

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
*Katedra farmakológie a toxikológie*



**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Porovnanie vplyvu bisfenolov na parentné a diferencované H9c2 bunky**

**Comparison of the effect of bisphenols on parental and differentiated H9c2 cells**

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

Konzultant: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

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

V Hradci Králové 2023

Barbora Macáková

## Podakovanie

V prvom rade ďakujem svojmu vedúcemu práce PharmDr. Eduardovi Jirkovskému, Ph.D. za odborné vedenie, spoluprácu, za cenné rady a pripomienky, za ochotu kedykoľvek pomôcť či už pri práci v laboratóriu alebo pri poskytnutí materiálov v priebehu vypracovania mojej diplomovej práce. Taktiež ďakujem mojej konzultantke PharmDr. Anne Jirkovskej, Ph.D. za poskytnuté odborné a cenné rady a Anne Gardianovej za pomoc v laboratóriu.

## ABSTRAKT

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakológie a toxikológie**

**Študentka:** Barbora Macáková

**Školiteľ:** PharmDr. Eduard Jirkovský, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Porovnanie vplyvu bisfenolov na parentné a diferencované H9c2 bunky

Bisfenoly je skupina látok vyskytujúca sa vo veľkej miere v produktoch a v životnom prostredí. Ich možná toxicita na ľudské zdravie je stále v procese študovania, pričom priamy účinok enviromentálne relevantných dávok nebol pozorovaný. Tieto endokrinné disruptory pôsobia na rôzne receptory v tele a taktiež nie je vylúčený vplyv na kardiovaskulárny systém. Najviac preskúmanou látkou je BPA, ktorý je postupne nahradzovaný svojimi analógmi, ktoré ale nie sú z veľkej časti tak preskúmané.

V tejto práci sme sa zamerali na vplyv bisfenolov BP, M a S na diferenciáciu H9c2 buniek, ako modelu, s možnými negatívnymi účinkami na vývoj srdca a jeho regenerácii po poškodení.

Bunková línia H9c2 majú nediferencovaný fenotyp ale môžu byť ľahko nasmerované k diferenciácii za určitých podmienok.

Skúmaný bol vplyv bisfenolov na diferencované bunky a zmeny v expresii vybraných markerov (GATA4, Hand2, Tnnt2, Myog) diferenciácie (transkripčných faktorov). Dané protokoly boli sledované 9 dní a líšili sa prídavkom fetálneho hovädzieho séra (1 % alebo 10 %), *all-trans* retinovej kyseliny (10 mmol/L) a vo výmenách médií.

Z pozorovaných výsledkov sa zistila toxicita na parentných bunkách, ktorá bola iba vo veľkých koncentráciách a naopak sa toxicita nepreukázala u BPS. Zo štyroch bisfenolov (BPBP, BPM, BPS, BPPH) boli vybrané len 3 látky netoxické, ktoré vykazovali netoxické vlastnosti aj na diferencované bunky. Vplyv bisfenolov na expresiu nebol jednotný a štatisticky významný voči kontrolným bunkám, avšak vzhľadom k variabilite dát sa ich účinok nedá úplne vylúčiť. Výsledky bude nutné následne overiť na úrovni proteínu a v súbore dát s menšou variabilitou.

## ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology & Toxicology**

**Student:** Barbora Macáková

**Supervisor:** PharmDr. Eduard Jirkovský, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Comparison of the effect of bisphenols on parental and differentiated H9c2 cells

Bisphenol is compound largely found in products and environment around us. Its toxicity and danger for human health is still being studied, meanwhile direct influence of environmentally relevant doses was not discovered. These endocrine disruptors are affecting various receptors in bodies and effect on cardiovascular system is not excluded either. The most extensively studied substance is BPA, which is gradually being replaced by its analogs, although these are not extensively researched to the same extent.

In this work we focused on influence of bisphenol BP, M and S on differentiation of H9c2 cells, serving as a model with potential negative effects on heart development and its regeneration after damage.

H9c2 cell line has an undifferentiated phenotype but can be easily directed towards differentiation under certain conditions

Research was focused on impact of bisphenol on differentiated cells and its changes in the expression of selected differentiation markers (GATA4, Hand2, Tnnt2, Myog) (transcription factors). Set protocols were observed and monitored for 9 days with addition of fetal bovine serum (1% to 10%), all-trans retinoic acid (10mmol/L) and media changes.

From observed results, toxicity was found in parent cells, but only at high concentrations, and conversely, no toxicity was demonstrated for BPS. Out of the four bisphenols (BPBP, BPM, BPS, BPPH), only three substances were selected as non-toxic, exhibiting non-toxic properties even on differentiated cells. The impact of bisphenols on expression was not uniform and not statistically significant compared to control cells; however, due to variability of gathered data, their effect cannot be completely ruled out. The results will need to be subsequently confirmed at the protein level and in a dataset with less variability.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1. BUNKOVÁ DIFERENCIÁCIA.....	10
2.2. BUNKOVÁ LÍNIA H9c2.....	11
2.2.1. Diferencované H9c2 bunky a jej diferenciačné markery .....	12
2.3. BISFENOLY.....	13
2.3.1. Farmakokinetika.....	14
2.3.2. Popísané vplyvy bisfenolov na organizmus.....	15
2.3.2.1. Bisfenol A a vplyv na pohlavný systém .....	15
2.3.2.2. Bisfenol A a vplyv na tyroidný systém.....	16
2.3.2.3. Bisfenol A a vplyv na kardiovaskulárny systém .....	17
2.3.3. Analógy BPA.....	17
3. HYPOTÉZA A CIEĽ DIPLOMOVEJ PRÁCE .....	19
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	20
4.1. CHEMIKÁLIE A PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE.....	20
4.2. PRACOVNÉ POSTUPY.....	21
4.2.1. Pasážovanie a kultivácia.....	21
4.2.2. Počítanie buniek.....	22
4.2.3. Príprava buniek na experimenty.....	22
4.3. PRÍPRAVA EXPERIMENTÁLNYCH VZORIEK PRE STANOVENIE CYTOTOXICITY .....	23
4.3.1. Stanovenie viability MTT testom.....	24
4.4. STANOVENIE GÉNOVEJ EXPRESIE.....	24
4.4.1. Príprava experimentálnych vzoriek pre stanovenie génovej expresie.....	24
4.4.2. Stanovenie génovej expresie .....	25
4.4.2.1. Izolácia RNA .....	25
4.4.2.2. Zmeranie koncentrácie a absorbanie na Nanodrop.....	26
4.4.2.3. Reverzná transkripcia RNA .....	26
4.4.2.4. Génová amplifikácia cDNA.....	27
4.5. ŠTATISTICKÁ ANALÝZA DÁT.....	29
5. VÝSLEDKY.....	30

5.1. HODNOTENIE CYTOTOXICITY ŠTUDOVANÝCH LÁTOK NA NEDIFERENCOVANÝCH H9c2 BUNKÁCH.....	30
5.2. HODNOTENIE VPLYVU KONTINUÁLNEJ EXPOZÍCIE BISFENOLOV NA VIABILITU DIFERENCOVANÝCH H9c2 BUNKÁCH.....	33
5.3. HODNOTENIE VPLYVU KONTINUÁLNEJ EXPOZÍCIE ŠTUDOVANÝCH LÁTOK NA EXPRESIU MARKEROV DIFERENCIÁCIE H9c2 BUNIEK .....	35
6. DISKUSIA .....	40
7. ZÁVER .....	43
8. ZDROJE.....	44

## Prehľad zavedených skratiek

HEPES	(4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazin- N'-(2-etansulfonová kyselina))
PBS	Fosfátový pufrovaný fyziologický roztok
RT-PCR	Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (Real-Time PCR)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
BCP	1-bróm-3-chlórpropán
Cdk	Cyklín-dependentná kináza
API	Nuclease-free water
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
RB1	Retinoblastom 1
SERCA2	Endoplazmatického retikula Ca <sup>2+</sup> ATPáza 2
SR	Sarkoplazmatické retikulum
ATRA	<i>all-trans</i> kyselina retinová
PCOS	Syndróm polycystických ovárií
EDC	Endocrine disrupting chemicals
SFM	Bezsérové médium
DMSO	Dimethylsulfoxid



# 1. Úvod

Bisfenoly sú organické zlúčeniny používané pre výrobu v rôznych plastových produktoch pre každodenné použitie. Stopové množstvo uvoľnené postupnou degradáciou či nezreagované zbytky bisfenolov z výrobných procesov sa vyluhovávajú do potravín, nápojov a životného prostredia, kde ako látky pôsobiace ako endokrinné disruptory ovplyvňujú fyziologické aj patologické procesy v organizmoch (Dias P et al. 2022).

Najviac preskúmaný je bisfenol A. Vlastnosti endokrinných disruptorov vyplývajú z podobnosti chemickej štruktúry s estrogénom, pretože disponuje fenolickými skupinami podobnými tým v štruktúre estradiolu (Bahelka I et al. 2021). BPA sa síce kvôli svojej obávanej toxicite nahradilo jeho analógmi, ale ich bezpečnosť resp. toxicita nie je stále dostatočne preštudovaná.. Pozornosť sa upriamuje aj na možnú kardiovaskulárnu toxicitu (Dias P et al. 2022). Je možné, že náchylnosť srdcovej bunky na bisfenoly môže byť ovplyvnená stavom diferenciácie či jej ovplyvnením, ktoré môže viesť k zmene expresie špecifických génov, transkripčných faktorov. Z publikovaných štúdií je známy vplyv bisfenolov na zmeny expresie markerov (napr. v tejto štúdii študovaných *Tnnt2*, *Gata4* a *Hand2*) pred a v priebehu diferenciácie (Escarda-Castro E 2021). Vplyv bisfenolov na diferenciáciu je možné študovať v rôznych modeloch s rôznou relevanciou. V tejto práci sme použili bunkovú líniu H9c2 izolovanú z buniek potkanieho neonatálneho srdca, ktorá sa často používa ako alternatíva kardiomyocytov, vhodnou na štúdium kardiotoxických látok (Witek P. et al. 2016).

## 2. Teoretická časť

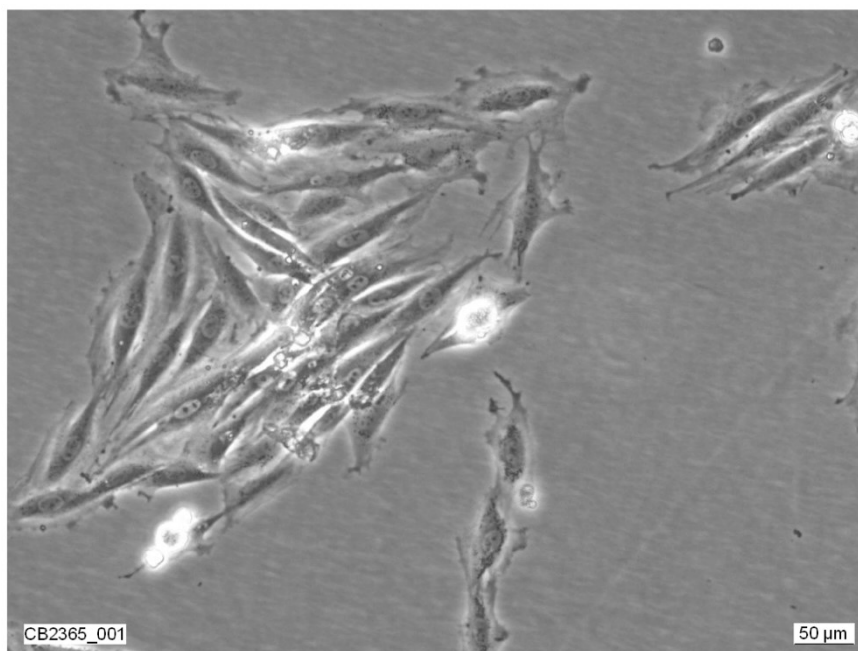
### 2.1. Bunková diferenciácia

Diferenciácia je proces, kedy sa z nešpecializovaných prekursorových buniek môžu stať špecializované (Ng IC et al. 2019). Tento dej spadá pod špecifické procesy po výstupe bunky z bunkového cyklu. Špecifickými procesmi sa chápe kviescencia, diferenciácia, senescencia a apoptóza. Kviescencia, alebo taktiež stav klúdu, je stav reverzibilného zastavenia proliferácie, v ktorom sa bunky aktívne nedelia a aj napriek tomu si zachovávajú schopnosť znova vstúpiť do bunkového cyklu. Klúdové bunky sa aktívne nemnožia a zastavia svoj postup do bunkového cyklu v G0 fázy. Či bunka vstúpi do G0 fázy alebo pokračuje cez G1, je regulované kľúčovými faktormi, vrátane cyklínov a cyklín-dependentných kináz (CDK), inhibítorov CDK a proteínov retinoblastomu (Marescal O et al. 2020). Komplexy Cyklín-CDK riadia progresiu bunkového cyklu prostredníctvom fosforylácie proteínov zapojených do každej z fázy bunkového cyklu. CDK sú serín/threonín kinázy, ktorých aktivita závisí na regulačnej podjednotke – špecifickému proteínu z rodiny cyklínov (Malumbres M 2014). Komplexy cyklínu D-CDK4/6 a cyklínu E-CDK2 podporujú progresiu G1 fázy. Významné sú inhibítory CDK, ktoré sú potrebné pre včasné opustenie bunkového cyklu behom diferenciácie a pre udržanie zástavy bunkového cyklu v diferencovaných bunkách. Napríklad protein p21 obmedzuje vstup do klúdového stavu, pretože tieto bunky nie sú schopné dosiahnuť dostatočne nízkej úrovne aktivity CDK2. Ďalej protein p27 je schopný identifikovať a izolovať populáciu klúdových buniek a efektívne vizualizovať prechod z G0 fázy na G1. Hlavným „hráčom“ pri rozhodovaní o proliferáciu a klúdu je protein retinoblastom 1 (RB1), ktorý inhibuje proliferáciu väzbou a inaktiváciou transkripčného faktora E2F1, a tým zabrániť E2F1 zacieliť génové produkty potrebné pre prechod bunky cez G1 do S fázy bunkového cyklu. U retinoblastomu mutáciou RB1 dochádza k dysfunkcii alebo absencii RB proteínu. Nastáva konštantná aktivita E2F a kontinuálna stimulácia bunkového cyklu, čo má za následok tvorbu nádoru. Pri strese a nadmernej proliferácii mení hyperfosforylácia terciárnu štruktúru RB, uvoľňuje E2F a vedie k apoptóze. (Malumbres M 2014, Mendoza PR 2015, Oki T et al. 2014).

