

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Michala Kratochvílová

miRNA analýza malých extracelulárních vezikul izolovaných z plasmy po dietní intervenci

miRNA analysis of small extracellular vesicles isolated from plasma after diet intervention

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michal Koc, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 08. 2022

.....

Michala Kratochvílová

Poděkování

Velice děkuji svému školiteli RNDr. Michalu Kocovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky a v neposlední řadě za čas, který mi při zpracovávání této diplomové práce věnoval. Zároveň děkuji také Ing. Liboru Kostkovi, Ph.D. za umožnění analýzy vzorků metodou NTA v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, za odborné zaškolení, pomoc a konzultace výsledků měření. Dále děkuji také Mgr. Lence Rossmeislové, Ph.D., RNDr. Veronice Šrámkové, Ph.D. a celému kolektivu Laboratoře fyziologie a patofyziologie tukové tkáně 3. LF UK za jejich ochotu, rady a přátelské pracovní prostředí.

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo zavedení protokolu izolace malých extracelulárních vezikul (sEV) z lidské plasmy. Vzorky plasmy byly odebírány od 44 zdravých žen, které v rámci klinické studie podstoupily dietní intervenci 60 h hladovění. Tyto ženy byly na základě BMI rozděleny do skupin hubené a obézní. Z plasmy odebrané před a po dietní intervenci byly metodou precipitace pomocí polyethylenglykolu vyizolovány sEV, které byly následně charakterizovány z hlediska jejich velikosti a koncentrace ve vzorku. U hubených i obézních žen byl počet sEV v plasmě stejný a nezměnil se ani v závislosti na dietní intervenci. V důsledku 60 h hladovění došlo ke změně velikosti sEV u skupiny hubených. Dalším cílem byla analýza miRNA exprese v sEV. Obsah sEV se v expresi některých analyzovaných miRNA lišil mezi skupinou hubených a obézních žen. Rozdíly byly pozorovány konkrétně v expresi *hsa-miR-17-5p*, *hsa-miR-20a-5p* a *hsa-let-7b-5p*. 60 h hladovění vedlo ke zvýšené expresi *hsa-miR-5100* u skupiny hubených a *hsa-miR-27a-3p* a *hsa-miR-27b-3p* u skupiny obézních. Tyto změny navozené dietní intervencí ale nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné. Hladovění tedy ani u jedné skupiny nevedlo k výrazným změnám miRNA obsahu v sEV. Odlišné miRNA exprese byly patrné pouze mezi skupinami na základě rozdílného BMI.

Klíčová slova

malé extracelulární vezikuly, exosomy, izolace exosomů, miRNA, hladovění

Abstract

The aim of this thesis was to establish a protocol for the isolation of small extracellular vesicles (sEVs) from human plasma. Plasma samples were collected from 44 healthy women who underwent a 60-hour dietary intervention in the form of fasting as part of a clinical trial. These women were divided into two groups based on their BMI – lean and obese. Plasma was collected from each participant before and after the dietary intervention and sEVs were isolated using the polyethylene glycol precipitation method. Each sample was then characterized by the size of sEVs and their concentration. The amount of sEVs in plasma before the dietary intervention was the same for both groups and did not change with dietary intervention. However, the 60-hour fasting resulted in a change in sEVs size in the lean group. Another goal of this thesis was to analyze miRNA expression in sEVs. There were differences found in the expression of certain miRNA between the two groups. More specifically, differences were observed in the expression of *hsa-miR-17-5p*, *hsa-miR-20a-5p* and *hsa-let-7b-5p*. The 60-hour fasting period resulted in an increased expression of *hsa-miR-5100* in the lean group and *hsa-miR-27a-3p* and *hsa-miR-27b-3p* in the obese group. However, these changes induced by the dietary intervention were not evaluated as statistically significant. Therefore, fasting did not lead to significant changes in miRNA content of sEVs in either group. The only evident variations in miRNA expression were based on differences in BMI.

Key words

small extracellular vesicles, exosomes, isolation of exosomes, miRNA, fasting

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1. Historie extracelulárních vezikul	12
2.2. Extracelulární vezikuly	12
2.2.1. Exosomy	14
2.2.2. Mikrovezikuly	16
2.2.3. Apoptotická tělíska	16
2.3. Metody izolace sEV	17
2.3.1. Ultracentrifugace	17
2.3.1.1. Diferenciální ultracentrifugace	18
2.3.1.2. Ultracentrifugace s hustotním gradientem	18
2.3.2. Ultrafiltrace	19
2.3.3. Gelová chromatografie	19
2.3.4. Precipitace sEV	19
2.4. Obsah sEV	20
2.4.1. Proteiny v sEV	20
2.4.2. Lipidy v sEV	21
2.4.3. Nukleové kyseliny v sEV	22
2.5. Signalizační funkce sEV	23
2.6. Dietní intervence a hladovění	25
2.7. Extracelulární miRNA a její změny v expresi	26
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	29
4. METODY	30
4.1. Klinická studie a vyšetřovací protokol	30
4.2. Selekcce vzorků	30
4.2.1. Optické zhodnocení	30
4.2.2. Spektrofotometrická selekce	31
4.2.3. Detekce hemolýzy pomocí metody qPCR	31
4.3. Izolace sEV	32
4.3.1. Zpracování vzorku krve	32

4.3.2.	Izolace sEV z plasmy.....	32
4.3.3.	Ultracentrifugace.....	33
4.4.	Stanovení koncentrace proteinů – metoda BCA.....	33
4.5.	Charakterizace sEV.....	34
4.5.1.	NTA analýza.....	34
4.5.2.	Detekce povrchových markerů.....	34
4.5.2.1.	SDS-PAGE Elektroforéza.....	35
4.5.2.2.	Western Blot.....	35
4.6.	miRNA analýza.....	36
4.6.1.	Izolace miRNA.....	36
4.6.2.	Reverzní transkripce (RT).....	37
4.6.3.	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce qPCR (real-time PCR).....	38
4.6.3.1.	qPCR – hodnocení hemolýzy a reverzní transkripce.....	38
4.6.3.2.	qPCR – focus panely.....	39
4.7.	Vyhodnocování.....	40
4.7.1.	Metodika zpracování qPCR dat.....	40
4.7.2.	Normalizace.....	40
4.7.3.	Statistické vyhodnocení.....	40
4.8.	Materiál a roztoky.....	41
5.	VÝSLEDKY.....	42
5.1.	Selekce vzorků.....	42
5.1.1.	Optické zhodnocení.....	42
5.1.2.	Spektrofotometrická selekce.....	42
5.1.3.	Detekce hemolýzy metodou qPCR.....	42
5.2.	Měření NTA.....	43
5.3.	Charakterizace sEV na základě povrchových markerů.....	45
5.4.	Analýza změny miRNA zastoupení v sEV v důsledku dietní intervence....	46
5.4.1.	Optimalizace izolace miRNA.....	46
5.4.2.	Analýza miRNA profilu v sEV.....	47
5.4.2.1.	Srovnání miRNA exprese v sEV mezi skupinou hubení a obézní v bazální podmínce D0.....	47
5.4.2.2.	Srovnání miRNA exprese v sEV po 60h hladovění mezi skupinou hubení a obézní.....	50

5.4.2.3. Analýza změny miRNA exprese v sEV v důsledku 60h hladovění bez ohledu na BMI	51
5.4.2.3.1. Analýza změny miRNA exprese v důsledku 60h hladovění ve skupině hubení.....	53
5.4.2.3.2. Analýza změny miRNA exprese v důsledku 60h hladovění ve skupině obézní.....	53
6. DISKUZE	55
6.1. Zavedení protokolu izolace sEV z plasmy.....	55
6.2. Optimalizace izolace miRNA z sEV.....	55
6.3. Měření koncentrace a velikosti sEV.....	56
6.4. Analýza souboru miRNA v sEV	57
6.4.1. Srovnání miRNA exprese v sEV mezi skupinou hubení a obézní.....	58
6.4.2. Analýza změny miRNA exprese v sEV v důsledku 60 h hladovění.....	59
7. ZÁVĚR.....	63
LITERATURA	64

SEZNAM ZKRATEK

AB	apoptotická tělíška (z ang. apoptotic bodies)
Adrb3	adrenoceptor beta 3
AGO	argonaute protein
ANGPTL 3	angiopoietin-like 3
BCA	bicinchoninic acid assay
BMI	index tělesné hmotnosti (z ang. body mass index)
BMP2	kostní morfogenetický protein 2 (z ang. bone morphogenetic protein)
BSA	hovězí sérový albumin (z ang. bovine serum albumin)
CNS	centrální nervová soustava
D0	den nula
D3	den tři
DELISA	de novo lipogenesis and insulin sensitivity in obese
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ER	endoplasmatické retikulum
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport
FACS	průtoková cytometrie (z ang. fluorescence-activated cell sorting)
EV	extracelulární vezikuly
FDR	false discovery rate
GPAM	glycerol-3-fosfát acyltransferáza 1
HADSc	lidské kmenové buňky tukové tkáně (z ang. human adipose derived stem cells)
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (z ang. high-density lipoproteins)
HEB	hematoencefalická bariéra
HUVEC	lidské endoteliální buňky pupečnickové žíly (z ang. human umbilical vein endothelial cells)
ICAM-1	intercelulární adhezivní molekula 1
ILV	intraluminární vezikuly
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (z ang. low-density lipoproteins)
ME	mercaptoethanol
miRNA	microRNA
mRNA	transferová RNA (z ang. messenger RNA)
MV	mikrovezikuly

MVB	multivezikulární tělísko (z ang. multivesicular body)
NCOA3	koaktivátor nukleárního receptoru 3 (z ang. nuclear receptor coactivator)
NTA	analýza sledování nanočástic (z ang. nanoparticle tracking analysis)
PEG	polyethylenglykol
PIK3R2	fosfoinositol-3-kinázová regulační podjednotka 2 (z ang. phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2)
PODXL	podocalyxin-like protein
PPAR γ	peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor γ (z ang. peroxisome proliferator activated receptor γ)
PS	fosfatidylserin
PVT1	plasmacytoma variant translocation 1
Rb2	retinoblastoma-like protein 2
ROX	carboxy-X-rhodamine
RT	reverzní transkripce
RVG	glykoprotein viru vztekliny (z ang. rabies virus glycoprotein)
SDS	dodecylsírán sodný (z ang. sodium dodecyl sulfate)
SEC	gelová chromatografie (z ang. size exclusion chromatography)
sEV	malé extracelulární vezikuly (z ang. small extracellular vesicles)
SNARE	SNAP receptor
SPRED1	sprouty-related protein
TBS	tris buffered saline
TGF- β	transformující růstový faktor β (z ang. transforming growth factor β)
TIM	T-cell immunoglobulin and mucin domain
UC	ultracentrifugace
UF	ultrafiltrace
VCAM-1	vaskulární buněčná adhezivní molekula 1 (z ang. vascular cell adhesion molecule)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z ang. vascular endothelial growth factor)

1. ÚVOD

Malé extracelulární vezikuly (sEV) jsou membránové váčky uvolňované buňkami do extracelulárního prostředí. Přenosem biologicky aktivních molekul z mateřských do recipientních buněk představují důležitou roli v mezibuněčné komunikaci a jsou součástí mnoha buněčných procesů. Skutečnost, že jejich koncentrace, velikost i obsah se mění v závislosti na jejich buněčném původu a různých fyziologických i patofyziologických podmínkách, z nich vytváří potenciální biomarkery různých onemocnění i prostředky pro cílenou vektorovou léčbu. Za klíčový funkční element v obsahu přenášeném sEV je v posledních letech považována miRNA, jejíž role spočívá v regulaci genové exprese. Charakteristika změny exprese jednotlivých miRNA a její vliv v rámci různých fyziologických i patofyziologických procesů je momentálně předmětem mnoha studií, jako i této diplomové práce.

Cílem této diplomové práce bylo izolovat a charakterizovat sEV z plasmy obézních a hubených žen v podmínce před a po dietní intervenci 60 h hladovění. Sledovaným parametrem byla velikost a koncentrace sEV a přítomnost jejich charakteristických povrchových markerů. Dalším cílem bylo analyzovat miRNA obsah v sEV hubených a obézních žen před a po 60 h hladovění a zjistit, zda tato dietní intervence vede k určitým změnám miRNA exprese obecně či pouze u některých skupin na základě BMI.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Historie extracelulárních vezikul

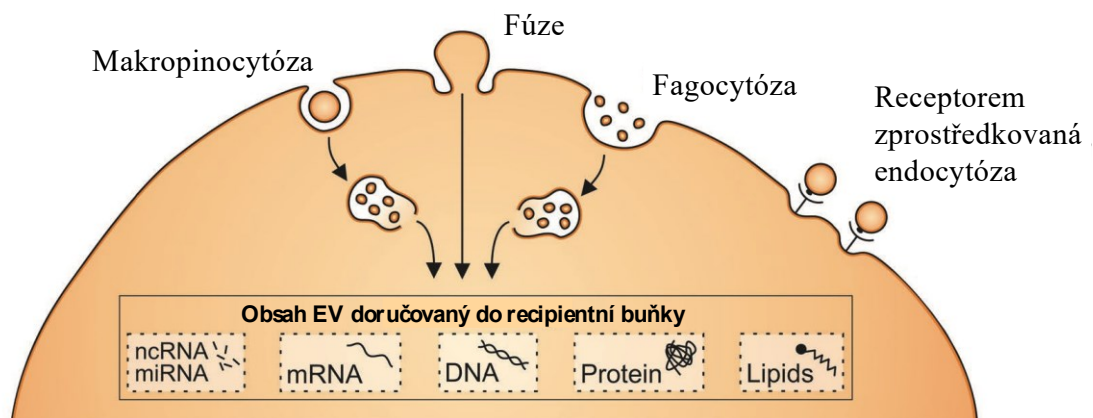
První nálezy extracelulárních vezikul (EV) pochází z různých, na sobě nezávislých pozorování v odlišných fyziologických prostředích (Yáñez-Mó et al., 2015). V roce 1946 byly popsány prokoagulační částice uvolněné z krevních destiček, které byly v roce 1967 nazvány jako „trombocytární prach“ (Wolf, 1967). V roce 1969 byly zpozorovány vezikuly v chrupavkové matrix při kalcifikaci kosti (Anderson, 1969). Jiné studie nezávisle na sobě popisovaly viru podobné částice v lidských buněčných kulturách a bovinním séru (Benz a Moses, 1974; Dalton, 1975) nebo vezikuly v semenné plasmě, později nazvané jako prosteasomy (Stegmayr a Ronquist, 1982). Pozorovány byly rovněž membránové fragmenty nádorového původu s prokoagulační aktivitou (Dvorak et al., 1981). V následujících letech vyšly studie popisující uvolňování vezikul z multivezikulárních endosomů, které fúzí s plasmatickou membránou v průběhu diferenciaci nezralých erytrocytů (tzv. retikulocytů) (Harding *et al.*, 1984; Johnstone *et al.*, 1987). V roce 1996 byly z buněčné kultury B lymfoblastoidních buněk vyizolovány antigen prezentující vezikuly (později nazvané jako exosomy), které jsou schopny aktivovat T-lymfocyty, a spustit tak imunitní odpověď (Raposo et al., 1996). Přítomnost RNA v EV byla objevena v roce 2007, díky které byly EV označeny jako nový mechanismus mezibuněčné komunikace a potenciální vektory genové terapie (Valadi et al., 2007).

2.2. Extracelulární vezikuly

EV jsou membránou obalené váčky uvolňované z buněk do extracelulárního prostoru (Zaborowski *et al.*, 2015; Doyle a Wang, 2019). Jejich membrána se skládá z lipidové dvojvrstvy, což odlišuje EV v tělesných tekutinách například od lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) a lipoproteinů o nízké hustotě (LDL), které mají pouze jednu vrstvu lipidové membrány (Zaborowski et al., 2015). Sekrece EV byla původně považovaná za způsob zbavování se odpadních látek z buňky. Nyní se studují především v souvislosti s jejich schopností signalizace mezi buňkami, a to jak při běžných homeostatických procesech, tak při patofyziologických reakcích (van Niel *et al.*, 2018).

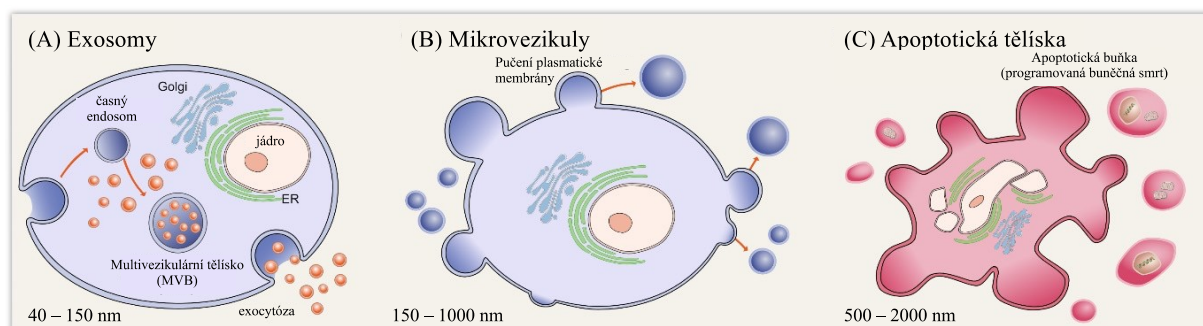
Signalizace může probíhat lokálně v rámci tkáně mezi buňkami stejného původu (např. endoteliálními buňkami, hepatocyty, imunitními buňkami) nebo napříč orgány uvolněním

do krevního oběhu (Akbar et al., 2019). Recipientní buňkou mohou být EV přijímány různými způsoby, například fagocytózou, receptorem zprostředkovanou endocytózou, fúzí membrán nebo makropinocytózou (Mulcahy et al., 2014; Zaborowski et al., 2015; Akbar et al., 2019) (obrázek 1).



Obrázek 1: Způsoby přijímání EV recipientní buňkou. Převzato a upraveno (Zaborowski et al., 2015).

Jednotlivé subtypy extracelulárních vezikul jsou dělené podle velikosti a způsobu jejich biogeneze (Nederveen et al., 2021; Zaborowski et al., 2015). Nejmenším podtypem EV jsou exosomy, které mají endosomální původ a jejich velikost se pohybuje od 40 do 150 nm. Dalším ze subtypů EV jsou mikrovezikuly, které pučí přímo z plasmatické membrány a jejich velikost činí 150 nm až 1 μ m (Jeppesen et al., 2019; Zaborowski et al., 2015). Mezi EV se řadí také tzv. apoptotická tělíska, která jsou uvolňována buňkami procházejícími programovanou buněčnou smrtí (apoptózou) a mají v průměru 500 nm až 2 μ m (Zaborowski et al., 2015) (obrázek 2).



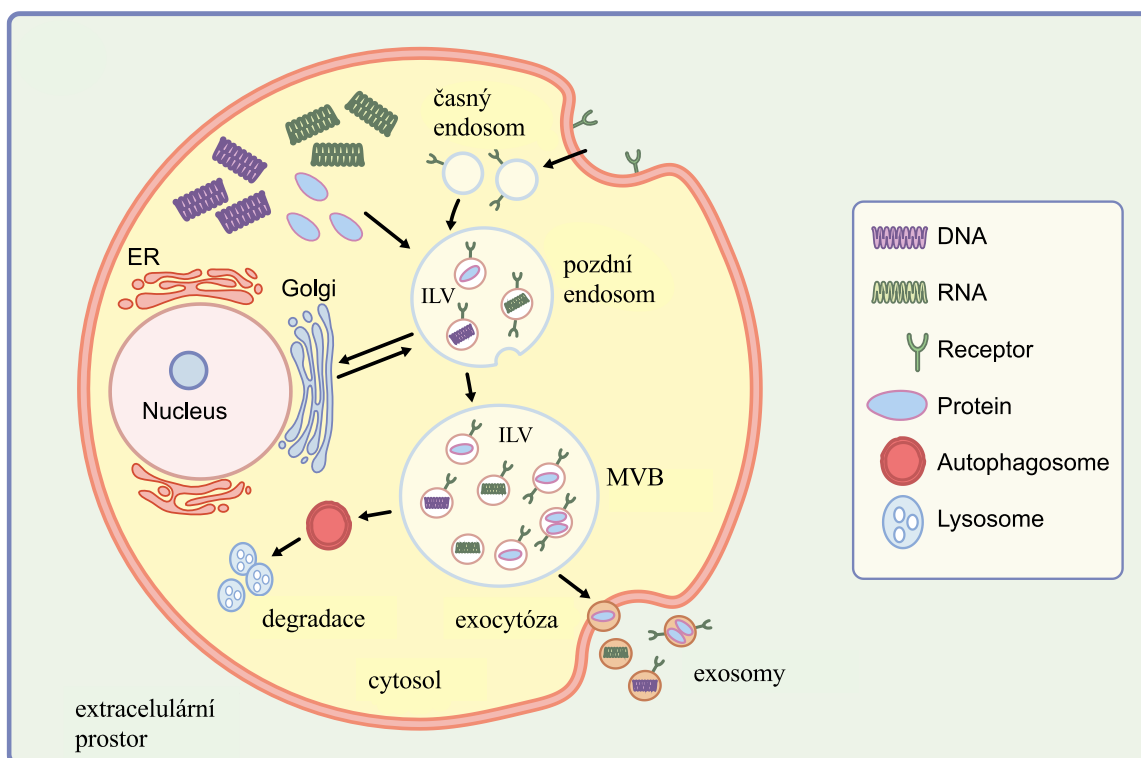
Obrázek 2: Jednotlivé subtypy EV dělené podle odlišné biogeneze a velikosti. Převzato a upraveno (Gurunathan et al., 2019).

2.2.1. Exosomy

Exosomy jsou malé membránové váčky endocytického původu (Théry *et al.*, 2002) a homogenního tvaru (Kalani *et al.*, 2014) o velikosti 40 – 150 nm (Jeppesen *et al.*, 2019; Zaborowski *et al.*, 2015). Mají lipidovou dvojvrstvu a malý cytosol bez buněčných organel. Jsou produkovány téměř všemi druhy buněk a lze je nalézt ve většině tělních tekutin, jako je například krev, plasma, sliny, moč, cerebrospinální tekutina, amniotická tekutina, synoviální tekutina, mateřské mléko, sperma a další (Dini *et al.*, 2020; Gurunathan *et al.*, 2019).

