotlivých jedincov na IMB spôsobili, že toto zvýšenie nie je štatisticky významné.



Okrem stanovenia vybraných miRNA sme veľkokapacitným vyšetrením cirkulujúcich miRNA zistili, že došlo k zvýšeniu expresie miR-1, miR-133a a miR-133b u vzoriek plazmy ovplyvnenej IMB aj DOX v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Podobne zníženie miR-6236, miR-339, miR-6240, miR-6946 môžeme pozorovať u oboch typov vzoriek v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Tieto výsledky by mohli byť podnetom pre hlbšie štúdium menej známych miRNA, ktorých hladiny boli deregulované.

Zvýšené hladiny cirkulujúcej miR-133a boli pozorované u pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami. Táto miRNA pochádzala hlavne z poškodeného myokardu. Hladina cirkulujúcej miR-133a by teda mohla byť markerom poškodenia a smrti kardiomyocytov (Kuwabara et al. 2011). V našej práci je expresia miR-133 podľa výsledkov z čipovej analýzy mierne zvýšená u vzoriek ošetrovaných DOX aj IMB. Výsledky čipovej analýzy sú potvrdené výsledkami z qPCR. Výsledná expresia miR-133 u IMB vzoriek je však podľa qPCR oproti DOX vzorkám veľmi variabilná. Táto variabilita môže byť dôvodom prečo výsledky čipovej analýzy nie sú štatisticky významné. Holmgren et al. vo svojej štúdií zaznamenali zmenu v expresii miR-146 po ovplyvnení ľudských kardiomyocytov DOX (Holmgren et al. 2016). Podobne Horie et al. vo svojej štúdií ukázali zvýšenie expresie miR-146 u potkaních kardiomyocytov ošetrovaných DOX (Horie et al. 2010). Bolo teda zaujímavé ju otestovať ako potenciálny biomarker kardiotoxicity IMB a DOX. V našich výsledkoch z qPCR nebola miR-146 zvýšená u vzoriek ovplyvnených IMB a ani u vzoriek ovplyvnených DOX. Tento fakt potvrdzuje výsledok z čipovej analýzy expresie miR-146, kde táto miRNA tiež nebola zvýšená. Zvýšenú expresiu miR-34a pozorovali u pacientov liečených DOX vo svojej štúdií Holmgren et al. (Holmgren et al. 2016). Podobne u myší, ktorým bol podávaný DOX sa priamo úmerne s dávkou zvyšovala aj expresia miR-34a. Zvýšenie tejto miRNA bolo zaznamenané skôr ako zvýšenie klasického markeru Troponínu. MiR-34a by teda mohla slúžiť ako včasný marker poškodenia srdca (Desai et al. 2014). Testovali sme ju aj v našich experimentoch. Z našich výsledkov získaných z qPCR je hladina miR-34a zvýšená u vzoriek ovplyvnených IMB a aj u vzoriek ovplyvnených DOX. Vo výsledkoch z čipovej analýzy však došlo k významnému zvýšeniu iba u vzoriek ovplyvnených DOX. Rigaud et al. vo svojej štúdií pozorovali zvýšenie hladiny cirkulujúcej miR-1 u pacientov liečených DOX (Rigaud et al. 2017). MiR-1 bola tiež zvýšená u pacientov s AMI (Long et

al. 2012). V tejto práci bola expresia miR-1 zvýšená u vzoriek plazmy ovplyvnených DOX aj IMB. Tento výsledok bol potvrdený aj analýzou expresie miRNA na čipe. Expresia miR-205 vyšla zvýšená iba u vzoriek plazmy ovplyvnených DOX. Tento výsledok je potvrdený aj vyšetrením plazmy na čipe. V srdcovom tkanive myši nastalo výrazné zníženie expresie iba u miR-205. Veľké smerodajné odchýlky u jednotlivých miRNA ukázali značnú variabilitu odpovedí jednotlivcov na IMB. K dosiahnutiu významnejších výsledkov by bolo dobré opakovať experiment s vyšším počtom myši.

V doplnkovom stanovení Troponínov T a I izolovaných zo srdcového tkaniva myši ovplyvnených IMB nedošlo k zmene ich množstva oproti kontrolným vzorkám. To znamená, že účinkom IMB nedochádza ku pozorovateľnej remodelácii srdca a takto stanovovaný marker teda nie je dôkazný pri určovaní poškodenia srdca IMB.