## 2.2. Bunková línia H9c2

H9c2 bunková línia (obrázok 1) izolovaná z ventrikulárneho tkaniva potkana je subklonálna línia pôvodnej klonálnej bunkovej línie odvodenej z embryonálneho srdcového tkaniva potkana BD1X Kimes a Brandt (1976) (Witek P et al. 2016).

### Images of Cell Line: H9c2 (2-1)



**Obrázok 1:** Nediferencovaná bunecná línia H9c2 (2-1) [prevzaté z:

<https://www.culturecollections.org.uk/media/54436/88092904-h9c2-2-1-images.pdf>]

Subklon H9c2(2-1) má podobnosť s kostrovým svalstvom. Šíri sa ako unipotentná kmeňová bunka- myoblast, ktorá slúži ako alternatíva pre kardiomyocyty. Pri deliacom procese sú vzhľadovo veľké, ploché a vretenovité predĺžené bunky. Pri diferenciácii obsahujú jadrá 2-4 jadriok. Po dosiahnutí konfluentnosti sa zoskupujú v myotuby. Myotuby sa veľmi tesne prichytia na povrch kultivačnej fľašky a vzájomne spoja cytoplazmatickými mostíkmi. Je bežne používaná in vitro v rôznych štúdiách vzhľadom na veľa podobností s primárnymi kardiocyty vrátane morfológie membrán, expresie g-signalizačného proteínu a elektrofyziologických vlastností (Hescheler J et al. 1991, Watkins SJ et al. 2011).

H9c2 sú vhodným modelom pre skúmanie mechanizmov poškodenia myocytov a dôsledkov srdcových patológií vrátane študovania toxických látok na apoptózu a nekrózu srdcových myocytov a pre analýzu kardiotoxicity nových, hlavne protinádorových liečiv. (Witek P. et al. 2016).

### 2.2.1. Diferencované H9c2 bunky a jej diferenciačné markery

Na základe publikovaných štúdií je známe, že proces diferenciácie závisí na podmienkach kultivácie bunkovej línie. Vplyv má zníženie sérovej koncentrácie kultivačného média z 10% na 1%. Dochádza rýchlejšie k fúzii a zahrňuje viac než 95% myoblastov (Branco AF et al. 2015, Kimes B et al. 1976).

Ďalším aspektom je suplementácia kyseliny retinovej (ATRA), ktorá indukuje schopnosť diferenciácie na kardiomyocyty (Suhaeri M et al. 2015). Takto diferencované bunky sú dlhé rozvetvené mnohoadrové bunky (Pereira SL et al. 2011) V štúdiu Branco et al. sa zistilo, že znížením séra a pridaním RA viedla k transkripčnej up-regulácii génov zapojených do srdcovej diferenciácie. Bolo dokázané, že RA zvýšila expresiu génov kódujúcich srdcové sarkomerické proteíny, ako sú troponín T a troponín C, troponínu I alebo prenášače vápniku a mechanizmy vrátane endoplazmatického retikula  $Ca^{2+}$  ATPáza 2 (SERCA2), ryanodinového receptora a fosfolambanu (Branco AF et al. 2015). SERCA2 sprostredkováva spätné vychytávanie  $Ca^{2+}$  do sarkoplazmatického retikula (SR) a tým podporuje relaxáciu kardiomyocytov, zatiaľ čo ryanodinový receptor sprostredkováva uvoľňovanie  $Ca^{2+}$  zo sarkoplazmatického retikula a spúšťa kontrakciu. Výsledné zvýšenie intracelulárnej koncentrácie  $Ca^{2+}$  spôsobuje väzbu na troponín C a aktiváciu myofilamentu vedúceho ku kontrakcii (Carlson CR et al. 2022). Fosfolamban môže inhibovať aktivitu SERCA2, čím bráni vstupu  $Ca^{2+}$  do SR (Vafiadaki E 2009). Vylúčené nie je ani zúčastnenie hlavných regulátorov bunkového rastu PI3K, PDK1 a p-CREB na diferenciácii tejto bunkovej línie. V RA diferencovaných H9c2 bunkách boli taktiež rozšírené transkripty génov FasL a Bcl2L11, ktoré sú zapojené do signálnych dráh bunkovej smrti. Z tejto publikácie je jasné, že diferenciácia kardiomyoblastov úspešne smeruje k dospelejšiemu svalovému fenotypu za použitia RA. Dokazujú to aj zvýšené hladiny transkriptov myogenínu (Myog), ktorý reguluje fúziu myocytov behom vývoja a Myom2 s funkciou stabilizácie usporiadania proteínov v sarkomere. Zo štúdie je známe zvýšenie množstva napr. PGC1 $\alpha$  (inhibitor stresovej zápalovej signalizácie), UCP3 (chráni mitochondrie pred poškodením lipidmi), SERCA2, PI3K, p85 (reguluje bunkové reakcie ako je bunkové delenie a prežitie) a PDK1 a zníženie antioxidantného proteínu (GPx1) a Pink1. Pink1 je mitochondriálny proteín vonkajšej membrány, ktorý chráni bunky pred mitochondriálnou dysfunkciou vyvolanou stresom. Pokles tohto proteínu môže vysvetliť rozdiely týkajúce sa náchylnosti týchto buniek k bunkovej smrti. Vzhľadom na zvýšený oxidačný aparát a metabolizmus buniek H9c2, môže zníženie proteínu znamenať poškodenie

štruktúr, ktoré nemusia byť vratné. U celkovej laktátdehydrogenázy, hexokinázy II, pyruvátdehydrogenázy, GATA4, celkovej ERK, fosfor-ERK, PI3K triedy III, CREB, PTEN a aktínu neboli detekované žiadne rozdiely na stavu diferenciácie (Branco AF et al. 2015). Niektoré publikácie uvádzajú, že náchylnosť srdcovej bunky na toxické látky je ovplyvnená stavom diferenciácie.

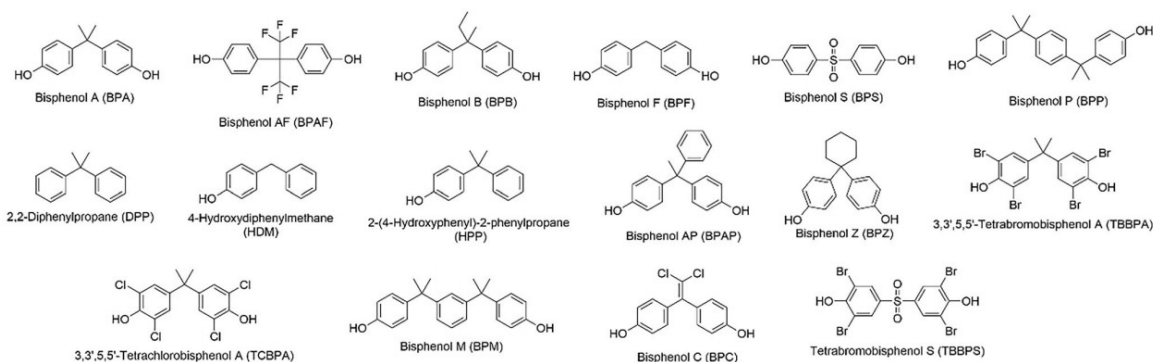
Medzi potenciálne toxické látky sa radia aj bisfenoly. V štúdiu Escarda-Castro a kol. bol zaznamenaný negatívny vplyv bisfenolov na diferenciáciu H9c2 buniek. V danej štúdiu pracujú s bunkami H9c2 ošetrovaných 10 a 30  $\mu\text{M}$  BPA a zistilo sa, že expresia dvoch transkripčných faktorov Hand2 a Gata4 bola významne znížená. Pokles expresie Hand2 súvisí s problémami so srdcovou šmyčkou a dysfunkciou u zebričiek. Downreguláciou Gata4 dochádza k narušeniu kardiovaskulárnej homeostázy. V priebehu diferenciácie voči kardiomyocytom bola expresia znížená a obnovená vystavením buniek BPA s RU486 (antagonista progesterínu). Expresia srdcového markeru Tnnt2, ktorý kóduje srdcový troponin T, bola v priebehu diferenciácie a pred ňou, potlačená oboma dávkami BPA. U Hand2 a Gata4 boli zmeny expresie nájdené len pred diferenciáciou, naopak u Myom2, Sln (regulátor aktivity SERCA v svaloch) a Atp2a1 bola oveľa viac ovplyvnená, keď sa BPA aplikovala posledné dva dni srdcovej diferenciácie. Tento fakt naznačuje zraniteľnosť voči BPA a závisí na dočasnej špecifickej expresii každého génu behom procesu diferenciácie. Morfológické zmeny sa prejavili v podobe straty tubulárneho tvaru buniek, dispozícii tubulárnych vlákien a podielu jadier na vlákno sa zvýšil. To viedlo k vytvoreniu veľkých syncytií, ktoré sú vhodnejšie pre bunky kostrového svalstva (Escarda-Castro E 2021).

### **2.3. Bisfenoly**

Bisfenoly je veľká skupina látok používaných v priemysle pri výrobe plastov a epoxidových živíc, na potahovanie potravinových aj nápojových povrchov plechoviek, spomalovače horenia, v dentálnych tesniacich hmotách, cigaretovej filtroch, termopapieroch a taktiež sú súčasťou kozmetiky. Detekované sú v životnom prostredí, potravinách, pitnej vode, odpadových vodách, v zvieracej či ľudskej krvi a vzorkách moču po celom svete (Dias P et al. 2022). Pôsobia ako endokrinné disruptory vďaka svojej schopnosti interferovať s hormonálnou homeostázou. V tele môžu reagovať s nukleárnymi, hormonálnymi receptormi, transkripčnými faktormi, iónovými kanálmi a narušiť intracelulárne signálne dráhy (Ramadan M et al. 2020). Viazu sa na androgénové, estrogénové, progesterónové, tyroidné a aryl hydrogénové receptory, ktoré sa spájajú s dýchacím, reprodukčným a nervovým systémom (Kim JJ et al. 2020).

Najviac preskúmaná je látka BPA, organicky syntetická zlúčenina, patriaca do skupiny difenylmetánových derivátov a bisfenolov. Vyvinutá bola ako syntetický estrogén v 90. rokoch 19. storočia, pričom v 30. rokoch 20. storočia bola popísaná ako látka s účinnosťou estrogénu pri stimulácii reprodukčného systému potkana (Barbagallo F et al. 2020). Svoje dominantné postavenie postupne stráca vzhľadom k obavám z možnej toxicity. Pôsobenie tohto typu látky je sprostredkované endokrinnými signálnymi cestami, ktoré pôsobia ako zosilovače, čo vedie k zmenám v bunkovej funkcii v závislosti na koncentrácii (Welshons WV et al. 2003) (Feiteiro J et al. 2018). Bisfenolové analógy (obrázok 2), ktoré nahrádzajú BPA sú známe ako „BPA-free“ alebo označované ako analógy bisfenolu novej generácie (NextGen). Najčastejšími používanými analógmi sú bisfenol S (BPS) a bisfenol F (BPF). Vďaka ich podobnosti v štruktúrach sa dajú využiť na rovnaké účely ako BPA avšak existuje nedostatok klinických aj experimentálnych štúdií overujúcich ich bezpečnosť (Dias P et al. 2022, Rochester JR et al. 2015).

72 P. DIAS ET AL.



**Obrázok 2:** Štruktúry bisfenolu A a jeho analógov

### 2.3.1. Farmakokinetika

Za normálnych podmienok použitia môžu degradovať a proces degradácie sa zvyšuje za podmienok vystavenia vyšších teplôt alebo mechanického namáhania (Ramadan M et al. 2020). Penetrujú do tela cez kožu, inhaláciou, tráviacim systémom. Parentný BPA sa rýchlo vstrebáva, a metabolizuje sa na glukuronid a čiastočne sulfát. Koncentrácie v sére voľného a konjugovaného BPA dosahujú maximum po 1 hodine. V systémovej cirkulácii je expozícia konjugovaného BPA 180krát vyššia než u voľného BPA. Hlavnou cestou eliminácie BPA je močom s takmer úplnou obnovou podanej dávky. U transdermálnej expozícii BPA, ktorá trvala 12 hodín, bola dlhšia systémová expozícia a vyšší pomer voľného BPA než konjugovaného. Aj napriek tomu, že 70% dávky BPA neprešlo kožnou bariérou, absorbované množstvo

sa postupne uvoľňovalo z vytvoreného depotu behom 6 dňovej štúdie. Celkový sérový BPA predstavoval len 2 % v porovnaní s orálnou expozíciou, ale množstvo konjugovaného BPA bolo 16krát vyššie než voľné BPA, čo viedlo k vyššej expozícii biologicky aktívnemu voľnému BPA, ktorý predstavoval 9 % celkový detekovaný BPA. Čo sa týka väzby na proteíny v plazme, BPA glukuronid sa zanedbateľne viaže narozdiel od voľného BPA, ktorý je vysoko viazaný. Farmakokinetické faktory BPS sú od BPA zcela odlišné. Rozdiel medzi BPA a BPS je, že sa zistila vyššia systémová expozícia voľného BPS. Hlavnou cestou eliminácie BPS bolo vylučovanie konjugovaného BPS močom ale len 2 % dávky boli vylúčené ako voľný BPS. U žien a mužov sa profily vylučovania líšili. U mužov bola priemerná exkrécia celkového BPS 92% a u žien len 70% (Dias P et al.).