Jejich striktně regulovaný proces biogeneze začíná formováním časných endosomů invaginací plasmatické membrány (Gurunathan *et al.*, 2019). Během tohoto procesu jsou endosomem pohlceny některé cytosolické komponenty a do invaginující endosomální membrány jsou inkorporovány určité membránové proteiny (Zhang *et al.*, 2019; Chivero *et al.*, 2021). Třídění těchto komponentů je specificky regulováno (Guay a Regazzi, 2017). Pučením membrány pozdních endosomů směrem dovnitř vznikají intraluminární vezikuly (ILV) a z pozdních endosomů se stávají multivezikulární tělíska (MVB) (Gurunathan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019) (obrázek 3). Tvorba ILV a formování MVB je regulována komplexem proteinů ESCRT (Chivero *et al.*, 2021). Jedná se o třicet různých proteinů složených do čtyř funkčních jednotek (Guay a Regazzi, 2017) ESCRT-0, I, II a III, které společně s dalšími proteiny zajišťují příjem cytosolických komponent do ILV a třídění proteinů. Tuto funkci jsou v určitých případech schopné zajišťovat nezávisle na komplexu ESCRT rovněž proteiny z rodiny tetraspaninů, především CD9, CD63, CD81, CD82 a CD151 (Chivero *et al.*, 2021).

MVB následně buď splývají s lysosomy za účelem degradace (Guay a Regazzi, 2017) nebo jsou pomocí cytoskeletálních proteinů transportovány k plasmatické membráně (Gurung *et al.*, 2021). ILV, které jsou po splynutí MVB a plasmatické membrány uvolňovány do extracelulárního prostoru, jsou nazývány exosomy (Guay a Regazzi, 2017; Gurunathan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019) (obrázek 3). Exosomy následně slouží jako prostředek mezibuněčné komunikace přenosem informací a metabolitů. Docking a fúze váček jsou v rámci vezikulárního transportu zprostředkovány tzv. SNARE komplexy (Gurunathan *et al.*, 2019), což jsou transmembránové proteiny zajišťující splynutí dvou membrán. Jeden typ komplexu se nachází na membráně transportovaného váčku (tzv. v-SNARE) a druhý je obsažený v cílové membráně (tzv. t-SNARE). Po dopravení váčku k cílové membráně se k sobě tyto dva komplexy vážou svými helikálními doménami a dochází k těsnému přiblížení obou membrán a následné fúzi (Rognien a Woodbury, 2003).



Obrázek 3: Biogeneze exosomů. Převzato a upraveno (Akbar *et al.*, 2019).

Exosomy obsahují různorodé bioaktivní cargo zahrnující rozpustné i membránově vázané proteiny, lipidy, DNA a RNA (mRNA, miRNA a další malé nekódující RNA), cytokiny, ionty, růstové faktory a transkripční faktory (Huang-Doran, *et al.*, 2017; Chivero *et al.*, 2021). Jednotlivé komponenty obsažené v exosomech pochází zejména z endosomů, cytosolu a plasmatické membrány původní buňky, v menší míře z jejího jádra, endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu (Gurunathan *et al.*, 2019). Obsah exosomů je velmi variabilní. Závisí na typu buňky, ze které pocházejí (Zhang *et al.*, 2019), a je ovlivňován fyziologickými i patofyziologickými stavy. Například sEV v krevním oběhu obézních jedinců mají zvýšenou hladinu perilipinu a pacienti s Alzheimerovou chorobou mají zvýšený obsah beta-amyloidu a fosfo-tau proteinu (Garcia-Martin *et al.*, 2022). Heterogenita exosomů může být ovlivněna rovněž stravou subjektu (diety, hladovění, sytost) (Mendivil-Alvarado *et al.*, 2022), cirkadiánními rytmy, hormony, fyzickou aktivitou, infekcí či stádiem buněčného cyklu (Pegtel a Gould, 2019). Má se za to, že specifický obsah exosomů by mohl mít vliv na jejich velikost (Pegtel a Gould, 2019).

2.2.2. Mikrovezikuly

Mikrovezikuly (MV) jsou membránové váčky různých tvarů (Borges *et al.*, 2013; Battistelli a Falcieri, 2020) pučící z plasmatické membrány. Jejich velikost se pohybuje od 150 nm do 1 μ m (Jeppesen *et al.*, 2019; Zaborowski *et al.*, 2015). Přesný mechanismus jejich biogeneze zatím není detailně prostudován, nicméně zahrnuje cytoskeletární komponenty (aktin a mikrotubuly), molekulárními motory (kinesiny a myosiny), SNARE komplexy (Doyle a Wang, 2019) a změny v hladinách vápníku (Camussi *et al.*, 2010).

Vzhledem ke způsobu jejich biogeneze obsahují MV mnoho proteinů a lipidů shodných s těmi, které se nachází v plasmatické membráně jejich mateřské buňky (Ratajczak *et al.*, 2006).

Jako markery MV jsou považovány flotillin-2, selektiny, integriny, metaloproteinázy, vysoká hladina fosfatidylserinu ve vnější vrstvě membrány (Borges *et al.*, 2013) a annexin A1 (Jeppesen *et al.*, 2019).

Vyjma jejich velikosti a způsobu biogeneze mají s exosomy mnoho společných vlastností. Rovněž obsahují proteiny, mRNA a miRNA a jsou zapojené do mezibuněčné komunikace (Borges *et al.*, 2013; Doyle a Wang, 2019).

2.2.3. Apoptotická tělíska

Apoptotická tělíska (z ang. apoptotic bodies, AB) jsou extracelulární vezikuly variabilní ve své velikosti, struktuře a obsahu, vznikající ve finální fázi programované buněčné smrti (Battistelli a Falcieri, 2020). Jejich formování probíhá oddělením plasmatické membrány od cytoskeletu v důsledku zvýšeného hydrostatického tlaku po kontrakci buňky (Doyle a Wang, 2019).

Oproti předešlým zmíněným druhům EV jsou AB mnohem větší (500 nm až 2 μ m) (Zaborowski *et al.*, 2015) a mohou obsahovat různé buněčné komponenty, především jaderné fragmenty, buněčné organely (Battistelli a Falcieri, 2020; Kakarla *et al.*, 2020; Ratajczak, 2020) a zbytky cytoplasmy (Hauser *et al.*, 2017).

Prostřednictvím AB a okolních fagocytů dochází k odstraňování buněčných zbytků (Battistelli a Falcieri, 2020).

Vzhledem k zatím neúplně ustálené nomenklatuře extracelulárních vezikul a k nedostatku stanovených specifických markerů pro jednotlivé subtypy se bude tato práce zabývat exosomy v rámci obecné skupiny „malých extracelulárních vezikul“ (sEV), definovaných svou velikostí do 200 nm.

2.3. Metody izolace sEV

Existuje více technik izolace sEV. Lze je izolovat jak z buněčného kondiciovaného média, tak z tělních tekutin (Zhang *et al.*, 2019) metodami jako je ultracentrifugace, ultrafiltrace, gelová chromatografie nebo precipitace (Gurunathan *et al.*, 2019).

Každý přístup má své výhody a nevýhody a jejich výběr je třeba přizpůsobit konkrétnímu typu vzorku (dle jeho původu, biofyzikálních a chemických vlastností) a jeho cílenému využití (Théry *et al.*, 2018; Gurunathan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

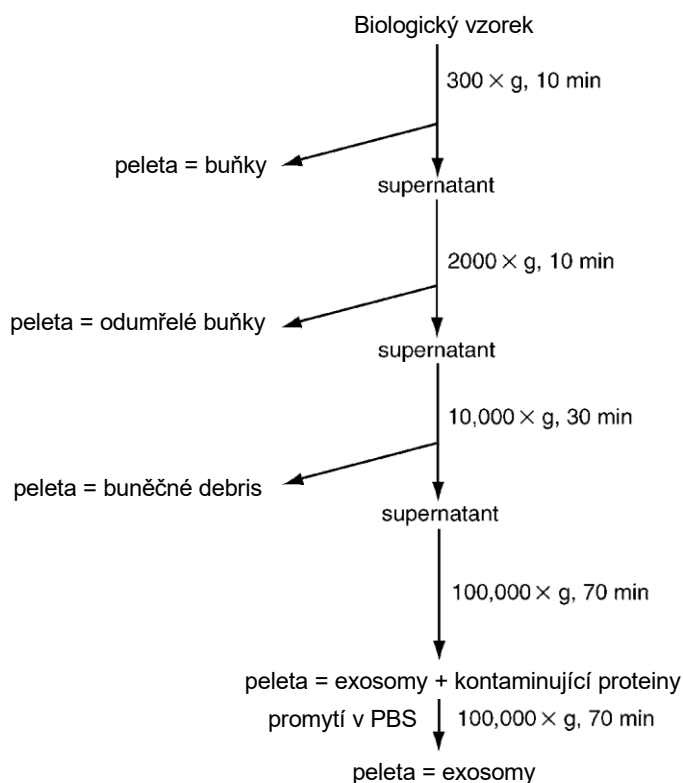
2.3.1. Ultracentrifugace

Nejstarší a nejpoužívanější metodu izolace sEV představuje ultracentrifugace (UC) (Akbar *et al.*, 2019). Existují dva typy UC, analytická a preparativní. Analytická UC je využívána pro analýzu fyzikálně chemických vlastností a molekulárních interakcí částic. Preparativní UC se používá k frakcionaci biologických komponentů, například k izolaci buněk z buněčného média, k izolaci virů, subcelulárních organel a sEV. Preparativní UC je dále dělena na diferenciální ultracentrifugaci a ultracentrifugaci s hustotním gradientem (Gurunathan *et al.*, 2019; Zemanová, 2018).

UC vyžaduje vysokou odstředivou sílu (Gurunathan *et al.*, 2019), většinou kolem 100,000 g (Théry *et al.*, 2006; Doyle a Wang, 2019). Výtěžek izolovaných sEV může být navýšen prodloužením doby centrifugace, avšak literatura zmiňuje, že centrifugace delší než 4 hodiny způsobuje signifikantní poškození sEV a zvýšenou kontaminaci vzorku rozpustnými proteiny (Doyle a Wang, 2019). Nevýhoda této metody izolace spočívá v nutnosti většího objemu vzorku (Doyle a Wang, 2019; Gurunathan *et al.*, 2019) a drahého vybavení (Nederveen *et al.*, 2021), na druhou stranu ale nevyžaduje příliš technických znalostí nebo náročnou přípravu vzorku (Akbar *et al.*, 2019; Doyle a Wang, 2019).

2.3.1.1. Diferenciální ultracentrifugace

Izolace pomocí diferenciální UC je založena na několika krocích, ve kterých dochází v závislosti na použité odstředivé síle k postupnému oddělování různě velikých struktur. V každém kroku je po centrifugaci odstraněn sediment a zachován supernatant, který se použije na následující stočení. Po několika centrifugacích, kdy dojde k odstranění velkých buněk či jejich částí, se finální supernatant stočí na 100,000 g. Po tomto kroku obsahuje stočená peleta malé částice odpovídající sEV. Peleta je promyta ve větším objemu roztoku PBS z důvodu odstranění kontaminujících proteinů a vzorek je znovu centrifugován při stejné rychlosti (Théry et al., 2006). Příklad diferenciální UC je zobrazen na obrázku 4.



Obrázek 4: Znárodnění principu diferenciální ultracentrifugace. Převzato a upraveno (Théry et al., 2006).

2.3.1.2. Ultracentrifugace s hustotním gradientem

Stejně jako diferenciální UC je tato metoda založena na separaci částic na základě velikosti a hustoty, avšak za přítomnosti předem připraveného hustotního gradientu, který je obvykle ze sacharózy. Do ultracentrifugační zkumavky se umístí hustotní gradient, který se převrší vzorkem. Působením centrifugační síly prochází částice vzorku hustotním

gradientem, který se zvyšuje směrem dolů, a usazují se v jednotlivých hustotních frakcích. sEV se typicky usazují v rozmezí 1,1 – 1,2 g/mL (Doyle a Wang, 2019). Touto metodou dochází k efektivnímu oddělení sEV od proteinových agregátů a dalších možných kontaminací (Théry *et al.*, 2006; Doyle a Wang, 2019).

2.3.2. Ultrafiltrace

Izolace metodou ultrafiltrace (UF) je založená na separaci částic v závislosti na jejich velikosti a molekulární hmotnosti. Izolace probíhá pomocí membránových filtrů, kterými jsou zadrženy částice větší než předem určená velikost, a menší částice prochází skrz do filtrátu. UF je oproti UC rychlá a finančně nenáročná a nevyžaduje speciální vybavení (Doyle a Wang, 2019; Gurunathan *et al.*, 2019). Nevýhodou může být ucpání a následné zachycení sEV na filtrovacím zařízení, čímž dochází ke snižování výtěžku sEV ve filtrátu (Doyle a Wang, 2019).

2.3.3. Gelová chromatografie

Princip metody gelové chromatografie (z ang. size exclusion chromatography. SEC) spočívá v dělení částic podle jejich velikosti a tvaru. Děje se tak pomocí kolony vyplněné gelem, který obsahuje ve své struktuře póry. Kolonou protéká konstantní rychlostí mobilní fáze. Částice větší než je gelový pór jsou touto mobilní fází unášeny kolonou. Částice s menší velikostí než je předem určený vylučovací limit protékají skrz póry, kudy mobilní fáze neprotéká, a prochází tak kolonou pomaleji. Částice se tedy eluují z kolony sestupně v závislosti na své velikosti (Sobotníková, 2004; Doyle a Wang, 2019). Výhodou této metody je zachování struktury, integrity a biologické aktivity sEV. Nevýhodou je časová náročnost metody (až několik hodin) a nízká kapacita pro vzorek (Doyle a Wang, 2019). SEC vykazuje oproti ostatním metodám izolace menší kontaminace výtěžku, avšak na úkor jeho kvantity (Nederveen *et al.*, 2021).

2.3.4. Precipitace sEV

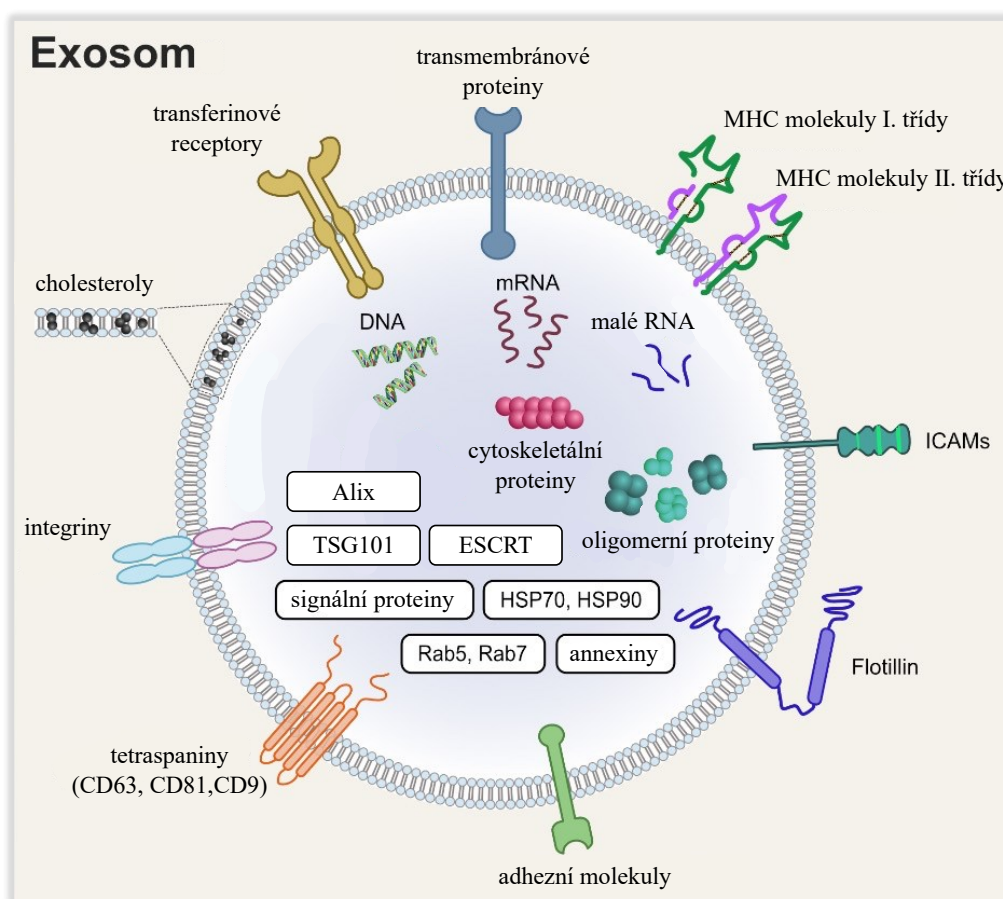
Tato metoda izolace spočívá v zachycení částic o velikosti 50 – 150 nm do sítě tvořené polymerem pomocí nízké odstředivé síly (Gurunathan *et al.*, 2019). Pro tento účel je jako polymer hojně využíván PEG. Výhoda této metody je jednoduchost postupu, technická

a nákladová nenáročnost a zároveň je vhodná pro vzorky jakéhokoliv objemu. Nevýhodou je možná kontaminace proteinovými agregáty (Doyle a Wang, 2019; Gurunathan *et al.*, 2019).

2.4. Obsah sEV

2.4.1. Proteiny v sEV

Proteiny obsažené v sEV mají typicky velmi rozmanité funkce (Zhang *et al.*, 2019) a zahrnují různorodou škálu cytosolických, membránových a cytoskeletálních proteinů pocházejících z mateřské buňky (Huang-Doran *et al.*, 2017) (obrázek 5).



Obrázek 5: Struktura a kompozice exosomů. Převzato a upraveno (Gurunathan *et al.*, 2019).

Heat shock proteiny (HSP70, HSP90) jsou součástí stresové odpovědi a podílejí se na prezentaci antigenů. Jiné proteiny jsou zahrnuté v procesu formování mikrovezikul a uvolňování exosomů (Alix a TSG101 v rámci ESCRT komplexu) nebo jsou zodpovědné za membránový transport a fúzi (annexiny a Rab proteiny) (Huang-Doran *et al.*, 2017; Pegtel a Gould, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Chivero *et al.*, 2021). Do exosomálních proteinů spadají

také molekuly podílející se na signální transdukcii (např. proteinkinázy, protein 14-3-3 a heterotrimerní G-proteiny). Exosomy obsahují rovněž MHC molekuly I. třídy (Théry *et al.*, 2002). Jednou z nejvíce zastoupených proteinových rodin v exosomech jsou tetraspaniny (CD9, CD63, CD81, CD82) (Huang-Doran *et al.*, 2017; Pegtel a Gould, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Chivero *et al.*, 2021), které interagují s mnoha dalšími proteiny včetně MHC molekul a integrinů a jsou zahrnuty do procesu organizace velkých molekulárních komplexů a membránových subdomén (Théry *et al.*, 2002). Podílí se mimo jiné také na fúzi váčků s cílovou buňkou. Jedná se o vezikulárně specifické proteiny, které se často používají jako markery sEV, respektive exosomů (Huang-Doran *et al.*, 2017; Pegtel a Gould, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Chivero *et al.*, 2021). Detekce těchto markerů je využívána pro potvrzení přítomnosti sEV ve vzorku, respektive pro zhodnocení čistoty vzorků sEV po jejich izolaci (Huang-Doran *et al.*, 2017).

Některé sEV proteiny se podílí na specifických funkcích mateřské buňky. Například exosomy antigen prezentujících buněk obsahují velké množství MHC molekul II. třídy a exosomy dendritických buněk obsahují protein CD86, což je molekula důležitá pro aktivaci T-lymfocytů. V exosomech byly rovněž objeveny transmembránové proteiny specifické pro daný typ buňky (Théry *et al.*, 2002). Některé proteiny jsou předpokládány potenciálními receptory zprostředkovávající příjem sEV, například TIM-1 a TIM-4 u B lymfocytů nebo ICAM-1 u antigen prezentujících buněk (Bunggulawa *et al.*, 2018).

Přesný mechanismus specifického třídění nákladu do exosomů je zatím neznámý, ale předpokládá se, že by k němu mohly přispívat kromě ESCRT komplexů také posttranslační modifikace proteinů jako je ubikvitinace či sumoylace (Guay a Regazzi, 2017).

2.4.2. Lipidy v sEV

Složení lipidových membrán exosomů se výrazně liší od složení plasmatické membrány jejich mateřských buněk. Obsahují větší množství sfingomyelinu, fosfatidylethanolaminu, cholesterolu a fosfatidylserinu (PS), a naopak méně diacylglycerolu a fosfatidylcholinu (Laulagnier *et al.*, 2004; Record *et al.*, 2014). PS je negativně nabitý lipid (Llorente *et al.*, 2013), který se běžně nachází ve vnitřní vrstvě plasmatické membrány. Výjimkou je jeho výskyt ve vnější vrstvě membrány například u apoptotických tělísek, kde slouží jako signál pro fagocyty (Fitzner *et al.*, 2011). U exosomů bylo objeveno náhodné umístění PS v obou vrstvách membrány (Fitzner *et al.*, 2011; Record *et al.*, 2014). Interakce PS s proteiny by mohla

být zapojena do formování exosomů (Llorente et al., 2013) a jeho zvýšená hladina ve vnější membráně by navíc mohla napomáhat příjmu exosomů recipientními buňkami (Fitzner et al., 2011). Vliv na biogenezi exosomů má rovněž cholesterol, který reguluje jejich sekreci z buňky (Yáñez-Mó et al., 2015). Zvýšená rigidita exosomů způsobená odlišnou kompozicí lipidové membrány by mohla přispívat k jejich odolnosti v extracelulárním prostoru (Yáñez-Mó et al., 2015; Zaborowski et al., 2015). K signalizační funkci sEV mohou rovněž přispívat bioaktivní lipidy transportované uvnitř váčků, jako je například kyselina arachidonová, prostaglandiny, cholesterol a ceramidy (Record et al., 2014; Yáñez-Mó et al., 2015; Zaborowski et al., 2015).

2.4.3. Nukleové kyseliny v sEV

Kromě proteinů jsou prostřednictvím exosomů mezi buňkami dopravovány rovněž různé druhy RNA, které by mohly cílovou buňku ovlivňovat prostřednictvím regulace genové exprese (Huang et al., 2013; Lässer, 2012; Zhang et al., 2015). Jejich délka bývá převážně kratší než 200 nukleotidů (Zaborowski et al., 2015). RNA profil v exosomech se od RNA profilu mateřské buňky liší, což poukazuje na to, že balení RNA do exosomů je selektivní proces (Huang et al., 2013; Lässer, 2012; Zhang et al., 2015).

Podle analýz sekvenování RNA jsou v exosomech vyizolovaných z plasmy nejhojněji zastoupené microRNA (miRNA) (Zhang *et al.*, 2019). Dalšími zastoupenými jsou mRNA, dlouhé nekódující RNA, ribosomální RNA (Yáñez-Mó et al., 2015) nebo například snRNA a tRNA (Pegtel a Gould, 2019).

Bylo dokázáno, že mRNA transportovaná exosomy může být v recipientní buňce translatovaná do proteinů (Lässer, 2012; Valadi et al., 2007). Velké pozornosti se v posledních letech dostává miRNA, která má regulační roli v genové expresi a je považována za klíčový funkční element v sEV obsahu. Její zastoupení se liší nejen v sEV jednotlivých druhů buněk, ale je závislé rovněž na různých fyziologických podmínkách (Zhang et al., 2015).

sEV obsahují také fragmenty DNA, ale její funkce zatím není přesně popsána a vyžaduje další studium (Kalani *et al.*, 2014; Zaborowski *et al.*, 2015).

