

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie, genetika a virologie



Bc. Adéla Ševčíková

Postpartální exprese kardiovaskulárních mikroRNA – srovnání expresních hladin mezi plazmou, plazmatickými exozómy a plnou periferní žilní krví

Postpartum expression of cardiovascular disease-associated microRNAs – comparison of expression levels between plasma, plasma exosomes and whole peripheral venous blood

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, PhD.

Praha, 2021

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, dne 8. 8. 2021

.....
Adéla Ševčíková

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, PhD. za odbornou pomoc, podnětné a cenné rady, ochotu, vstřícnost a příležitost k vypracování této práce. Nemalé díky také patří mé kolegyni Mgr. Kateřině Kotlabové, PhD. za pomoc, laskavost, množství času, které mi věnovala, ale především za její nekonečnou trpělivost. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu.

Abstrakt

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující molekuly RNA, které post-transkripčně regulují genovou expresi. Celá řada miRNA se podílí na patogenezi kardiovaskulárních onemocnění, což je asociováno se změnou jejich genové exprese. Cílem této práce bylo zjistit, jak se liší genová exprese miRNA mezi jednotlivými biologickými zdroji - plnou periferní žilní krví (plná PK), plazmou a plazmatickými exozómy. U celého souboru žen byly expresní hladiny miRNA nejvyšší v plné PK v porovnání s plazmou či plazmatickými exozómy. U celého souboru žen byly expresní hladiny miRNA vyšší v plazmě v porovnání s plazmatickými exozómy, kromě miR-126-3p, kde byla detekována vyšší hladina v plazmatických exozómech ve srovnání s plazmou. V této práci byly také porovnány expresní hladiny kardiovaskulárních miRNA mezi ženami s anamnézou gestačního diabetu mellitu (GDM) a ženami s anamnézou fyziologické gravidity (FG) v období 3-11 let postpartum v plné PK, plazmě a plazmatických exozómech. V plné PK bylo 12 z 29 testovaných miRNA up-regulováno u žen s anamnézou GDM. V plazmatických exozómech byla up-regulována miR-181a-5p a v plazmě miR-499a-5p u žen s anamnézou GDM. Změny v plné PK zřejmě odrážejí komplexní systémovou reakci na změny, které nastaly v důsledku klinické manifestace GDM. U žen s aberantním epigenetickým profilem by bylo vhodné zavést primární preventivní péči z důvodu potencionálně zvýšeného rizika pozdějšího rozvoje kardiovaskulárních onemocnění.

Klíčová slova: mikroRNA, plná periferní žilní krev, plazma, plazmatické exozómy, gestační diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění

Abstract

MicroRNA (miRNA) are short non-coding RNA molecules that regulate gene expression at the post-transcriptional level. Many miRNAs are involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases, which is associated with altered gene expression. This work compares miRNA gene expression profiles among various biological sources – whole peripheral venous blood (whole PB), plasma and plasma exosomes. For all tested groups combined, the expression levels of miRNA were maximal in whole PB and lowered in plasma and plasma exosomes, and the expression levels of miRNA were higher in plasma than in plasma exosomes, except miR-126-3p, which had a higher level detected in plasma exosomes compared to plasma. This work also compares expression levels of cardiovascular miRNA between women with anamnesis of gestational diabetes mellitus (GDM) and physiological gravidity 3-11 years postpartum in whole PB, plasma and plasma exosomes. In whole PB, 12 of 29 tested miRNAs were up-regulated in women with prior exposure to GDM. MiR-181a-5p was up-regulated in plasma exosomes and miR-499a-5p in plasma in women with prior exposure to GDM. The changes in whole peripheral venous blood seem to reflect the complex systemic response to the changes that occurred during the onset of GDM. Women with aberrant epigenetic profiles may have an increased risk of later development of cardiovascular disease and therefore may benefit from early implementation of primary prevention strategies.

Keywords: microRNA, whole peripheral venous blood, plasma, plasma exosome, gestational diabetes mellitus, cardiovascular disease

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Nekódující RNA	10
3	MikroRNA	11
3.1	Historie miRNA.....	11
3.2	Definice a názvosloví	11
3.3	Lokalizace miRNA genů	12
3.4	Biogeneze miRNA.....	14
3.5	Funkce miRNA.....	17
3.6	Kardiovaskulární miRNA.....	17
4	Zdroje miRNA	22
4.1	Plná periferní žilní krev	22
4.2	Krevní plazma.....	22
4.3	Plazmatické exozómy	23
5	Gestační diabetes mellitus.....	26
6	Cíle práce	28
7	Biologický materiál.....	29
8	Metody	30
8.1	Izolace RNA obohacené o krátké RNA z plné periferní žilní krve	30
8.2	Izolace RNA z plazmy.....	31
8.3	Izolace RNA z plazmatických exozómů	31
8.4	Reverzní transkripce	32
8.5	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	33
8.6	Relativní kvantifikace.....	34
8.7	Statistická analýza dat	35
9	Výsledky	36
9.1	Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích ve skupině žen s anamnézou fyziologické gravidity	36
9.2	Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích ve skupině žen s anamnézou GDM	42
9.3	Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích u žen s anamnézou FG a GDM dohromady	47
9.4	Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmou	52
9.5	Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy.....	54
9.6	Korelace genové exprese mezi plazmou a plazmatickými exozómy	56

9.7	Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA mezi skupinami FG a GDM ve třech biologických zdrojích	59
10	Diskuze.....	68
11	Souhrn	75
12	Přehled použité literatury	77

Seznam zkratek:

ADAM22 – disintegrin a metaloproteáza-22

Ago2 – argonaut 2

AMPK α 1 - AMP-aktivovaná proteinkináza α 1

BMPR2 –receptor typu II pro kostní morfogenetický protein

C19MC – mikroRNA klastr lokalizovaný na chromozomu 19

CACNA1C - podjednotka alfa1 C pro vápníkový napětově řízený kanál

CD38 – klastr diference 38

Dcp1 – exonukleáza

Dcp2 – exonukleáza

DGCR8 – gen 8 kritické oblasti DiGeorgeova syndromu

DM – diabetes mellitus

eIF4E – eukaryotický iniciační faktor 4E

eIF6 – eukaryotický iniciační faktor 6

Exp-5 – exportin-5

FG – fyziologická gravidita

FGF – fibroblastový růstový faktor

GDM – gestační diabetes mellitus

GWAS – celogenomová asociační studie

HDL – lipoprotein s vysokou hustotou

hnRNPA1 - heterogenní jaderný ribonukleoprotein A1

hnRNPA2B1 - heterogenní jaderný ribonukleoprotein A2B1

hnRNPC - heterogenní jaderný ribonukleoprotein C

ILV – intra-luminární vezikuly

LDH – laktátová dehydrogenáza

miRNA - mikroRNA

mRNA – mediátorová RNA

MVB – multivezikulární tělíska

NAP – nestabilní angina pectoris

ncRNA – nekódující RNA

NGS – sekvenování nové generace
NPM1 – nukleofosmin-1
P bodies – processing bodies
PACT – proteinkinázu R aktivující protein
PAZ – piwi/argonaut/zwilli
PIK3 – fosfatidylinositol-3-kináza
piRNA – piwi-interagující RNA
pre-miRNA – prekurzorová miRNA
pri-miRNA – primární miRNA
RISC – RNA-indukovaný umlčovací komplex
RLC – RISC-loading komplex
RNA pol. II – RNA polymeráza II
RNA pol. III – RNA polymeráza III
rRNA – ribozomální RNA
siRNA – malá interferující RNA
snoRNA – malá jadéřková RNA
snRNA – malá jaderná RNA
SRP – signál rozpoznávající částice
TGF- β – transformující růstový faktor β
TRBP – trans-aktivační RNA vazebný protein
tRNA – transferová RNA
ULK1 – kináza aktivující autofagii jako unc-51
UTR – netranslatovaná oblast
Xrn 1p – exonukleáza

1 Úvod

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA. Významně se podílejí na post-transkripční regulaci genové exprese, čímž zabraňují translaci specifické cílové mediátorové RNA (mRNA). Potenciálním cílem miRNA je několik tisíc genů, což představuje až jednu třetinu lidského genomu (Jackson a Standart 2007). Účastní se tedy mnoha fyziologických i patologických procesů v buňce. Jako příklad lze uvést diferenciaci, proliferaci, tumorigenezi i programovanou buněčnou smrt (Hwang a Mendell 2006).

Kardiovaskulární onemocnění patří k nejčastějším příčinám morbidity a mortality. I když došlo k velkému posunu v diagnostice, prognostice i léčbě, je zde snaha o snížení vysoké úmrtnosti. Z tohoto důvodu se výzkum orientuje na identifikaci diagnostických biomarkerů, které by zjednodušily, zefektivnily a rozšířily již zažitá postupy. MiRNA představují vhodné kandidáty, jelikož jsou asociovány s výskytem některých kardiovaskulárních onemocnění (Zhou a kol. 2018).

U některých miRNA (např. miR-29a) byly nalezeny rozdíly v expresních profilech mezi ženami s fyziologickým průběhem těhotenství a ženami s diagnostikovaným gestačním diabetem mellitem (GDM) (Hromadníková a kol. 2020). GDM je dnes běžnou těhotenskou komplikací, která má zpravidla krátkodobé i dlouhodobé následky jak pro matku, tak pro dítě. Ženy s anamnézou GDM mají zvýšené riziko rozvoje diabetu mellitu 2. typu a 2-3x zvýšené riziko pozdějšího výskytu kardiovaskulárních onemocnění (Kramer a kol. 2019).

Ve své práci jsem se zaměřila na zdroje miRNA jako potenciální biomarkery kardiovaskulárních onemocnění a GDM. Porovnála jsem a zhodnotila expresní profily kardiovaskulárních miRNA v plné periferní žilní krvi, plazmě a plazmatických exozómech.

2 Nekódující RNA

Na rozdíl od kódujících mRNA, které zprostředkovávají přenos informace z DNA do proteinu, rozlišujeme také rozsáhlou skupinu nekódujících RNA (ncRNA). NcRNA dělíme na krátké a dlouhé. Krátké mají méně než 200 nukleotidů a patří mezi ně transferové RNA (tRNA), ribozomální RNA (rRNA), malé jaderné RNA (snRNA), malé jadéřkové RNA (snoRNA), malé interferující RNA (siRNA), miRNA, piRNA (piwi-intergující RNA), gRNA (guide RNA) a introny typu I a II. Dlouhé ncRNA (lncRNA) mají více než 200 nukleotidů a patří sem např. XIST RNA (Zhou a kol. 2010, Amin a kol. 2019).

NcRNA plní rozmanité funkce:

- a) strukturní funkci - rRNA v ribozomu, snRNA, které jsou součástí spliceozomu, nebo 7SL RNA, která je součástí SRP (signál rozpoznávající částice) slouží jako lešení (tzv. scaffold);
- b) rozpoznávací funkci - transferová RNA (tRNA) rozeznává kodony v mRNA a nese k nim příslušnou aminokyselinu, 16S rRNA rozeznává ShineDalgarno sekvenci u bakterií;
- c) funkci templátu – RNA v telomeráze slouží jako templát k prodlužování konců telomer;
- d) katalytickou funkci - introny typu I a II;
- e) regulační funkci - miRNA regulují genovou expresi na post-transkripční úrovni, XIST RNA u samic savců umlčuje X chromozom, čímž kompenzuje genovou dávku a další (Zhou a kol. 2010).