### **2.3.2. Popísané vplyvy bisfenolov na organizmus**

V nasledujúcej kapitole sú uvedené niektoré popísané účinky bisfenolov na cicavčí organizmus. Najviac poznatkov bolo získaných pre bisfenol A, ktoré v tomto texte dominujú.

#### **2.3.2.1. Bisfenol A a vplyv na pohlavný systém**

Sertoliho bunky úzko spolupracujú s Leydigovými bunkami na produkcii androgénu, pričom Leydigove bunky sú hlavným miestom syntézy testosterónu (O'Donnell L et al. 2022). Prítomnosť steroidných receptorov v Sertoliho bunkách môže znamenať väzbu BPA na tieto receptory a narušiť ich funkciu. Štúdie ohľadom toxicity BPA sa zisťovali na dospelých aj neonatálnych potkanoch. U dospelých jedincov sa nezistil vplyv na spermatogézu. Môže to byť spôsobené rýchlejšou metabolizáciou BPA na svoju biologicky neaktívnu formu u dospelých jedincov, čo skracuje dobu vystavenia reprodukčných orgánov bisfenolom A. U neonatálnych potkanov malo BPA negatívny vplyv na Sertoliho bunky izolované z potkanov a na semenotvorný epitel, čo viedlo k zníženiu počtu spermií (Gao Y et al. 2015, Li MWM et al. 2009).

Štúdie sledujúce ženy so syndrómom polycystických ovárií (PCOS) preukázali značné rozdiely koncentrácie BPA v sére v porovnaní so zdravými ženami. Ženy trpiace na PCOS mali vyššie hladiny (Takeuchi T et al. 2002). Keďže androgény interferujú s clearance BPA v pečeni, vedie to k zvýšeniu hladín BPA v sére. BPA mení metabolizmus androgénov v pečeni, vytesňuje androgény a to vedie k zvýšeným hladinám bezsérových androgénov (Kandaraki E et al. 2011).

Nie je zcela jasné, či hladiny androgénov boli zvýšené kvôli príznakom PCOS alebo zvýšenou hladinou BPA.

Sledované boli aj súvislosti BPA s rakovinou prs. Predpokladá sa, že EDC (endocrine disrupting chemicals) prispievajú zvýšenému výskytu rakoviny prs. Kritickým obdobím je vývoj prs, kedy sú mliečne žľazy predisponované k atypickej proliferácii. Štúdie na potkanoch odhalili zvýšený výskyt nádorov mliečnej žľazy po podaní rôznych dávok BPA (0,25, 2,5, 25 a 250 ug/kg/deň v priebehu gestačného aj laktačného obdobia. Preneoplastické nálezy boli pozorované už v 50. deň. Väčšie riziko rakoviny prs je spojené s mutáciami génov BRCA1 a BRCA2. Dokázaná bola vyššia možnosť negatívnych účinkov BPA u žien vykazujúcich mutáciu BRCA1 a BRCA2 (Dumitrascu MC et al. 2020).

Taktiež sa porovnávali obe pohlavia. Pri pozorovaní mužov aj žien boli zistené odlišné hladiny BPA. U mužov boli koncentrácie BPA v sére podstatne vyššie než u žien. Mechanizmus spočíva buď v stimulácii produkcie testosterónu BPA alebo potlačenie metabolizmu BPA testosterónom. Ďalej bolo hlásené, že podávanie BPA znížila aktivitu uridindifosfát-glukuronosyltransferázy voči pohlavným hormónom a BPA v pečeni potkaních samcov ale nie samíc. Rozdiel medzi pohlaviami je pravdepodobne kvôli rozdielom v hladinách aktivity enzýmov súvisiacich s androgénmi (Caporossi L et al. 2015, Takeuchi T et al. 2002)

### **2.3.2.2. Bisfenol A a vplyv na tyroidný systém**

Štruktúra BPA je značne analógová k štruktúre trijodtyroninu. BPA sa viaže na tyroidné receptory konkrétne na beta izoformu a chová sa ako antagonista. Bolo zistené, že BPA inhibuje tyroidné receptory sprostredkujúce transkripciu odpovedajúcich génov T3. Domnienkou je, že mechanizmus účinku, ktorý poškodzuje tyroidnú funkciu, je antagonistický efekt na tyroidné receptory (Kim MJ et al. 2019)

Štúdie preukázali zhoršenie funkcie štítnej žľazy vyvolané zmenou hladín TSH v sére. Tento účinok môže byť spôsobený pôsobením BPA na hypofýzu cez estrogénové signálne dráhy alebo prechodným zvýšením produkcie T3 a T4. Narušenie funkcie štítnej žľazy však môže byť ovplyvnený viacerými faktormi ako sú napríklad vek, strava, metódy stanovenia tyroidných hormónov, príjmu jódu (Gorini F et al. 2020)



### 2.3.2.3. Bisfenol A a vplyv na kardiovaskulárny systém

Pri vytváraní srdcového akčného potenciálu a elektrického šírenia hrajú dôležitú rolu iónové kanály v hladkom svalstve ciev. Narušenie ich funkcie, expresie či funkcie môže urýchliť srdcovú arytmiu. V štúdií Wang et. al bolo dokázané, že BPA inhibuje prúd sodíkových kanálov v izolovaných neurónoch ganglií dorzálnych koreňov myši. Tieto účinky boli blokované inhibítormi proteinkinázy C a proteinkinázy A. Zdá sa, že BPA môže pôsobiť cestou závislou na proteinkináze (O'Reilly A O. et al. 2012, Ramadan M et al. 2020). BPA môže pravdepodobne pôsobiť aj na parametre oxidačného stresu, konkrétne NO. Zníženie jeho hladín sa dá považovať za hlavný mechanizmus rozvoja kardiovaskulárneho ochorenia (Feiteiro J et al. 2018). Dokázaná bola aj inhibícia prúdu vápnikových kanálov. Tie sú dôležité pre depolarizáciu nodálnych buniek, atrioventrikulárneho vedenia a fázy plateau srdcového akčného potenciálu. V štúdií Manelle Ramadan et. al sa zistilo, že zmeny s intracelulárnym vápnikom v kardiomyocytoch potkanov boli reverzibilné, čo naznačuje priamu interakciu s vápnikovými kanálmi alebo rýchlymi posttranslačnými modifikáciami proteínov manipulujúcich s vápnikom (Ramadan M et al. 2020).

### 2.3.3. Analógy BPA

Bisfenol S (4,4'-sulfonyldiphenol) a bisfenol F (4,4'-dihydroxydiphenylmethane) sú analógy bisfenolu A. Keďže sú štrukturálne a chemicky podobné BPA, očakávajú sa aj nepriaznivé účinky na endokrinný systém (Alharbi HF et al. 2022).

Z analógov BPA je najviac preštudovaný BPS. Taktiež sa veľmi často využíva ako náhrada BPA. Predpokladá sa menšia pravdepodobnosť výluhu monomérov do jedla a pitia. Je stabilnejší pri vystavení teplom a odolnejší voči žiareniu (Thoene M et al. 2020).

Štúdie vykonávané v Číne s BPS sústredené na diabetes preukázali vyššiu hodnotu BPS v moči u diabetikov než u nediabetikov. Miera detekcie bola 68,1% vs. 47,8%. U bisfenolu F bola naopak miera detekcie vyššia u nediabetikov. Predpokladá sa aj súvislosť BPS spájaná s rozvojom gestačného diabetu. Meranie hladín prebiehalo v priemere v 13. týždni. Hladiny plazmatickej glukózy nalačno a 1 h postprandiálnej glukózy boli zvýšené. Tieto výsledky boli spozorované u žien nesúce plod ženského pohlavia. Tento fakt poukazuje na vplyv fetálneho pohlavia. Narozdiel od BPS, BPF nevykázal súvislosť so zvýšením hladín glukózy (Alharbi HF et al. 2022). V súvislosti s tehotnými ženami boli nájdené množstvá BPS v pupočníkovom

a materskom sére, čo naznačuje vystavenie ľudského plodu bisfenolom S cez placentu (Zhang YF et al. 2020).

Skúmal sa aj účinok BPP a BPM na bunkách in vitro. Ako kontrola bola použitá BPA, možný známy faktor zapojený do hormonálne závislej progresie rakoviny prs. Zistený bol nevýznamný vplyv na proliferáciu 4T1 a MDA-MB-231 buniek, naopak však môžu významne zvýšiť motilitu týchto buniek. Skúmal sa EMT (epitelo-mezenchymálna tranzícia), ktorá hrá kľúčovú rolu v metastázovaní rakovinových buniek. Bunky strácajú adhéziu medzibunkovej a extracelulárnej matrix a získavajú fenotyp mezenchymálnych buniek, aby boli schopné migrovať a invázie. Zistilo sa, že BPP a BPM indukovali expresiu N-cadherinu, MMP-9, MMP-2 a Snail a tým podporujú inváziu TNBC (triple-negative breast cancer) prostredníctvom aktivácie EMT in vitro (Liu J et al. 2023).

Zdravotné účinky BPAF sú menej známe. V porovnaní s BPA alebo BPS bolo zistené zvýšenie oxidačného stresu v erytrocytoch u BPAF vo väčšej miere. Ukázalo sa aj, že BPAF je potenciálne, v porovnaní s BPA, silnejší endokrinný disruptor. Taktiež kompromituje reprodukčné zdravie myši v štúdiách in vitro aj in vivo (García-Recio E et al. 2023). V ďalšej štúdií sa preukázala stimulácia tvorby reaktívnych foriem kyslíka a zvýšenie intracelulárnych iónov vápnika, čo viedlo k poškodeniu DNA a podpore bunecnej proliferácie ľudských buniek rakoviny prs indukované BPF a BPAF (Catenza CJ et al. 2021).

Agentúra ECHA klasifikuje BPPF ako veľmi toxický pre vodné organizmy a známe je podráždenie očí a kože. Zistilo sa, že nevykazuje estrogénne účinky ale naopak antiestrogénne podobné tamoxifenu (k liečbe určitých foriem rakoviny prs) (Howard G. et al. 2018).

### 3. Hypotéza a cieľ diplomovej práce

Pracovná hypotéza tejto diplomovej práce je otázka, či kontinuálna expozícia vybranými bisfenolmi v netoxických koncentráciách bude mať vplyv na priebeh diferenciácie potkaních kardiomyblastov H9c2 a či sa zmení citlivosť buniek na pôsobenie bisfenolov. Potenciálny vplyv bisfenolov na proces diferenciácie by sa mal prejavíť zmenou v génovej expresii vybraných markerov (Hand2, GATA4, Myog, a Tnnt2) diferenciácie smerom k srdcovým alebo kostrovým svalovým bunkám.

Cieľom práce bolo:

- 1) porovnať cytotoxicitu bisfenolov BP, M, PH a S na parentnej nediferencovanej bunkovej línii potkaních kardiomyblastov H9c2 v časových intervaloch 24, 48 a 72 hodín.
- 2) porovnať cytotoxicitu bisfenolov BP, M a S na bunkách diferencovaných H9c2 v rôznych diferenciačných médiách a protokoloch po ich kontinuálnej expozícii v priebehu diferenciácie.
- 3) stanovenie génovej expresie markerov diferenciácie (Hand2, GATA4, Myog, a Tnnt2) v odpovedi na kontinuálnu expozíciu bisfenolov BP, M a S.

## 4. Experimentálna časť

### 4.1. Chemikálie a prístrojové vybavenie

V zátvorke je uvedený výrobca a katalógové číslo produktu.

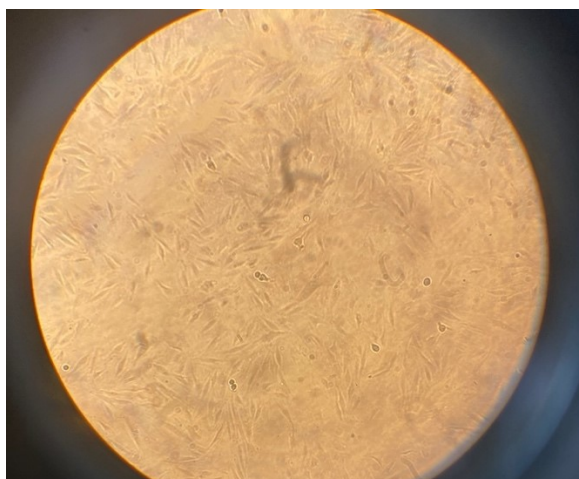
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bez pyruvátu (Sigma-Aldrich, kat. č.: D57960)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, kat. č.: F9665)
- StableCell Trypsin Solution (Trypsin/EDTA 10X) (Sigma-Aldrich, kat. č.: T2610)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich, kat. č.: P4417)
- Trypanová modrá (GE Healthcare, kat. č.: SV30084.01)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) (Sigma-Aldrich, kat. č.: M5655)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Fisher Chemicals, kat.č.: D4125/PB17)
- Etanol absolútny p.a. (Penta, kat. č.: 71250-11001)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, kat. č.: 563935)
- TRI Reagent (Sigma-Aldrich, kat. č.: T9424)
- Nuclease-free water (API) (Sigma-Aldrich, kat. č.: 3098)
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, kat. č.: 4374966)
- Gb SG PCR Master Mix (Generi biotech, kat. č.: 3005)
- Passive Reference Dye (Generi Biotech, kat. č.: 3010)
- Bunkový CO<sub>2</sub> inkubátor a laminárny box (ESCO)
- Invertovaný mikroskop (Optika, XDS-1R)
- Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific)
- T100 Thermal Cycler Bio-Rad (ThermoFisher Scientific)
- Quantstudio 6 (Applied biosystems)
- Chladená stolná centrifuga (Hermle)
- Vortex (ThermoFisher Scientific)
- Automatické pipety s rôznymi rozsahmi (Eppendorf)
- Automatické pipetory Accu-jet Pro (Brand)
- Bürkerova komôrka (Brand)

## 4.2. Pracovné postupy

### 4.2.1. Pasážovanie a kultivácia

Použitá bola nediferencovaná bunková línia H9c2 z potkaních srdcových kardiomyoblastov (obrázok 3). Bunky boli kultivované v médiu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-high glucose obsahujúce 10 % - tepelne inaktivovaného FBS, 1 % P/S (100x), 1 % HEPES (1M) pri teplote 37 °C v atmosfére s 5 % CO<sub>2</sub> a za konštantnej humidity.