2.5. Signalizační funkce sEV

sEV hrají důležitou roli v mezibuněčné komunikaci (Février a Raposo, 2004; Lässer, 2012; Gurunathan *et al.*, 2019). Mohou být sekretovány prakticky jakoukoliv eukaryotickou buňkou (Yáñez-Mó *et al.*, 2015; Zaborowski *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). Po jejich uvolnění z mateřské buňky cirkulují extracelulárním prostorem a regulují fyziologické procesy v recipientních buňkách (Zhang *et al.*, 2015). Jejich malé rozměry a membránová kompozice jim umožňuje překonávání biologických bariér jako je například HEB (Gurung *et al.*, 2021; Haney *et al.*, 2015).

K signalizaci může docházet vícero způsoby, například stimulací okolních buněk povrchovými ligandy nebo transportem svého obsahu (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny či patogenní částice) mezi buňkami (Ratajczak *et al.*, 2006; Camussi *et al.*, 2010; Zhang a Yang, 2018).

Obsah je v sEV chráněn před degradací a je rychle přijímán různými orgány. Poločas cirkulujících sEV byl intravenózním vpravením značených sEV do myši vyhodnocen na přibližně 2 minuty, ale některé sEV byly detekovatelné ještě hodiny po jejich aplikaci (Guay a Regazzi, 2017). Na základě výsledků z myších studií závisí distribuce sEV na způsobu jejich podání. Po orálním podání sEV docházelo k jejich příjmu většinou orgánů včetně jater, plic, ledvin, slinivky, sleziny, vaječníků, střeva a mozku, avšak po intravenózním podání byly sEV přijímány především játry. Transport a distribuce je rovněž ovlivňována velikostí vezikul, například větší sEV se akumuluje především v kostech, lymfatických uzlinách a v játrech. Důležitou roli ve funkci sEV jako mezibuněčných posílů hraje jejich specifická distribuce do cílových buněk. Ta je zprostředkována povrchovým složením sEV (Gurung *et al.*, 2021). Například sEV sekretované buňkami neuroblastomu, které obsahují na svém povrchu CD63, jsou vychytávány neuronálními výběžky. sEV, které CD63 neexpronují, jsou vychytávány celými neurony a gliovými buňkami zároveň (Laulagnier *et al.*, 2004). Dalším příkladem je glykoprotein RVG, který specificky interaguje s acetylcholinovým receptorem a zprostředkovává doručení sEV do mozku (Gurung *et al.*, 2021).

Počet, velikost, obsah a membránové složení sEV mohou být odlišné v závislosti na buňce jejich původu, na jejím aktuálním stavu a environmentálních podmínkách (Yáñez-Mó *et al.*, 2015; Zaborowski *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). Výlev sEV může být ustálený anebo stimulovaný různými faktory jako jsou rozpustní agonisté a fyzikální nebo chemický stres (např. ozáření, oxidační stres, hypoxie) (Ratajczak *et al.*, 2006). Biogeneze a sekrece

exosomů může být ovlivňována rovněž buněčným metabolickým statutem (např. metabolismem ceramidů, stresem ER, autofágií a intracelulárním vápníkem) (Kita *et al.*, 2019). Změny velikostí sEV, jejich počtu a obsahu byly zaznamenány rovněž v souvislosti se změnami BMI, hladinou insulinu, glukózy a triglyceridů v krvi nebo nadměrným objemem tělesného tuku (Mendivil-Alvarado *et al.*, 2022). Regulační efekt má rovněž glukagon a adiponektin. Tyto poznatky naznačují, že biogeneze sEV je metabolicky regulovaný proces (Kita *et al.*, 2019). Zároveň by se sEV mohly podílet na fyziologických procesech, které odpovídají na koncentrační změny dostupných živin v organismu (Crewe *et al.*, 2018; Mendivil-Alvarado *et al.*, 2022).

Jelikož jsou sEV uvolňované z rozmanitých druhů buněk procházejícími různými buněčnými fázemi a fyziologickými či patofyziologickými stavy, vykazují mnoho rozdílných funkcí. Důležitou roli hrají při koagulaci (Camussi *et al.*, 2010), prezentaci antigenů, regeneraci tkání (Bang a Thum, 2012), angiogenezi, apoptóze (Gurunathan *et al.*, 2019) a účastní se různých stádií zánětu přenosem protizánětlivých či prozánětlivých faktorů (Camussi *et al.*, 2010). sEV jsou rovněž součástí mezibuněčné signalizace při patofyziologických stavech, například zvýšené hladiny sEV sekretované z epitelálních buněk byly zaznamenány v souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním (Camussi *et al.*, 2010). Změny v koncentraci sEV byly zaznamenány rovněž v souvislosti s obezitou. Studie předkládají, že koncentrace sEV v plasmě obézních jedinců je oproti koncentraci neobézních jedinců vyšší (Eguchi *et al.*, 2016; Heinrich *et al.*, 2015; Pardo *et al.*, 2018; Stepanian *et al.*, 2013). Výsledky studií naznačují, že po následném navození redukční diety či zavedením pravidelné fyzické aktivity a snížením BMI u obézních subjektů dojde k opětovnému poklesu koncentrace plasmatických EV (Eguchi *et al.*, 2016; Murakami *et al.*, 2007), což je přikládáno snížení obsahu tukové tkáně (Campello *et al.*, 2016). V souladu s tím vyšla i studie, která popisuje, že tuková tkáň je největším přispěvatelem sEV v krvi (Thomou *et al.*, 2017).

Analýzy sEV pocházejících z tukové tkáně obézních subjektů vykazují oproti kontrolám pozměněnou expresi miRNA (Ferrante *et al.*, 2015), proteinů (Lee *et al.*, 2015) a adipokinů. Například hladina adiponektinu byla u obézních subjektů v porovnání s kontrolami snížena (Phoonsawat *et al.*, 2014) a koncentrace perilipinu A, který byl označen jako biomarker sEV tukové tkáně, byl v sEV obézních subjektů zvýšen (Eguchi *et al.*, 2016).

sEV sekretované tukovou tkání obézních *ob/ob* myší jsou vycytávány monocyty v periferní krvi a způsobují jejich diferenciaci v aktivované makrofágy. Toto pozorování dokazuje četnou interakci tukové tkáně a imunitních buněk prostřednictvím sEV, a naznačuje

tak podíl sEV na rozvoji zánětů a inzulínové rezistence při obezitě (Deng et al., 2009). Tuto teorii potvrzuje i studie z roku 2014, kde exosomy sekretované makrofágy tukové tkáně obézních myší způsobovaly po jejich vpravení do hubených myší glukózovou intoleranci a inzulínovou rezistenci. Naopak exosomy sekretované makrofágy tukové tkáně hubených myší měly po vpravení do obézních myší opačný efekt (Santovito et al., 2014).

Do budoucna představují sEV potenciální klinické biomarkery různých onemocnění, např. kardiovaskulárního, renálního a neurodegenerativního, poruch lipidového metabolismu, nádorů nebo například chronického zánětu (Zhang *et al.*, 2019).

2.6. Dietní intervence a hladovění

Příjem základních živin v podobě energetických zdrojů, organických látek, minerálů, vitaminů a vody je nezbytný pro udržení fyziologických procesů a stálosti vnitřního prostředí organismu. Při nedostatku specifických makromolekul a negativní energetické bilanci dochází k aktivaci behaviorálních, fyziologických a biochemických reakcí, které organismu umožňují udržení homeostázy a přežití v rámci využití endogenních energetických zásob (Brandhorst a Longo, 2016; Secor a Carey, 2016), především z tukové tkáně a částečně ze svalů (Nencioni et al., 2018). Schopnost organismu přizpůsobit se změnám metabolické a energetické dostupnosti je nazývána jako metabolická flexibilita (Goodpaster a Sparks, 2017; Olenick, 2017; Tinius *et al.*, 2020). Neschopnost této reakce (tzv. metabolická nepružnost) může mít vliv na poruchu metabolismu glukózy a vznik inzulínové rezistence a je spojena s metabolickým onemocněním, diabetem 2. typu, obezitou, kardiovaskulárním onemocněním či rakovinou (Olenick, 2017; Smith et al., 2018; Tinius et al., 2020). Literatura uvádí, že obézní jedinci mají oproti hubeným výrazně sníženou schopnost adaptovat metabolismus mastných kyselin na podmínky hladovění, stimulaci inzulínem (Kelley et al., 1999) i vysokotučné diety (Battaglia et al., 2012).

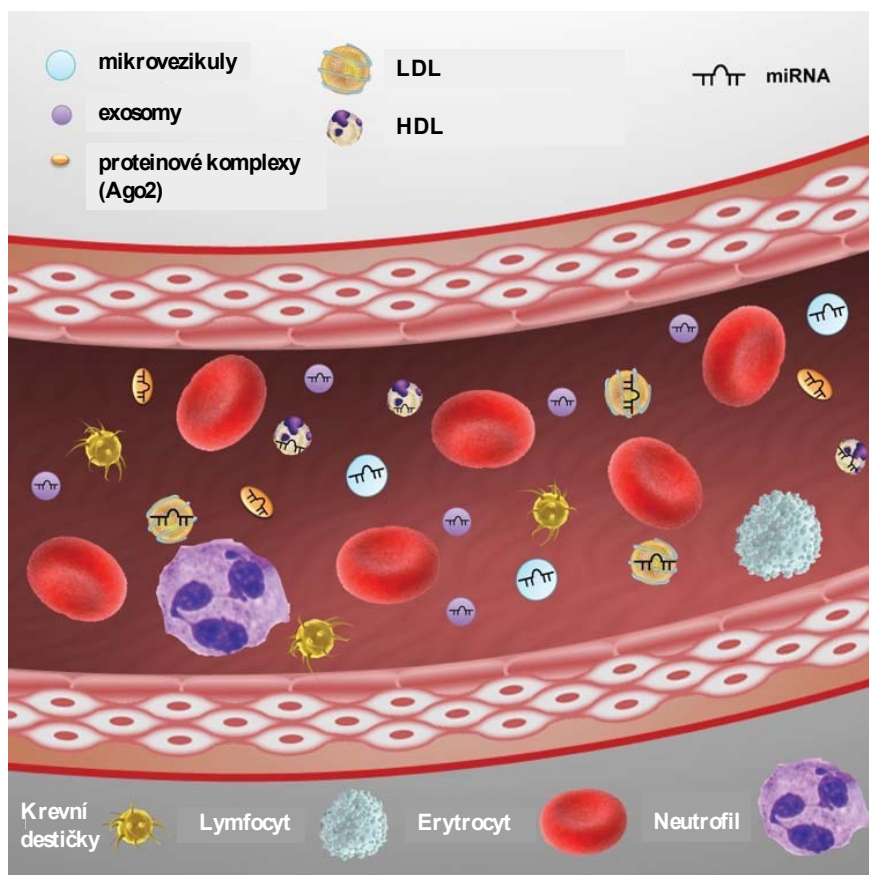
Ačkoliv dlouhodobá absence příjmu potravy je škodlivá pro zdraví i výkonnost organismu, částečná redukce příjmu potravy či krátkodobé hladovění může mít naopak účinky pozitivního charakteru. V posledních letech jsou dietní intervence intenzivně zkoumány v souvislosti s jejich vlivem na zdraví a prevenci některých onemocnění (Brandhorst a Longo, 2016; Nencioni *et al.*, 2018; Plotti *et al.*, 2020; Gudden *et al.*, Bloemendaal, 2021). Nejčastějšími typy dietních intervencí je kalorická restrikce, přerušovaný půst, hladovění nebo specifické diety se zvýšeným či sníženým obsahem určité složky potravy (například

nízkosacharidová či vysokotučná dieta) (Brandhorst a Longo, 2016). Kalorická restrikce je definována jako snížení energetického příjmu o 20–30 % (Brandhorst a Longo, 2016; Nencioni *et al.*, 2018). V dostupné literatuře je uvedeno množství pozitivních účinků kalorické restrikce, jako je například snížení oxidačního stresu (Youngman, 1993) a hladin cholesterolu, triglyceridů a prozánětlivých cytokinů v krvi (Mahoney *et al.*, 2006). Zároveň je asociována s prevencí aterosklerózy, diabetu, obezity (Paoletti *et al.*, 2006), kardiovaskulárního onemocnění (Nencioni *et al.*, 2018) a rakoviny prsu (Levine *et al.*, 2014). Přerušovaný půst je definován absencí kalorického příjmu po dobu 12–48 hodin, který je prokládán běžným příjmem potravy (Gudden *et al.*, 2021). V klinických studiích byly publikovány výsledky naznačující pozitivní efekt přerušovaného půstu na epilepsii, Alzheimerovu chorobu a další neurologické poruchy (Gudden *et al.*, 2021). Hladovění je charakterizováno absencí jídla delší než 48 hodin (Brandhorst a Longo, 2016). Ve studiích provedených na myších jsou účinky hladovění spojovány se zlepšenými regeneračními účinky kosterního svalstva, pankreatických beta buněk i v rámci hematopoetického a nervového systému (Nencioni *et al.*, 2018).

2.7. Extracelulární miRNA a její změny v expresi

MicroRNA (miRNA) je nekódující RNA o délce 19–24 nukleotidů. Funkce miRNA spočívá v regulaci genové exprese navázáním na cílovou mRNA, po kterém dochází k inhibici tvorby proteinových produktů (MacFarlane a Murphy, 2010) a ovlivňování stability a degradace mRNA (Landrier *et al.*, 2019). Bylo popsáno více než 1000 lidských miRNA (Hu *et al.*, 2012) a předpokládá se, že každý druh miRNA může interagovat až s 200 druhy mRNA (Krek *et al.*, 2005). V tělních tekutinách se miRNA vyskytují buď uložené ve váčcích (exosomech, mikrovezikulech nebo apoptotických tělíscích), anebo jsou asociované s proteiny, především s AGO2 nebo s HDL (O'Brien *et al.*, 2018; Zampetaki *et al.*, 2012) (obrázek 6). Uložení miRNA v EV umožňuje jejich cirkulaci v tělních tekutinách s ochranou před degradačním působením ribonukleáz (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

miRNA hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech jako je buněčná proliferace, apoptóza, vývoj CNS a diferenciací tkání, ale rovněž i v patologických procesech (Ross *et al.*, 2014; Landrier *et al.*, 2019; Giardina, 2019). Extracelulární miRNA jsou tedy hojně popisovány jako potenciální neinvazivní biomarkery různých onemocnění (O'Brien *et al.*, 2018) a manipulace s miRNA v exosomech proto může být do budoucna účinným nástrojem pro cílenou léčbu různých onemocnění (Hu *et al.*, 2012).



Obrázek 6: miRNA cirkulující v krvi. Převzato a upraveno (Zampetaki et al., 2012).

Aberantní exprese miRNA je spojována s patofyziologickými stavy. Například upregulace *miR-21* je asociována mimo jiné s vývojem rakoviny prsu, vaječníku a střeva. Pozměněné hladiny *miR-34b* a *miR-34c* jsou spojovány s vývojem Parkinsonovy choroby (Hu et al., 2012) a zvýšené hladiny *miR-1*, *miR-21*, *miR-133a*, and *miR-208* jsou asociovány s infarktem myokardu (Iacomino a Siani, 2017).

Bylo zjištěno, že miRNA jsou zapojeny i do regulace vývoje a metabolismu tukové tkáně a sekrece inzulinu, což naznačuje, že jejich pozměněná exprese může být spojena se vznikem metabolických onemocnění (Landrier et al., 2019). Bylo potvrzeno, že exosomální miRNA profily u pacientů s diabetem druhého typu jsou oproti těm u zdravých jedinců pozměněny (Pan et al., 2019). Jedná se například o snížení exprese *miR-126* (Iacomino a Siani, 2017). S regulací inzulinové senzitivity a glukózové homeostázy by měla být spojena také *miR-155* (Pan et al., 2019). Exprese *miR-122* je zvýšena při jaterní steatóze, *let-7e* při hypertenzi a *miR-130a* a *miR-195* jsou spojovány s vysokým tlakem (Iacomino a Siani, 2017).

Několik na sobě nezávislých studií, které zkoumaly expresi miRNA spojenou s obezitou a metabolickým syndromem, zaznamenaly odlišné exprese *miR-17-5p* (Heneghan et al., 2011;

Karolina et al., 2012; Klöting et al., 2009) a *miR-132*. Exprese těchto miRNA negativně koreluje s hodnotami BMI subjektů (Heneghan et al., 2011; Klöting et al., 2009) a jejich snížené hladiny jsou spojovány s inzulínovou rezistencí (Klöting et al., 2009). Usuzuje se, že *miR-17-5p* hraje roli v diferenciaci adipocytů (Wang et al., 2008) a *miR-132* se podílí na regulaci glukózové a energetické homeostázy (Heneghan et al., 2011; Klöting et al., 2009).

Dalšími miRNA s odlišnou expresí u lidských subjektů s metabolickým syndromem jsou *miR-197*, *miR-509-5p*, *miR-92a* a *miR-320a*, jejichž hladiny korelují s hodnotami BMI a krevního tlaku (Karolina et al., 2012) a *miR-134*, *miR-181a*, *miR-27a*, *miR-30e*, *miR-140*, *miR-147*, *miR-155*, *miR-197* a *miR-210*, spojované s dysfunkcí tukové tkáně a vývojem obezity (Klöting et al., 2009).

Zajímavé zjištění bylo, že miRNA hojně exprimované při adipogenezi (*miR-103*, *miR-107* a *miR-143*), které by tedy potenciálně mohly mít stimulační vliv na vývoj tukových buněk, byly u obézních myši značně sníženy. Naopak miRNA, jejichž exprese je při adipogenezi snížena (*miR-222*, *miR-221*), byly u obézních zvýšeny (Xie et al., 2009).

S rozvojem obezity u myši je rovněž asociovaný nárůst exprese *miRNA-34a*. Myši, které měly tento gen v tukové tkáni vyřazený, vykazovaly odolnost vůči obezitou navozené glukózové intoleranci a inzulínové rezistenci (Pan et al., 2019).

Některé studie poukázaly na to, že miRNA exprese se mění také v závislosti na nutričních intervencích jako je hladovění či kalorické restrikce (Khanna et al., 2011; Olivo-Marston et al., 2014; Ozorhan et al., 2022; Shastri et al., 2020). Myši, které hladověly po dobu 24 hodin, měly signifikantně zvýšenou expresi několika zástupců miRNA z rodiny *miR-29* a *miR-30* (Shastri et al., 2020). U lidských subjektů byla po kalorické restrikci signifikantně snížena hladina *miR-361* (S.Giardina et al., 2019). V návaznosti na 10 denní snížený kalorický příjem (250 kcal/den) byly zaznamenány odlišné hladiny 7 miRNA, a to *miR-19b-3p*, *miR22-3p*, *miR-122-5p*, *miR-126-3p*, *miR-142-3p*, *miR-143-3p* a *miR-145-5p* (Ravanidis et al., 2021).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1) Zavedení protokolu izolace sEV z lidské plasmy pomocí PEG a ultracentrifugy v rámci klinické studie „DELISA“

2) Analýza miRNA exprese v sEV izolovaných z lidské plasmy:

Porovnání miRNA exprese mezi skupinou hubených a obézních subjektů

- a) v bazální podmínce (D0)
- b) v podmínce po 60 h hladovění (D3)

Analýza změny miRNA exprese v důsledku 60 h hladovění

- a) u všech subjektů bez ohledu na BMI
- b) ve skupině hubených
- c) ve skupině obézních

4. METODY

4.1. Klinická studie a vyšetřovací protokol

V rámci této diplomové práce byly zpracovány biologické vzorky ze studie DELISA (De Novo Lipogenesis and Insulin Sensitivity in Obese, číslo grantu NV19-01-00263), která je registrovaná pod číslem NCT04260542 (ClinicalTrials.gov). Do studie bylo zapsáno 44 zdravých žen rozdělených na základě BMI do dvou skupin: hubené ($18 < \text{BMI} < 25$) a obézní ($\text{BMI} < 30$). Kompletní protokol dokončilo 39 žen, z toho 22 ze skupiny hubených ($\text{BMI} = 21,49 \pm 0,41$) a 17 ze skupiny obézních ($\text{BMI} = 33,7 \pm 0,96$).

Vyšetřovací protokol se skládal ze 3 návštěv ve zdravotnickém zařízení a zahrnoval odběry subkutánní tukové tkáně a tělních tekutin. První odběr (D0) představoval bazální podmínku. Druhý odběr (D3) následoval po 60 h hladovění pod stálým dohledem zdravotnického personálu. Poslední odběr (D5) proběhl po 48 h fáze „refeedingu“. V rámci odběrů bylo mým úkolem zpracovat vzorky plasmy v odběrový den D0 a D3 a provést následnou analýzu miRNA z izolovaných sEV ze vzorků plasmy.

4.2. Selektce vzorků

Analýza sEV z plasmy může být ovlivněna přítomností vezikulů v důsledku rozpadu červených krvinek (=hemolýza) při jednotlivých odběrech krve. Dle dostupné literatury je hemolýzou ovlivněno až 65 % detekovatelných miRNA v plasmě. Změna exprese miRNA se může projevit dříve, než se hemolýza ve vzorku projeví viditelnou změnou barvy (Shah et al., 2016). Z důvodu hemolýzy u jednotlivých odběrů bylo nutné některé vzorky před miRNA analýzou vyřadit.

Selektce vzorků proběhla ve třech postupných krocích: (1) vizuální, (2) spektrofotometrický a (3) na základě exprese 2 specifických miRNA rutinně používaných k určení hemolýzy.

4.2.1. Optické zhodnocení

Vzorky byly opticky vyhodnocovány jako žluté, růžové a červené. Vyřazeny byly subjekty, které měly viditelně růžově či červeně zbarvené vzorky plasmy z alespoň dvou podmínek.

4.2.2. Spektrofotometrická selekce

Druhý krok selekce byl prováděn spektrofotometricky pomocí zjištění koncentrace hemoglobinu, který má absorpční spektrum při 415 nm. Zvětšená hodnota absorbance při této vlnové délce koreluje se zvýšenou koncentrací volného hemoglobinu (Huynh et al., 2017; Kirschner et al., 2013). Měřeno bylo celé spektrum vlnových délek, ze kterých pak byly použity hodnoty absorbancí třech vlnových délek, a to 380 nm, 415 nm a 450 nm. Jedná se o metodu Harboe, která pomocí těchto 3 hodnot koriguje výsledek od možných interferencí ostatních látek v tomto absorpčním spektru (nespecifické plazmatické interference, komplexy bilirubin/albumin). Koncentrace hemoglobinu byla posuzována po dosažení daných hodnot do následujícího vzorce (Cookson et al., 2004). Hodnota byla následně vynásobena mírou naředění vzorku. Všechny vzorky, které měly koncentraci hemoglobinu menší než 0,5 g/l, postoupily do dalšího kola vyřazování.

$$Hb [g/l] = \frac{k * (167,2 * A_{415} - 83,6 * A_{380} - 83,6 * A_{450})}{1000}$$

$k = \text{calibration coefficient} = 1$

Na základě literatury byl vzorek plasmy 3x naředěn v PBS a měřen v nanášeném množství 1,5 ul. Měření probíhalo na přístroji *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (THERMO Scientific) po jeho zkalibrování roztokem PBS.