3 MikroRNA

3.1 Historie miRNA

První miRNA byla objevena u modelového organismu *Ceanorhabditis elegans* (*C. elegans*) roku 1993. Byly popsány dva transkripty genu *lin-4*, 22 nukleotidů dlouhý *lin-4S* a 61 nukleotidů dlouhý *lin-4L*. *Lin-4S* je nejspíš součástí *lin-4L* a je komplementární k 7 kopiím repetitivního elementu v 3' nepřekládané oblasti (UTR) mRNA genu *lin-14* (Lee a kol. 1993). Mutanti *C. elegans* deficientní v genu *lin-4* mají vysoké hladiny proteinu LIN-14 a je u nich narušen normální larvální vývoj (Ambros 1989). Předpokládalo se tedy, že pomocí RNA-RNA antisense interakce transkripty genu *lin-4* negativně regulují translaci mRNA *lin-14* a tím i množství proteinu LIN-14 (Lee a kol. 1993).

V roce 2000 byla u téhož organismu popsána 21 nukleotidů dlouhá RNA *let-7*. Tato RNA funguje na stejném principu jako *lin-4* s tím rozdílem, že ovlivňuje pozdější larvální stádia. *Let-7* je komplementární k 3'UTR genů *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* a *daf-12*, čímž je může negativně regulovat (Reinhart a kol. 2000). *Lin-4* a *let-7* ovlivňují nejenom správné načasování larválního vývoje u *C. elegans*, ale regulují genovou expresi u širokého množství organismů (Pasquinelli a kol. 2000). Následně bylo popsáno velké množství malých regulačních RNA a byl ustanoven termín mikroRNA (Lagos-Quintana a kol. 2001, Lau a kol. 2001). K dnešnímu dni je známo u *Homo sapiens* více než 2600 maturovaných miRNA (www.mirbase.org, 10.5.2021)

3.2 Definice a názvosloví

MiRNA, siRNA a krátké fragmenty RNA jsou mnohdy od sebe těžko rozlišitelné. Aby miRNA byla správně označena jako miRNA, musí splnit následující kritéria její exprese (a,b) a biogeneze (c,d,e):

- a) Detekce ~22 nukleotidů dlouhého RNA transkriptu pomocí hybridizace RNA.
- b) Identifikace ~22 nukleotidů dlouhé sekvence v knihovně cDNA, přesně odpovídající sekvenci organismu, z něhož byla získána.
- c) Predikce možné prekurzorové struktury obsahující ~22 nukleotidů dlouhou sekvenci uvnitř jednoho raménka vlásenky. U živočichů bývají potenciální prekurzorové struktury dlouhé

60-80 nukleotidů. Větší variabilita je u rostlin, které mohou dosáhnout délky několika set nukleotidů.

- d) Fylogenetická konzervace ~22 nukleotidů dlouhé sekvence a její predikované prekursorové sekundární struktury.
- e) Detekce zvýšeného množství prekursorové struktury u organismů se sníženou funkcí Diceru.

Aby byl kandidátní gen označen jako nová miRNA, musí splňovat alespoň jedno z kritérií exprese (a, b) a jedno z kritérií biogeneze (c, d, e) (Ambros a kol. 2003).

Maturovaná miRNA je označena předponou „miR“ a unikátním identifikačním číslem (např. miR-1, miR-2...miR-499, atd.). Identifikační číslo je přiřazováno postupně podle toho, jak jsou miRNA objevovány. Tomuto pravidlu se vymykají lin-4 a let-7, jejichž pojmenování bylo již ustáleno. Geny kódující miRNA a pre-miRNA jsou u živočichů ve většině případů označeny kurzívou a stejnou třípísmennou předponou s identifikačním číslem s tím rozdílem, že r je malé (např. *mir-1*). Takto tomu je např. u *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* a *Homo sapiens*. Pojmenování miRNA se mírně liší u rostlin a virů. Záleží i na tom, jak jsou u konkrétního organismu geny označovány např. u *Arabidopsis thaliana* je předpona genu kódující miRNA velkými písmeny (např. MIR1). Pro rozlišení, ze kterého organismu daná miRNA pochází, je použita 3-4 písmenná předpona označující druh – u *Homo sapiens* se jedná o zkratku „hsa“, u *Drosophila melanogaster* o zkratku „dme“ apod. Ortology miRNA se liší pouze touto zkratkou. Paralogy miRNA, rozdílné v jednom či dvou nukleotidech, jsou odlišeny přidáním malého písmene (např. miR-20a a miR20b). V případě, že jsou geny pre-miRNA lokalizovány na jiném místě v genomu, ale dávají vznik identické maturované miRNA, jsou odlišeny přidáním číselné přípony (např. dme-mir-281-1 či dme-mir-1 dávají vznik miR-125b). Pokud pochází dvě miRNA z jedné vlásenkové struktury, je k jejich jménu přidána přípona „-3p“ nebo „-5p“ dle toho, z kterého řetězce prekursoru daná miRNA pochází (Griffiths-Jones a kol. 2006, Ambros a kol. 2003).

3.3 Lokalizace miRNA genů

Geny kódující miRNA najdeme rozmístěny po celém genomu daného organismu. Počty těchto genů a i prekursorů miRNA se však velmi liší na základě chromozomu, na němž se nacházejí, a konkrétním organismu. Například u člověka najdeme nejvíce prekursorů miRNA na chromozomu 1 (161), zatímco na Y chromozomu byly pozorovány pouze 2 miRNA prekursorů. U živočichů s určením pohlaví XY lze konstatovat, že se na Y chromozomech nachází

zanedbatelné množství, ne-li žádné, oproti němu X chromozom bývá na tyto prekurzory hojný. U většiny druhů (55 %) neexistuje korelace mezi délkou chromozomu a počtem miRNA genů, ale existuje pozitivní korelace mezi počtem protein kódujících genů na daném chromozomu a počtem miRNA genů. Nejvíce miRNA asociovaných s maligními a kardiovaskulárními onemocněními je lokalizováno na chromozomech 19, 14, 1 a X. (Ghorai a Ghosh, 2014).