Práca s bunkami podliehala štandardným aseptickým podmienkam a práci v jednorázových rukaviciach. Pri pasážovaní sa odsaje pôvodné médium a napipetuje 5 ml PBS pre stabilizovanie pH. Tento krok sa opakuje dvakrát. Po vysatí PBS sa do fľašky pridá silným prúdom 2 ml trypsin s EDTA (10x nariedený zásobný roztok) a následne sa 1,5 ml trypsin/EDTA vysaje. Kultivačná fľaša sa dá inkubovať pri teplote 37 °C na 5-10 minút pre dosiahnutie odstránenia adherentných buniek z povrchu kultivačnej fľaše. Po vybratí z inkubátora, je nutné sa mikroskopicky presvedčiť o odlepení a rozbití zhlukov buniek. Väčšinou sa pasážovalo dvakrát týždenne 1:3 alebo 1:4 podľa miery konfluentnosti buniek. Po pridaní čerstvého média sa steny omyjú pridaným médiom a vzniká suspenzia. Zo vzniknutej suspenzii sa nasadzuje na pokus.



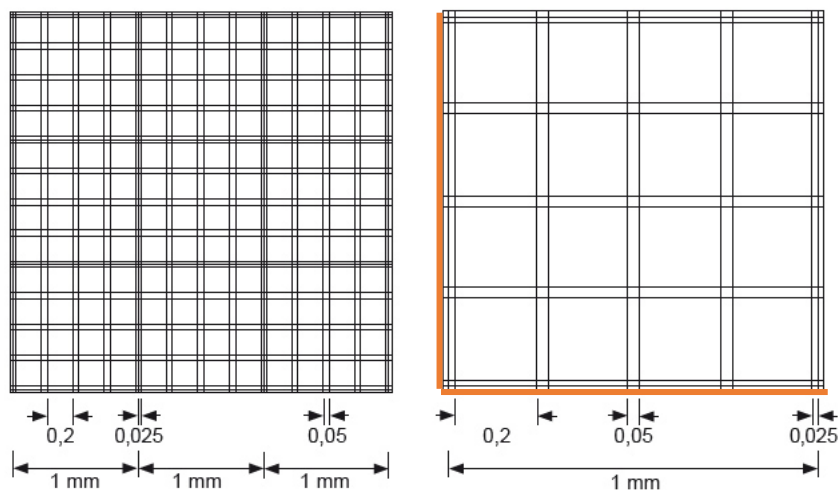
**Obrázok 3:** Reprezentatívna fotografia nediferencovanej bunkovej línie H9c2

#### 4.2.2. Počítanie buniek

Pre počítanie živých buniek bola použitá Bürkerova komôrka a farbenie buniek trypanovou modrou, ktorá je pre bunky toxická a do buniek sa dostáva pasívne po koncentračnom gradiente. Mŕtve alebo vážne poškodené bunky sa farbja modro, zatiaľ čo živé bunky ju odčerpávajú z cytosolu pomocou aktívneho transportu.

Odpipetujeme si 100  $\mu\text{l}$  resuspendovanej bunkovej suspenzie a preniesieme do mikroskúmvky. Pridá sa nesterilná trypanová modrá (0,4%) v pomere 1:1. Suspenzia sa nechá približne 5 minút inkubovať pri laboratórnej teplote a následne sa zvertexuje. Na Bürkerovu komôrku sa napipetuje 2x10  $\mu\text{l}$  dobre premiešanej suspenzie.

Bürkerova komôrka sa skladá z dvoch polovic. Každá polovica obsahuje 9 štvorcov oddelených trojitými čiarami. Počíta sa každá neofarbená bunka vo vnútri 10 štvorcov (rozmer jedného štvorca 1x1 mm odpovedajúci objemu 0,1  $\mu\text{l}$ ) podľa „L“ pravidla (obrázok 4). Počet buniek sa vynásobí dvoma (faktor riedenia trypanovou modrou) a 1000 (prepočítanie z  $\mu\text{l}$  na ml). Množstvo suspenzie, ktoré použijeme sa vypočíta pomocou rovnice  $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$



**Obrázok 4:** Schéma Bürkerovej komôrky s vyznačením „L“ pravidla [prevzaté z <https://www.marienfeld-superior.com/counting-grids.html>]

#### 4.2.3. Príprava buniek na experimenty

Bunky použité na experimenty boli medzi pasážami P21 až P28. Pre pokusy bola používaná suspenzia o rovnakej koncentrácii buniek 100 000 buniek/ml pripravená

v kultivačnom médiu – DMEM+ 10 % FBS. Na 96 jamkovú doštičku používanú pre stanovenie cytotoxicity bolo do každej jamky napipetovaných 100  $\mu$ l danej suspenzie, teda 10 000 buniek na jamku. Pre stanovenie génovej expresie boli bunky nasadené na 12 jamkovú doštičku v množstve 0,5 ml/jamku, teda 50 000 buniek na jamku.

Bunky boli potom inkubované 24 hodín v kultivačnom médiu, potom bolo médium vymenené za expozičné bezsérové médium (SFM, z anglického *serum free medium*) na ďalších 24 hodín, aby bunky prestali proliferovať a synchronizovali sa.

### 4.3. Príprava experimentálnych vzoriek pre stanovenie cytotoxicity

Pokusy pre stanovenie cytotoxicity testovaných bisfenolov boli prevedené s diferencovanými aj nediferencovanými bunkami H9c2 na 96 jamkovej mikrotitračnej doštičke. Študovaný bol aj vplyv kontinuálnej expozície bisfenolov behom procesu diferenciácie na ich výslednú cytotoxicitu. Experimenty boli prevedené minimálne v technickom triplikáte a výsledky boli hodnotené z troch nezávislých opakovaní experimentov.

Pre prvotný toxicitný screening bisfenolov BP, PH, M, S boli použité nediferencované bunky so širokým koncentračným rozmedzím (0,1 mM až 10 nM) a expozíciou 24, 48 alebo 72 hodín, ktorá bola zahájená 48 hodín od nasadení (viz vyššie). Zásobné roztoky o koncentráciách 100 mM ( $1 \cdot 10^{-1}$  M), 10 mM ( $1 \cdot 10^{-2}$  M), 1 mM ( $1 \cdot 10^{-3}$  M), 100  $\mu$ M ( $1 \cdot 10^{-4}$  M), 10  $\mu$ M ( $1 \cdot 10^{-5}$  M) boli pripravené v sterilnom DMSO a uchovávané pri -20 °C. Tesne pred začiatkom každého experimentu boli pripravené 1000x nariadené čerstvé pracovné roztoky testovaných látok zo zásobných roztokov pridaním 1  $\mu$ l zásobného roztoku do 1 ml SFM. Cieľové koncentrácie látok boli 100  $\mu$ M ( $1 \cdot 10^{-4}$  M), 10  $\mu$ M ( $1 \cdot 10^{-5}$  M), 1  $\mu$ M ( $1 \cdot 10^{-6}$  M), 1 nM ( $1 \cdot 10^{-7}$  M) a 10 nM ( $1 \cdot 10^{-8}$  M). Kontrolné bunky boli inkubované v SFM s pridaným sterilným DMSO, 1  $\mu$ L na 1 ml SFM (tj. finálna koncentrácia 0,1 %). Cytotoxicita (respektívne viabilita) bola stanovená pomocou MTT testu (viz ďalej).

Pre následné finálne experimenty boli vybrané len látky bisfenol BP, M a S v cieľových koncentráciách 1  $\mu$ M, 100 nM a 10 nM (tj.  $1 \cdot 10^{-6}$  M,  $1 \cdot 10^{-7}$  M,  $1 \cdot 10^{-8}$  M) a časový interval 24 hodín. Experimenty boli prevedené na nediferencovaných a z nich diferencovaných bunkách z rovnakej kultivácie. Nediferencované bunky slúžili ako kontrola a boli inkubované podľa schématu uvedeného pre prvotný toxicitný screening, expozícia bisfenolmi bola 24 hodín. Diferencované bunky boli diferencované pomocou 4 rôznych diferenciačných médií a za použitia 2 diferenciačných protokolov. Použité diferenciačné médiá

boli DMEM +1 % FBS, DMEM +1 % FBS s ATRA, DMEM+ 10 % FBS, DMEM+10 % FBS s ATRA. Diferenciácia bola zahájená 24 hodín po nasadení buniek na kultivačné doštičky, kedy bolo SFM vymenené za vyššie uvedené diferenciačné médiá, ktoré už obsahovala testované látky. Diferenciácia trvala 9 dní, kedy bolo médium buď menené každý deň alebo bolo po celú dobu diferenciácie nechané bez výmeny. U oboch prípadov bola ako kontrola použitá DMSO vo finálnej koncentrácii 0,1 %.

#### **4.3.1. Stanovenie viability MTT testom**

Farbivo MTT, chemicky 3-(4,5-dimetyltiazol)-2,5-difenylnitrazoliumbromid, je nažltlá soľ používaná pre testy na životaschopnosť a proliferáciu buniek. MTT z média prestupuje do buniek, kde sa pôsobením oxidoredukčných enzýmov v metabolicky aktívnych bunkách premení na farebný a nerozpustný fialový formazan (Benov L. 2021). Pod mikroskopom sa dá priebeh reakcie detekovať prítomnosťou kryštálov vo vnútri buniek.

Pre pokusy sa MTT pripravoval v koncentrácii 3 g/ml rozpúšťadla nesterilného PBS. Na doštičky sa pipetoval v množstve 25 µl/jamku. Doštičky sa nechali inkubovať 3 hodiny pri 37 °C, teda MTT bolo pridané k prebiehajúcejmu pokusu 3 hodiny pred jeho koncom. Pre zrealizovanie spektrofotometrického merania bolo nutné z doštičky po inkubácii dostatočne odsáť médium s MTT a napipetovať DMSO pre rozpustenie kryštálov formazanu (Benov L. 2021).

Vyhodnotenie cytotoxicity prebehlo na spektrofotometri (Hidex Sense) pri vlnovej dĺžke 570 nm.

### **4.4. Stanovenie génovej expresie**

#### **4.4.1. Príprava experimentálnych vzoriek pre stanovenie génovej expresie**

Na základe výsledkov predchádzajúcej diplomovej práce Anny Gardianovej bolo pre stanovenie génovej expresie vybraných markerov proliferácie použité len médium s 10 % FBS s prídavkom ATRA, ktoré bolo menené každý deň. Látky použité na stanovenie génovej expresie boli bisfenoly BP, M a S v koncentrácii 1 µM, 100 a 10 nM. Ako kontrola bola použitá DMSO vo finálnej koncentrácii 0,1 %.



Pokus sa vykonával na diferencovaných bunkách na 12 jamkovej doštičke, kedy sa médium s látkami menili za čerstvé každý deň od druhého dňa od nasadenia, alebo sa médium s látkami pridalo druhý deň po nasadení a už sa nemenilo. V oboch prípadoch bol pokus ukončený deviaty deň odsatím média, jamky sa omyli nesterilným PBS a napipetovalo sa 200  $\mu$ l TRI Reagent® pre lýzu buniek. Niekoľkokrát sa jamky spláchli prítomným TRI Reagent® pre zmytie prisadnutých buniek. Lyzáty boli z každej jamky prepipetované do samostatných 1,5 ml mikroskúmaviek.

#### **4.4.2. Stanovení génové expresie**

Zmeny v génovej expresii spočívajú v niekoľkých krokoch. Prvým krokom je izolácia RNA a jej zmeranie čistoty a koncentrácie. V následnej fázy vyizolovaná RNA slúži ako templát pre reverznú transkriptázu a tvorbu cDNA. Vzniknutá cDNA následne slúži ako templát pre samotné PCR. Princípom je riadená denaturácia dvojvláknového reťazca za rozpadnutia vodíkových mostíkov medzi vláknami. Na takto vzniknuté jednovláknové molekuly DNA môžu nasadnúť v ďalšom kroku primery. Následne dochádza k hybridizácii jednovláknových reťazcov DNA tzv. *annealing*. V tomto kroku je umožnené nasadenie primerov na špecifické miesta DNA. Posledným krokom je elongácia, pri ktorej dochádza k syntéze nového vlákna komplementárneho s templátovým.

##### **4.4.2.1. Izolace RNA**

Izolácia RNA bola prevedená klasickou fázovou separáciou za použitia TRIreagentu podľa postupu výrobcu. Miesto chloroformu bola použitá látka 1-bromo-3-chloropropan. Ku každému vzorku sa pridá BCP v množstve 10% z množstva použitého TRI Reagentu pri spratávaní (v tomto prípade to bolo 20  $\mu$ l) a 15 sekúnd zvisle pretrepávať v rukách a nechať 2 minúty inkubovať pri pokojovej teplote. Vzorky sa dajú centrifugovať na 15 min pri 4 °C a otáčkach 13 000 x g. Vzniknú dve fázy. Hornú vodnú fázu odsajeme a presunieme do novej mikroskúmavky. Do vodnej fázy sa pridal isopropanol v množstve 50% z pôvodne pridaného množstva TRIreagentu. V tomto prípade bolo pridaných 100  $\mu$ l isopropanolu. Po pridaní isopropanolu treba zvortexovať, nechať 10 min inkubovať pri pokojovej teplote a následne dať centrifugovať na 10 min pri 4 °C na 13 000 x g.