4.2.3. Detekce hemolýzy pomocí metody qPCR

Třetí krok selekce probíhal metodou qPCR, pomocí které byl měřen rozdíl Ct dvou miRNA, *miR-451a* a *miR-23a-3p*. Vzorky s rozdílem větším než 7 byly vyhodnoceny jako hemolytické a byly vyloučeny. Jedná se o nejcitlivější metodu detekce hemolýzy, s přesností až do 0,001% (Shah et al., 2016). Technické provedení bude zmíněno dále.

4.3. Izolace sEV

4.3.1. Zpracování vzorku krve

9 ml plné krve bylo stočeno v odběrové EDTA zkumavce (Vacuette) na stolní centrifuze (Eppendorf 5804 R) za podmínek 1000 g/10 min/4 °C. Plasma byla následně přemístěna do 5ml zkumavky a znovu stočena na 3000 g/20 min/4 °C. Takto zpracovaná plasma byla rozdělena do aliquot po 450 ul pro další použití.

4.3.2. Izolace sEV z plasmy

Protokol izolace sEV byl optimalizován na základě článku (Ludwig *et al.*, 2018). Byla zvolena metoda izolace sEV pomocí PEG, která dle autorů vykazuje vyšší výtěžky než jiné metody a lepší reprodukovatelnost. Na základě výsledků NTA analýzy provedenou autory článku byl v této diplomové práci využit PEG8000 s finální koncentrací 10 %, pomocí kterého byl oproti ostatním testovaným koncentracím vyizolován nejvyšší počet částic. Peleta byla rozpouštěna v 0,9% roztoku NaCl. NaCl je na rozdíl od roztoku PBS dobře rozpustný ve vodě a neformuje se do nano- až mikrokrytálků, které mohou být detekovány metodou NTA společně s sEV, a zkreslovat tak výsledky měření.

Ve zkumavce s maximálním objemem 650 ul bylo smícháno 440 ul zpracované plasmy s 146,7 ul 40% PEG8000. Směs byla v ruce jemně protřepána, aby bylo docíleno plného promíchání. Vzorky byly následně umístěny do lednice na HulaMixer™ a točeny přes noc při 4 °C.

Další den byl vzorek stočen 3000 g/20 min/4 °C. Po stočení byl získán precipitát obsahující sEV/PEG/proteiny a plasma zbavená sEV. 100 ul plasmy bylo odebráno na kontrolu účinnosti PEG precipitace a zbytek supernatantu byl odstraněn. Precipitát byl následně rozpuštěn ve 420 ul 0,9% NaCl přehřátého na 37 °C. Rozpuštění probíhalo v bločku (Thermo shaker TC-100C) po dobu 50 minut při 37 °C a 900 RPM. Vzorek sEV ve fyziologickém roztoku byl rozdělen na dvě poloviny. Jedna polovina byla určena na ultracentrifugaci a druhá polovina byla rozdělena do několika aliquot podle následných analýz: 200 ul na izolaci miRNA, 5 ul na měření NTA a 2,5 ul na stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.

4.3.3. Ultracentrifugace

Vzhledem k vysokému množství proteinů ve vzorku sEV po PEG8000 izolaci bylo nutné před následnými proteinovými analýzami (ELISA, Luminex, western blot) tyto proteiny odmýt pomocí ultracentrifugace.

Polypropylenová ultracentrifugační zkumavka s maximálním objemem 14 ml (Beckman coulter) byla naplněna 12,5 ml 0,9% NaCl a následně převrstvena vzorkem obsahujícím sEV/PEG/proteiny, rozpuštěným ve 250 ul 0,9% NaCl. Zkumavky byly vyváženy na setiny gramu přidáním adekvátního množství 0,9% NaCl a umístěny do uzavíratelných kovových závěsů určených pro SW40Ti rotor.

Vzorky byly stáčeny na 4 °C chlazené ultracentrifuze Optima L-100XP (Beckman Coulter) při průměrném přetížení 120 000 g po dobu 3,5 h. Po stočení byl supernatant odstraněn a peleta byla rozpuštěna ve 250 ul 0,9% NaCl. 20 ul vzorku bylo použito na charakterizaci sEV a zbytek byl uložen do -80 °C na Luminex a ELISA analýzy, které nejsou součástí diplomové práce.

4.4. Stanovení koncentrace proteinů – metoda BCA

Pro stanovení koncentrace proteinů byl použit komerční kit „*Pierce BCA Protein Assay Kit*“ (Thermo SCIENTIFIC). Metoda pracuje na principu fotometrického měření modro-fialových komplexů sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA) s ionty Cu^{1+} , které vznikají redukcí Cu^{2+} při vazbě na protein, tzv. biuretické reakci. Množství těchto komplexů přímo úměrně odpovídá koncentraci proteinů.

Do mikrotitrační destičky byly napipetovány standardy hovězího sérového albuminu (BSA) dle rozpisu (tabulka 1) a vzorky 20x naředěné destilovanou vodou v duplikátech. Následně bylo do všech jamek přidáno 100 ul pracovního roztoku reagentů A a B smíchaného v poměru 50:1. Poté byla destička vložena do spektrofotometru VersaMax, kde byla promíchána a nechala se inkubovat při 37 °C 15 minut. Měření proběhlo při vlnové délce 562 nm. Data byla vyhodnocena programem SoftMax Pro a následně dosazena do kalibrační křivky získané měřením standardů.

BSA [ug]	ddH ₂ O [ul]	BSA (2ug/ul) [ul]
0	15	0
5	12,5	2,5
10	10	5
20	5	10

Tabulka 1: Rozpis ředění jednotlivých bodů standardu BSA

4.5. Charakterizace sEV

4.5.1. NTA analýza

Metoda NTA měří počet a velikosti nanočástic zastoupených ve vzorku, a to v rozmezí od 50 nm do 1 μ m. Vzorek je osvětlen světelným paprskem, který je částicemi daného vzorku rozptýlen a následně shromažďován optickým mikroskopem. Toto světlo je vizualizováno přístrojem a zobrazováno jako světlé body pohybující se Brownovým pohybem. Pohyby částic jsou zaznamenávány v jednotlivých videosekvencích a výsledky měření jsou zpracovávány pomocí softwaru pro analýzu obrazu (Van Der Pol et al., 2010). Pro měření NTA analýzy byly použity sEV po PEG8000 izolaci rozpuštěné ve 250 μ l 0,9% NaCl. Analýza všech vzorků byla provedena na přístroji NanoSight NS 3000 (Malvern Panalytical).

Přístroj byl před prvním měřením propláchnut fyziologickým roztokem. Pro vlastní měření byl připraven 1 ml 1000x zředěného roztoku sEV a po intenzivním promíchání byl vzorek vpraven stříkačkou do hadičky přístroje tak, aby nevznikly bubliny. V programu byla zvolena stálá teplota 37 °C a rychlost infuze 50. Po zapnutí kamery se vyčkalo na správný proud vzorku a zaostřil se obraz. Celkem byly zaznamenávány 4 videosekvence po 45 sekundách. Po každém pátém vzorku bylo potřeba přístroj rozebrat, opláchnout destilovanou vodou a otřít neprašnými ubrousky.

4.5.2. Detekce povrchových markerů

sEV mají dle dostupné literatury povrchové markery detekovatelné pomocí dvou metod, nepřímou (ELISA, FACS) a pomocí elektroforetického rozdělení proteinů (elektroforéza, western blot). Analýza proteinů probíhala v rámci této diplomové práce pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následného western blotu.

4.5.2.1. SDS-PAGE Elektroforéza

Elektroforetická metoda pracuje na principu separace proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS. SDS proteiny obaluje, a zajišťuje tak jejich záporný náboj. V přítomnosti elektrického proudu putují záporně nabitě proteiny směrem k anodě rychlostí závislé na jejich velikosti. Menší proteiny se v gelu pohybují rychleji než proteiny s delším polypeptidovým řetězcem, a dochází tak k jejich rozdělení. Koncentrace polyakrylamidového gelu je určována podle velikosti zkoumaných proteinů.

K elektroforéze byla použita aparatura *Mini PROTEAN Tetra Cell* (Biorad). Do sestavených skel na SDS Page elektroforézu byl nalit 12% rozdělovací gel, který byl pro zarovnání přelitý isopropanolem a ponechán 20 minut zatusnout. Poté byl isopropanol slit a 12% gel byl převrstven 5% zaostřovacím gelem, do kterého byl vložen hřebínek s 10 jamkami a šířkou 1 mm.

Vzorky izolovaných sEV byly smíchány s 5x SDS a nechaly se povařit při 95 °C po dobu 10 minut. Nanášeny byly v množství 21 ul/jamku.

Elektroforéza běžela 1h při konstantním napětí 130V v running pufru. K určení velikosti proteinů byly použity 4 ul obarveného standardu *PageRuler Plus „26619“* (Thermo Fisher).

4.5.2.2. Western Blot

Pro detekci proteinů pomocí protilátek je nezbytný transfer proteinů na membránu. Vzhledem k malé velikosti detekovaných proteinů byl použit polosuchý western blot (Biorad), který umožňuje díky své ploše přenos z více gelů najednou.

Po dokončení elektroforézy byl gel oříznut podle požadované velikosti sledovaných proteinů (17-36 kDa) a vložen na 15 minut do blotovacího pufru na ekvilibraci. Proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Amersham Hybond ECL, Life Science) při napětí 16 V a proudu 2 mA na 1cm² membrány po dobu 2 hodin. K blotování byla použita aparatura *Trans-blot SD semi-dry transfer cell* (BIO-RAD).

Po dokončení western blotu byla membrána obarvena v roztoku Ponceau S pro primární kontrolu přenosu proteinů. Následně byla membrána 1x promyta v roztoku TBS a skalpelem rozříznuta na požadované části určené k následné inkubaci v daných protilátkách. Poté byly membrány v TBS kompletně odmyty od barvení Ponceau S a blokovány v roztoku 5% BSA po dobu 1 hodiny. Následovalo promytí membrán v TBS.

Inkubace membrány s primárními protilátkami CD9 a CD81 probíhala přes noc při pokojové teplotě. Protilátky byly naředěny v roztoku 2,5% BSA s TBS v poměru 1:200.

Následující den byla membrána 3x promyta v TBS a inkubována po dobu 1 hodiny se sekundární protilátkou v roztoku 2,5% BSA s TBS v poměru 1:5000. Poté byla membrána opět 3x promyta v TBS. Pro vyvolání membrány chemiluminiscenční metodou byl použit komerční kit „*Pierce ECL Western Blotting Substrate*“ (Thermo Scientific) a přístroj *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BIO-RAD). Před vyvoláním byl na membránu napipetován roztok z ECL kitu (*Solution 1* a *Solution 2* v poměru 1:1). Následně byly proteiny vizualizovány na základě chemiluminiscence.

4.6. miRNA analýza

4.6.1. Izolace miRNA

K izolaci miRNA z sEV byl použit komerční kit „*Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit*“ (Invitrogen) s drobnými modifikacemi v postupu na základě testovacích izolací. Pro ověření kvality izolace miRNA byl do denaturačního roztoku izolačního kitu přidán Spike-in mix (Qiagen): směs tří sekvencí (UniSp2, UniSp4, UniSp5) odlišných od endogenních miRNA.

Před začátkem izolace miRNA z sEV bylo nutné smíchat denaturační činidlo s beta-ME (finální koncentrace 1% beta-ME) a rozpuštěným Spike-in mixem v množství 5 ul na 1 ml denaturačního činidla. Vzorek 200 ul sEV byl smíchán s 200 ul čerstvě připraveného denaturačního činidla a po vortexování inkubován 5 minut na ledě.

Denaturovaný vzorek byl následně smíchán s kyselým fenol chloroformem v poměru 1:1 a 1 minutu intenzivně vortexován. Po stočení vzorku na 12 000 g/5 min došlo k rozdělení frakcí na spodní vrstvu fenolu, střední vrstvu proteinů a horní vodnou frakci, která byla odebrána k následnému zpracování. Přesný objem vodní frakce byl smíchán s 1,25násobkem 100% ethanolu a přenesen do izolační kolony. Po stočení 10 000 g/30 s/25 °C byl jednou protočený vzorek přes kolonu opětovně napipetován do kolony. Po dvojím stočení byl vzorek vyhozen do opadu.

Následně byla kolona za použití centrifugy postupně propláchnuta 1x 700ul Wash Solution 1 a 2x 500 ul Wash Solution 2/3 se stejným postupem centrifugace

10 000 g/30 s/ 25°C. Po posledním promytí byla prázdná kolona stočena 2 min, aby její obsah co nejvíce vyschl.

Kolony byly přemístěny do nových sběrných zkumavek. Na cartridge kolony bylo napipetováno 50 ul Elution Solution přehřátého na 95 °C. Vzorky byly ponechány 3 minuty odstát a následně byly stočeny na 10 000 g/60 s. Eluát byl opakovaně napipetován na cartridge a znovu stočen na 10 000 g/2 min. miRNA byla skladována v -80 °C.

4.6.2. Reverzní transkripce (RT)

Pro přepsání miRNA do cDNA byl využit komerční kit „*miRCURY LNA RT Kit*“ (QIAGEN) a přístroj „*2720 Thermal Cycler* (APPLIED BIOSYSTEMS)“. Pro kontrolu kvality RT je využit spike SP6, který je obsažen v kitu.

Použity byly tenkostěnné PCR zkumavky velikosti 0,2 ml. Master mix byl namíchán dle tabulky 2. Do každé zkumavky bylo přidáno 18 ul master mixu a 2 ul 100% eluátu vyizolované miRNA. Se vzorky se pracovalo na ledu. Po vortexování a stočení na stolní centrifuze následovala reverzní transkripce, která probíhala dle následujícího programu: 60 minut při 42 °C a denaturace 5 minut při 95°C.

20 ul cDNA bylo následně rozděleno: 1,3 ul bylo využito na testování hemolýzy a kontrolu RT ve vzorku a 18,7 ul se použilo na analýzu miRNA pomocí focus panelu.

Master mix	na 1 vzorek [ul]:
5x miRCURY RT buffer	4
10x miRCURY RT enzyme mix	2
UniSP6 RNA spike-in	1
ddH2O	11
Celkem	18

Tabulka 2: Složení mastermixu na RT

4.6.3. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce qPCR (real-time PCR)

Tato metoda umožňuje amplifikaci sledovaného genu, která je zaznamenávána v reálném čase. Ke sledování amplifikace dochází pomocí fluorescenčního signálu, který je emitován interkalačním barvivem SYBR Green po jeho navázání na dvouřetězcovou DNA daného PCR produktu. Intenzita světelného signálu je přímo úměrná kvantitě dsDNA polymerizované při PCR reakci a je zaznamenávána termocyklérem. Data jsou vyhodnocována pomocí softwaru, který definuje tzv. prahové cykly PCR produktů („threshold cycle“, Ct). Čím více templátu se ve vzorku vyskytuje, tím menší bude Ct produktu.

Metoda qPCR byla použita pro vyhodnocování stupně hemolýzy u jednotlivých vzorků a k analýze souboru miRNA obsažených v sEV. Pro její provedení byl využit komerční kit „*miRCURY SYBR Green PCR Kit*“ (QIAGEN).

Krátce před qPCR reakcí byl smíchán miRCURY SYBR Green a Rox v poměru 100:1.

4.6.3.1. qPCR – hodnocení hemolýzy a reverzní transkripce

K hodnocení hemolýzy pomocí metody qPCR byly využity komerční LNA primery miR-451-a, miR-23a-3p a Uni SP6 (QIAGEN).

cDNA z reverzní transkripce byla 11x naředěna destilovanou vodou a mastermix byl namíchan dle rozpisu (tabulka 3). Pomocí automatické pipety byly do 96 jamkové destičky pipetovány 2 ul 11x naředěné cDNA a 8 ul mastermixů. Destička byla překryta fólií a stočena v centrifuze na 1000 g/1 min/25 °C. Měření probíhalo v přístroji *Abi7500 Real-Time PCR System, APPLIED BIOSYSTEMS*.

Master mix	na 1jamku [ul]:
miRCURY SYBR Green + ROX	5,05
LNA primery	0,5
ddH ₂ O	2,45
Celkem	8

Tabulka 3: Složení PCR mastermixu na jednotlivé reakce

4.6.3.2. qPCR – focus panely

K analýze souboru miRNA obsažených v sEV byl využit „focus panel“ (*miRCURY LNA miRNA Focus PCR Panels – YAHS-216ZC-4, QIAGEN*). Jedná se o 96 jamkovou PCR destičku s předvyplněnými jamičkami s konkrétními LNA primery (obrázek 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7c-5p	hsa-let-7f-5p	hsa-let-7g-5p	hsa-miR-1-3p	hsa-miR-100-5p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-107	hsa-miR-122-3p	hsa-miR-122-5p
B	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-1260a	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-145-3p	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-148a-3p
C	hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-192-3p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-19a-3p
D	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-224-5p	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-23a-3p
E	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-29a-5p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30b-5p
F	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-3183	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-3663-3p	hsa-miR-375	hsa-miR-3907	hsa-miR-4286
G	hsa-miR-4291	hsa-miR-4301	hsa-miR-4454	hsa-miR-4516	hsa-miR-451a	hsa-miR-5100	hsa-miR-5701	hsa-miR-664b-3p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-940	hsa-miR-99a-5p
H	cel-miR-39-3p	cel-miR-39-3p	SNORD44 (hsa)	SNORD38B (hsa)	SNORD49A (hsa)	U6 snRNA (v2)	UniSp2	UniSp4	UniSp5	UniSp6	UniSp3 IPC	UniSp3 IPC

Obrázek 7: Rozpis LNA primerů ve focus panelu

Neředěný vzorek cDNA z RT byl smíchán s miRCURY SYBR Green a ddH₂O dle rozpisu (tabulka 4) a vzniklý roztok byl napipetován pomocí automatické pipety po 10 ul do jednotlivých jamek focus panelu. Na jeden focus panel byl pipetován vždy roztok jednoho vzorku. Panely byly přikryty fólií, stočeny 1000 g/1 min a měřeny v přístroji *Abi7500 Real-Time PCR System, APPLIED BIOSYSTEMS*.

qPCR roztok	na 100 jamek [ul]:
cDNA templát	18
miRCURY SYBR Green + ROX	505
ddH ₂ O	477
Celkem	1000

Tabulka 4: Složení qPCR roztoku na jeden focus panel

4.7. Vyhodnocování

4.7.1. Metodika zpracování qPCR dat

qPCR data (CT treshold = 0,2) ze všech focus panelů byla nahrána na webový portál QIAGEN Gene globe. Na základě UniSP3, která je součástí každého focus panelu, byly hodnoty Ct automaticky korigovány mezi všemi platy. Aplikace po označení použitých spike kontrol a specifických miRNA umožňuje přehledný grafický výstup a kontrolu, např. účinnost izolace miRNA z sEV (UniSP2, UniSP4 a UniSP5) a míru hemolýzy. Následná práce s daty byla provedena pomocí softwarů GenEx (normalizace) a GraphPad Prism 9.4 (statistické a grafické vyhodnocení).

4.7.2. Normalizace

Pro normalizaci Ct jednotlivých miRNA mezi vzorky nelze použít klasickou normalizaci používanou u buněčných vzorků z důvodu absence normalizačních genů v sEV. Pro vyhodnocení byly proto použity dvě normalizace a výsledky následně srovnány. První normalizace je na základě Norm Finder, který vybere vhodné miRNA. V našem případě bylo použito 5 miRNA (126-3p, 148b-3p, 21-5p, 222-3p, 23a-3p). Tato normalizace je v následujícím textu označována jako „normalizace I“. Druhý typ normalizace byl na základě průměru všech Ct menších než 38 a je značen „normalizace II“. Podmínkou je srovnatelný průměr Ct u všech skupin porovnávaných mezi sebou. Oba typy normalizace byly zpracovány v softwaru GenEx.

4.7.3. Statistické vyhodnocení

Před vlastní statistickou analýzou byla data podrobena testu normality a byly odstraněny odlehlé hodnoty (Q = 0,1 %) (GraphPad Prism 9.2). Jelikož ne všechna data měla normální rozdělení, byly následné testy provedeny neparametricky. Výsledná analýza vycházela z dat po normalizaci $2^{-\Delta Ct}$.

Pro srovnání souboru dat mezi podmínkami D0 a D3 v rámci stejných subjektů (hubení nebo obézni) byl použit párový Multiple Wilcoxon test, zatímco při srovnání souboru dat mezi hubenými a obézními v rámci D0 nebo D3 podmínek byl použit nepárový Multiple Mann-Whitney test.

Míra signifikance byla stanovena na základě *p* hodnoty ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$ a $p < 0,001 = ***$). U souborů s vyšším počtem analyzovaných genů/miRNA může docházet k výskytu falešně pozitivních nálezů (False Discovery Rate = FDR). FDR byla stanovena na základě *q* hodnoty = 10 %.

4.8. Materiál a roztoky

10x Tris/Glycin: 30,3 g Tris, 144 g Glycin, doplněno dH₂O do 1 l

Blotovací pufr: 150 ml methanolu, 750 ml dH₂O, 100 ml 10x Tris/Glycin

Fyziologický roztok: 0,9% NaCl, filtrace přes 0,2 µm filtr (Corning, katalogové číslo: 431229)

PEG8000: 40% PEG8000 v dH₂O, filtrace přes 0,2 µm filtr (Corning, katalogové číslo: 431229)

Primární protilátky:

Anti-CD9: mouse monoclonal IgG anti-CD9 (Santa Cruz, katalogové číslo: sc-59140)

Anti-CD81: mouse monoclonal IgG anti-CD81 (Santa Cruz, katalogové číslo: sc-166029)

Running pufr (10x): 30,3 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, doplněno dH₂O do 1 l

Sekundární protilátky: goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz, katalogové číslo: sc-2005)

Separáčn  gel (12%): 3,3 ml ddH₂O, 4 ml 30% akrylamid, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µl 10% SDS, 100 µl 10% amonium persulfát, 4 µl TEMED (tetrametyletylendiamin)

TBS: 0,1% Tween v PBS

Zaostřovací gel (5%): 2,1 ml ddH₂O, 0,5 ml 30% akrylamid, 380 µl 1,0 M Tris (pH 6,8), 30 µl 10% SDS, 30 µl 10% amonium persulfát, 3 µl TEMED (tetrametyletylendiamin)

5. VÝSLEDKY

5.1. Selekce vzorků

5.1.1. Optické zhodnocení

Vzorky byly opticky vyhodnocovány jako žluté, růžové a červené. Vyřazeny byly subjekty, které měly viditelně růžově či červeně zbarvené vzorky plasmy z obou podmínek. Tomuto kritériu odpovídal 1 subjekt ze skupiny obézních. Z původního počtu vzorků tedy prošlo optickou selekcí 32 vzorků ze skupiny obézních (16x D0 a 16x D3) a 44 ze skupiny hubených (22x D0 a 22x D3) (tabulka 5).