Distribuce na chromozomech není náhodná, jelikož více než 50 % známých genů miRNA se nachází v klastrech. V daném klastru najdeme příbuzné i nepříbuzné miRNA. Příbuzné miRNA v klastrech jsou pravděpodobně výsledkem genové duplikace, ale ne všechny příbuzné miRNA se vyskytují pouze v jediném klastru. Například let-7 rodina se objevuje v 6 klastrech (Lau a kol. 2001, Guo a kol. 2013). U člověka bylo objeveno více než 150 miRNA klastrů (www.mirbase.org), nejvíce klastrů najdeme na chromozomech 8, 17 a X. Klastry obsahují 2 - 8 miRNA genů (v 68, 49 % jsou to pouze 2 miRNA geny), výjimkou jsou klastry C19MC (miRNA klastr lokalizovaný na chromozomu 19) a miR-379/miR-656 (Guo a kol. 2013).

Největším miRNA klastrem je C19MC, který obsahuje 46 miRNA genů, a nalezneme jej pouze u primátů. Geny na tomto klastru hrají roli ve vývoji primátů, jsou preferenčně exprimovány v placentě a mozku plodu (Zhang a kol. 2008, Guo a kol. 2013). Geny v klastrech jsou transkribovány jako polycistronní transkript pod vlivem stejných regulačních faktorů a většinou se podílejí na regulaci stejné signální kaskády. Klastr miR-379/miR-656 obsahující 42 miRNA je downregulován u neuroepiteliálního nádoru mozku - oligodendrogliomu, což ústí v aktivaci genů spojených s migrací buněk a obohacením PIK3 (fosfatidylinositol-3-kináza) a gliomové signální kaskády (Kumar a kol. 2018). Obecně lze říci, že miRNA klastry a rodiny jsou úzce funkčně a evolučně propojeny (Baskerville a Bartel, 2005).

MiRNA můžeme rozdělit na intergenní a intragenní. Původně se věřilo, že jsou miRNA geny lokalizovány v intergenních oblastech, avšak většina je lokalizována v oblastech intragenních. Bylo zjištěno, že 161 z 232 zkoumaných miRNA genů je lokalizováno v definovaných transkripčních jednotkách, 117 z těchto 161 miRNA genů je v intronech v sense orientaci, 90 z nich je v intronech protein kódujících genů a 27 v intronech jiných ncRNA. V některých případech byly miRNA geny nalezeny jak v exonech, tak v intronech (alternativní splicing) nebo zasahovaly do oblastí dvou a více transkripčních jednotek. MiRNA geny rozdělujeme do 4 subtypů: intergenní, exonové, intronové a ostatní. U posledních 3 subtypů se jedná o intragenní miRNA geny (Rodriguez a kol. 2004).

Nejvíce intergenních miRNA genů nalezneme u člověka na chromozomech 19, poté na chromozomech X, 14 a 1, zatímco intronových miRNA genů je nejvíce zastoupeno na chromozomech 1, 2, 11 a 3. Počty exonových miRNA genů jsou výrazně menší než počty intergenních a intronových miRNA genů (Ghorai a Ghosh 2014).

Jak lze předpokládat, u genů sdílejících stejný promotor, intragenní miRNA vykazují podobný expresní profil jako transkript genu, ve kterém leží (Baskerville a Bartel 2005). Známé miRNA promotory obsahují obecné transkripční regulační elementy RNA polymerázy II (RNA pol. II), které nacházíme v protein kódujících genech (Lee a kol. 2004), a odhaduje se, že 10 % exprese miRNA je regulováno pomocí DNA metylace (Han a kol. 2007).

3.4 Biogeneze miRNA

Biogeneze miRNA u eukaryot probíhá ve dvou krocích nejdříve v jádře a poté v cytoplasmě. Stejně jako u kódující mRNA, transkripce miRNA genů je zprostředkována RNA pol. II. Primární transkript je opatřen 7- metylguanositovou čepičkou a poly(A) koncem. Tyto dva atributy jsou typické pro transkripty této polymerázy a plní ochrannou funkci. Mezi další důkazy transkripce pomocí RNA pol. II patří, že transkripce miRNA je senzitivní na α -amanitin a fyzická asociace RNA pol. II s miRNA promotorem. Navíc u většiny miRNA promotorů byly identifikovány RNA pol. II elementy, např. TATA box (Lee a kol. 2004, Xie a kol. 2005).

Borchert a kol. (2006), přišli s tvrzením, že miRNA z C19MC klastru jsou rozmístěny mezi Alu repeticemi a jsou stejně jako Alu repetice transkribovány pomocí RNA polymerázy III (RNA pol. III). Tato polymeráza přepisuje především malé nekódující RNA – tRNA a 5S rRNA (Weinmann a Roeder 1974). Poté se ukázalo, že miRNA z C19MC klastru jsou intronové a transkribované RNA pol. II (Bortolin-Cavaillé a kol. 2009). Zapojení RNA pol. III u menší části miRNA genů nelze však úplně vyloučit. Zástupce herpesvirů, virus Epstein-Barrové, kóduje 2 klastry miRNA a ty jsou pravděpodobně transkribovány jak RNA pol. II, tak RNA pol. III. První klastr je lokalizovaný v genu kódujícím homolog Bcl-2 (lymfom B buněk) a druhý v intragenním regionu BART genu (Pfeffer a kol. 2005).