Cirkulujúce miRNA nachádzajúce sa v krvi sú stabilné v širokom rozpätí pH, sú odolné voči varu a opakovanému zmrazovaniu. Stabilita miRNA je daná ich väzbou na proteíny. Ich prítomnosť v krvi umožňuje jednoduchý neinvazívny odber vzorky na vyšetrenie. Zo vzoriek plazmy sa pomocou známych metód od izolácie až po kvantifikáciu miRNA pomocou qPCR môže ľahko vyšetriť ich prítomnosť a množstvo v krvi pacienta. Ukázalo sa, že nárast ich hladiny v plazme, napríklad po poškodení myokardu, je rýchlejší ako nárast klasických biomarkerov Troponínov. Vďaka týmto vlastnostiam spĺňajú predpoklady pre vhodné prognostické a diagnostické biomarkery poškodenia srdca, nádorov alebo iných chorôb (Min a Chan 2015). Použitie miRNA ako biomarkerov rôznych chorôb má však svoje obmedzenia. Pre ich plnohodnotné využitie v diagnostike bude potrebné vykonať ďalšie podrobné štúdie na veľkom počte pacientov. Ďalším úskalím je nešpecifita niektorých miRNA pre dané ochorenie. Príkladom môžu byť napríklad miR-1, miR-122, miR-126, miR-223, ktoré sa vyskytujú aj u leukémií a nádorov. Zdrojom variability výsledku stanovenia miRNA z telesných tekutín môže byť aj spôsob extrakcie a kvantifikácie. Stanovenie je tiež komplikované faktom, že miRNA sa v krvi vyskytujú nielen voľne, ale aj viazané na proteíny a lipoproteíny alebo sú vnútri exozómov a mikrovezikúl. Všetky tieto komplikácie môžu viesť k rôznym výsledkom (Moldovan et al. 2014).

## 9. ZÁVER

V našom experimente sme pozorovali zmeny expresie vybraných miRNA, ktoré sú špecifické pre srdcové tkanivo a sú vhodnými kandidátmi na biomarkery, slúžiace na včasné odhalenie poškodenia srdca. Liečivá DOX a IMB používané pri liečbe nádorov môžu spôsobovať poškodenie srdca a preto je dôležité včas odhaliť ich škodlivé pôsobenie na srdce daného jedinca a tak zabrániť väčšiemu poškodeniu.

Metódou qPCR sa zmerala zmena expresie vybraných miRNA. V plazme myší, ktorým bol podávaný DOX bola zvýšená expresia miR-1, miR-133, miR-34a a najvýraznejšie miR-205. V plazme myší, ktorým bol podávaný IMB bola zvýšená miR-34a, miR-1 a miR-499a, ale tieto výsledky neboli, na rozdiel od DOX, významné kvôli veľkým odchýlkám v odpovedi jednotlivých jedincov. Študovali sme tiež zmenu expresie miR-367 a miR-208, ale hladiny týchto miRNA boli pod detekčnou medzou. V srdci myší ovplyvnených IMB došlo k výraznému zníženiu expresie miR-205.

Veľkokapacitné stanovenie miRNA odhalilo zvýšenie expresie miR-1, miR-133a a miR-133b u vzoriek plazmy ovplyvnených DOX aj IMB oproti vzorkám kontrolným. Naopak zníženie expresie bolo u miR-6236, miR-339, miR-6240, miR-6946 u oboch typov vzoriek oproti vzorkám kontrolným.

Koncentrácia Troponínu T vo vzorkách plazmy ovplyvnených IMB bola zvýšená, avšak kvôli veľkej smerodajnej odchýlke nebola zvýšená štatisticky významne. Vo vzorkách srdcového tkaniva nedošlo k zvýšeniu Troponínu T ani Troponínu I.

## 10. POUŽITÉ SKRATKY

skratka	význam skratky	slovenský význam
5-FU	<i>5-Fluorouracil</i>	5-Fluorouracil
AA	<i>Acrylamide</i>	Akrylamid
AF	<i>Atrial fibrillation</i>	Fibrilácia predsiení
AMI	<i>Acute myocardial infarction</i>	Akútny infarkt myokardu
APS	<i>Ammonium Persulfate</i>	Persulfát amonný
ATP	<i>Adenosin triphosphate</i>	Adenosín trifosfát
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>	Bicinchonínová kyselina
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>	Mozgový natriuretický peptid
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	Hovädzí sérový albumín
CAD	<i>Coronary artery disease</i>	Ischemická choroba srdca
cDNA	<i>Complementary DNA</i>	Komplementárna DNA
CML	<i>Chronic myeloid leukemia</i>	Chronická myeloidná leukémia
Ct	<i>Threshold cycle</i>	Prahový cyklus
CYP	<i>Cytochrome P450</i>	Cytochróm P450
DCM	<i>Dilated cardiomyopathy</i>	Dilatačná kardiomyopatia
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>	Dietylpyrokarbonát
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Deoxyribonukleová kyselina
DNAza I	<i>Deoxyribonuclease I</i>	Deoxyribonukleáza I
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>	Deoxynukleotid trifosfát
DOX	<i>Doxorubicin</i>	Doxorubicín
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	Ditiotreitól