5.1.2. Spektrofotometrická selekce

Spektrofotometrickým měřením byly jako hemolytické vzorky s koncentrací hemoglobinu nad 0,5 g/l vyhodnoceny 3 vzorky ze skupiny obézních (2x D0, 1x D3) a 9 vzorků ze skupiny hubených (2x D0, 7x D3). Z původního počtu subjektů tedy prošlo dosavadní selekcí 29 vzorků ze skupiny obézních (15x D0 a 14x D3) a 33 vzorků ze skupiny hubených (20x D0 a 13x D3) (tabulka 5).

5.1.3. Detekce hemolýzy metodou qPCR

Třetí krok selekce probíhal metodou qPCR, pomocí které byl měřen rozdíl Ct dvou miRNA, miR-451a a miR-23a-3p. Vzorky s rozdílem větším než 7 byly vyhodnoceny jako hemolytické a byly vyloučeny. Vyřazeny byly celkem 2 vzorky ze skupiny obézních (2x D0) a 6 vzorků ze skupiny hubených (3x D0, 3x D3).

Do analýzy miRNA profilu sEV pomocí focus panelů bylo vybráno ze skupiny obézních celkem 27 vzorků, z toho 13x D0 a 14x D3. Ze skupiny hubených bylo jako nehemolytických označeno celkem 27 vzorků, z toho 17x D0 a 10x D3 (tabulka 5). Pro srovnávání profilu miRNA u obézních vs. hubených subjektů v bazální podmínce tedy bylo možné použít 13 vzorků ze skupiny obézní a 17 vzorků ze skupiny hubení. Pro párové srovnávání efektu hladovění vyhovovalo 12 vzorků ze skupiny obézních subjektů a 10 ze skupiny hubených (tabulka 6).

	celkem subjektů	po selekci			
		optické	spektrofotometrické	metodou qPCR	
obézní	D0	17	16	15	13
	D3	17	16	14	14
hubení	D0	22	22	20	17
	D3	22	22	13	10

Tabulka 5: Výsledky selekce vzorků na základě detekčních metod hemolýzy

obézní vs. hubení (D0)	13x D0 obézní	vs.	17x D0 hubení
efekt hladovění D0 vs. D3	12x D0 obézní	vs.	12x D3 obézní
	10x D0 hubení	vs.	10x D3 hubení

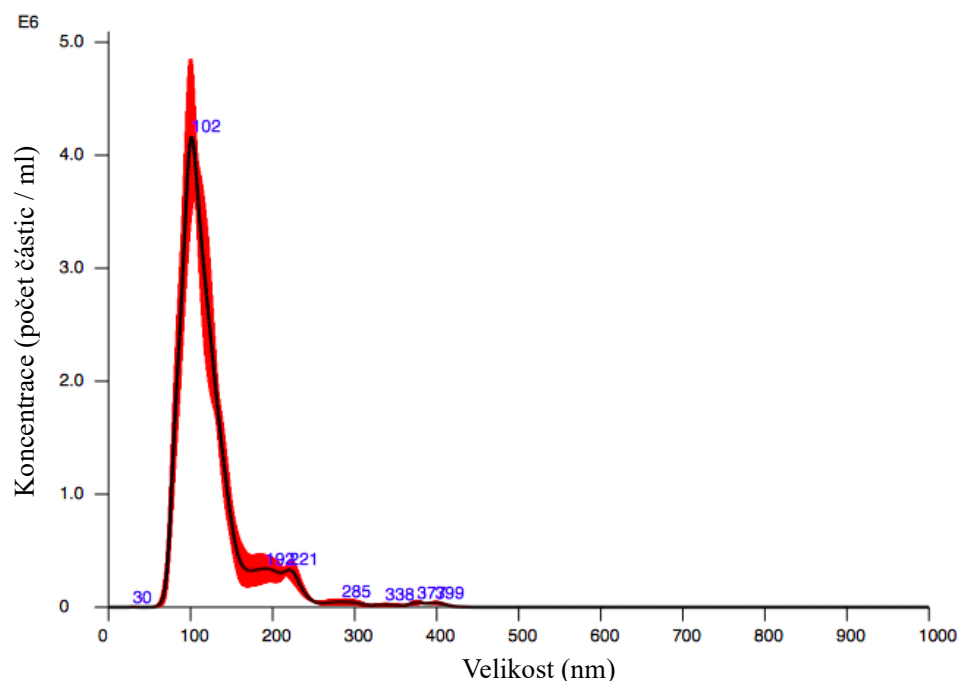
Tabulka 6: Zastoupení jednotlivých vzorků v porovnávaných skupinách

5.2. Měření NTA

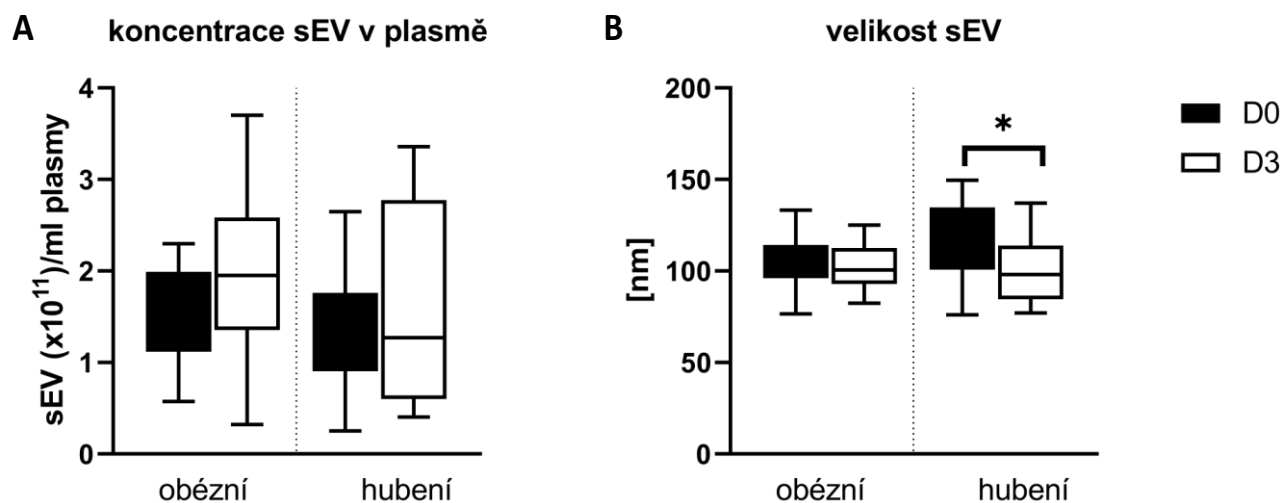
U vybraných vzorků byla následně provedena analýza velikosti sEV (obrázek 8) a na základě počtu sEV v měřeném vzorku stanovena jejich koncentrace v plasmě u hubených a obézních subjektů v obou sledovaných podmínkách D0 a D3.

Koncentrace sEV v plasmě u obou porovnávaných skupin (hubení a obézní) se za bazálních podmínek neliší. Po 60h hladovění je z grafu patrná určitá změna, která se však neprojevuje jednoznačným zvýšením koncentrace sEV, ale pouze větším rozptylem hodnot. Na základě získaných dat nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v koncentraci sEV v plasmě v důsledku hladovění u žádné z testovaných skupin (obrázek 9A).

Naopak analýza zastoupení velikosti sEV odhalila u skupiny hubených subjektů statisticky významné zmenšení velikosti sEV v důsledku hladovění. Podobný efekt nebyl u skupiny obézních pozorován. Srovnání velikostí sEV mezi skupinami nevykazoval statisticky významné změny ani v jedné testované podmínce D0 a D3 (obrázek 9B).



Obrázek 8: Reprezentativní grafický výstup z měření velikosti sEV metodou NTA

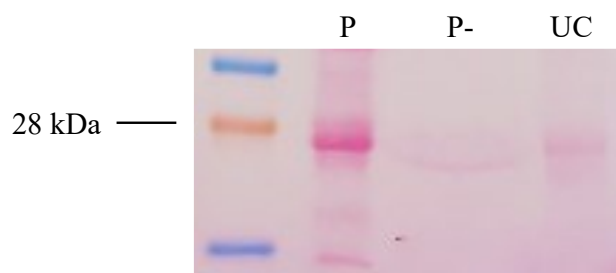


Obrázek 9: Výsledky měření NTA u obézních a hubených subjektů v podmínkách D0 a D3. Obrázek A reprezentuje koncentrace nanočástic zastoupených v 1 ml plasmy. Obrázek B znázorňuje jejich velikosti (mode). Bazální podmínka D0 je značena černými sloupci, podmínka hladovění D3 je reprezentována sloupcem bílým. K porovnávání hodnot byla použita metoda t-testu.

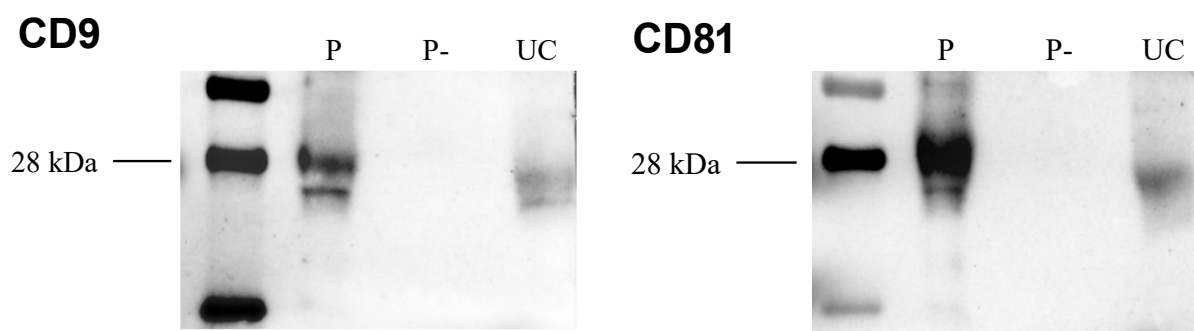
5.3. Charakterizace sEV na základě povrchových markerů

Hlavní složku sEV tvoří exosomy, charakterizované jak na základě velikosti (40–150 nm), tak i na základě přítomnosti specifických povrchových proteinů z rodiny tetraspaninů CD9 a CD81.

Pomocí WB byla analyzována plasma 10x ředěná v 0,9% NaCl, plasma po PEG8000 precipitaci 10x ředěná v 0,9% NaCl a sEV po PEG8000 precipitaci s následnou ultracentrifugací. Materiál, který obsahoval PEG8000 nebyl vhodný pro elektroforézu, proto se použil až vzorek přečištěný ultracentrifugací. Ani plasma po PEG izolaci nemá ideální vlastnosti, což se po obarvení membrány projevilo roztažením signálu (obrázek 10). Z příložených obrázků je patrná detekce obou markerů exosomů CD9 i CD81 ve vzorku plné plasmy a izolovaných sEV po ultracentrifugaci. Absence markerů exosomů v plasmě po PEG8000 precipitaci prokázala účinnost izolace exosomů z plasmy pomocí PEG8000 (obrázek 11).



Obrázek 10: Kontrolní obarvení membrány roztokem Ponceau S



Obrázek 11: Reprezentativní výstup detekce povrchového proteinu CD9 a CD81 u vzorku plasmy (P), plasmy zbavené sEV (P-) a ultracentrifugovaného vzorku sEV (UC). Velikost proteinu CD9 se pohybuje okolo 22–27 kDa, protein CD81 má rovněž velikost 22–27 kDa.

5.4. Analýza změny miRNA zastoupení v sEV v důsledku dietní intervence

5.4.1. Optimalizace izolace miRNA

Před prací se vzorky z klinické studie a analýzou na „focus panelu“ byly provedeny testy jednotlivých kitů a ředění kvůli možnému inhibičnímu efektu roztoků od různých výrobců kitů. Srovnávány byly výtěžky izolované miRNA jednokolonovou metodou izolace a izolace přes dvě kolony, dále pak různá ředění vzorku izolované miRNA do reverzní transkripce (50% a 25%) a různá ředění vzorků cDNA pro qPCR (11x a 22x). Výtěžky izolované miRNA byly porovnávány na základě Ct *miRNA24-3p* a *miRNA16-5p* (tabulka 7).

typ izolace	ředění RT/qPCR	průměr Ct <i>miR24-3p</i>	fold change	průměr Ct <i>miR16-5p</i>	fold change
jednokolonová izolace miRNA z sEV	50% / 11x	29,44	1,00	25,51	1,00
	50% / 22x	30,31	0,55	26,58	0,48
	25% / 11x	30,61	0,44	26,43	0,53
	25% / 22x	32,01	0,17	27,53	0,25
dvoukolonová izolace miRNA z sEV	50% / 11x	30,16	0,60	26,31	0,58
	50% / 22x	31,30	0,28	27,39	0,27
	25% / 11x	31,40	0,26	27,43	0,27
	25% / 22x	32,30	0,14	28,35	0,14

Tabulka 7: Srovnání výtěžku miRNA z sEV. Hodnoty fold change (násobné změny rozdílu Δ Ct) jsou vztaženy k prvnímu vzorku ve sloupci.

Z uvedených hodnot bylo konstatováno, že nedochází k inhibici RNA eluátem v RT a že izolace miRNA z sEV pomocí jedné kolony byla v průměru 1,73x vyšší než izolace miRNA z sEV přes dvě kolony (tabulka 8).

Na základě výstupů této optimalizace byla použita jednokolonová izolace miRNA, eluát miRNA byl do reverzní transkripce ředěn na finální koncentraci 50 % a cDNA byla do qPCR ředěna 11x.

ředění RT/qPCR	miR24 jednokolonová vs. dvoukolonová izolace	miR16 jednokolonová vs. dvoukolonová izolace
50% / 11x	1,66	1,74
50% / 22x	1,99	1,76
25% / 11x	1,73	2,00
25% / 22x	1,22	1,76
průměr	1,65	1,81
celkový průměr	1,73	

Tabulka 8: Srovnání výtěžku miRNA z sEV. Uvedené hodnoty reprezentují poměr hodnot „fold change“ uvedených v tabulce 7 za příslušných podmínek charakterizovaných prvním sloupci

5.4.2. Analýza miRNA profilu v sEV

5.4.2.1. Srovnání miRNA exprese v sEV mezi skupinou hubení a obézní v bazální podmínce D0

Porovnávány byly exprese jednotlivých miRNA u hubených a obézních v bazální podmínce D0. Výsledky získané pomocí normalizace I vykazují 19 různých miRNA, které se v této podmínce svou expresí významně liší mezi skupinou hubených a obézních subjektů. Po korekci na mnohonásobné testování pomocí FDR ($q = 10\%$) vychází z tohoto souboru pouze 8 miRNA významně rozdílných. Na základě srovnání hodnot získaných normalizací II bylo stanoveno 19 různých miRNA lišících se v této podmínce mezi skupinami. Po FDR korekci ($q = 10\%$) klesne počet miRNA z tohoto souboru na 3 miRNA.

Průnikem obou normalizací po FDR korekci jsou 3 miRNA. Jedná se o *hsa-miR-17-5p*, *hsa-miR-20a-5p* a *hsa-let-7b-5p* (tabulka 9 a obrázek 12+13).

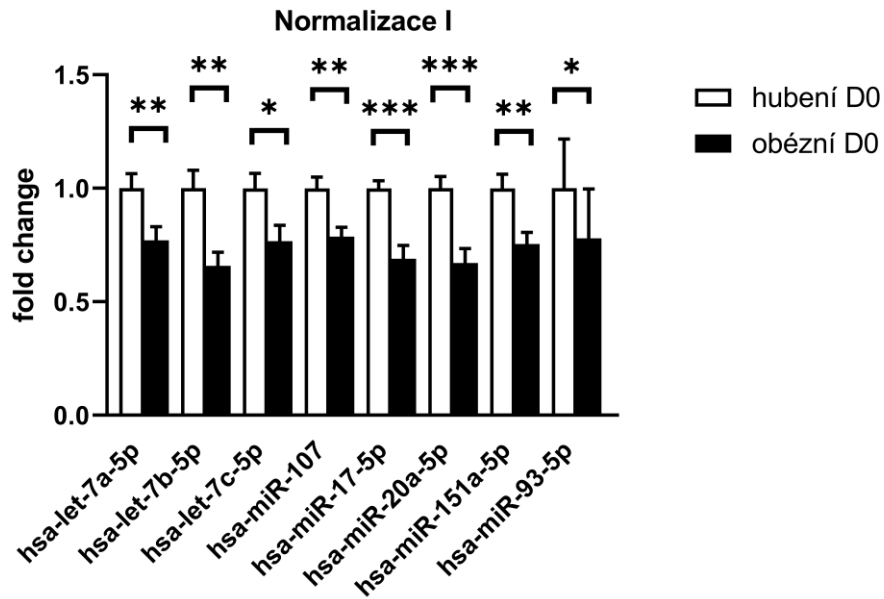
normalizace I :

miRNA	fold change
P hodnota < 0,001 (***)	
hsa-miR-17-5p	0,69
hsa-miR-20a-5p	0,67
P hodnota < 0,01 (**)	
hsa-let-7a-5p	0,77
hsa-let-7b-5p	0,66
hsa-miR-107	0,79
hsa-miR-151a-5p	0,75
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-let-7c-5p	0,77
hsa-let-7f-5p	0,73
hsa-miR-1-3p	0,62
hsa-miR-126-5p	1,13
hsa-miR-142-3p	0,77
hsa-miR-22-3p	1,39
hsa-miR-224-5p	0,52
hsa-miR-24-3p	1,18
hsa-miR-26a-5p	0,78
hsa-miR-26b-5p	0,76
hsa-miR-27b-3p	1,19
hsa-miR-30b-5p	0,83
hsa-miR-93-5p	0,78

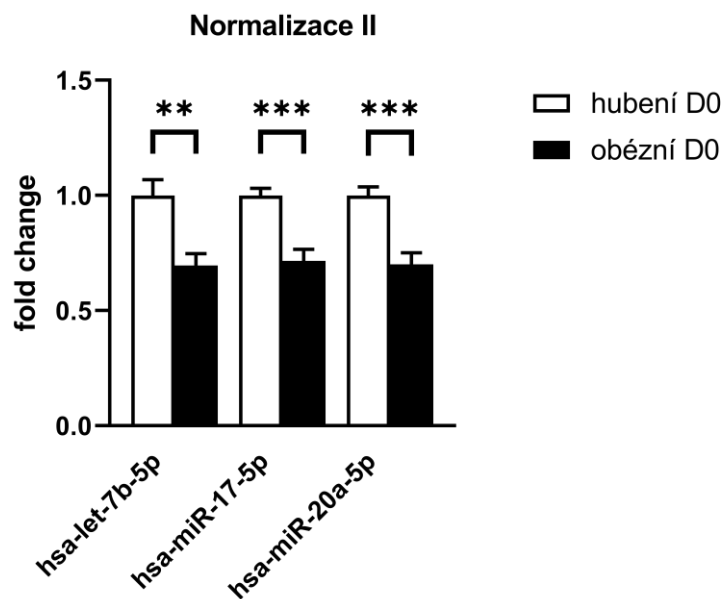
normalizace II :

miRNA	fold change
P hodnota < 0,001 (***)	
hsa-miR-17-5p	0,72
hsa-miR-20a-5p	0,70
P hodnota < 0,01 (**)	
hsa-let-7b-5p	0,70
hsa-miR-93-5p	0,82
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-let-7a-5p	0,81
hsa-let-7c-5p	0,80
hsa-miR-107	0,82
hsa-miR-122-5p	2,16
hsa-miR-125a-5p	1,28
hsa-miR-126-5p	1,21
hsa-miR-222-3p	1,18
hsa-miR-22-3p	1,48
hsa-miR-224-5p	0,54
hsa-miR-24-3p	1,26
hsa-miR-26a-5p	0,81
hsa-miR-26b-5p	0,79
hsa-miR-27b-3p	1,25
hsa-miR-30e-5p	1,14
hsa-miR-151a-5p	0,79

Tabulka 9: Seznam miRNA v izolovaných sEV s odlišnou expresí mezi skupinou hubení a obězí v bazální podmínce (D0). Tučně jsou označeny miRNA, které jsou FDR ($q = 10\%$) signifikantní. Modré označení značí průnik jednotlivých miRNA vyhodnocených v obou normalizacích. Expese miRNA u hubených subjektů je vztažena k hodnotě 1. Uvedené hodnoty fold change představují násobnou změnu exprese miRNA obézních subjektů vztaženou ke skupině hubených subjektů.



Obrázek 10: Signifikantní změny miRNA exprese v izolovaných sEV – srovnání hubení vs. obézní v bazální podmínce (D0). Normalizace I, FDR ($q = 10\%$). Bílé sloupce reprezentují expresi miRNA u hubených subjektů vztáženou k hodnotě 1, černé sloupce značí násobnou změnu miRNA exprese obézních subjektů vztáženou ke skupině hubených subjektů.



Obrázek 11: Signifikantní změny miRNA exprese v izolovaných sEV – srovnání hubení vs. obézní v bazální podmínce (D0). Normalizace II, FDR ($q = 10\%$). Bílé sloupce reprezentují expresi miRNA u hubených subjektů vztáženou k hodnotě 1, černé sloupce značí násobnou změnu miRNA exprese obézních subjektů vztáženou ke skupině hubených subjektů.

5.4.2.2. Srovnání miRNA exprese v sEV po 60h hladovění mezi skupinou hubených a obézních

Porovnávány byly exprese jednotlivých miRNA u hubených a obézních v podmínce po 60h hladovění (D3). Na základě normalizace I bylo odhaleno 10 miRNA s odlišnou expresí po 60h hladovění mezi skupinou hubených a obézních subjektů. Po korekci na mnohonásobné testování FDR ($q = 10\%$) byl počet miRNA se signifikantní změnou snížen na 1 miRNA. Normalizace II odhalila 9 miRNA s odlišnou expresí, nicméně FDR korekce ($q = 10\%$) snížila tento počet na 2 miRNA.

Průnikem obou normalizací po FDR korekci je 1 miRNA. Jedná se o *hsa-miR-17-5p* (tabulka 10 a obrázek 14).