Po vybratí by mala byť na dne mikroskúmavky viditeľná peleta. Keďže bolo pre izoláciu RNA použité relatívne málo buniek, nemusí byť vždy viditeľná. Ak nie je, aj tak

sa postupuje ďalej v krokoch. Supernatant sa s opatnosťou na peletu dôkladne vysaje. Pridá sa 0,5 ml 75% etanolu na premytie pelety a dá sa centrifugovať na 5 min pri otáčkách 7 500 x g pri 4 °C. Následne sa vysaje etanol a peleta sa nechá osušiť na 2-3 min. K pelete sa napipetuje 15 µl nuclease-free vody (API) pre jej rozpustenie.

#### 4.4.2.2. Zmeranie koncentrácie a absorbancie na Nanodrop

Po rozpustení pelety sa meria čistota a absorbanca vzoriek. Ideálna RNA koncentrácia pre reverznú transkripciu je viac než 100 ng/µl. Absorbancia sa merala pri vlnovej dĺžke 230, 260 a 280 nm. Pri pomere A260/280 by mala byť hodnota 1,9-2,1 (ak hodnota vyjde pod 1,7, znamená to kontamináciu s DNA). Pri pomere A260/230 by mala byť hodnota 2,0-2,2. Tieto pomery reflektujú čistotu RNA.

Kontaminácia sa ukázala iba pri pomere A260/230, avšak iba v malom množstve vzoriek bola hodnota pod 1,5. Vzhľadom k malému množstvu materiálu neboli tieto vzorky prečistené. Z priebehu PCR reakcie však bolo patrné že, táto kontaminácia nijak neovplyvnila PCR reakcie.

#### 4.4.2.3. Reverzná transkripcia RNA

RNA koncentrácia pre reverznú transkripciu (RT) bola 200 µl, z ktorej sa vypočítal objem RNA podľa vzorca:

$$objemRNA [\mu l] = \frac{10 * 100 [ng/\mu l]}{množstvoRNA [ng/\mu l]}$$

Objem RNA sa riedil s API, pričom množstvo API bolo vypočítané podľa vzorca:

$$objem API [\mu l] = 10 - objemRNA [\mu l]$$

Množstvo RNA aj API sa pipetovalo do PCR stripov umiestnených na chladiacich stojanoch. Následne sa pripravil mastemix pre 83 vzoriek a do stripov sa pipetovalo 10 µl (tabuľka 1). Finálny objem reakcie tak činil 20 µl.

**Tabuľka 1:** Rozpis zložiek MasterMixu

	Množstvo pre 1 reakciu [ $\mu$ l]
Nuclease-free water (API)	3,2
10X RT Buffer	2
10X RT Random Primers	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
Multiscribe Reverse Transcriptase	1
Rnase Inhibitor	1

PCR stripy boli umiestnené do T100 Thermal Cycler Bio-Rad nastaveného podľa daného teplotného profilu: 10 min 25 °C, 120 min 37 °C, 5 min 85 °C a následné ochladenie na 5 °C do vypnutia.

Po reverznej transkripcie sa následne vzorky riedili API na koncentráciu 15 ng/ $\mu$ l cDNA a celkové množstvo cDNA vloženéj do PCR reakcie činila 30 ng.

#### 4.4.2.4. Génová amplifikácia cDNA

Ďalší nutný krok bola príprava kalibračného roztoku pre zistenie efektivity primerov. Pripravil sa odobratím 2  $\mu$ l z každej vzorky do voľnej mikroskúmavky v novom stripe. Následne bola pripravená koncentračná rada s riediacim faktorom 10. Riedilo sa nasledovne (tabuľka 2):

**Tabuľka 2:** Rozpis riedenia kalibračných roztokov

		Riedenie	cDNA	MQ
neriedený	K1	1,0000		0
	K2	0,1000	10 ul „K1“	90
	K3	0,0100	10ul „K2“	90
	K4	0,0010	10 ul „K3“	90
	K5	0,0001	10 ul „K4“	90
	K6	0,0000	10 ul „K5“	90

Kalibračný roztok sa pipetoval pre každý jeden primer zvlášť (7 primerov) k testovaným vzorkom na 384 jamkovú PCR doštičku v množstve 2  $\mu$ l/jamku v triplicate.

Z každej vzorky sa napipetovalo do 384 jamkovej PCR doštičky 2  $\mu$ l/jamku v triplikáte. Do každej jamky, sa napipetovali 3  $\mu$ l master mix (tabuľka 3), ktorý bol pripravený pre každý primer k danému génu zvlášť (forward a reverse primer):

**Tabuľka 3:** Zložky pre prípravu Master Mixu pre každý primer zvlášť

Passive reference dye 30 nm -12 $\mu$ l/1 ml MM	0,012	
Master Mix pre 200 nM konc. primerov v reakcii	Zásobný ( $\mu$ M)	Objem ( $\mu$ l) 1 reakcie
Forward primer	1x	0,10
Reverse primer	1x	0,10
gb SG PCR Master Mix (2x)	2x	2,50
Passive Reference Dye (ROX)	100%	0,04
Nuclease free water (API)		0,26

Na experimenty sa použili gény HPRT1, GAPDH, Hand2, GATA4, Tnnt2 a Myog. Sekvencia použitých primerov a ich efektivita je uvedená v tabuľke 4:

**Tabuľka 4:** Sekvencia použitých primerov

názov	sekvencia (5'-3')	Efektivita %
HPRT1	r-HPRT1-F	105,5
	r-HPRT1-R	
GAPDH	r-GAPDH-F	103
	r-GAPDH-R	
GATA4	r-GATA4-F	108,1
	r-GATA4-R	
Hand2	r-Hand2-F	95
	r-Hand2-R	
Myog	r-Myog-F	111,9
	r-Myog-R	
Tnnt2	r-Tnnt2-F	108,7
	r-Tnnt2-R	

Takto napipetovaná doštička sa zcentrifugovala a prelepila ochrannou fóliou pre zamedzenie možného odparenia vzoriek. Doštička sa uložila do QuantStudio6 (Applied Biosystems) za podmienok (tabuľka 5):

**Tabuľka 5:** Podmienky pre RT-PCR

	teplota	dĺžka	počet cyklov
počiatočná denaturácia	95°C	3 min	1
denaturácia	95°C	30s	
annealing	60°C	40s	40
extenzia	72°C	50s	

Relatívna génová expresia bola následne hodnotená metódou  $\Delta\Delta$ -ct (Pfafflova metoda) na geometrický priemer expresie „housekeepingových“ génov HPRT1 a GAPDH. Výsledky sú z priemeru technického triplikátu získaného z 3-4 nezávislých opakovaní inkubácie.

#### 4.5. Štatistická analýza dát

Pre spracovanie raw dát zo stanovovania bunkovej cytotoxicity a gébovej expresie bol použitý program Microsoft Excel. Pre následnú štatistickú analýzu a grafické spracovanie bol použitý program GraphPad Prism v9.5.1 (GraphPad Software). Hodnota štatistickej významnosti bola v celej štúdii stanovená na  $p > 0,05$ .

Pre hodnotenie cytotoxicity študovaných látok v čase na nediferencovaných bunkách bol zvolený štatistický test dvojcestná ANOVA porovnávajúca expozíciu danými látkami s expozičnými časmi, s následným *post-hoc* Holm-Šidák testom pre viacnásobné porovnanie. Rovnaký štatistický model bol použitý pre hodnotenie vplyvu každodennej výmeny diferenciačného média na toxicitu látok, a zmeny v expresii študovaných markerov diferenciácie. Pre hodnotenie cytotoxicity bola vypočítaná hodnota parametru  $IC_{50}$  len u experimentov, kde bol zaznamenaný pokles viability pod 50 %. Pre výpočet bola použitá funkcia nelineárnej regresie a štvorparametrový model.

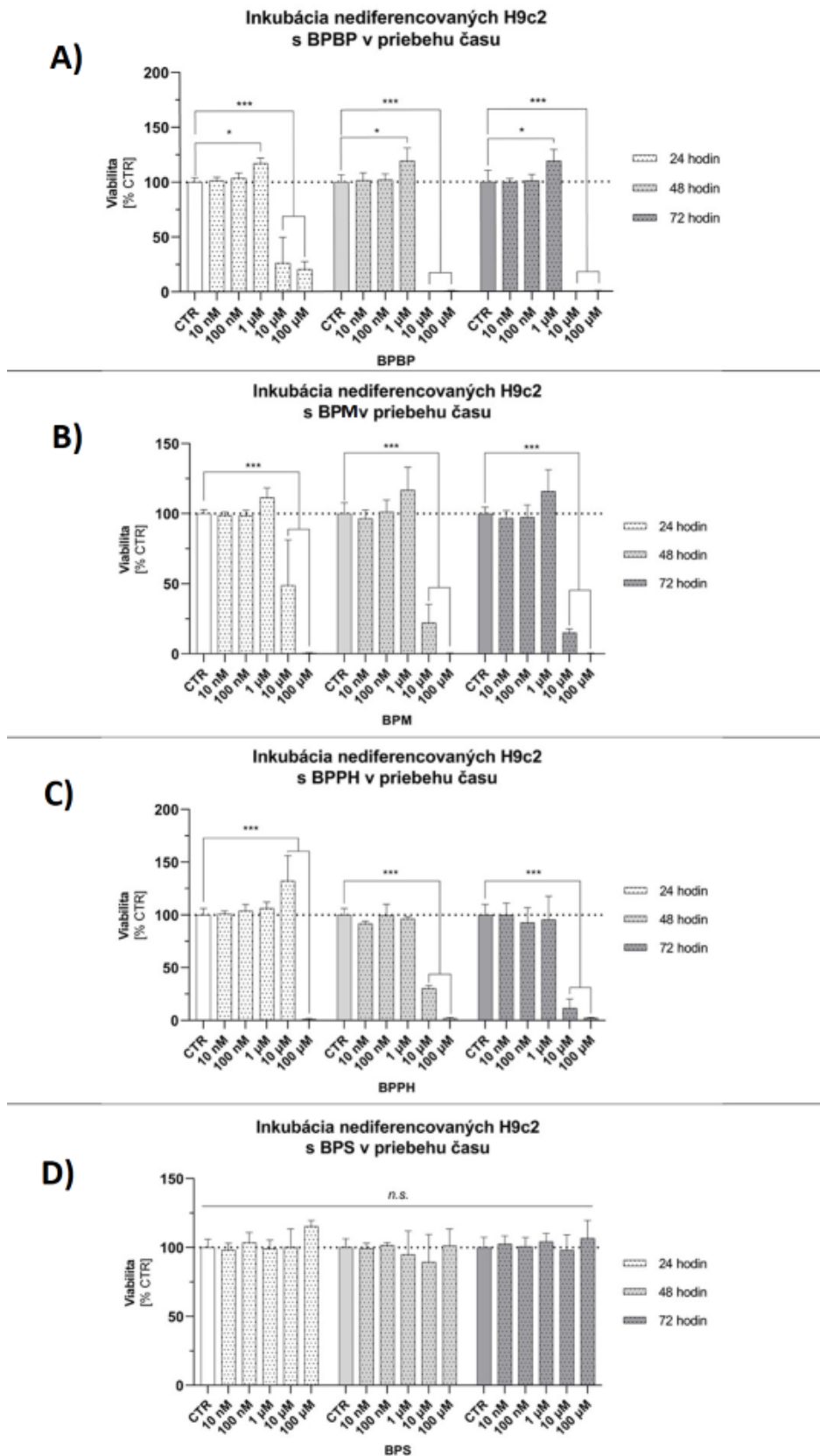
Pre hodnotenie rozdielov v expresii daných markerov medzi kontrolnými diferencovanými a nediferencovanými bunkami bola použitá jednocestná ANOVA s Holm-Šidák *post-hoc* testom. Dáta v grafoch sú prezentované ako priemer skupiny so štandardnou odchýlkou. Prezentované dáta sú z 3-4 nezávislých opakovaní.

## 5. Výsledky

### 5.1. Hodnotenie cytotoxicity študovaných látok na nediferencovaných H9c2 bunkách

V prvotnej časti projektu bola hodnotená cytotoxicita bisfenolov BP, M, PH a S v rôznych koncentráciách na nediferencovaných H9c2 bunkách po 24, 48 a 72 hodinovej expozícii. Cieľom bolo vybrať tri látky a tri netoxické koncentrácie, u ktorých bude následne hodnotený vplyv na priebeh diferenciácie H9c2 buniek.

Na obrázku 5 je prezentovaný vplyv testovaných bisfenolov na viabilitu parentných H9c2 buniek v čase. Z grafov je patrné, že sledované bisfenoly BP, M a PH (obrázok 5 A až C) navodzujú v koncentráciách vyšších ako 10  $\mu\text{M}$  pokles viability o viac ako 70 % v porovnaní s kontrolnými bunkami (exponovanými DMSO,  $p < 0,001$ ), a to vo všetkých študovaných časových intervaloch. Pokles viability sa s rastúcou dobou expozície zvyšuje až na takmer 100 %. Výnimkou bol bisfenol PH, ktorý v koncentrácii 10  $\mu\text{M}$  po 24 hodinovej expozícii signifikantne zvýšil o zhruba 32 % viabilitu nad kontrolnú úroveň ( $p < 0,001$ ); avšak v ostatných časových intervaloch bol už v tejto koncentrácii zaznamenaný pokles viability o viac než 70 % ( $p < 0,001$ ). Oproti ostatným látkam, bisfenol S bol vo všetkých koncentráciách netoxický. Zaujímavým výsledkom je fakt, že u všetkých látok okrem bisfenolu PH bol v koncentrácii 1  $\mu\text{M}$  zaznamenaný trend k miernemu nárastu viability o zhruba 10-20 %, ktorý bol štatisticky významný len u látky bisfenol BP.