Přepis miRNA genů dává vznik primárnímu prekurzoru miRNA. Tento i několik kilobází dlouhý transkript, sbalený do jedné či více vlásenkových struktur („hairpin“), opatřený 5'čepičkou, 3'polyA koncem a jednovláknovými přesahy, je označován jako pri-miRNA (Lee a kol. 2002, 2003, 2004). Prekurzorová vlásenka může dát vznik více rozdílným izoformám

(isomiRs), které se mohou lišit délkou i sekvencí (Lee a kol. 2010). V jádře je pri-miRNA štěpena mikroprocesorem na ~70 nukleotidů dlouhé vlásečkové prekurzory tzv. pre-miRNA. Mikroprocesor je multiproteinový komplex. Jeho hlavními komponenty jsou enzym RNáza III Drosha a protein s doménou vázající dvouvláknovou RNA DGCR8 neboli Pasha. DGCR8 (gen 8 kritické oblasti DiGeorgeova syndromu) je produktem genu deletovaného u DiGeorgeova syndromu a nejspíše hraje roli v identifikaci a zaujmutí prostorové orientace pri-miRNA, čímž umožňuje štěpení enzymem Drosha. Mikroprocesor dále sestává z různého množství kofaktorů jako DEAD box RNA helikáza p68 (DDX5) a p72 (DDX17) a heterogenních jaderných ribonukleoproteinů (hnRNP) (Denli a kol. 2004, Gregory a kol. 2004). Zajímavá je vzájemná regulace mezi DGCR8 a Droshou. DGCR8 stabilizuje pomocí protein-proteinové interakce Droshu a podílí se na kontrole jeho množství. Drosha štěpí 88 nukleotidovou vlásečku lokalizovanou v 5'UTR mRNA DGCR8, čímž negativně reguluje enzym na post-transkripční úrovni (Han a kol. 2009). Zatímco většina miRNA je generována výše popsanou cestou, existují také krátké RNA, vzniklé z intronových vláseček tzv. „mirtrons“, do jejichž biogeneze štěpení Droshou není zapojeno. Mirtrony prochází splicingem a využívají enzymy odštěpující lariát; jsou alternativním zdrojem regulačních RNA typu miRNA (Okamura a kol. 2007).

Aby se z pre-miRNA mohla stát maturovaná miRNA, musí být exportována z jádra do cytoplazmy. Tento transport je zprostředkován exportinem-5 (Exp-5), což je Ran-dependentní jaderný transportní receptor. Exp-5 rozpoznává 2 nukleotidový přesah na 3'konci a dvouvláknovou část vlásečky pre-miRNA pomocí vodíkových a iontových interakcí. Nezáleží na sekvenci RNA, a tím pádem Exp-5 rozpoznává rozmanité množství pre-miRNA (Yi a kol. 2003, Bohnsack a kol. 2004, Okada a kol. 2009). Yi a kol. (2003) zjistili, že pokud je Exp-5 vyčerpán RNA interferencí, dojde k poklesu množství maturovaných miRNA, ale nedochází k akumulaci pre-miRNA v jádře. Domnívali se tedy, že pre-miRNA jsou relativně nestabilní a jsou stabilizovány interakcí právě s Exp-5. Tuto domněnku potvrdili Zheng a Cullen (2006).

Celý proces dále pokračuje v cytoplazmě, kde je pre-miRNA štěpena na ~22 nukleotidů dlouhé miRNA duplexy pomocí Diceru. Dicer je vysoce konzervovaný multidoménový protein (~200kDa) s endonukleázovou aktivitou, enzym RNáza třídy III (Grishok a kol. 2001, Hutvanger a kol. 2001, Lau a kol. 2012). Sestává se z N-terminální ATP vázající, helikální domény, DUF283 domény neznámé funkce, PAZ domény (Piwi/Argonaut/Zwilli), dvou RNA nukleázových domén (RNáza IIIa a RNáza IIIb) lokalizovaných na C-terminálním konci, a nakonec následuje doména vázající dvouvláknovou RNA (dsRBD). Izolovaná DUF283

doména je schopna vázat jednovláknovou RNA a urychluje párování bází mezi komplementární RNA/DNA molekulami *in vitro*. Dicer pravděpodobně usnadňuje hybridizaci mezi krátkými RNA a jejich cílem (Provost a kol. 2002, Kurzynska-Kokorniak a kol. 2016). Doména PAZ rozpoznává 2 nukleotidy dlouhý přesah na 3'konci pre-miRNA a zahajuje navázání RNA (Song a kol. 2003). RNáza IIIa/b domény štěpí pre-miRNA a vzniká dvouvláknový miRNA duplex s 3'přesahujícími konci (Zhang a kol. 2004). Savčí Dicer nejspíše ještě kooperuje s dalšími dvěma proteiny - TRBP (trans-aktivační RNA vazebný protein) a PACT (protein aktivující proteinkinázu R) (Kok a kol. 2007). Kofaktory Diceru však nejsou pravděpodobně esenciální při štěpení RNA. Spíše se zdá, že stabilizují a napomáhají formovat efektorový komplex (Chendrimada a kol. 2005, Zhang a kol. 2002, 2004). Později bylo popsáno i zpracování pre-miRNA nezávislé na Diceru s pomocí proteinu Argonaut 2 (Ago2), který obsahuje Piwi a PAZ doménu s endonukleázovou aktivitou (Cifuentes a kol. 2010).

Dicer, TRBP, PACT a Ago2 tvoří RISC-loading komplex (RLC). Dicer-TRBP komplex asociuje s Ago2 a miRNA duplexy jsou do něj inkorporovány. Jedná se o ATP-dependentní proces, zatímco následné rozvinutí duplexu je už překvapivě proces nezávislý na ATP. Poté dochází k disociaci Dicer-TRBP komplexu a vzniká tzv. pre-RISC komplex (RNA-induced silencing complex) (Chendrimada a kol. 2005, Maniataki a kol. 2005, MacRae a kol. 2007). Po rozvinutí duplexu je pre-RISC schopný ponechat si jakékoliv z obou vláken a vzniká multiproteinový efektorový RISC komplex. To, které vlákno nakonec zůstane, záleží na asymetrii v relativní termodynamické stabilitě 5'konců vláken. Méně stabilní vlákno se přednostně váže s RISC komplexem a označuje se jako „guide“ vlákno, přičemž druhé vlákno tzv. „passenger“ vlákno je většinou degradováno. Někdy se RISC komplex utváří nezávisle na Diceru. Avšak pro jeho utvoření, ať už jde o Dicer dependentní či independentní cestu, je esenciální přítomnost 5 chaperonových proteinů (Hsp90, Hsc70, Hop, Hsp40 a p23) a ATPázová aktivita Hsp90 a Hsc70. Zdá se, že je proces inkorporování miRNA duplexu velmi konzervovaný (Khvorova a kol. 2003, Naruse a kol. 2018).