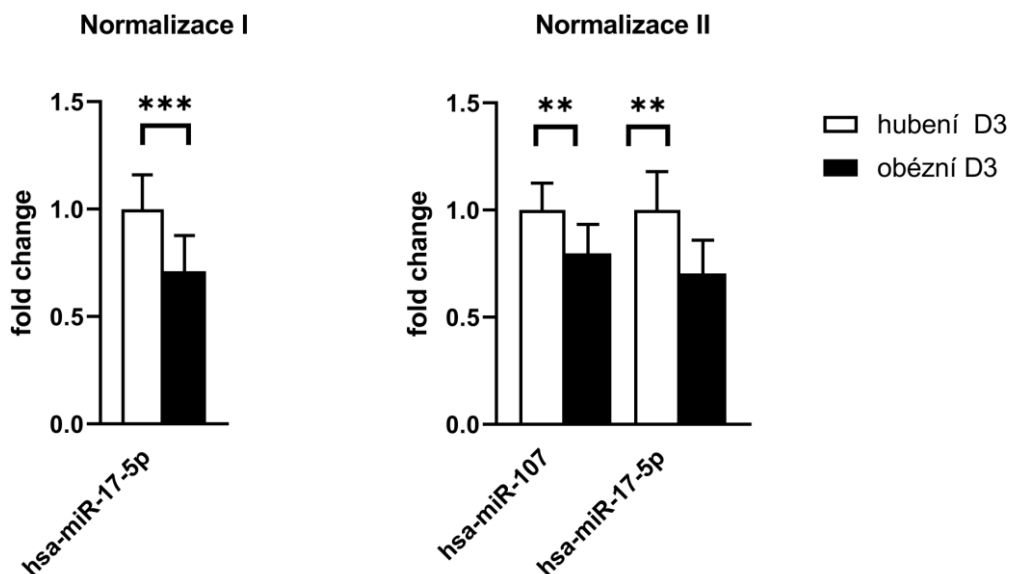
normalizace I :

miRNA	fold change
P hodnota < 0,001 (***)	
hsa-miR-17-5p	0,71
P hodnota < 0,01 (**)	
hsa-miR-20a-5p	0,71
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-let-7c-5p	0,74
hsa-miR-107	0,81
hsa-miR-1260a	1,50
hsa-miR-126-5p	1,18
hsa-miR-148b-3p	1,10
hsa-miR-224-5p	0,48
hsa-miR-151a-5p	0,79
hsa-miR-4286	1,38

normalizace II :

miRNA	fold change
P hodnota < 0,01 (**)	
hsa-miR-107	0,80
hsa-miR-17-5p	0,70
hsa-miR-20a-5p	0,71
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-let-7c-5p	0,73
hsa-miR-1260a	1,51
hsa-miR-224-5p	0,47
hsa-miR-26b-5p	0,74
hsa-miR-30e-5p	1,38
hsa-miR-151a-5p	0,78

Tabulka 10: Seznam miRNA v izolovaných sEV s odlišnou expresí mezi skupinou hubených a obézních v podmínce po 60h hladovění (D3). Tučně jsou označeny miRNA, které jsou FDR ($q = 10\%$) signifikantní. Modré označení značí průnik jednotlivých miRNA vyhodnocených v obou normalizacích. Exprese miRNA u hubených subjektů je vztažena k hodnotě 1. Uvedené hodnoty fold change představují násobnou změnu exprese miRNA obézních subjektů vztaženou ke skupině hubených subjektů.



Obrázek 12: Signifikantní změny miRNA exprese v izolovaných sEV – srovnání hubení vs. obézní v podmínce po 60h hladovění (D3). FDR ($q = 10\%$). Bílé sloupce reprezentují expresi miRNA u hubených subjektů vztáženou k hodnotě 1, černé sloupce značí násobnou změnu miRNA exprese obézních subjektů vztáženou ke skupině hubených subjektů.

5.4.2.3. Analýza změny miRNA exprese v sEV v důsledku 60h hladovění bez ohledu na BMI

Vyhodnocovány byly rovněž změny exprese miRNA v reakci na 60h hladovění (podmínka D0 vs. D3), a to bez ohledu na BMI i jednotlivě ve skupinách hubení a obézní. Výsledky získané pomocí normalizace I vykazují 11 nalezených miRNA, které se v těchto dvou podmínkách svou expesí ve skupině všech subjektů signifikantně liší. Po korekci na mnohonásobné testování pomocí FDR ($q = 10\%$) vychází z tohoto souboru pouze 2 miRNA se signifikantně rozdílnou expesí. Na základě srovnání hodnot získaných normalizací II bylo vyhodnoceno 12 různých miRNA lišících se v této skupině mezi podmínkami. Po FDR korekci ($q = 10\%$) dojde k redukci na pouze 1 miRNA.

Průnikem obou normalizací po FDR korekci je 1 miRNA, a to *hsa-miR-21-5p* (tabulka 11 a obrázek 15).

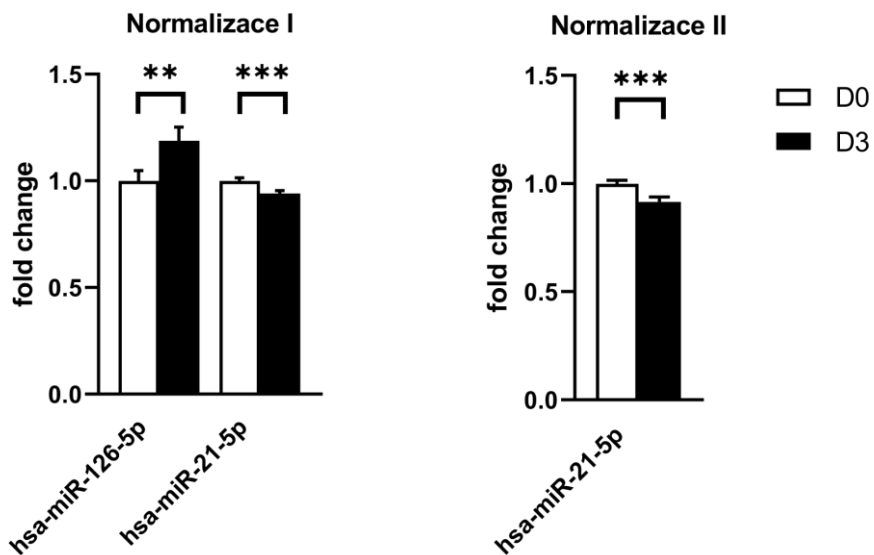
normalizace I:

miRNA	fold change
P hodnota < 0,001 (***)	
hsa-miR-21-5p	0,95
P hodnota < 0,01 (**)	
hsa-miR-126-5p	1,21
hsa-miR-24-3p	1,09
hsa-miR-27b-3p	1,19
hsa-miR-4291	1,09
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-miR-101-3p	0,89
hsa-miR-221-3p	1,11
hsa-miR-22-5p	1,19
hsa-miR-27a-3p	1,22
hsa-miR-30d-5p	1,25
hsa-miR-5100	1,18

normalizace II:

miRNA	fold change
P hodnota < 0,001 (***)	
hsa-miR-21-5p	0,93
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-let-7b-5p	0,93
hsa-miR-101-3p	0,86
hsa-miR-126-5p	1,18
hsa-miR-221-3p	1,08
hsa-miR-24-3p	1,07
hsa-miR-27a-3p	1,18
hsa-miR-27b-3p	1,15
hsa-miR-30d-5p	1,22
hsa-miR-424-5p	0,87
hsa-miR-4291	1,08
hsa-miR-5100	1,15

Tabulka 11: Seznam miRNA v izolovaných sEV s odlišnou expresí v podmínce D0 vs. D3 ve skupině všech subjektů. Tučně jsou označeny miRNA, které jsou FDR ($q = 10\%$) signifikantní. Modré označení značí průnik jednotlivých miRNA vyhodnocených v obou normalizacích. Expresí miRNA všech subjektů v podmínce D0 je vztažena k hodnotě 1. Uvedené hodnoty fold change představují násobnou změnu exprese miRNA všech subjektů v podmínce D3 vztaženou k podmínce D0.



Obrázek 13: Signifikantní změny miRNA exprese v izolovaných sEV – srovnání podmínky D0 vs. D3 ve skupině všech subjektů. FDR ($q = 10\%$). Bílé sloupce reprezentují expresi miRNA všech subjektů v podmínce D0 vztaženou k hodnotě 1, černé sloupce značí násobnou změnu miRNA exprese všech subjektů v podmínce D3 vztaženou k podmínce D0.

5.4.2.3.1. Analýza změny miRNA exprese v důsledku 60h hladovění ve skupině hubení

Analýzou změny exprese miRNA v rámci efektu 60h hladovění (podmínka D0 vs. D3) v podskupině hubených byly při normalizaci I nalezeny signifikantní změny u 4 miRNA. Nicméně ani jedna z těchto miRNA neprošla korekcí FDR ($q = 10\%$). Výsledky získané normalizací II vykazují odlišnou expresi 1 miRNA, která taktéž neprošla korekcí FDR ($q = 10\%$) (tabulka 12).

normalizace I :

miRNA	fold change
P hodnota < 0,01 (**)	
hsa-miR-21-5p	0,93
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-miR-125a-5p	1,20
hsa-miR-4291	1,42
hsa-miR-5100	1,87

normalizace II :

miRNA	fold change
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-miR-5100	1,82

Tabulka 12: Seznam miRNA v izolovaných sEV s odlišnou expresí v podmínce D0 vs. D3 ve skupině hubení. Tučně jsou označeny miRNA, které jsou FDR ($q = 10\%$) signifikantní. Modré označení značí průnik jednotlivých miRNA vyhodnocených v obou normalizacích. Expese miRNA hubených subjektů v podmínce D0 je vztažena k hodnotě 1. Uvedené hodnoty fold change představují násobnou změnu exprese miRNA hubených subjektů v podmínce D3 vztaženou k podmínce D0.

5.4.2.3.2. Analýza změny miRNA exprese v důsledku 60h hladovění ve skupině obézní

Analýza změny miRNA profilu v rámci efektu 60h hladovění (podmínka D0 vs. D3) proběhla rovněž v podskupině obézních subjektů. Při normalizaci I bylo nalezeno 5 miRNA, které se svou expresí mezi podmínkami liší. Výsledky získané normalizací II vykazují odlišnou expresi u 6 miRNA. Nicméně ani jedna normalizace nevykazovala po FDR korekci signifikantní změnu u žádné z miRNA (tabulka 13).

normalizace I :

miRNA	fold change
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-miR-126-5p	1,21
hsa-miR-17-5p	1,09
hsa-miR-21-5p	0,95
hsa-miR-27a-3p	1,22
hsa-miR-27b-3p	1,19

normalizace II :

miRNA	fold change
P hodnota < 0,01 (**)	
hsa-miR-21-5p	0,93
P hodnota < 0,05 (*)	
hsa-miR-101-3p	0,86
hsa-miR-195-5p	0,76
hsa-miR-27a-3p	1,18
hsa-miR-27b-3p	1,15
hsa-miR-424-5p	0,87

Tabulka 13: Seznam miRNA v izolovaných sEV s odlišnou expresí v podmínce D0 vs. D3 ve skupině obézní. Tučně jsou označeny miRNA, které jsou FDR ($q = 10\%$) signifikantní. Modré označení značí průnik jednotlivých miRNA vyhodnocených v obou normalizacích. Expese miRNA obézních subjektů v podmínce D0 je vztažena k hodnotě 1. Uvedené hodnoty fold change představují násobnou změnu exprese miRNA obézních subjektů v podmínce D3 vztaženou k podmínce D0.

6. DISKUZE

Tato diplomová práce se věnuje zavedení protokolu izolace sEV z lidské plasmy pomocí PEG a ultracentrifugy pro klinickou studii „DELISA“. Vzorke plasmy byly odebírány od hubených a obézních žen před a po dietní intervenci 60 h hladovění, kterou ženy v rámci této klinické studie podstoupily. Po izolaci sEV z plasmy proběhla charakterizace jejich velikosti a koncentrace a byla sledována přítomnost jejich charakteristických povrchových markerů. Následně proběhla izolace a analýza miRNA obsažené v sEV. Cílem bylo analyzovat rozdíly v miRNA obsahu sEV mezi skupinou hubených a obézních a zjistit, zda v důsledku dietní intervence 60 h hladovění dochází v sEV ke změnám exprese miRNA.

6.1. Zavedení protokolu izolace sEV z plasmy

Jak již bylo zmíněno v literárním úvodu, existuje více způsobů izolace sEV a i přes velkou pozornost, které se v poslední době extracelulárním vezikulám včetně exosomů dostává, zatím nepanuje shoda na jedné standardizované metodě. Nejhojněji je v literatuře zmiňována a používána metoda ultracentrifugace (Akbar et al., 2019; Ludwig et al., 2018; Théry et al., 2006; Weng et al., 2016). V rámci této diplomové práce však byla k izolaci sEV z plasmy použita metoda precipitace pomocí PEG. Jak na základě literatury (Ludwig et al., 2018; Weng et al., 2016), tak naší zkušenosti (data neprezentována) je totiž patrné, že ultracentrifugací dochází k výraznému poklesu výtěžku sEV ve vzorku, a to až desetinásobnému. Tento efekt je způsoben vyšším počtem opakovaného stáčení v průběhu izolace. Izolace sEV pomocí PEG navíc vykazuje lepší reprodukovatelnost (Ludwig et al., 2018).

Úspěšnost námi zvolené metody izolace byla ověřena měřením velikosti a koncentrace izolovaných částic ve vzorku a detekcí specifických povrchových markerů CD9 a CD81 charakteristických pro sEV. Na základě modů změřených velikostí částic ve vzorcích, které se pohybovaly od 76 do 150 nm, a potvrzení přítomnosti tetraspaninů CD9 a CD81 jsme zároveň došli k závěru, že hlavní složku sEV tvoří exosomy.

6.2. Optimalizace izolace miRNA z sEV

Komerční kity na izolaci RNA, které jsou založené na kolonové metodě izolace, využívají pro eluci miRNA obecně 2 kolony. Dle námi získaných dat ale použití 2 kolon zvyšuje ztrátu výtěžku. Vzhledem k tomu, že sEV neobsahují přemíru mRNA (Huang et al.,

2013; Li et al., 2014; van Balkom et al., 2015) jsme tak použili pouze 1 kolonu, která svou kapacitou pokryje jak mRNA, tak miRNA.

6.3. Měření koncentrace a velikosti sEV

V rámci této diplomové práce nebyl v koncentracích sEV mezi hubenými a obézními subjekty nalezen rozdíl. Obdobné výsledky byly publikovány ve studii (Mleczko et al., 2018), ve které byly k izolaci sEV z plasmy a následnému měření koncentrace využity metody ultracentrifugace a NTA. V rozporu s tím lze v literatuře najít několik studií, které vyhodnotily, že obezita je asociována se signifikantně zvýšenou koncentrací EV v plasmě (Eguchi et al., 2016; Murakami et al., 2007; Stepanian et al., 2013). V publikacích (Murakami et al., 2007; Stepanian et al., 2013) k těmto výsledkům došlo využitím centrifugace s následnou průtokovou cytometrií, naopak autoři (Eguchi et al., 2016) použili metodu ultracentrifugace s následným měřením počtu částic pomocí dynamického rozptylu světla. Všechny zmíněné studie byly stejně jako v případě této práce prováděny na lidských subjektech, autoři (Eguchi et al., 2016) své poznatky navíc potvrdili i na myších modelech.

Podle našich výsledků nevedlo hladovění k žádným statisticky významným rozdílům koncentrací sEV v plasmě ani u jedné skupiny. Podobný závěr byl publikován ve studii (Goichot et al., 2006), která uvádí, že koncentrace sEV není asociována s hladinami inzulínu, leptinu ani metabolitů (cholesterol, triglyceridy, glukóza), které byly u hubených a obézních žen naměřeny. V rozporu s těmito výsledky je studie (Heinrich et al., 2015), ve které autoři publikovali, že koncentrace EV se mění v závislosti na dietních intervencích. Tato studie byla provedena na potkanech dlouhodobě krmených vysokotučnou dietou, po které byla pozorována až 8x vyšší koncentrace plasmatických EV společně se zvýšenou glykemií, která s počtem EV korelovala.

Srovnáním velikostí sEV mezi skupinami nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly ani v jedné z testovaných podmínek. Této problematice se věnovali i autoři studie (Alvarado et al., 2019), ve které publikovali, že velikosti sEV obézních subjektů byly větší než sEV subjektů hubených, ačkoliv tyto rozdíly ve velikostech nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné. Velikosti sEV naměřené v této studii (obézní 65.9 ± 16.1 nm, hubení 42.3 ± 10.7 nm) byly navíc ve srovnání s našimi výrazně nižší. K izolaci sEV byla ve zmíněné práci použita precipitace pomocí komerčního reagentu a velikost částic byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla. Naopak menší velikosti sEV u obézních subjektů (116.7 ± 9.1

nm) ve srovnání s hubenými (122.6 ± 5 nm) byly pozorovány ve studii (Santamaria-Martos et al., 2020), kde proběhla izolace sEV pomocí diferenciální ultracentrifugace a velikosti částic byly měřeny metodou NTA. Rozdělení velikosti částic v této studii navíc oproti našim výsledům vykazovalo vyšší počet částic větších než 200 nm.

Zajímavým poznatkem tohoto měření však bylo významné zmenšení velikostí sEV navozené 60 h hladověním u hubených subjektů, které u obézní skupiny pozorováno nebylo. Tento jev by mohl souviset s metabolickou flexibilitou, tedy schopností metabolismu přizpůsobit se na změnu dostupných živin, která je dle mnoha studií u obézních jedinců značně snížena (Battaglia et al., 2012; Kelley et al., 1999; Olenick, 2017).

Nedostatkem naší studie byl větší počet vzorků, které musely být vyloučeny z analýzy na základě překročení míry hemolýzy.

6.4. Analýza souboru miRNA v sEV

Jako klíčový funkční prvek v rámci mezibuněčné signalizace prostřednictvím sEV je považována miRNA, která má regulační roli v genové expresi (Zhang et al., 2015). Dostupná literatura uvádí, že exprese miRNA je charakteristická pro jednotlivé tkáně a může se lišit v závislosti na různých fyziologických a patofyziologických podmínkách (Ross a Davis, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

V rámci analýzy miRNA exprese byly v této diplomové práci použity 2 typy normalizací, charakterizované v sekci metod. Účelem normalizace je získat co nejspolehlivější a nejreprodukovatelnější výsledek, a volba vhodného normalizátoru je tudíž pro kvantifikaci miRNA klíčová. Některé studie používají jako normalizátor exogenní syntetický oligonukleotid, jako je například cel-miR-39, UniSp2, UniSp4 nebo UniSp6. Stanovená koncentrace těchto oligonukleotidů je přidána do biologických vzorků a slouží ke kontrole RNA izolace a reverzní transkripce, nicméně k analýze exprese miRNA nejsou doporučovány. Za vhodné referenčními geny jsou považovány endogenní miRNA, ačkoliv standardizovaná normalizační strategie zatím nebyla stanovena. Nejčastěji používané normalizace jsou založeny na průměru více miRNA. V experimentech, v nichž nejsou známé žádné stabilní referenční geny, se běžně využívá normalizace založená na zprůměrované hodnotě Ct všech analyzovaných miRNA. Další možnou normalizací je využití průměru hodnot Ct nejstabilnějších endogenních miRNA, které jsou identifikovány algoritmem speciálních programů (Faraldi et al., 2019). V této diplomové práci bylo v rámci normalizace využito obou

zmíněných průměrů. Jako směrodatné jsme brali výsledky, které byly průnikem obou forem normalizací. Data vycházející z obou normalizací byla velmi podobná. Pozorované rozdíly mezi výsledky jednotlivých normalizací byly často dány následkem korekce na mnohonásobné testování. Některé miRNA totiž nebyly v rámci jedné normalizace po této korekci brány v potaz, ačkoliv byly původně značeny jako statisticky významné. Statistika je rovněž zatížena tím, že díky redukci vzorků po hemolýze nemáme dostatečně velké množství subjektů.

6.4.1. Srovnání miRNA exprese v sEV mezi skupinou hubení a obézní

Primárně jsme našli několik miRNA, které odlišují skupiny hubených a obézních. Jedná se o *hsa-miR-17-5p*, *hsa-miR-20a-5p* a *hsa-let-7b-5p*, jejichž exprese byla významně snížena u obézních subjektů. Navíc jsme zjistili, že poměr exprese *hsa-miR-17-5p* mezi hubenými a obézními zůstává zachován i v rámci dietní intervence.

Změnu exprese *miR-17-5p* v souvislosti s obezitou identifikovali i další studie, v nichž bylo rovněž pozorováno její snížení u obézních subjektů (Heneghan et al., 2011; Klötting et al., 2009). Na rozdíl od naší práce byly tyto miRNA v první studii izolovány z tukové tkáně (Klötting et al., 2009) a v případě druhé studie z tukové tkáně a krve (Heneghan et al., 2011). V rozporu s těmito výsledky jsou autoři (Karolina et al., 2012), kteří ve své práci mezi skupinami obézních a hubených rozdílou expresi *miR-17-5p* neodhalili. Tuto skutečnost přikládají odlišnému podílu diabetiků v testované skupině obézních subjektů a naznačují, že snížená exprese *miR-17-5p* je spíše než s vysokým BMI spojena s diabetem 2. typu. miRNA byla v případě této studie izolována, stejně jako v naší práci, z exosomů (Karolina et al., 2012). *miR-17-5p* by dle *in vitro* studie (Wang et al., 2008) prováděné na buněčné linii 3T3L1 mohla podporovat diferenciaci adipocytů prostřednictvím snížení genové exprese Rb2/p130. Ve studii na lidských kmenových buňkách tukové tkáně (hADSCs) bylo publikováno, že zvýšená exprese *miR-17-5p* navozuje adipogenezi a snižuje osteogenezi inhibicí genové exprese kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP2) (Li et al., 2013). K odlišným výsledkům došli autoři studie (Han et al., 2017), kteří prokázali, že s nadměrnou expresí *miR-17-5p* dochází ke snížené diferenciaci prasečích preadipocytů. Tato studie potvrdila, že *miR-17-5p* inhibuje expresi NCOA3, který hraje roli v ukládání a distribuci tuku. Pozorováno bylo rovněž snížení hladiny triglyceridů. Autoři tento nesoulad přikládají rozdílům mezi buněčnými typy používanými v jednotlivých studiích (Han et al., 2017).

Zmínky o expresi *miR-20a-5p* se v ostatních studiích vyskytují především v souvislosti s její rolí v regulaci proliferačních signálů a diagnostikou rakoviny prsu, jater a leukémie (Huang et al., 2022; Zhao et al., 2018). Role *miR-20a-5p* v metabolických drahách včetně inzulinové signalizace byla odhalena ve studii (Pheiffer et al., 2018), kde bylo snížení její exprese asociováno s rozvojem gestačního diabetu. Naše odhalení exprese *miR-20a-5p* v souvislosti s obezitou podporují výsledky studie (Zhang et al., 2021). Tato studie na myších modelech i lidských subjektech potvrdila, že *miR-20a-5p* hraje důležitou roli v regulaci adipogeneze a lipogeneze, a mohla by tedy podle autorů představovat biomarker obezity. Konkrétně by měla funkce *miR-20a-5p* spočívat v negativní regulaci genu PVT1, který je asociovaný se zvýšenou syntézou a sníženou oxidací mastných kyselin (Zhang et al., 2021).