<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Etyléndiamíntetraoctová kyselina
<b>EETs</b>	<i>Epoxyeicosatrienoic acids</i>	Epoxyeikosatriénové kyseliny
<b>EGFR</b>	<i>Epithelial growth factor receptor</i>	Receptor pre epitelový rastový faktor
<b>EGTA</b>	<i>Ethyleneglycoltetraacetic acid</i>	Etylénglykoltetraoctová kyselina
<b>eIF-2</b>	<i>Eucaryotic initiation factor-2</i>	Eukaryotický iniciačný faktor-2
<b>HCM</b>	<i>Hypertrophic cardiomyopathy</i>	Hypertrofická kardiomyopatia
<b>HER 2</b>	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>	Receptor pre ľudský epidermálny rastový faktor 2
<b>IMB</b>	<i>Imatinib</i>	Imatinib
<b>miRNA</b>	<i>MicroRNA</i>	MikroRNA
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i>	Mediátorová RNA
<b>NP</b>	<i>Natriuretic peptide</i>	Natriuretický peptid
<b>NTC</b>	<i>No template control</i>	Beztemplátová kontrola
<b>PDGFR</b>	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>	Receptor pre rastový faktor doštičiek
<b>PERK</b>	<i>PRKR-like endoplasmic reticulum kinase</i>	PRKR-podobná kináza endoplazmatického retikula
<b>Pre-miRNA</b>	<i>Precursor miRNA</i>	Prekurzorová miRNA
<b>Pri-miRNA</b>	<i>Primary miRNA</i>	Primárna miRNA
<b>PRKR</b>	<i>Protein kinase R</i>	Proteín kináza R
<b>PTK</b>	<i>Protein tyrosine kinase</i>	Proteín tyrozín kináza
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia

<b>RISC</b>	<i>RNA induced silencing complex</i>	Komplex tlmiači transláciu mRNA pomocou miRNA
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>	Ribonukleová kyselina
<b>RT</b>	<i>Reverse transcriptase</i>	Reverzná transkriptáza
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>	Dodecylsulfát sodný
<b>TBST</b>	<i>Tris buffered saline with Tween-20</i>	Tris pufrovaný fyziologický roztok s Tween-20
<b>TEMED</b>	<i>Tetramethylethylenediamine</i>	Tetrametyletyléndiamín
<b>TIM</b>	<i>Translocase of the inner membrane</i>	Translokáza vnútornej membrány mitochondrií
<b>TKI</b>	<i>Tyrosine kinase inhibitors</i>	Tyrozín kinázové inhibítory
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>	Receptor pre rastový faktor endotelu

## 11. POUŽITÁ LITERATÚRA

Abushouk AI, Ismail A, Salem AMA, Afifi AM, Abdel-Daim MM (2017) Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 90: 935-946

Adamcová M, Šimůnek T, Kaiserová H, Popelová O, Štěrbá M, Potáčková A, Vávrová J, Maláková J, Geršl V (2007) *In vitro* and *in vivo* examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. *Toxicology* 237 (1-3): 218-228

Alter P, Herzum M, Soufi M, Schaefer JR, Maisch B (2006) Cardiotoxicity of 5-Fluorouracil. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 4 (1): 1-5

Arnold WR, Das A (2018) An Emerging Pathway of Doxorubicin Cardiotoxicity Mediated through CYP2J2. *Biochemistry* 57 (16): 2294-2296

Barca-Mayo O, Lu QR (2012) Fine-tuning oligodendrocyte development by microRNAs. *Frontiers in Neuroscience* 6 (13): 1-7

Beránek M, Cerman J, Holečková M, Hyšpler R, Kocna P, Malířová E, Špírková J, Tichý M, Vávrová J, Živná H, Živný P (2013) *Vybrané kapitoly z klinické biochemie*. 1.vyd. Karolinum Praha 129-132 ISBN: 978-80-246-2186-9