Ago tvoří jádro RISC, váže na sebe „guide“ vlákno miRNA, podporuje stabilitu vlákna a udržuje ho v prostorové konformaci vhodné k navázání na cílovou mRNA. Jejich počet se u jednotlivých organismů liší. U člověka najdeme 8 typů proteinu Ago, 4 z nich (hAgo1-hAgo4) jsou exprimovány v různých tkáních a buněčných typech. Členové Ago rodiny mají PAZ, MID a PIWI doménu. PAZ doména váže 3'konec a MID váže 5'konec vlákna miRNA. PIWI doména u Ago 2 napomáhá štěpení cílové mRNA (Azuma-Mukai a kol. 2008, Wang a kol. 2008).

3.5 Funkce miRNA

„Guide“ vlákno miRNA se v aktivovaném RISC komplexu váže Watson-Crickovým párováním k 3'UTR cílové mRNA a negativně reguluje její expresi (Wightman a kol. 1993). Jedna miRNA může regulovat více mRNA a více miRNA může regulovat tu samou mRNA. Dysregulace exprese miRNA může vést k rozvoji onemocnění (Bartel a kol. 2004, Kuhn a kol. 2007). RISC je schopen volně přidružovat potenciální cílové mRNA a provést „scan“ cílových vazebných míst. Toto umožňuje najít správnou mRNA rychleji, než kdyby miRNA nebyla navázaná na RISC. K vyhledávání a vazbě na cílovou mRNA je použita volná část vlákna tzv. „seed region“. Tento region se nachází mezi 2.-7. bází na 5'konci miRNA. Míra komplementarity mezi „seed region“ a mRNA určuje, jakým způsobem bude gen umlčen. MiRNA může být ireverzibilně štěpena, anebo může být pouze reverzibilně umlčena translací (Ameres a kol. 2007, Bartel a kol. 2004, 2009).

Pokud je téměř perfektní komplementarita mezi „seed region“ miRNA a mRNA, Ago2 štěpí mRNA. Při degradaci mRNA je odstraněn polyA konec a poté pomocí enzymů Dcp1 a Dcp2 5'čepička, což umožní degradaci mRNA exoribonukleázou Xrn1p. V případě, že párování není perfektní, objevují se při něm strukturní nerovnosti, které inhibují aktivitu Ago2. Kompetice mezi Ago2 a iniciačním faktorem eIF4E a rovněž i antiasociace s iniciačním faktorem eIF6 vedou k blokování translace. K inhibici translace může také dojít lokalizací mRNA v „processing bodies“ („P bodies“). Jedná se o cytoplazmatická granula obsahující i Ago proteiny, které chrání mRNA před degradací (Wu a Belasco 2007).

3.6 Kardiovaskulární miRNA

Kardiovaskulární miRNA se podílejí na patogenezi kardiovaskulárních onemocnění tím, že ovlivňují expresi genů hrajících roli ve vývoji a správném fungování srdce a cév. Do skupiny onemocnění kardiovaskulárního systému spadá např. ischemická choroba srdeční, infarkt myokardu a srdeční selhání, chlopenní vady, arteriální hypertenze, cévní mozková příhoda, ateroskleróza, arytmie, aneurysma velkých tepen, trombóza, chronická žilní insuficience, plicní embolie atd.

Kardiovaskulární onemocnění představují dlouhodobě nejčastější příčinu úmrtí. Každoročně na tato onemocnění umírá ~17,9 milionů lidí, z toho 85 % na infarkt myokardu a

cévní mozkovou příhodu, ačkoli většině z nich lze předejít prevencí behaviorálních a environmentálních rizikových faktorů (Libby a kol. 2002, Kumar a kol. 2014, Nourae a Mowla 2015, www.who.int).

Je důležité pochopit, jak a co vše jednotlivé miRNA regulují. Stejně miRNA mají často odlišné expresní profily v různých tkáních a tělních tekutinách. Je nezbytné porovnat jejich expresní profily za fyziologických podmínek a patologických stavů v různých biologických materiálech a následně je využít jako neinvazivní biomarkery. Problémem u některých miRNA je, že jejich exprese je ovlivněna vnějšími vlivy nebo stavy přímo nesouvisejícími s kardiovaskulárními onemocněními (např. maligní onemocnění, infekce a léky). Avšak aby byly použity jako neinvazivní biomarkery, měly by být jednak převážně exprimovány v kardiovaskulárním systému nebo by měly být esenciální pro vývoj srdce, také je nezbytné provést studie na velkém souboru jedinců různých etnik a standardizovat metodologické postupy (Zhou a kol. 2018).

Jako příklad bych ráda uvedla miR-1. MiR-1 moduluje aktivitu WNT a FGF (fibroblastový růstový faktor) signalizačních drah. WNT a FGF signalizační dráhy hrají významnou roli v raném stadiu vývoje srdce. Když dochází k nadměrné expresi miR-1 v lidských indukovaných pluripotentních buňkách, dochází k snížené expresi FZD7, což vede k potlačení WNT signalizační dráhy. Mutanti FZD7 mají strukturální defekty srdce. Při nadměrné expresi miR-1 dochází rovněž ke snížené expresi FRS2, který napomáhá přenosu signálu z FGF receptorů směrem do buňky, což vede k deformacím srdce (Lu a kol. 2013). V tabulce č.1 je vyobrazen souhrn všech kardiovaskulárních miRNA, jejichž expresní profil jsem zkoumala ve své diplomové práci.