Naše výsledky jsou rovněž v souladu se studií (Hsieh et al., 2015), kde byla snížená exprese *let-7b* zaznamenána u obézních myší. Tyto výsledky byly potvrzeny jak na myších, tak lidských subjektech ve studii (Jones et al., 2017), kde byla snížená exprese *let-7b* navíc asociována i se zvýšenou inzulinovou rezistencí. Autoři (Zhao et al., 2022) naopak publikovali, že exprese *let-7b-5p* v hepatocytárních exosomech je stimulovaná prostřednictvím TGF- β , jehož signalizace je často spojena s metabolickým syndromem. *let-7b-5p* podle nich přímo reguluje expresi *Adrb3* (Zhao et al., 2022). β 3-adrenoceptor kódovaný tímto genem je lokalizovaný především v tukové tkáni a podílí se na regulaci lipolýzy (Perrone a Scilimati, 2010). Vyšší exprese *let-7b-5p* by tak mělo docházet ke zvýšení objemu bílé tukové tkáně a k její dysfunkci (Zhao et al., 2022), což je v rozporu s našimi výsledky, jelikož obézní skupina měla tuto expresi sníženou.

6.4.2. Analýza změny miRNA exprese v sEV v důsledku 60 h hladovění

Byly pozorovány změny exprese miRNA navozené dietní intervencí 60 h hladovění. Jako statisticky významná byla u všech subjektů bez ohledu na BMI vyhodnocena odlišná exprese *hsa-miR-21-5p*, která byla po hladovění snížena. *miR-21* je v dostupné literatuře asociována se zánětlivou odpovědí a poruchou homeostázy v těle (Sheedy, 2015). Její zvýšená hladina byla ve studii (Valenti et al., 2019) pozorována po intenzivní fyzické činnosti. V jiné studii byla její hladina bezprostředně po fyzické činnosti snížena a byla zvyšována postupně v průběhu zotavování (Cui et al., 2017). Změny exprese *miR-21-5p* pozorované v důsledku nutričních intervencí nebyly doposud v námi dostupných studiích publikovány. *miR-21-5p* byla

v této diplomové práci použita jako součást souboru referenčních genů normalizace I a změny v její expresi jsou velmi drobné (na úrovni 5–7 %). Ačkoliv se tyto změny jeví jako statisticky významné, biologicky mohou být zanedbatelné a nemusí hrát žádnou roli.

V důsledku 60 h hladovění byla pozorována rovněž významně zvýšená exprese *hsa-miR-126-5p*, která ale po korekci na mnohonásobné testování nebyla v rámci jedné normalizace brána v potaz. Dle literatury je tato miRNA hojně exprimovaná endoteliálními buňkami a hraje roli v procesu angiogeneze (Yamakuchi a Hashiguchi, 2018; Eyileten *et al.*, 2022). *miR-126-5p* potlačuje expresi 2 negativních regulátorů signální dráhy vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), konkrétně Sprouty-related proteinu (SPRED1) a fosfoinositol-3-kinázové regulační podjednotky 2 (PIK3R2/p85-beta) (Fish *et al.*, 2008). Zároveň potlačuje cévní zánětlivé procesy inhibicí exprese genu pro vaskulární buněčnou adhezní molekulu 1 (VCAM-1), který zprostředkovává adhezi leukocytů k endoteliálním buňkám (Harris *et al.*, 2008). Její snížená exprese byla pozorována v souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním (Li *et al.*, 2016), diabetem 2. typu a s vysokou glykemií (Zampetaki *et al.*, 2010). Odlišná exprese *miR-126-5p* byla v závislosti na hladině glukózy zaznamenána rovněž v *in vitro* studii (Olivieri *et al.*, 2014), kde byla její exprese snížena u lidských endoteliálních buněk (HUVEC) inkubovaných ve vysokoglukózovém médiu. Tyto poznatky korespondují s našimi výsledky, kdy následkem dietní intervence, a tedy nižší glykemie, došlo ke zvýšené expresi této miRNA. Stejný efekt na expresi *miR-126-5p* byl pozorován ve studii (Eyileten *et al.*, 2022), kde bylo její zvýšení pozorovatelné ještě 7 dní po navození hypoglykemie pomocí hyperglykemického clampu. *miR-126-5p* by tak mohla mít souvislost s některými pozitivními účinky, které bývají s hladověním či přerušovaným půstem spojovány, jako je například prevence kardiovaskulárního onemocnění, diabetu či rozvoje zánětu a efektivnější hojení ran.

Ve skupině hubených se nám podařilo v souvislosti s dietní intervencí identifikovat změnu exprese *hsa-miR-5100*. Tato signifikance nebyla po korekci na mnohonásobné testování brána v potaz. Nicméně vzhledem k velkému rozdílu v její expresi, která byla po 60 h hladovění o více jak 80 % vyšší, se dá předpokládat, že by mohla mít biologický význam. Dostupná literatura uvádí, že *miR-5100* potlačuje vznik a rozvoj rakoviny pankreatu inhibicí exprese genu kódujícího podocalyxin-like protein (PODXL) (Chijiwa *et al.*, 2016). Naopak ve studii (Huang *et al.*, 2015) se uvádí, že zvýšená exprese *miR-5100* je asociována s rozvojem rakoviny plic potlačením genové exprese ras-related proteinu (Rab6). Souvislost dietních intervencí

s *miR-5100* a změnami v její expresi nebyla doposud v námi dostupné literatuře popsána a představuje tedy námět pro další studium.

Ve skupině obézních byly v návaznosti na 60 h hladovění objeveny změny exprese *hsa-miR-27a-3p* a *hsa-miR-27b-3p*, společně s již zmíněnou *hsa-miR-21-5p*. Tyto signifikance nebyly po korekci na mnohonásobné testování, stejně jako v případě hubených subjektů, zachovány. *miR-27a* a *miR-27b* jsou v literatuře spojované s regulací adipogeneze (Lin *et al.*, 2009; Sun a Trajkovski, 2014). Autoři studie (Lin *et al.*, 2009) publikovali, že rodina *miR-27* blokuje genovou expresi peroxizomálními proliferátory aktivovaných receptorů γ (PPAR γ), které představují jedny z hlavních proadipogenních transkripčních faktorů. Podle autorů tedy *miR-27a* a *miR-27b* představují novou třídu adipogenních inhibitorů. Ve studii (Kulshreshtha *et al.*, 2007) byla pozorována zvýšená exprese *miR-27a* v podmínkách hypoxie. Autoři (Lin *et al.*, 2009) se domnívají, že exprese *miR-27a* se mění v důsledku vlivů mnoha dalších stresových podmínek (Lin *et al.*, 2009), což by odpovídalo i zvýšené expresi vyvolané 60 h hladověním, kterou jsme pozorovali v naší práci. Data publikace (Vickers *et al.*, 2013) naznačují, že *miR-27b* má vliv na geny lipidového metabolismu. Jejím působením dochází ke snížení genové exprese glycerol-3-fosfát acyltransferázy 1 (GPAM) s následným zvýšením hladiny plasmatických triglyceridů. Dalším genem, jehož expresi *miR-27b* inhibuje, je angiopoietin-like 3 (ANGPTL3), který potlačuje aktivitu lipoproteinových lipáz (Vickers *et al.*, 2013). Je tedy možné, že by *miR-27b-5p* mohla svou funkcí v rámci efektu hladovění přispívat ke kontrole hladiny plasmatických lipidů.

Vliv dietních intervencí na expresi miRNA byl zkoumán i ve studiích (Hess *et al.*, 2020; Ravanidis *et al.*, 2021). Autoři (Hess *et al.*, 2020) analyzovali změnu exprese cirkulujících miRNA po 12 týdenním kalorickém deficitu, který představoval 500 kcal/den. Identifikovány byly odlišné exprese u 4 miRNA (*miR-122-5p*, *miR-126-3p*, *miR-193a-5p*, *miR-222-3p* a *miR-485-5p*). Ve studii (Ravanidis *et al.*, 2021) byla analyzována změna exprese plasmatické miRNA v důsledku kalorické restrikce s denním příjmem 250 kcal v podobě ovocného džusu a zeleninové polévky po dobu 10 dnů. Významné změny exprese byly vyhodnoceny u 7 miRNA (*miR-19b-3p*, *miR22-3p*, *miR-122-5p*, *miR-126-3p*, *miR-142-3p*, *miR-143-3p* a *miR-145-5p*). Tyto studie zaznamenaly oproti naší práci v souvislosti s dietní intervencí významně více změn v genové expresi, což by mohlo být způsobeno délkou intervence, která byla v našem případě mnohem kratší. Dalším faktorem může být například i odlišný výběr analyzovaných miRNA. Autoři (Ravanidis *et al.*, 2021) analyzovali expresi 24 předem vybraných miRNA, které byly v dostupné literatuře asociované s metabolismem a jeho

poruchami, ve studii (Hess et al., 2020) se jednalo o analýzu 22 miRNA. Studie (Hess et al., 2020) navíc pracovala s výrazně vyšším počtem vzorků, které byly odebírány od 85 subjektů.

7. ZÁVĚR

Byla provedena úspěšná izolace sEV ze vzorků plasmy obézních a hubených žen, která byla ověřena změřením velikosti a koncentrace izolovaných částic pomocí metody NTA a detekcí specifických povrchových markerů CD9 a CD81 metodou Western Blot. Na základě těchto dat bylo zároveň stanoveno, že hlavní část izolovaných sEV představují exosomy.

Velikosti ani koncentrace částic ve vzorcích sEV se mezi hubenými a obézními subjekty nelišily před ani po navozené dietní intervenci. V důsledku 60 h hladovění došlo k významnému snížení velikosti sEV u skupiny hubených, které u obézních pozorováno nebylo.

Dále byly provedeny analýzy miRNA exprese v sEV. Byly identifikovány miRNA, které jsou pravděpodobně rozdělovacím elementem u hubených a obézních subjektů. Jedná se konkrétně o *hsa-miR-17-5p*, *hsa-miR-20a-5p* a *hsa-let-7b-5p*, jejichž exprese byly u skupiny obézních výrazně sníženy. Poměr exprese *hsa-miR-17-5p* mezi hubenými a obézními byl navíc zachován i po dietní intervenci. Změny exprese miRNA v důsledku hladovění byly u lidských subjektů v rámci studovaného setu miRNA velmi malé. Podstatně větší množství informací bylo obdrženo porovnáním skupin hubených a obézních.

Předmětem dalšího výzkumu by nyní mohlo být podrobné studium jednotlivých identifikovaných miRNA a jejich role ve fyziologických i patofyziologických procesech spojených s obezitou a dietními intervencemi.

LITERATURA

- Akbar, N., Azzimato, V., Choudhury, R.P., Aouadi, M., 2019. Extracellular vesicles in metabolic disease. *Diabetologia* 62, 2179–2187.
- Alvarado, H.M., Millan, E.C., Hernandez, M.H., Teros, V.L., Moreno, B.I.P., Duran, M.L.R., Corona, I.A., Munguia, B.C., Astiazaran-Garcia, H., 2019. Morphometric Characterization of Extracellular Vesicles and Their Contents of miRNA-145 in Adults with and Without Obesity. *Curr Dev Nutr* 3, P18-127-19.
- Anderson, H.C., 1969. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 41, 59–72.
- Bang, C., Thum, T., 2012. Exosomes: New players in cell–cell communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 2060–2064.
- Battaglia, G.M., Zheng, D., Hickner, R.C., Houmard, J.A., 2012. Effect of exercise training on metabolic flexibility in response to a high-fat diet in obese individuals. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E1440-1445.
- Battistelli, M., Falcieri, E., 2020. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)* 9, 21.
- Benz, E.W., Moses, H.L., 1974. Small, virus-like particles detected in bovine sera by electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 52, 1931–1934.
- Borges, F.T., Reis, L.A., Schor, N., 2013. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res* 46, 824–830.
- Brandhorst, S., Longo, V.D., 2016. Fasting and Caloric Restriction in Cancer Prevention and Treatment. *Recent Results Cancer Res* 207, 241–266.
- Bunggulawa, E.J., Wang, W., Yin, T., Wang, N., Durkan, C., Wang, Y., Wang, G., 2018. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *Journal of Nanobiotechnology* 16, 81.
- Campello, E., Zabeo, E., Radu, C.M., Spiezia, L., Foletto, M., Prevedello, L., Gavasso, S., Bulato, C., Vettor, R., Simioni, P., 2016. Dynamics of circulating microparticles in obesity after weight loss. *Intern Emerg Med* 11, 695–702.
- Camussi, G., Deregibus, M.C., Bruno, S., Cantaluppi, V., Biancone, L., 2010. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International* 78, 838–848.
- Chijiwa, Y., Moriyama, T., Ohuchida, K., Nabae, T., Ohtsuka, T., Miyasaka, Y., Fujita, H., Maeyama, R., Manabe, T., Abe, A., Mizuuchi, Y., Oda, Y., Mizumoto, K., Nakamura, M., 2016. Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL. *International Journal of Oncology* 48, 1688–1700.
- Chivero, E.T., Dagur, R.S., Peeples, E.S., Sil, S., Liao, K., Ma, R., Chen, L., Gurumurthy, C.B., Buch, S., Hu, G., 2021. Biogenesis, physiological functions and potential applications of extracellular vesicles in substance use disorders. *Cell Mol Life Sci* 78, 4849–4865.
- Cookson, P., Sutherland, J., Cardigan, R., 2004. A simple spectrophotometric method for the quantification of residual haemoglobin in platelet concentrates. *Vox Sang* 87, 264–271.

- Crewe, C., Joffin, N., Rutkowski, J.M., Kim, M., Zhang, F., Towler, D.A., Gordillo, R., Scherer, P.E., 2018. An Endothelial-to-Adipocyte Extracellular Vesicle Axis Governed by Metabolic State. *Cell* 175, 695-708.e13.
- Cui, S., Sun, B., Yin, X., Guo, X., Chao, D., Zhang, C., Zhang, C.-Y., Chen, X., Ma, J., 2017. Time-course responses of circulating microRNAs to three resistance training protocols in healthy young men. *Sci Rep* 7, 2203.
- Dalton, A.J., 1975. Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus “virus-like” particles. *J Natl Cancer Inst* 54, 1137–1148.
- Deng, Z., Poliakov, A., Hardy, R.W., Clements, R., Liu, C., Liu, Y., Wang, J., Xiang, X., Zhang, S., Zhuang, X., Shah, S.V., Sun, D., Michalek, S., Grizzle, W.E., Garvey, T., Mobley, J., Zhang, H.-G., 2009. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes* 58, 2498–2505.
- Dini, L., Tacconi, S., Carata, E., Tata, A.M., Vergallo, C., Panzarini, E., 2020. Microvesicles and exosomes in metabolic diseases and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 51, 27–39.
- Doyle, L.M., Wang, M.Z., 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8, 727.
- Dvorak, H.F., Quay, S.C., Orenstein, N.S., Dvorak, A.M., Hahn, P., Bitzer, A.M., Carvalho, A.C., 1981. Tumor shedding and coagulation. *Science* 212, 923–924.
- Eguchi, A., Lazic, M., Armando, A.M., Phillips, S.A., Katebian, R., Maraka, S., Quehenberger, O., Sears, D.D., Feldstein, A.E., 2016. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J Mol Med (Berl)* 94, 1241–1253.
- Eyileten, C., Wicik, Z., Keshwani, D., Aziz, F., Aberer, F., Pferschy, P.N., Tripolt, N.J., Sourij, C., Prietl, B., Prüller, F., von Lewinski, D., De Rosa, S., Siller-Matula, J.M., Postula, M., Sourij, H., 2022. Alteration of circulating platelet-related and diabetes-related microRNAs in individuals with type 2 diabetes mellitus: a stepwise hypoglycaemic clamp study. *Cardiovascular Diabetology* 21, 79.
- Faraldi, M., Gomasca, M., Sansoni, V., Perego, S., Banfi, G., Lombardi, G., 2019. Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. *Sci Rep* 9, 1584.
- Ferrante, S.C., Nadler, E.P., Pillai, D.K., Hubal, M.J., Wang, Z., Wang, J.M., Gordish-Dressman, H., Koeck, E., Sevilla, S., Wiles, A.A., Freishtat, R.J., 2015. Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. *Pediatr Res* 77, 447–454.
- Février, B., Raposo, G., 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16, 415–421.
- Fish, J.E., Santoro, M.M., Morton, S.U., Yu, S., Yeh, R.-F., Wythe, J.D., Ivey, K.N., Bruneau, B.G., Stainier, D.Y.R., Srivastava, D., 2008. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 15, 272–284.
- Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K., Simons, M., 2011. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci* 124, 447–458.

- Garcia-Martin, R., Brandao, B.B., Thomou, T., Altindis, E., Kahn, C.R., 2022. Tissue differences in the exosomal/small extracellular vesicle proteome and their potential as indicators of altered tissue metabolism. *Cell Rep* 38, 110277.
- Giardina, S., 2019. Changes in circulating miRNAs in healthy overweight and obese subjects: Effect of diet composition and weight loss. *Clinical Nutrition* 38, 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.11.014>
- Goichot, B., Grunebaum, L., Desprez, D., Vinzio, S., Meyer, L., Schlienger, J.L., Lessard, M., Simon, C., 2006. Circulating procoagulant microparticles in obesity. *Diabetes Metab* 32, 82–85.
- Goodpaster, B.H., Sparks, L.M., 2017. Metabolic flexibility in health and disease. *Cell Metab* 25, 1027–1036.
- Grazia Perrone, M., Scilimati, A., 2010. Chapter Eleven - β 3-Adrenoceptor Agonists and (Antagonists as) Inverse Agonists: History, Perspective, Constitutive Activity, and Stereospecific Binding, in: Conn, P.M. (Ed.), *Methods in Enzymology, Constitutive Activity in Receptors and Other Proteins, Part A*. Academic Press, pp. 197–230.
- Guay, C., Regazzi, R., 2017. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 19, 137–146.
- Gudden, J., Arias Vasquez, A., Bloemendaal, M., 2021. The Effects of Intermittent Fasting on Brain and Cognitive Function. *Nutrients* 13, 3166.
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., Kim, J.-H., 2019. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* 8, E307.
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., Baruteau, J., 2021. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling* 19, 47.
- Han, H., Gu, S., Chu, W., Sun, W., Wei, W., Dang, X., Tian, Y., Liu, K., Chen, J., 2017. miR-17-5p Regulates Differential Expression of NCOA3 in Pig Intramuscular and Subcutaneous Adipose Tissue. *Lipids* 52, 939–949.
- Haney, M.J., Klyachko, N.L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E.G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., 2015. Exosomes as Drug Delivery Vehicles for Parkinson's Disease Therapy. *J Control Release* 207, 18–30.
- Harding, C., Heuser, J., Stahl, P., 1984. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 35, 256–263.
- Harris, T.A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J.T., Lowenstein, C.J., 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1516–1521.
- Hauser, P., Wang, S., Didenko, V.V., 2017. Apoptotic Bodies: Selective Detection in Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol* 1554, 193–200.
- Heinrich, L.F., Andersen, D.K., Cleasby, M.E., Lawson, C., 2015. Long-term high fat feeding of rats results in increased numbers of circulating microvesicles with pro-inflammatory effects on endothelial cells. *Br J Nutr* 113, 1704–1711.

- Heneghan, H.M., Miller, N., McAnena, O.J., O'Brien, T., Kerin, M.J., 2011. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E846-850.
- Hess, A.L., Larsen, L.H., Udesen, P.B., Sanz, Y., Larsen, T.M., Dalgaard, L.T., 2020. Levels of Circulating miR-122 are Associated with Weight Loss and Metabolic Syndrome. *Obesity* 28, 493–501.
- Hsieh, C.-H., Rau, C.-S., Wu, S.-C., Yang, J.C.-S., Wu, Y.-C., Lu, T.-H., Tzeng, S.-L., Wu, C.-J., Lin, C.-W., 2015. Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice. *BMC Genomics* 16, 699.
- Hu, G., Drescher, K., Chen, X., 2012. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Frontiers in Genetics* 3.
- Huang, H., Jiang, Y., Wang, Y., Chen, T., Yang, L., He, H., Lin, Z., Liu, T., Yang, T., Kamp, D.W., Wu, B., Liu, G., 2015. miR-5100 promotes tumor growth in lung cancer by targeting Rab6. *Cancer Lett* 362, 15–24.
- Huang, W., Wu, X., Xiang, S., Qiao, M., Cen, X., Pan, X., Huang, X., Zhao, Z., 2022. Regulatory mechanism of miR-20a-5p expression in Cancer. *Cell Death Discov.* 8, 1–10.
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, Meihua, Dittmar, R.L., Liu, Y., Liang, Mingyu, Kohli, M., Thibodeau, S.N., Boardman, L., Wang, L., 2013. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 14, 319.
- Huang-Doran, I., Zhang, C.-Y., Vidal-Puig, A., 2017. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 28, 3–18.
- Huynh, T., Lai, M.J., Liu, Y.L., Ly, L., Gong, X., Rommel, K.R., Young, D.L., 2017. Spectral Analysis Methods Based on Background Subtraction and Curvature Calculation Used in the Detection or Quantification of Hemolysis and Icterus in Blood-derived Clinical Samples. *Cureus* 9, e1965.
- Iacomino, G., Siani, A., 2017. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & Nutrition* 12, 23.
- Ismail, N., Wang, Y., Dakhllallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T.D., Tridandapani, S., Paulaitis, M.E., Piper, M.G., Marsh, C.B., 2013. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 121, 984–995.
- Jeppesen, D.K., Fenix, A.M., Franklin, J.L., Higginbotham, J.N., Zhang, Q., Zimmerman, L.J., Liebler, D.C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W.H., Patton, J.G., Rome, L.H., Burnette, D.T., Coffey, R.J., 2019. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* 177, 428-445.e18.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262, 9412–9420.
- Jones, A., Danielson, K.M., Benton, M.C., Ziegler, O., Shah, R., Stubbs, R.S., Das, S., Macartney-Coxson, D., 2017. miRNA signatures of insulin resistance in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 25, 1734–1744.
- Kakarla, R., Hur, J., Kim, Y.J., Kim, J., Chwae, Y.-J., 2020. Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. *Exp Mol Med* 52, 1–6.