Cross MJ, Berridge BR, Clements PJM, Cove-Smith L, Force TL, Hoffmann P, Holbrook M, Lyon AR, Mellor HR, Norris AA, Pirmohamed M, Tugwood JD, Sidaway JE, Park BK (2015) Physiological, pharmacological and toxicological considerations of drug-induced structural cardiac injury. *British Journal of Pharmacology* 172 (4): 957-974

Desai VG, Kwekel JC, Vijay V, Moland CL, Herman EH, Lee T, Han T, Lewis SM, Davis KJ, Muskhelishvili L, Kerr S, Fuscoe JC (2014) Early biomarkers of doxorubicin-induced heart injury in a mouse model. *Toxicology and Applied Pharmacology* 281 (2): 221-229

Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M (2008) Biochemical Markers for Prediction of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Systematic Review of the Literature and Recommendations for Use. *American Journal of Clinical Pathology* 130 (5): 688-695

ElZarrad MK, Mukhopadhyay P, Mohan N, Hao E, Dokmanovic M, Hirsch DS, Shen Y, Pacher P, Wu WJ (2013) Trastuzumab Alters the Expression of Genes Essential for Cardiac Function and Induces Ultrastructural Changes of Cardiomyocytes in Mice. *PLOS ONE* 8 (11): e79543

Ewer MS, Lippmann SM (2005) Type II Chemotherapy-Related Cardiac Dysfunction: Time to Recognize a New Entity. *Journal of Clinical Oncology* 23 (13): 2900-2902

da Silva AMG, de Araújo JNG, de Freitas RCC, Silbiger VN (2017) Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers of Atrial Fibrillation. *BioMed Research International* 2017: 7804763

Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O (2012) Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *European Journal of Heart Failure* 14 (2): 147-154

Grieve DJ, Davidson SM (2017) New insights into cardiotoxicity caused by chemotherapeutic agents. *British Journal of Pharmacology* 174 (21): 3675-3676

Holmgren G, Synnergren J, Andersson CX, Lindahl A, Sartipy P (2016) MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology in Vitro* 34: 26-34

Horie T, Ono K, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Kuwabara Y, Nakashima Y, Takanabe-Mori R, Nishi E, Hasegawa K, Kita T, Kimura T (2010) Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway. *Cardiovascular research* 87 (4): 656-664

Chambers TP, Santiesteban L, Gomez D, Chambers JW (2017) Sab mediates mitochondrial dysfunction involved in imatinib mesylate-induced cardiotoxicity. *Toxicology* 382: 24-35



Iqbal N, Iqbal N (2014) Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemotherapy Research and Practice* 2014: 357027

Iram H, Iram F, Husain A (2016) A Review on Imatinib: A wonder drug in Oncology. *Advances in Biomedicine and Pharmacy* 3 (4): 227-244

Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q, Wang YS (2018) Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer* 17 (1): 36

Jung EJ, Santarpia L, Kim J, Esteva FJ, Moretti E, Buzdar AU, Leo AD, Le XF, Bast RC, Park ST, Puztai L, Calin GA (2012) Plasma MicroRNA 210 Levels Correlate With Sensitivity to Trastuzumab and Tumor Presence in Breast Cancer Patients. *Cancer* 118 (10): 2603-2614

Kerkelä R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T (2006) Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nature Medicine* 12 (8): 908-916

Kreth S, Hübner M, Hinske LC (2018) MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine. *Anesthesia & Analgesia* 126 (2): 670-681

Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura T (2011) Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients With Cardiovascular Disease Indicate Myocardial Damage. *Circulation. Cardiovascular genetics* 4 (4): 446-454

Lenihan DJ, Kowey PR (2013) Overview and Management of Cardiac Adverse Events Associated With Tyrosine Kinase Inhibitors. *The Oncologist* 18 (8): 900-908

Li M, Zhang J (2015) Circulating MicroRNAs: Potential and Emerging Biomarkers for Diagnosis of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases. *BioMed Research International* 2015: 730535

Liu N, Olson EN (2010) MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development. *Developmental Cell* 18 (4): 510-525

Long G, Wang F, Duan Q, Chen F, Yang S, Gong W, Wang Y, Chen Ch, Wang DW (2012) Human Circulating MicroRNA-1 and MicroRNA-126 as Potential Novel Indicators for Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Biological Sciences* 8 (6): 811-818

Malik R, Mushtaque RS, Siddiqui UA, Younus A, Aziz MA, Humayun Ch, Mansoor K, Latif MA, Waheed S, Assad S, Khan I, Bukhari SM, DelCampo D, Adus A, Gannarapu S (2017) Association Between Coronary Artery Disease and MicroRNA: Literature Review and Clinical Perspective. *Cureus* 9 (4): e1188

Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, Fabbro D, Fendrich G, Furet P, Meyer T, Zimmermann J (2002) Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *European Journal of Cancer* 38 (5): 19-27

Marcucci G, Perrotti D, Caligiuri MA (2003) Understanding the Molecular Basis of Imatinib Mesylate Therapy in Chronic Myelogenous Leukemia and the Related Mechanisms of Resistance. *Clinical Cancer Research* 9 (4): 1248-1252

Marslin G, Revina AM, Khandelwal VKM, Balakumar K, Prakash J, Franklin G, Sheeba CJ (2015) Delivery as nanoparticles reduces imatinib mesylate-induced cardiotoxicity and improves anticancer activity. *International Journal of Nanomedicine* 10 (1): 3163-3170

Min PK, Chan SY (2015) The Biology of Circulating MicroRNAs in Cardiovascular Diseases. *European Journal of Clinical Investigation* 45 (8): 860-874

Mladěnka P, Applová L, Patočka J, Costa VM, Remiao F, Pourová J, Mladěnka A, Karlíčková J, Jahodář L, Vopršalová M, Varner KJ, Štěrba M (2018) Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents. *Medicinal Research Reviews* 38 (4): 1332-1403

Mohan N, Jiang J, Dokmanovic M, Wu WJ (2018) Trastuzumab-mediated cardiotoxicity: current understanding challenges, and frontiers. *Antibody Therapeutics* 1 (1): 13-17

Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M (2014) Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18 (3): 371-390

Mughal TI, Schrieber A (2010) Principal long-term adverse effects of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Biologics: Targets & Therapy* 4: 315-323

Novák J, Kružliak P, Bienertová-Vašků J, Slabý O, Novák M (2014) MicroRNA-206: a Promising Theranostic Marker. *Theranostics* 4 (2): 119-133

Rawal S, Manning P, Katare R (2014) Cardiovascular microRNAs: as modulators and diagnostic biomarkers of diabetic heart disease. *Cardiovascular Diabetology* 13: 44

Rigaud VOC, Ferreira LRP, Ayub-Ferreira SM, Ávila MS, Brandão SMG, Cruz FD, Santos MHH, Cruz CBBV, Alves MSL, Issa VS, Guimarães GV, Cunha-Neto E, Bocchi EA (2017) Circulating miR-1 as a potential biomarker of doxorubicin induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Oncotarget* 8 (4): 6994-7002

Roncarati R, Anselmi CV, Losi MA, Papa L, Cavarretta E, Martins PDC, Contaldi C, Jotti GS, Franzone A, Galastri L, Latronico MVG, Imbriaco M, Esposito G, Windt LD, Betocchi S, Condorelli G (2014) Circulating miR-29a, Among Other Up-Regulated MicroRNAs, Is the Only Biomarker for Both Hypertrophy and Fibrosis in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 63 (9): 920-927

Sara JD, Kaur J, Khodadadi R, Rehman M, Lobo R, Chakrabarti S, Herrmann J, Lerman A, Grothey A (2018) 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review. *Therapeutic Advances in Medicinal Oncology* 10: 1-18

Small EM, Olson EN (2011) Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 469 (7330): 336-342

Thompson AE (2015) Atrial Fibrillation. *Journal of the American Medical Association* 313 (10): 1070

Vaitiekus D, Martines EK, Lingytė E, Dambrauskas L, Juozaitytė E (2017) Tyrosine kinase inhibitors induced cardiotoxicity. *Journal of Medical Sciences* 1: 1-10

Varga ZV, Ferdinandy P, Liaudet L, Pacher P (2015) Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 309 (9): 1453-1467

Vejpongsa P, Yeh ETH (2014) Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Challenges and Opportunities. *Journal of The American College of Cardiology* 64 (9): 938-945

Wang H, Chen F, Tong J, Li Y, Cai J, Wang Y, Li P, Hao Y, Tian W, Lv Y, Chong J, Yang J (2017) Circulating microRNAs as novel biomarkers for dilated cardiomyopathy. *Cardiology Journal* 24 (1): 65-73

Xu J, Zhao J, Evan G, Xiao Ch, Cheng Y, Xiao J (2012) Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. *Journal of Molecular Medicine* 90 (8): 865-875

Zhang L, Chen X, Su T, Li H, Huang Q, Wu D, Yang Ch, Han Z (2015) Circulating miR-499 are novel and sensitive biomarker of acute myocardial infarction. *Journal of Thoracic Disease* 7 (3): 303-308

Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, Cai L (2018) miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica* 39 (7): 1073-1084