**Obr. 5.** Vplyv inkubácie parentných H9c2 s testovanými látkami: **A)** bisfenol BP, **B)** bisfenol M, **C)** bisfenol PH a **D)** bisfenol S. 24 hodinová expozícia, viabilita hodnotená pomocou MTT testu. CTR - DMSO vo finálnej koncentrácii 0,1 % ako kontrolná skupina. Prezentované dáta sú z 3-4 nezávislých opakovaní. Štatistická

signifikancia (dvojcenná ANOVA s Holm-Šidák *post-hoc* testom): \*  $p > 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$ , \*\*\*  $p > 0,001$  a n.s. nesignifikantné.

V tabuľke 6 sú uvedené pre jednotlivé testované látky a časové intervaly hodnoty parametru  $IC_{50}$  odhadujúce koncentráciu látky navodzujúcu 50% pokles viability, spolu s hodnotou spoľahlivosti  $R^2$ . Hodnoty  $IC_{50}$  sa pohybujú v jednotkách  $\mu M$  s výnimkou pre bisfenol S, ktorý bol netoxický a hodnotu  $IC_{50}$  nešlo vypočítať. Okrem bisfenolu PH, je u bisfenolu BP a M vyjadrená dobre dávková závislosť. Pre ďalšie experimenty bolo v pláne použiť netoxické koncentrácie bisfenolov, preto sa ďalej pracovalo s bisfenolmi BP, M a S.

**Tabuľka 6:** Hodnoty  $IC_{50}$  a  $R^2$  pre jednotlivé testované látky a časové intervaly.

		<i>24 hod</i>	<i>48 hod</i>	<i>72 hod</i>
<b>Bisfenol BP</b>	$IC_{50}$	8,067 $\mu M$	6,784 $\mu M$	6,912 $\mu M$
	$R^2$	0,8859	0,9714	0,9502
<b>Bisfenol M</b>	$IC_{50}$	9,900 $\mu M$	9,237 $\mu M$	8,198 $\mu M$
	$R^2$	0,9143	0,9439	0,9339
<b>Bisfenol PH</b>	$IC_{50}$	0,691 $\mu M$	7,140 $\mu M$	4,509 $\mu M$
	$R^2$	0,8584	0,9758	0,9259
<b>Bisfenol S</b>	$IC_{50}$	n.d.	n.d.	n.d.
	$R^2$			

V tabuľke 7 sú uvedené hodnoty štatistickej významnosti ( $p$ ) vypočítané zmiešaným modelom dvojcennej analýzy rozptylu, ktoré hodnotí vplyv doby expozície a koncentrácie použitého bisfenolu na výslednú viabilitu parentných H9c2 buniek. Z dát je vidieť, že najväčší vplyv mala koncentrácia použitého bisfenolu BP, M, PH.

**Tabuľka 7:** Hodnoty štatistickej významnosti vplyvu jednotlivých faktorov na viabilitu nediferencovaných H9c2 buniek

	<i>Vplyv doby expozície</i>	<i>Vplyv koncentrácie látky</i>	<i>Interakcie medzi faktormi</i>
<b>Bisfenol BP</b>	0,0027 **	< 0,0001 ***	0,0138 *
<b>Bisfenol M</b>	0,2448	< 0,0001 ***	0,1788
<b>Bisfenol PH</b>	< 0,0001 ***	< 0,0001 ***	< 0,0001 ***
<b>Bisfenol S</b>	0,1715	0,1037	0,8325



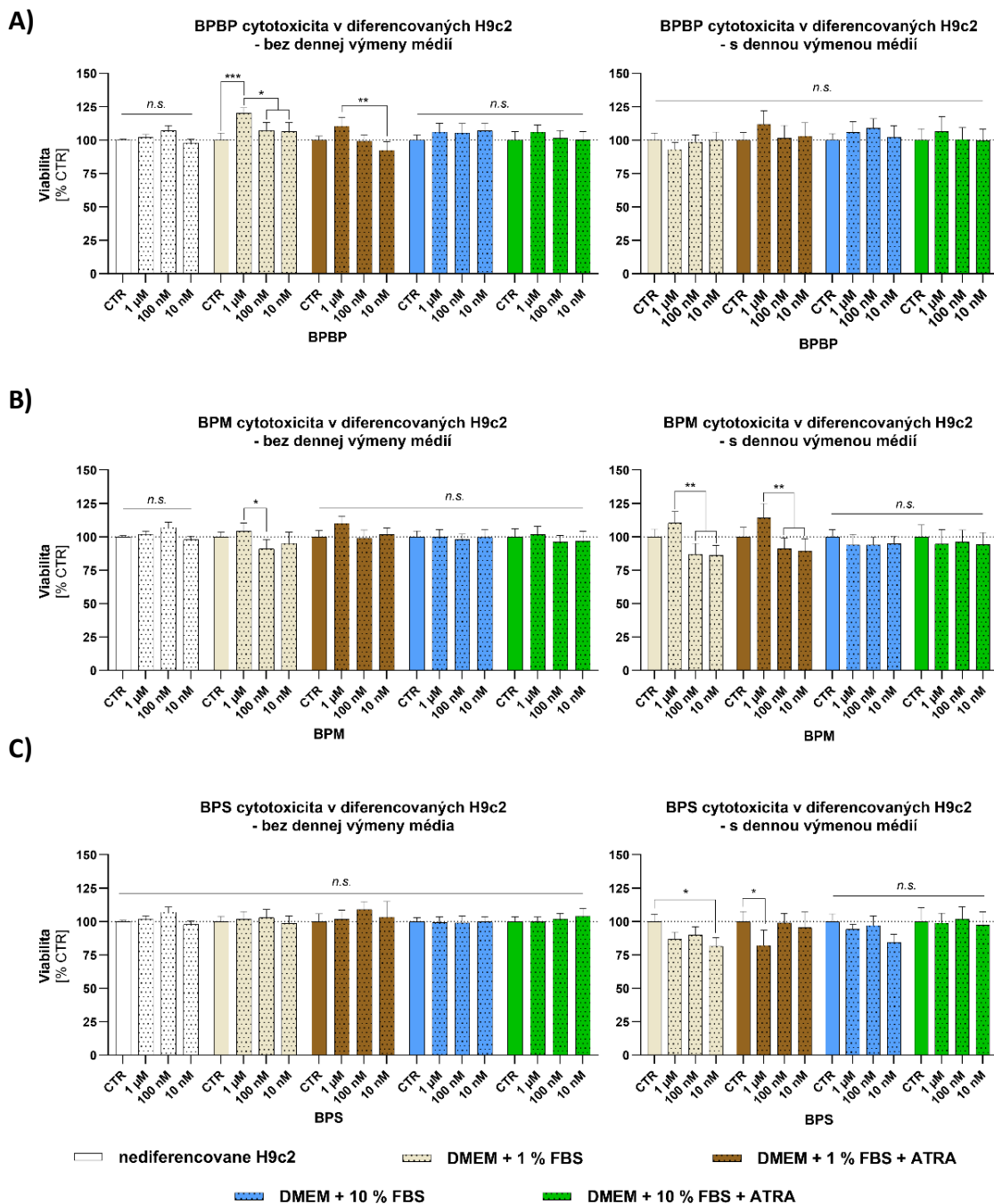
## 5.2. Hodnotenie vplyvu kontinuálnej expozície bisfenolov na viabilitu diferencovaných H9c2 bunkách

V nasledujúcej časti experimentu bol sledovaný vplyv vybraných bisfenolov BP, M a S na viabilitu diferencovaných H9c2 buniek. Sledovaný bol vplyv štyroch rôznych diferenciačných médií a dvoch diferenciačných protokolov použitých behom experimentu. Pre porovnanie bola hodnotená aj viabilita na parentných nediferencovaných bunkách z rovnakej pasáže, ktoré boli inkubované v SFM a exponované bisfenolmi 24 hodín. Viabilita bola hodnotená pomocou MTT testu u diferencovaných buniek desiaty deň od nasadenia na doštičky, a tretí deň od nasadenia u kontrolných parentných buniek.

Na obrázku 6 A-C sú prezentované viability parentných a diferencovaných buniek rôznymi médiami a protokolmi po kontinuálnej expozícii študovanými bisfenolmi. Ako je vidieť, žiadna testovaná koncentrácia bisfenolov nemala významný toxický vplyv na viabilitu či už parentných, tak aj diferencovaných buniek. Najvýznamnejší pokles viability bol na úroveň zhruba 80 % hodnôt buniek vystavených samotnému DMSO (rozpúšťadlo bisfenolov). Naopak bolo pozorované aj zvýšenie viability pri niektorých kombináciách, najviac o 20 % u bisfenolu BP v najvyššej testovanej koncentrácii 1  $\mu$ M v médiu s 1 % FBS (obrázok 6A), menej potom u bisfenolu M (nárast o zhruba 10 %, obrázok 6B).

Pri hodnotení vplyvu použitého protokolu (každodennej výmeny diferenciačného média) je patrné, že väčší vplyv na viabilitu má každodenná výmena, čo je zrejmé aj z hodnôt štatistickej významnosti jednotlivých faktorov dvojrozmernej analýzy rozptylu (tabuľka 8). Bez každodennej výmeny média nebola pozorovaná toxicita u žiadnej testovanej koncentrácie bisfenolov, zatiaľ čo pri každodennej výmene a expozícii čerstvými bisfenolmi bol pozorovaný negatívny vplyv aj u bisfenolu S, ktorý bol zcela netoxický (obrázok 6C).

Ďalším sledovaným faktorom na viabilitu bolo použité diferenciačné médium. Z obrázku 6 je patrné, že médiá s 10 % FBS s a bez ATRA nemali žiadny štatisticky významný vplyv na viabilitu, zatiaľ čo sérová deprivácia na 1 % FBS už u niektorých látok vplyv mala. Bohužiaľ bez zjavného vplyvu látky a média (tj., že rovnaká látka nemala vždy podobný účinok).



**Obrázok 6.** Vplyv kontinuálnej expozície H9c2 testovanými látkami a použitého diferenciálneho protokolu na ich diferenciáciu: **A)** bisfenol BP, **B)** bisfenol M, **C)** bisfenol S. CTR - DMSO vo finálnej koncentrácii 0,1 % ako kontrolná skupina. Viabilita hodnotená MTT testom u diferencovaných buniek desiaty deň od nasadenia, tretí deň u parentných po 24 hodinovej expozícii. Prezentačné dáta sú z 3-4 nezávislých opakovaní. Štatistická signifikancia (dvojcetrná ANOVA s Holm-Šidák *post-hoc* testom): \*  $p > 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$ , \*\*\*  $p > 0,001$  a *n.s.* nesignifikantné.

**Tabuľka 8:** Hodnoty štatistickej významnosti vplyvu jednotlivých faktorov diferenciácie na viabilitu diferencovaných H9c2 buniek

<i>Bez výmeny</i>	<i>Vplyv diferenciačného média</i>	<i>Vplyv koncentrácie látky</i>	<i>Interakcie medzi faktormi</i>
<b>Bisfenol BP</b>	0,1920	0,3530	0,5293
<b>Bisfenol M</b>	0,1707	<b>0,0153 *</b>	0,7438
<b>Bisfenol S</b>	0,3786	0,5282	0,8909
<i>S každodennou výmenou</i>	<i>Vplyv diferenciačného média</i>	<i>Vplyv koncentrácie látky</i>	<i>Interakcie medzi faktormi</i>
<b>Bisfenol BP</b>	<b>0,0085 **</b>	<b>0,0003 ***</b>	0,1172
<b>Bisfenol M</b>	0,7940	<b>0,0014 **</b>	0,0634
<b>Bisfenol S</b>	<b>0,0338 *</b>	<b>0,0060 **</b>	0,2913

### 5.3. Hodnotenie vplyvu kontinuálnej expozície študovaných látok na expresiu markerov diferenciácie H9c2 buniek

Na obrázku 7 sú uvedené zmeny v relatívnej génovej expresii vybraných markerov diferenciácie špecifických pre srdcové tkanivo (GATA4, Hand2 a Tnnt2) a kostrový sval (Myog) po kontinuálnu expozíciu vybranými bisfenolmi v netoxických koncentráciách a pri použití dvoch diferenciačných protokolov s každodennou výmenou média a bez nej. Z technických a časových dôvodov bol sledovaný len vplyv diferenciačného média DMEM + 10 % FBS s ATRA.

Ako je vidieť z grafu na obrázku 7, vplyv diferenciácie na zmeny expresie u buniek nevystavených bisfenolmi nebol u markerov jednotný, ani u tkanivovo špecifických markerov. Na obrázku 7B-D, je vidieť signifikantný vplyv na expresiu markerov Hand2, Tnnt2 a Myog v porovnaní s expresiou v parentných bunkách, u GATA4 bola zmena nesignifikantná vrátane vplyvu diferenciačného protokolu (obrázok 7A). Pre marker Hand2 bol pozorovaný mierny pokles bez vplyvu diferenciačného protokolu (obrázok 7B), zatiaľ čo u srdcového troponínu T bola pozorovaná najväčšia zmena expresie (obrázok 7C), ktorá u diferenciačného protokolu bez každodennej výmeny média dosahovala trojnásobnú expresiu (o 300 %) kontrolných parentných buniek a pri použití protokolu s každodennou výmenou bol nárast len o zhruba

50 %. U markerov kostrového svalstva myogenínu bol pozorovaný taktiež výrazný rozdiel medzi oboma diferenciačnými protokolmi, kedy diferenciacia bez výmeny média viedla k nárastu expresie o zhruba 50 %, zatiaľ čo kultivácia s každodennou výmenou média viedla naopak k 50% poklesu.