- Kalani, A., Tyagi, A., Tyagi, N., 2014. Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics. *Mol Neurobiol* 49, 590–600.
- Karolina, D.S., Tavintharan, S., Armugam, A., Sepramaniam, S., Pek, S.L.T., Wong, M.T.K., Lim, S.C., Sum, C.F., Jeyaseelan, K., 2012. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E2271-2276.
- Kelley, D.E., Goodpaster, B., Wing, R.R., Simoneau, J.A., 1999. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 277, E1130-1141.
- Khanna, A., Muthusamy, S., Liang, R., Sarojini, H., Wang, E., 2011. Gain of survival signaling by down-regulation of three key miRNAs in brain of calorie-restricted mice. *Aging (Albany NY)* 3, 223–236.
- Kirschner, M.B., Edelman, J.J.B., Kao, S.C.-H., Vallely, M.P., van Zandwijk, N., Reid, G., 2013. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet* 4, 94.
- Kita, S., Maeda, N., Shimomura, I., 2019. Interorgan communication by exosomes, adipose tissue, and adiponectin in metabolic syndrome. *J Clin Invest* 129, 4041–4049.
- Klötting, N., Berthold, S., Kovacs, P., Schön, M.R., Fasshauer, M., Ruschke, K., Stumvoll, M., Blüher, M., 2009. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One* 4, e4699.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., Ochiya, T., 2010. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 1, 7.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., Rajewsky, N., 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495–500.
- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F.J., Davuluri, R., Liu, C.G., Croce, C.M., Negrini, M., Calin, G.A., Ivan, M., 2007. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol* 27, 1859–1867.
- Landrier, J.F., Derghal, A., Mounien, L., 2019. MicroRNAs in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Cells* 8, 859.
- Lässer, C., 2012. Exosomal RNA as biomarkers and the therapeutic potential of exosome vectors. *Expert Opin Biol Ther* 12 Suppl 1, S189-197.
- Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., Record, M., 2004. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 380, 161–171.
- Lee, J.E., Moon, P.G., Lee, I.K., Baek, M.C., 2015. Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Released by Adipocytes of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. *Protein J* 34, 220–235.
- Levine, M.E., Suarez, J.A., Brandhorst, S., Balasubramanian, P., Cheng, C.-W., Madia, F., Fontana, L., Mirisola, M.G., Guevara-Aguirre, J., Wan, J., Passarino, G., Kennedy, B.K., Wei, M., Cohen, P., Crimmins, E.M., Longo, V.D., 2014. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metab* 19, 407–417.

- Li, H., Li, T., Wang, S., Wei, J., Fan, J., Li, J., Han, Q., Liao, L., Shao, C., Zhao, R.C., 2013. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* 10, 313–324.
- Li, H.Y., Zhao, X., Liu, Y.Z., Meng, Z., Wang, D., Yang, F., Shi, Q.-W., 2016. Plasma MicroRNA-126-5p is Associated with the Complexity and Severity of Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina Pectoris. *Cell Physiol Biochem* 39, 837–846.
- Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., Vlassov, A.V., 2014. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130502.
- Lin, Q., Gao, Z., Alarcon, R.M., Ye, J., Yun, Z., 2009. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *The FEBS Journal* 276, 2348–2358.
- Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., Sandvig, K., 2013. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1831, 1302–1309.
- Ludwig, A.K., De Miroschedji, K., Doepfner, T.R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., Behrmann, E., Singer, B.B., Jastrow, H., Kuhlmann, J.D., El Magraoui, F., Meyer, H.E., Hermann, D.M., Opalka, B., Raunser, S., Epple, M., Horn, P.A., Giebel, B., 2018. Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of Extracellular Vesicles* 7, 1528109.
- MacFarlane, L.-A., Murphy, P.R., 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 11, 537–561.
- Mahoney, L.B., Denny, C.A., Seyfried, T.N., 2006. Caloric restriction in C57BL/6J mice mimics therapeutic fasting in humans. *Lipids Health Dis* 5, 13.
- Mendivil-Alvarado, H., Sosa-León, L.A., Carvajal-Millan, E., Astiazaran-Garcia, H., 2022. Malnutrition and Biomarkers: A Journey through Extracellular Vesicles. *Nutrients* 14, 1002.
- Mleczo, J., Ortega, F.J., Falcon-Perez, J.M., Wabitsch, M., Fernandez-Real, J.M., Mora, S., 2018. Extracellular Vesicles from Hypoxic Adipocytes and Obese Subjects Reduce Insulin-Stimulated Glucose Uptake. *Mol Nutr Food Res* 62.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., Carter, D.R.F., 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles* 3, 24641.
- Murakami, T., Horigome, H., Tanaka, K., Nakata, Y., Ohkawara, K., Katayama, Y., Matsui, A., 2007. Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thrombosis Research* 119, 45–53.
- Nederveen, J.P., Warnier, G., Di Carlo, A., Nilsson, M.I., Tarnopolsky, M.A., 2021. Extracellular Vesicles and Exosomes: Insights From Exercise Science. *Frontiers in Physiology* 11.
- Nencioni, A., Caffà, I., Cortellino, S., Longo, V.D., 2018. Fasting and cancer: molecular mechanisms and clinical application. *Nat Rev Cancer* 18, 707–719.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* 9.

- Olenick, A. Metabolic Flexibility Among Women after a Single High Fat Meal. Western Kentucky University, 2017. Masters Theses & Specialist Projects. Paper 1970.
- Olivieri, F., Bonafè, M., Spazzafumo, L., Gobbi, M., Prattichizzo, F., Recchioni, R., Marcheselli, F., La Sala, L., Galeazzi, R., Rippo, M.R., Fulgenzi, G., Angelini, S., Lazzarini, R., Bonfigli, A.R., Brugè, F., Tiano, L., Genovese, S., Ceriello, A., Boemi, M., Franceschi, C., Procopio, A.D., Testa, R., 2014. Age- and glycemia-related miR-126-3p levels in plasma and endothelial cells. *Aging (Albany NY)* 6, 771–787.
- Olivo-Marston, S.E., Hursting, S.D., Perkins, S.N., Schetter, A., Khan, M., Croce, C., Harris, C.C., Lavigne, J., 2014. Effects of Calorie Restriction and Diet-Induced Obesity on Murine Colon Carcinogenesis, Growth and Inflammatory Factors, and MicroRNA Expression. *PLoS One* 9, e94765.
- Ozorhan, U., Tuna, B.G., Cicekdal, M.B., Kuskucu, A., Bayrak, O.F., Yilmaz, B., Demirel, P.B., Cleary, M.P., Dogan, S., 2022. Long-term chronic caloric restriction alters miRNA profiles in the brain of ageing mice. *British Journal of Nutrition* 127, 641–652.
- Pan, Y., Hui, X., Hoo, R.L.C., Ye, D., Chan, C.Y.C., Feng, T., Wang, Y., Lam, K.S.L., Xu, A., 2019. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. *J Clin Invest* 129, 834–849.
- Paoletti, R., Bolego, C., Poli, A., Cignarella, A., 2006. Metabolic Syndrome, Inflammation and Atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag* 2, 145–152.
- Pardo, F., Villalobos-Labra, R., Sobrevia, B., Toledo, F., Sobrevia, L., 2018. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Mol Aspects Med* 60, 81–91.
- Pegtel, D.M., Gould, S.J., 2019. Exosomes. *Annual Review of Biochemistry* 88, 487–514.
- Pheiffer, C., Dias, S., Rheeder, P., Adam, S., 2018. Decreased Expression of Circulating miR-20a-5p in South African Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Mol Diagn Ther* 22, 345–352.
- Phoonsawat, W., Aoki-Yoshida, A., Tsuruta, T., Sonoyama, K., 2014. Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum. *Biochem Biophys Res Commun* 448, 261–266.
- Plotti, F., Terranova, C., Luvero, D., Bartolone, M., Messina, G., Feole, L., Cianci, S., Scaletta, G., Marchetti, C., Di Donato, V., Fagotti, A., Scambia, G., Benedetti Panici, P., Angioli, R., 2020. Diet and Chemotherapy: The Effects of Fasting and Ketogenic Diet on Cancer Treatment. *Chemotherapy* 65, 77–84.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161–1172.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M.Z., 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20, 1487–1495.
- Ratajczak, M.Z., Ratajczak, J., 2020. Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia* 34, 3126–3135.
- Ravanidis, S., Grundler, F., de Toledo, F.W., Dimitriou, E., Tekos, F., Skaperda, Z., Kouretas, D., Doxakis, E., 2021. Fasting-mediated metabolic and toxicity reprogramming impacts circulating microRNA levels in humans. *Food Chem Toxicol* 152, 112187.

- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., Silvente-Poirot, S., 2014. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta* 1841, 108–120.
- Rognlien, K.T., Woodbury, D.J., 2003. Chapter 16 - Reconstituting SNARE proteins into BLMs, in: Tien, H.T., Ottova-Leitmannova, A. (Eds.), *Membrane Science and Technology, Planar Lipid Bilayers (BLMs) and Their Applications*. Elsevier, pp. 479–488.
- Ross, S.A., Davis, C.D., 2014. The emerging role of microRNAs and nutrition in modulating health and disease. *Annu Rev Nutr* 34, 305–336.
- Santamaria-Martos, F., Benitez, I.D., Latorre, J., Lluch, A., Moreno-Navarrete, J.M., Sabater, M., Ricart, W., Sanchez de la Torre, M., Mora, S., Fernández-Real, J.M., Ortega, F.J., 2020. Comparative and functional analysis of plasma membrane-derived extracellular vesicles from obese vs. nonobese women. *Clin Nutr* 39, 1067–1076.
- Santovito, D., De Nardis, V., Marcantonio, P., Mandolini, C., Paganelli, C., Vitale, E., Buttitta, F., Bucci, M., Mezzetti, A., Consoli, A., Cipollone, F., 2014. Plasma Exosome MicroRNA Profiling Unravels a New Potential Modulator of Adiponectin Pathway in Diabetes: Effect of Glycemic Control. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99, E1681–E1685.
- Secor, S., Carey, H., 2016. Integrative Physiology of Fasting. *Comprehensive Physiology* 6, 773–825.
- Shah, J.S., Soon, P.S., Marsh, D.J., 2016. Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PLOS ONE* 11, e0153200.
- Shastri, A.A., Saleh, A., Savage, J.E., DeAngelis, T., Camphausen, K., Simone, N.L., 2020. Dietary alterations modulate the microRNA 29/30 and IGF-1/AKT signaling axis in breast Cancer liver metastasis. *Nutrition & Metabolism* 17, 23.
- Sheedy, F.J., 2015. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology* 6.
- Smith, R.L., Soeters, M.R., Wüst, R.C.I., Houtkooper, R.H., 2018. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr Rev* 39, 489–517.
- Sobotníková, J., 2004. Vylučovací chromatografie (Size Exclusion Chromatography, SEC). Univerzita Karlova [online], cit. 2022-07-29. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~suchan/SEC_2021_web.pdf
- Stegmayr, B., Ronquist, G., 1982. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 10, 253–257.
- Stepanian, A., Bourguignat, L., Hennou, S., Coupaye, M., Hajage, D., Salomon, L., Alessi, M.-C., Msika, S., de Prost, D., 2013. Microparticle increase in severe obesity: not related to metabolic syndrome and unchanged after massive weight loss. *Obesity (Silver Spring)* 21, 2236–2243.
- Sun, L., Trajkovski, M., 2014. MiR-27 orchestrates the transcriptional regulation of brown adipogenesis. *Metabolism* 63, 272–282.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3, Unit 3.22.

Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., Ayre, D.C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N.N., Baxter, A.A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A.C., Bergese, P., Bielska, E., Blenkinsop, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E., Boireau, W., Bongiovanni, A., Borràs, F.E., Bosch, S., Boulanger, C.M., Breakefield, X., Breglio, A.M., Brennan, M.Á., Brigstock, D.R., Brisson, A., Broekman, M.L., Bromberg, J.F., Bryl-Górecka, P., Buch, S., Buck, A.H., Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzás, E.I., Byrd, J.B., Camussi, G., Carter, D.R., Caruso, S., Chamley, L.W., Chang, Y.-T., Chen, C., Chen, S., Cheng, L., Chin, A.R., Clayton, A., Clerici, S.P., Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R.J., Cordeiro-da-Silva, A., Couch, Y., Coumans, F.A., Coyle, B., Crescitelli, R., Criado, M.F., D'Souza-Schorey, C., Das, S., Datta Chaudhuri, A., de Candia, P., De Santana, E.F., De Wever, O., Del Portillo, H.A., Demaret, T., Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L.C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A.P., Dominici, M., Dourado, M.R., Driedonks, T.A., Duarte, F.V., Duncan, H.M., Eichenberger, R.M., Ekström, K., El Andaloussi, S., Elie-Caille, C., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J.M., Fatima, F., Fish, J.E., Flores-Bellver, M., Försonits, A., Frelet-Barrand, A., Fricke, F., Fuhrmann, G., Gabriëlsson, S., Gámez-Valero, A., Gardiner, C., Gärtner, K., Gaudin, R., Ghosh, Y.S., Giebel, B., Gilbert, C., Gimona, M., Giusti, I., Goberdhan, D.C., Görgens, A., Gorski, S.M., Greening, D.W., Gross, J.C., Gualerzi, A., Gupta, G.N., Gustafson, D., Handberg, A., Haraszti, R.A., Harrison, P., Hegyesi, H., Hendrix, A., Hill, A.F., Hochberg, F.H., Hoffmann, K.F., Holder, B., Holthofer, H., Hosseinkhani, B., Hu, G., Huang, Y., Huber, V., Hunt, S., Ibrahim, A.G.-E., Ikezu, T., Inal, J.M., Isin, M., Ivanova, A., Jackson, H.K., Jacobsen, S., Jay, S.M., Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S.M., Jones, J.C., Jong, A., Jovanovic-Talisman, T., Jung, S., Kalluri, R., Kano, S.-I., Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E.T., Khamari, D., Khomyakova, E., Khvorova, A., Kierulf, P., Kim, K.P., Kislinger, T., Klingeborn, M., Klinke, D.J., Kornek, M., Kosanović, M.M., Kovács, Á.F., Krämer-Albers, E.-M., Krasemann, S., Krause, M., Kurochkin, I.V., Kusuma, G.D., Kuypers, S., Laitinen, S., Langevin, S.M., Languino, L.R., Lannigan, J., Lässer, C., Laurent, L.C., Lavieu, G., Lázaro-Ibáñez, E., Le Lay, S., Lee, M.-S., Lee, Y.X.F., Lemos, D.S., Lenassi, M., Leszczynska, A., Li, I.T., Liao, K., Libregts, S.F., Ligeti, E., Lim, R., Lim, S.K., Lin, A., Linnemannstöns, K., Llorente, A., Lombard, C.A., Lorenowicz, M.J., Lörincz, Á.M., Lötvall, J., Lovett, J., Lowry, M.C., Loyer, X., Lu, Q., Lukomska, B., Lunavat, T.R., Maas, S.L., Malhi, H., Marcilla, A., Mariani, J., Mariscal, J., Martens-Uzunova, E.S., Martin-Jaular, L., Martinez, M.C., Martins, V.R., Mathieu, M., Mathivanan, S., Maugeri, M., McGinnis, L.K., McVey, M.J., Meckes, D.G., Meehan, K.L., Mertens, I., Minciocchi, V.R., Möller, A., Møller Jørgensen, M., Morales-Kastresana, A., Morhayim, J., Mullier, F., Muraca, M., Musante, L., Mussack, V., Muth, D.C., Myburgh, K.H., Najrana, T., Nawaz, M., Nazarenko, I., Nejsum, P., Neri, C., Neri, T., Nieuwland, R., Nimrichter, L., Nolan, J.P., Nolte-’t Hoen, E.N., Noren Hooten, N., O’Driscoll, L., O’Grady, T., O’Loughlin, A., Ochiya, T., Olivier, M., Ortiz, A., Ortiz, L.A., Osteikoetxea, X., Østergaard, O., Ostrowski, M., Park, J., Pegtel, D.M., Peinado, H., Perut, F., Pfaffl, M.W., Phinney, D.G., Pieters, B.C., Pink, R.C., Pisetsky, D.S., Pogge von Strandmann, E., Polakovicova, I., Poon, I.K., Powell, B.H., Prada, I., Pulliam, L., Quesenberry, P., Radeghieri, A., Raffai, R.L., Raimondo, S., Rak, J., Ramirez, M.I., Raposo, G., Rayyan, M.S., Regev-Rudzki, N., Ricklefs, F.L., Robbins, P.D., Roberts, D.D., Rodrigues, S.C., Rohde, E., Rome, S., Rouschop, K.M., Rughetti, A., Russell, A.E., Saá, P., Sahoo, S., Salas-Huenuleo, E., Sánchez, C., Saugstad, J.A., Saul, M.J., Schiffelers, R.M., Schneider, R., Schøyen, T.H., Scott, A., Shahaj, E., Sharma, S., Shatnyeva, O., Shekari, F., Shelke, G.V., Shetty, A.K., Shiba, K., Siljander, P.R.-M., Silva, A.M., Skowronek, A., Snyder, O.L., Soares, R.P., Sódar, B.W., Soekmadji, C., Sotillo, J., Stahl, P.D., Stoorvogel, W., Stott, S.L., Strasser, E.F., Swift, S., Tahara, H., Tewari, M., Timms, K., Tiwari, S., Tixeira, R., Tkach, M., Toh, W.S., Tomasini, R., Torrecilhas, A.C., Tosar, J.P., Toxavidis, V., Urbanelli, L., Vader, P., van Balkom, B.W., van der Grein, S.G., Van Deun, J., van Herwijnen, M.J., Van Keuren-Jensen, K., van Niel, G., van Royen, M.E., van Wijnen, A.J., Vasconcelos, M.H., Vechetti, I.J., Veit, T.D., Vella, L.J., Velot, É., Verweij, F.J., Vestad, B., Viñas, J.L., Visnovitz, T., Vukman, K.V., Wahlgren, J., Watson, D.C., Wauben, M.H., Weaver, A., Webber, J.P., Weber, V., Wehman, A.M., Weiss, D.J., Welsh, J.A., Wendt, S., Wheelock, A.M., Wiener, Z., Witte, L., Wolfram,

- J., Xagorari, A., Xander, P., Xu, J., Yan, X., Yáñez-Mó, M., Yin, H., Yuana, Y., Zappulli, V., Zarubova, J., Žekas, V., Zhang, J.-Y., Zhao, Z., Zheng, L., Zheutlin, A.R., Zickler, A.M., Zimmermann, P., Zivkovic, A.M., Zocco, D., Zuba-Surma, E.K., 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7, 1535750.
- Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002a. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569–579.
- Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002b. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569–579.
- Thomou, T., Mori, M.A., Dreyfuss, J.M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T.N., Winnay, J.N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S.K., Gorden, P., Kahn, C.R., 2017. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* 542, 450–455.
- Tinius, R.A., Blankenship, M.M., Furgal, K.E., Cade, W.T., Pearson, K.J., Rowland, N.S., Pearson, R.C., Hoover, D.L., Maples, J.M., 2020. Metabolic flexibility is impaired in women who are pregnant and overweight/obese and related to insulin resistance and inflammation. *Metabolism* 104, 154142.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654–659.
- Valenti, M.T., Deiana, M., Cheri, S., Dotta, M., Zamboni, F., Gabbiani, D., Schena, F., Dalle Carbonare, L., Mottes, M., 2019. Physical Exercise Modulates miR-21-5p, miR-129-5p, miR-378-5p, and miR-188-5p Expression in Progenitor Cells Promoting Osteogenesis. *Cells* 8, 742. h
- van Balkom, B.W.M., Eisele, A.S., Pegtel, D.M., Bervoets, S., Verhaar, M.C., 2015. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *Journal of Extracellular Vesicles* 4, 26760.
- Van Der Pol, E., Hoekstra, A.G., Sturk, A., Otto, C., Van Leeuwen, T.G., Nieuwland, R., 2010. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8, 2596–2607.
- van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228.
- Vickers, K.C., Shoucri, B.M., Levin, M.G., Wu, H., Pearson, D.S., Osei-Hwedieh, D., Collins, F.S., Remaley, A.T., Sethupathy, P., 2013. MicroRNA-27b is a regulatory hub in lipid metabolism and is altered in dyslipidemia. *Hepatology* 57, 533–542.
- Wang, Q., Li, Y.C., Wang, J., Kong, J., Qi, Y., Quigg, R.J., Li, X., 2008. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 2889–2894.
- Weng, Y., Sui, Z., Shan, Y., Hu, Y., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, Y., 2016. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst* 141, 4640–4646.
- Wolf, P., 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13, 269–288.

- Xie, H., Lim, B., Lodish, H.F., 2009. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes* 58, 1050–1057.
- Yamakuchi, M., Hashiguchi, T., 2018. Endothelial Cell Aging: How miRNAs Contribute? *Journal of Clinical Medicine* 7, 170.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J.M., Ghobrial, I.M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N.H.H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E.-M., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötvall, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-'t Hoen, E.N.M., Nyman, T.A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, É., Del Portillo, H.A., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Ostenfeld, M.S., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S.G., Vasconcelos, M.H., Wauben, M.H.M., De Wever, O., 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4, 27066.
- Youngman, L.D., 1993. Protein restriction (PR) and caloric restriction (CR) compared: effects on DNA damage, carcinogenesis, and oxidative damage. *Mutat Res* 295, 165–179.
- Zaborowski, M.P., Balaj, L., Breakefield, X.O., Lai, C.P., 2015. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 65, 783–797.
- Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, A., Weger, S., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Shah, A., Willeit, J., Mayr, M., 2010. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 107, 810–817.
- Zampetaki, A., Willeit, P., Drozdov, I., Kiechl, S., Mayr, M., 2012. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovascular Research* 93, 555–562.
- Zemanová P., Ultracentrifugace lidské plazmy a její využití v klinické biochemii. Pardubice, 2018. Bakalářská práce. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Katedra biologických a biochemických věd. Vedoucí práce prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
- Zhang, B., Yang, Y., Xiang, L., Zhao, Z., Ye, R., 2019. Adipose-derived exosomes: A novel adipokine in obesity-associated diabetes. *J Cell Physiol* 234, 16692–16702.
- Zhang, G., Yang, P., 2018. A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *Journal of Neuroscience Research* 96, 45–52.
- Zhang, H., Niu, Q., Liang, K., Li, X., Jiang, J., Bian, C., 2021. Effect of LncPVT1/miR-20a-5p on Lipid Metabolism and Insulin Resistance in NAFLD. *Diabetes Metab Syndr Obes* 14, 4599–4608.
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., Mi, S., 2015. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13, 17–24.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., Tang, W.H., 2019. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* 9, 19.
- Zhao, J., Hu, L., Gui, W., Xiao, L., Wang, W., Xia, J., Fan, H., Li, Z., Zhu, Q., Hou, X., Chu, H., Seki, E., Yang, L., 2022. Hepatocyte TGF- β Signaling Inhibiting WAT Browning to Promote NAFLD and Obesity Is Associated With Let-7b-5p. *Hepatology Communications* 6, 1301–1321.

Zhao, W., Geng, D., Li, S., Chen, Z., Sun, M., 2018. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer. *Cancer Medicine* 7, 842–855.