Tabulka č. 1: Vybrané kardiovaskulární miRNA, jejich lokalizace a role v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění

Kardiovaskulární miRNA	Lokalizace na chromozomu	Kardiovaskulární onemocnění a rizikové faktory pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění
hsa-miR-1-3p	20q13.33	Ateroskleróza (Šatrauskienė a kol. 2021) Infarkt myokardu (Pinchi a kol. 2019) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-16-5p	13q14.2	Angiogeneze (Wang a kol. 2012) Ischemická choroba srdeční (Wakabayashi a kol. 2020) GDM (Hromadníková a kol. 2020)

hsa-miR-17-5p	13q31.3	Angiogeneze (Wang a kol. 2012) Infarkt myokardu (Boon a Dimeler 2014) Srdeční selhání (Boon a Dimeler 2014) Difúzní fibróza myokardu (Fang a kol. 2015) Ischemická choroba srdeční (Du a kol. 2014) GDM (Cao a kol. 2017, Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-20a-5p	13q31.3	Angiogeneze (Wang a kol. 2012) Plicní arteriální hypertenze (Brock a kol. 2012) Vaskulitida (Skoglund a kol. 2015) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-20b-5p	X26.2	Angiogeneze (Wang a kol. 2012) Diabetická retinopatie (Zhu a kol. 2019) Srdeční selhání (Dickinson a kol. 2013) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-21-5p	17q23.1	Dyslipidémie (Flowers a kol. 2013) Hypertenze (Kan a kol. 2019) Srdeční selhání (Kan a kol. 2019) Srdeční fibróza a hypertrofie (Zhang a kol. 2017) Diabetes mellitus 2. typu (Olivieri a kol. 2015, Jiang a kol. 2017) Angiogeneze (Olivieri a kol. 2015) Ischemická choroba srdeční (Kura a kol. 2020) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-23a-3p	19p13.12	Infarkt myokardu (Bukauskas a kol. 2019) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-24-3p	19p13.12	Infarkt myokardu (Boon a Dimeler 2014) Srdeční selhání (Boon a Dimeler 2014) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-26a-5p	3p22.2	Diabetes mellitus 1. typu (Stefan-Lifshitz a kol. 2019) Srdeční fibróza (Zheng a kol. 2018) Infarkt myokardu (Velle-Forbord a kol. 2019) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-29a-3p	7q32.3	Vaskulitida (Skoglund a kol. 2015) Diabetes mellitus 2. typu (Massart a kol. 2017) Fibrilace síní (Zhao a kol. 2016) Infarkt myokardu (Boon a Dimeler 2014) Srdeční selhání (Boon a Dimeler 2014) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-92a-3p	13q31.3	Angiogeneze (Zhang a kol. 2014) Ischemická choroba srdeční (Wakabayashi a kol. 2020) Vaskulitida (Skoglund a kol. 2015) Infarkt myokardu (Boon a Dimeler 2014) Srdeční selhání (Boon a Dimeler 2014)

hsa-miR-100-5p	11q24.1	Angiogeneze (Pakravan a kol. 2017) Diabetes mellitus 2. typu (Pek a kol. 2016) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-103a-3p	20p13	Inzulinová rezistence (Cohen a kol. 2003) Diabetes mellitus 2. typu (Luo a kol. 2019) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-125b-5p	21q21.1	Infarkt myokardu (Tiedt a kol. 2017) Srdeční selhání (Tiedt a kol. 2017) Akutní ischemická cévní příhoda (Tiedt a kol. 2017) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-126-3p	9q34.3	Diabetes mellitus 2. typu (Olivieri a kol. 2015) Angiogeneze (Olivieri a kol. 2015) Ischemická choroba srdeční (Jiang a kol. 2017) Infarkt myokardu (Hsu a kol. 2014) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-130b-3p	22q11.21	GDM (Tryggestad a kol. 2016, Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-133a-3p	20q13.33	Diabetes mellitus 2. typu (Ghasemi a kol. 2019) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-143-3p	5q32	Hypertenze (Holmberg a kol. 2018) Akutní ischemická srdeční příhoda (Tiedt a kol. 2017) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-145-5p	5q32	Hypertenze (Holmberg a kol. 2018) Ischemická choroba srdeční (Faccini a kol. 2017) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-146a-5p	5q33.3	Infarkt myokardu (Xue a kol. 2019) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-155-5p	21q21.1	Dyslipidémie (Mahdavi a kol. 2018) Ateroskleróza (Bruen a kol. 2019) Srdeční selhání (Wang a kol. 2019)
hsa-miR-181a-5p	9q33.3	Nestabilní angina pectoris (Magenta a kol. 2016) Infarkt myokardu (Zhu a kol. 2015, Magenta a kol. 2016) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-195-5p	17p13.1	Vaskulitida (Bras a kol. 2017) Ischemická choroba srdeční (Caroli a kol. 2013) Infarkt myokardu (Boon a Dimeler 2014) Srdeční selhání (Boon a Dimeler 2014) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-199a-5p	19p13.2	Infarkt myokardu (Xue a kol. 2019) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-210-3p	11p15.5	Angiogeneze (Lou a kol. 2012) Infarkt myokardu (Boon a Dimeler 2014) Srdeční selhání (Boon a Dimeler 2014)

hsa-miR-221-3p	Xp11.3	Vaskulitida (Skoglund a kol. 2015) Ateroskleróza (Zhuang a kol. 2019) Angiogeneze (Yang a kol. 2015) Srdeční selhání (Li a kol. 2021) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-342-3p	14q32.2	GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-499a-5p	20q11.22	Infarkt myokardu (Pinchi a kol. 2019) Ischemicko-reperfúzní poškození myokardu (Zhao a kol. 2020) GDM (Hromadníková a kol. 2020)
hsa-miR-574-3p	4p14	GDM (Hromadníková a kol. 2020)

4 Zdroje miRNA

MiRNA se jednak lokalizují v buňkách – nazýváme je intracelulární, ale nalézt je lze i volně v různých tělních tekutinách – v takovém případě se jedná o extracelulární miRNA. Poprvé byly extracelulární miRNA popsány v plné periferní žilní krvi a plazmě u pacientů s lymfomy (Lawrie a kol. 2008), rovněž byly objeveny placentární miRNA v plazmě matky (Chim a kol. 2008). Poté následovaly objevy ve slinách, moči, mateřském mléce a spermatu (Park a kol. 2009, Hanke a kol. 2010, Pigati a kol. 2010, Li a kol. 2012). Ve své diplomové práci jsem porovnávala expresní profily mezi plnou periferní žilní krví, krevní plazmou a plazmatickými exozómy.