Obdobný charakter rozdielneho vplyvu jednotlivých diferenciačných protokolov na expresiu markerov bol patrný aj po expozícii jednotlivými bisfenolmi, avšak bez jednotnej odpovedi aj vrámci daného markeru, preto je interpretácia výsledkov problematická.

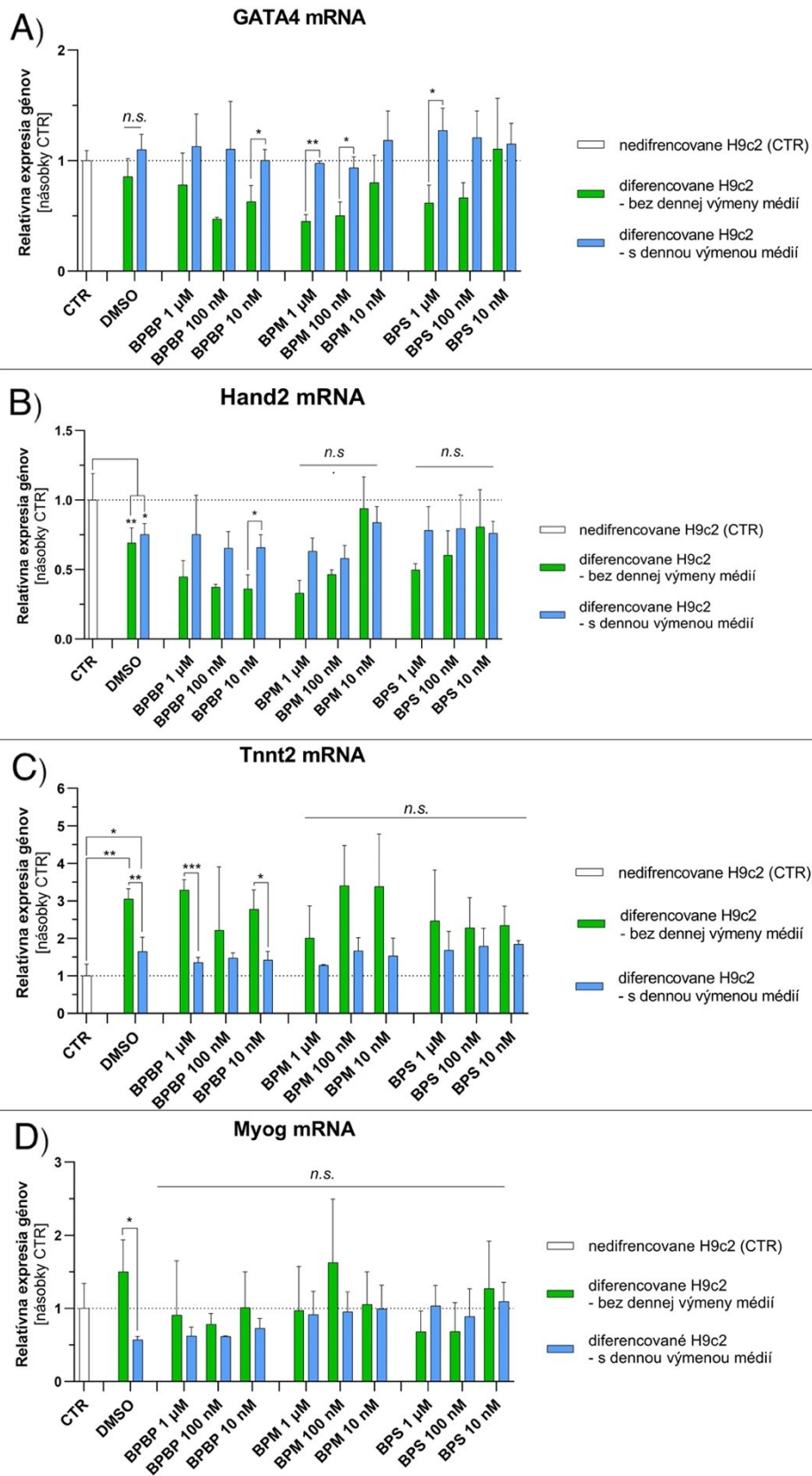
Ak budeme hodnotiť expresiu prvého z kardio-selektívnych markerov, GATA4, vidíme vplyvom expozície bisfenolmi trend zníženia jeho expresie pri diferenciacii bez každodennej výmeny média, zatiaľ čo pri diferenciacii s každodennou výmenou média (obsahujú bisfenoly) nedochádza k poklesu oproti kontrolným diferencovaným bunkám. Navyše pri expozícii bisfenolmi M a S je vidieť trend k dávkovej závislosti pri prevedení diferencie s kontinuálnou expozíciou bez výmeny média.

Ďalší srdcový marker Hand2 vykazoval výraznejší pokles expresie pri expozícii bisfenolom BP bez každodennej výmeny média, zatiaľ čo pri každodennej výmene bola zmena minimálna. Pri expozícii bisfenolom M a S bol navyše taktiež patrný trend k dávkovej závislosti, hlavne u buniek bez výmeny média, avšak všetky zmeny vyšli štatisticky nevýznamné.

Posledným a hlavným markerom diferencie smerom k srdcovému fenotypu je srdcový troponín T (Tnnt2). Jeho expresia bola veľmi ovplyvnená každodennou výmenou média. Pri absencii tejto výmeny boli pozorované výrazné zmeny, ktoré neboli zmenené expozíciou bisfenolom BP a nižšími koncentraciami bisfenolu M, ale bisfenol S a najvyššou koncentraciou bisfenolu M áno. Expresia pri každodennej výmene média nebola zmenená oproti kontrolným bunkám.

Transkripčný faktor špecifický pre kostrové svalové bunky myogenín (Myog) nevykazoval žiadne štatisticky významné zmeny, ale vplyvom variability sa nedá vylúčiť vplyv bisfenolov. Po kontinuálnej expozícii nevyšeňovaným médiom bisfenolom BP je vidieť trend k zníženiu expresie na úroveň parentnej expresie, zatiaľ čo pri každodennej výmene žiadny taký trend vidieť nie je. U bisfenolu S je expresia ešte viac znížená pri diferenciacii bez výmeny média (dokonca aj s náznakom dávkovej závislosti), zatiaľ čo expresia pri každodennej výmene sa vrátila k úrovni parentnej expresie. Expozícia bisfenolom M mala najmenší vplyv na expresiu. Vplyv diferencie na zmeny expresie u buniek nevystavených bisfenolmi nebol u markerov jednotný, ani u tkanivovo špecifických markerov.

Pri hodnotení štatistickej významnosti vplyvu faktoru diferenciačného protokolu a vplyvu bisfenolov na expresiu daných markerov dvojcestnou analýzou rozptylu so zmiešaným modelom (tabuľka 9), bola najsilnejšia štatistická významnosť vplyvu diferenciácie nájdená u markerov Hand2, nasledovaný markermi GATA4 a Tnnt2, zatiaľ čo vplyv tohto faktoru vyšiel u markeru Myog štatisticky nevýznamný. Pri hodnotení vplyvu expozície bisfenolmi na expresiu bola najvyššia štatistická významnosť opäť u markeru Hand2 a následne u GATA4.



**Obrázok 7.** Vplyv kontinuálnej expozície H9c2 testovanými látkami na expresiu sledovaných markerov diferenciácie: **A)** GATA4, **B)** Hand2, **C)** Tnnt2 a **D)** Myog. CTR – nediferencované bunky bez akéhokoľvek pridania látky, DMSO (vo finálnej koncentrácii 0,1%) kontrolná skupina pre expozíciu bisfenolmi. Prezentované

dáta sú z 3-4 nezávislých opakovaní. Štatistická signifikancia (dvojcenná ANOVA s Holm-Šidák *post-hoc* testom):  
 \*  $p > 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$ , \*\*\*  $p > 0,001$  a *n.s.* nesignifikantné.

**Tabuľka 9:** Hodnoty štatistickej významnosti vplyvu jednotlivých faktorov diferenciácie na génovú expresiu markerov diferenciácie.

	<i>Vplyv diferenciačného protokolu</i>	<i>Vplyv bisfenolu</i>	<i>Interakcie medzi faktormi</i>
<b>GATA4</b>	<b>0,0016 **</b>	<b>0,0449 *</b>	0,4015
<b>Hand2</b>	<b>&lt; 0,0001 ***</b>	<b>&lt; 0,0001 ***</b>	0,1258
<b>Myog</b>	0,0660	0,3319	0,3933
<b>Tnnt2</b>	<b>0,0213 *</b>	0,3430	0,2456

## 6. Diskusia

Bunková línia H9c2, izolovaná zo srdcového tkaniva potkana, je zavedeným in vitro modelom pre kardiomyocyty v experimentálnych štúdiách. Tieto bunky sú do istej miery relevantným modelom pre prvotné skúmanie mechanizmov a dôsledkov rôznych srdcových patológií, hlavne ischemicko-reperfúzneho poškodenia (Branco AF et al. 2015), avšak majú svoje limity a získané výsledky je nutné verifikovať na relevantnejšom modeli. Významným posunom k relevantnejšiemu modelu je prevedenie diferenciácie smerom k fenotypu srdcového alebo kostrového svalu (Menard C et al. 1999). Pri diferenciácii k srdcovému fenotypu sa dá, na rozdiel od proliferujúcich (parentných) H9c2 buniek, dosiahnuť myokardiálneho transkripčného profilu a expresie kontraktálnych proteínov typických pre myokard, ale nie už ich funkčnú organizovanú štruktúru. Ďalší z limitov je, že diferencované H9c2 bunky neodpovedajú na stimuláciu angiotensinu II či isoprenalínom. Prehľad limitácií a odlišností od obdobných diferencovateľných bunkových línií HL-1 (myš), AC16 (človek), ľudských iPSC buniek a izolovaných neonatálnych a adultných tkanív podala nedávno publikovaná štúdia Onódi et al. porovnávajúca transkriptomický a fenotypický profil (2022).

Zvláštnosťou myoblastov H9c2 je ich schopnosť diferencovať sa na bunky kostrového svalu po znížení množstva séra. Súčasné zníženie séra s denným prídavkom ATRA núti bunky, aby prijali fenotyp podobný srdcovému, s výskytom rozvetvených mnohjadrových buniek, ktoré prezentujú špecifické markery. Je známe, že stav diferenciácie srdcovej bunky ovplyvňuje jej náchylnosť k toxickej látke. Napriek tomu je väčšina toxikologických štúdií prevádzaná na nediferencovaných bunkách (Pereira SL et al. 2011, Branco AF et al. 2015).

Publikované a tu diskutované diferenciačné protokoly trvajú rôznu dobu, čo má vplyv na výsledný stav diferenciácie. Najčastejšie trvá diferenciácia 5 (Branco et al. 2015, Escarda-Castro et al. 2021) alebo 6 dní (Pereira et al. 2011), a sú založené na kultivácii v DMEM s 1 % FBS a 10 nM ATRA. Diferenciácia buniek v tejto práci bola prevedená v médiách s rôznym obsahom séra (1 % vs. 10 %) v kultivačnom médiu s prídavkom alebo bez ATRA, pričom dané protokoly boli sledované po dobu 9 dní. Tento interval bol vybraný na základe predošlej diplomovej práce z nášho laboratória Anny Gardianovej (2023), ktorá sledovala transkripčný profil vybraných markerov diferenciácie v čase až do 15 dňa, pričom najväčšie zmeny boli v 9. deň. Rovnako dlhá diferenciácia bola použitá aj v už spomínanej recentnej transkriptomickej štúdií (Onódi et al. 2022), kde sledovali mimo iné expresiu aj nami sledovaných markerov GATA4 a Tnnt2. V oboch prípadoch sme dosiahli rovnakého charakteru zmeny expresie, teda pokles GATA4 a výrazný vzostup Tnnt2.



Cieľom tejto práce bolo porovnať vplyv bisfenolov na diferenciáciu H9c2 buniek, pretože bol pozorovaný negatívny vplyv 10 a 30  $\mu\text{M}$  bisfenolu A na expresiu transkripčných faktorov GATA4 a Hand2 (Escarda-Castro et al. 2021). Pretože je bisfenol A kvôli obavám z negatívneho pôsobenia na ľudský organizmus v súčasnej dobe hojne nahradzovaný tzv. „BPA-free“ derivátmi, teda inými bisfenolmi, rozhodli sme sa študovať vplyv bisfenolov S (druhý najznámejší bisfenol), M a BP na diferenciáciu H9c2 buniek. Použité koncentrácie od 10 nM po 1  $\mu\text{M}$  sú netoxické a sú relevantné ku koncentráciám nájdených v životnom prostredí. Pretože priama kardiotoxicita bisfenolov nebola nikdy dokázaná (Dias et al. 2022), zamerali sme sa práve na ovplyvnenie diferenciácie, ako modelu poškodenia vývoja či regenerácie srdca. V prvom kroku sme sledovali cytotoxicitu vybraných bisfenolov na parentnej nediferencovanej bunkovej línii potkaních kardiomyoblastov H9c2. Bisfenol S nevykazoval cytotoxické účinky pri ktorejkoľvek koncentrácii. Zároveň sa preukázala citlivosť buniek k vyšším koncentráciám bisfenolov M a BP (nad 1  $\mu\text{M}$ ), čo je v súlade s predchádzajúcimi publikovanými výsledkami z našej výskumnej skupiny (Dias P et al. 2022). Je nutné doplniť, že BPA je obecné málo toxická látka a v zmienenej štúdii Escarda-Castro et al. vykazoval cytotoxicitu zhruba 10 a 20 % pri koncentrácii 10 a 30  $\mu\text{M}$ . Výsledky nami testovaných cytotoxicít bisfenolov BP, M a S na diferencované bunky neboli ešte publikované, preto sa ich nedá diskutovať v kontexte.

Rovnako tak ovplyvnenie génovej expzie vybraných transkripčných faktorov použitými bisfenolmi sa nedá diskutovať, pretože táto práca je prvou, ktorá ich sleduje. Diskutovať sa dá vplyv každodennej výmeny média, ktorý nepatrí medzi štandardné diferenciačné protokoly. Tento faktor mal prekvapivo väčší vplyv na expresiu transkripčných faktorov než by sa očakávalo s ohľadom na prerušenie každodenného prísunu čerstvej ATRA, ktorá bola vždy považovaná za významný diferenciačný faktor nutný pre diferenciáciu smerom k srdcovému fenotypu (Menard C et al. 1999, Branco et al. 2015). Ako ale ukázala iná recentná transkriptomická štúdia, v skutočnosti na prídavok ATRA reaguje iba malá časť cieľových génov a väčší vplyv má čas kultivácie, teda diferenciácie (Campero-Basaldua C et al. 2023). V tejto štúdii používali k diferenciácii DMEM s 1 % FBS s a bez ATRA. Expzia srdcového troponínu T (Tnnt2) bola 7. deň od nasadenia 2,6x a 14. deň 3,6x väčšia než v parentných bunkách, zatiaľ čo prídavok 10 nM ATRA znižoval expresiu o zhruba 0,3x násobku kontrolných hodnôt. Toto je podobné k tomu, čo sme pozorovali v našom prípade, ale pri použití média DMEM s 10 % FBS a 9 dennou diferenciáciou.

Získané výsledky sú bohužiaľ zaťažené v niektorých skupinách veľkou variabilitou, ktorá môže pochádzať buď z technickej chyby pri prevedení experimentu, alebo vplyvom vrodenej

variability buniek alebo vonkajších faktorov, ktoré neboli rozpoznané. Preto bude nutné pred ďalším postupom verifikovať dané výsledky a overiť ich na úrovni proteínu.

## **7. Záver**

Naše výsledky poukazujú na možný vplyv bisfenolov BP, M, S a na výsledok diferenciácie H9c2 buniek a to v použitých koncentráciách, ktoré sú netoxické a približujú sa enviromentálne relevantným koncentráciám. Ovplyvnenie diferenciácie nemusí znamenať problém nielen v rámci vývoja srdca behom organogenézy plodu, ale aj u dospelého myokardu, kedy sú zapojené transkripčné faktory aj do regenerácie srdca po poškodení, napr. po infarktu myokardu či iného poškodenia.

Získané výsledky sú v niektorých skupinách zaťažené väčšou variabilitou, a preto je nutné ich ešte verifikovať na úrovni proteínu. Aj tak sú získané výsledky cenné pre ďalšie pokračovanie výskumu vplyvu bisfenolov na diferenciáciu H9c2 buniek.

## 8. Zdroje

1. AG AFIRM GROUP. BISPHENOLS - Chemical Information Sheet, verze 2.0. Datum publikace: březen 2021. . Datum přístupu: 1. 9. 2023. Dostupné na: [https://afirm-group.com/wp-content/uploads/2021/07/afirm\\_bisphenols\\_v2.pdf](https://afirm-group.com/wp-content/uploads/2021/07/afirm_bisphenols_v2.pdf)
2. Alharbi HF, Algonaiman R, Alduwayghiri R, Aljutaily T, Algheshairy RM, Almutairi AS, Alharbi RM, Alfurayh LA, Alshahwan AA, Alsadun AF, Barakat H. Exposure to Bisphenol A Substitutes, Bisphenol S and Bisphenol F, and Its Association with Developing Obesity and Diabetes Mellitus: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(23):15918. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9736995/>
3. Bahelka I, Stupka R, Čítek J, Šprysl M. The impact of bisphenols on reproductive system and on offspring in pigs – A review 2011–2020. *Chemosphere*. 2021;263:128203. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653520323985>
4. Barbagallo F, Condorelli RA, Mongioì LM, Cannarella R, Aversa A, Calogero AE, La Vignera S. Effects of Bisphenols on Testicular Steroidogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:373. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7344146/>
5. Benov L. Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT Assay. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3):e01637-21. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8694201/>
6. Branco AF, Pereira SP, Gonzalez S, Gusev O, Rizvanov AA, Oliveira PJ. Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129303. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4485408/>

7. Campero-Basaldua C, Herrera-Gamboa J, Bernal-Ramírez J, Lopez-Moran S, Luévano-Martínez LA, Alves-Figueiredo H, Guerrero G, García-Rivs G, Trevino V. The retinoic acid response is a minor component of the cardiac phenotype in H9c2 myoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2023;24(1):431. Dostupné na: <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09512-0>
8. Caporossi L, Papaleo B. Exposure to Bisphenol a and Gender Differences: From Rodents to Humans Evidences and Hypothesis about the Health Effects. *J Xenobiot*. 2015;5(1):5264. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6324472/>
9. Carlson CR, Aronsen JM, Bergan-Dahl A, Moutty MC, Lunde M, Lunde PK, Jarstadmarken H, Wanichawan P, Pereira L, Kolstad TRS, Dalhus B, Subramanian H, Hille S, Christensen G, Müller OJ, Nikolaev V, Bers DM, Sjaastad I, Shen X, Louch WE, Klusmann E, Sejersted OM. AKAP18 $\delta$  Anchors and Regulates CaMKII Activity at Phospholamban-SERCA2 and RYR. *Circ Res*. 2022;130(1):27–44. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9500498/>
10. Catenza CJ, Farooq A, Shubear NS, Donkor KK. A targeted review on fate, occurrence, risk and health implications of bisphenol analogues. *Chemosphere*. 2021;268:129273. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653520334706>
11. Coffman JA. Cell Cycle Development. *Dev Cell*. 2004;6(3):321–7. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153458070400067X>
12. Dias P, Tvrdý V, Jirkovský E, Sollner Dolenc M, Peterlin Mašič L, Mladěnka P. The effects of bisphenols on the cardiovascular system. *Crit Rev Toxicol*. 2022; ;52(1):66-87 Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35394415/>
13. Dumitrascu MC, Mares C, Petca RC, Sandru F, Popescu RI, Mehedintu C, Petca A. Carcinogenic effects of bisphenol A in breast and ovarian cancers. *Oncol Lett*. 2020;20(6):282. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7520752/>

14. Escarda-Castro E, Herráez MP, Lombó M. Effects of bisphenol A exposure during cardiac cell differentiation. *Environ Pollut.* 2021;286:117567. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749121011490>
15. Feiteiro J, Mariana M, Glória S, Cairrao E. Inhibition of L-type calcium channels by Bisphenol A in rat aorta smooth muscle. *J Toxicol Sci.* 2018;43(10):579–86. Dostupné na: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/43/10/43\\_579/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/43/10/43_579/article)
16. Gao Y, Mruk DD, Cheng CY. Sertoli cells are the target of environmental toxicants in the testis – a mechanistic and therapeutic insight. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(8):1073–90. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4822540/>
17. García-Recio E, Costela-Ruiz VJ, Melguizo-Rodríguez L, Ramos-Torrecillas J, Illescas-Montes R, De Luna-Bertos E, Ruiz C. Effects of bisphenol F, bisphenol S, and bisphenol AF on cultured human osteoblasts. *Arch Toxicol.* 2023;97(7):1899–905. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10256648/>
18. GARDIANOVÁ, A. Charakterizace různých diferenciačních protokolů H9c2 kardiomyoblastů. 2023. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Dostupné na: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/181848>
19. Gorini F, Bustaffa E, Coi A, Iervasi G, Bianchi F. Bisphenols as Environmental Triggers of Thyroid Dysfunction: Clues and Evidence. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(8):2654. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7216215/>
20. Howard G et al.. From BPA to BPZ: a toxic soup? A CHEM Trust Report. Datum publikace: 2018. Datum prístupu: 1. 9. 2023. Dostupné na: <https://www.chemtrust.org/wp-content/uploads/chemtrust-toxicsoup-mar-18.pdf>
21. J Hescheler, R Meyer, S Plant, D Krautwurst, W Rosenthal, G Schultz. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from

rat heart. *Circ Res.* 1991;69(6):1476-86. Dostupné na:

[https://www.ahajournals.org/doi/epdf/](https://www.ahajournals.org/doi/epdf/10.1161/01.RES.69.6.1476)

[10.1161/01.RES.69.6.1476](https://www.ahajournals.org/doi/epdf/10.1161/01.RES.69.6.1476)

22. Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Livadas S, Palioura E, Economou F, Koutsilieris M, Palimeri S, Panidis D, Diamanti-Kandarakis E. Endocrine Disruptors and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Elevated Serum Levels of Bisphenol A in Women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(3):E480–4. Dostupné na:

[https://academic.oup.com/jcem/article/96/3/](https://academic.oup.com/jcem/article/96/3/E480/2597282)

[E480/2597282](https://academic.oup.com/jcem/article/96/3/E480/2597282)

23. Kim JJ, Kumar S, Kumar V, Lee YM, Kim YS, Kumar V. Bisphenols as a Legacy Pollutant, and Their Effects on Organ Vulnerability. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(1):112. Dostupné na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6982222/>

24. Kim MJ, Park YJ. Bisphenols and Thyroid Hormone. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2019;34(4):340–8. Dostupné na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6935774/>

25. Kimes B, Brandt B. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res.* 1976;98(2):367–81. Dostupné na:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001448277690447X>

26. Li MWM, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(11):2302–14. Dostupné na:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516449/)

[articles/PMC3516449/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516449/)

27. Liu J, Wang H, Hou X, Fan L, Yang F, Dai Y, Deng Y, Fu Z, Shu X, Sun B, Liu Y. Bisphenol P and bisphenol M promote triple-negative breast cancer metastasis through activation of AKT pathways. *Sci Total Environ.* 2023;892:164748. Dostupné na:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969723033715>

28. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014;15(6):122. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4097832/>
29. Marescal O, Cheeseman IM. Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence. *Dev Cell.* 2020;55(3):259–71. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7665062/>
30. Mendoza PR, Grossniklaus HE. The Biology of Retinoblastoma. V: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 2015;s. 503–16. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117315001143>
31. Ng IC, Pawijit P, Tan J, Yu H. Anatomy and Physiology for Biomaterials Research and Development. V: *Encyclopedia of Biomedical Engineering.* 2019;s. 225–36. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128012383998763>
32. O'Donnell L, Smith LB, Rebourcet D. Sertoli cells as key drivers of testis function. *Semin Cell Dev Biol.* 2022;121:2–9. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952121001671>
33. O'Reilly AO, Eberhardt E, Weidner C, Alzheimer C, Wallace BA, Lampert A. Bisphenol A Binds to the Local Anesthetic Receptor Site to Block the Human Cardiac Sodium Channel. *PLoS One.* 2012;7(7):e41667. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407203/>
34. Oki T, Nishimura K, Kitaura J, Togami K, Maehara A, Izawa K, Sakaue-Sawano A, Niida A, Miyano S, Aburatani H, Kiyonari H, Miyawaki A, Kitamura T. A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0–G1 transition. *Sci Rep.* 2014;4:4012. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3915272/>



35. Onódi Z, Visnovitz T, Kiss B, Hambalkó S, Koncz A, Ágg B, Váradi B, Tóth VE, Nagy RN, Gergely TG, Gergő D, Makkos A, Pelyhe C, Varga N, Reé D, Apáti Á, Leszek P, Kovács T, Nagy N, Ferdinandy P, Buzás EI, Görbe A, Giricz Z., Varga ZV.. Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. *J Mol Cell Cardiol.* 2022;165:19–30. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282821002340>
36. Pereira SL, Ramalho-Santos J, Branco AF, Sardão VA, Oliveira PJ, Carvalho RA. Metabolic Remodeling During H9c2 Myoblast Differentiation: Relevance for In Vitro Toxicity Studies. *Cardiovasc Toxicol.* 2011;11(2):180–90. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s12012-011-9112-4>
37. Ramadan M, Cooper B, Posnack NG. Bisphenols and phthalates: Plastic chemical exposures can contribute to adverse cardiovascular health outcomes. *Birth Defects Res.* 2020;112(17):1362–85. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7934580/>
38. Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect.* 2015;123(7):643–50. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492270/>
39. Suhaeri M, Subbiah R, Van SY, Du P, Kim IG, Lee K, Park K. Cardiomyoblast (H9c2) Differentiation on Tunable Extracellular Matrix Microenvironment. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(11–12):1940–51. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449717/>
40. Takeuchi T, Tsutsumi O. Serum Bisphenol A Concentrations Showed Gender Differences, Possibly Linked to Androgen Levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;291(1):76–8. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X02964077>

41. Thoene M, Dzika E, Gonkowski S, Wojtkiewicz J. Bisphenol S in Food Causes Hormonal and Obesogenic Effects Comparable to or Worse than Bisphenol A: A Literature Review. *Nutrients*. 2020;12(2):532. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7071457/>
42. Vafiadaki E, Papalouka V, Arvanitis DA, Kranias EG, Sanoudou D. The role of SERCA2a/PLN complex, Ca<sup>2+</sup> homeostasis, and anti-apoptotic proteins in determining cell fate. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2009;457(3):687–700. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0506-5>
43. Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011;47(2):125–31. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9368-1>
44. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect*. 2003;111(8):994–1006. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241550/>
45. Witek P, Korga A, Burdan F, Ostrowska M, Nosowska B, Iwan M, Dudka J. The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. *Cytotechnology*. 2016;68(6):2407–15. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5101311/>
46. Zhang YF, Shan C, Wang Y, Qian LL, Jia DD, Zhang YF, Hao XD, Xu HM. Cardiovascular toxicity and mechanism of bisphenol A and emerging risk of bisphenol S. *Sci Total Environ*. 2020;723:137952. Dostupné na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969720314650>