4.1 Plná periferní žilní krev

Krev se skládá ze dvou složek – krevní plazmy a krevních elementů. Vzhledem k tomu, že periferní žilní krev je nejčastěji odebíranou tělní tekutinou, většina studií o využití miRNA jako neinvazivních biomarkerů se v současné době zaměřuje právě na měření expresních profilů miRNA v periferní žilní krvi. Intracelulární miRNA lze detekovat v leukocytech (NK buňkách, B lymfocytech, cytotoxických T lymfocytech, pomocných T lymfocytech, monocytech, neutrofilech) a erytrocytech (Juzenas a kol. 2017).

Juzenas a kol. (2017) zjistili, že většina miRNA se objevuje ve více než jednom buněčném typu. K tomuto napomohlo použití sekvenování nové generace (NGS) a provedení studie na větším počtu pacientů. Zajímavé bylo také zjištění, že více než polovina isomiRNA, specifických pro určitý typ buněk, pocházela z buněčně nespecifických ramen vlásenkových prekurzorů (Juzenas a kol. 2017).

4.2 Krevní plazma

Krevní plazma představuje nejobjemnější část krve. Plazmu tvoří z 90-92 % voda, zbylých 8-9 % tvoří organické a anorganické látky v ní rozpuštěné. Její pH je poměrně stabilní (7,36-7,44). Nukleové kyseliny se v plazmě vyskytují v extracelulárních vezikulech. Existují 4 hlavní subtypy extracelulárních vezikulů - mikrovezikuly, velké onkozómy, exozómy a apoptotická tělíška.

Velké onkozómy transportují bioaktivní molekuly a podílí se tak na vytváření mikroprostředí tumoru (Morello a kol. 2013). Při programované buněčné smrti neboli apoptóze dochází ke kontrolovanému smršťování buňky a následné fragmentaci na apoptotická tělíska. Hladina extracelulárních miRNA se tím pádem zvyšuje s vyšší četností buněčné smrti. (Reed 2000, Kosaka a kol. 2010). Při nekróze dochází k uvolňování nukleových kyselin přímo do krevního řečiště, kde jsou následně štěpeny exonukleázami (Jahr a kol. 2001).

Pro extracelulární prostředí je typický vysoký obsah RNáz, které slouží jako obrana organismu proti cizorodým RNA. MiRNA lokalizované v extracelulárních vezikulech nebo extracelulárně stabilizované jsou v tomto prostředí hojné a stabilní, tím pádem je lze snadno detekovat (Park a kol. 2009). Nejdříve se předpokládalo, že jsou stabilní, protože jsou chráněny membránovými strukturami (Hunter a kol. 2008). Nakonec se ale zjistilo, že většinu extracelulárních miRNA najdeme volně v komplexu s Ago2, nukleofosminem-1 (NPM1) nebo s lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL), které je stabilizují a zvyšují jejich odolnost vůči RNázám (Arroyo a kol. 2011, Turchinovich a kol. 2011, Tabet a kol. 2014). Byla popsána i jejich rezistence k extrémním pH hodnotám (Chen a kol. 2008).

NPM1, multifunkční jaderný protein, chrání před agregací jaderných proteinů, podílí se na regulaci aktivity transkripčního faktoru p53 (Borer a kol. 1989, Yang a kol. 2016) a váže s vysokou afinitou jednovláknové nukleové kyseliny. Při stresu se snižuje hladina intracelulárních miRNA a zvyšuje se hladina extracelulárních miRNA asociovaných s NPM1 (Wang a kol. 2010).

4.3 Plazmatické exozómy

Extracelulární vezikuly rozdělujeme na základě jejich biogeneze, funkce, velikosti, původu a složení do 3 subpopulací – exozómy, mikrovezikuly a apoptická tělíska. Mikrovezikuly (100 nm – 1 µm) jsou poměrně heterogenní skupinou, pokud jde o tvar a velikost, a vznikají exocytózou z plazmatické membrány (Heijnen a kol. 1999).

Exozómy byly objeveny nezávisle na sobě dvěma skupinami (Harding a kol. 1983, Pan a Johnston, 1983). Jméno však dostaly až následně (Johnston a kol. 1987). Plazmatické exozómy jsou 40-100 nm velké a mají endocytický původ. Nejdříve se endocytózou vytvoří časný endozóm z buněčného membránového kompartmentu. Z časného endozómu vznikají různými cestami multivezikulární tělíska (MVB) neboli pozdní endozóm. Během tohoto

procesu dochází k invaginaci endozomální membrány a formují se tzv. intra-luminální vezikuly (ILV) (Huotari a Helenius, 2011). Ve většině buněk fúzí MVB s lyzozómy a degraduje se jejich obsah, avšak organely obsahující MVB mohou také fúzovat s membránou a uvolnit ILV do extracelulárního prostoru (Edgar a kol. 2014).

Byla popsána sekrece plazmatických exozómů většinou buněk (např. T i B lymfocyty, neurony a buňkami hladké svaloviny) a lze je detekovat ve všech tělních tekutinách, tudíž i v krevním oběhu (Fauré a kol. 2006, Valadi a kol. 2007, Hunter a kol. 2008, Comelli a kol. 2014). Původně se myslelo, že slouží jako prostředek, jakým se buňka může zbavit odpadních látek. Později bylo prokázáno, že hrají důležitou roli v komunikaci a signalizaci mezi buňkami (Hessvik a Llorente 2018). Kromě proteinů mohou exozómy sloužit jako dopravci mRNA, miRNA a dalších malých RNA (neobsahují DNA). Jeden exozóm nese ~121 miRNA. Chrání RNA před exonukleázami a po fúzi s cílovou buňkou tyto RNA plní svoji funkci. MiRNA regulují genovou expresi a mRNA jsou translatovány (Valadi a kol. 2007). Obsah exozómů se liší v závislosti na tom, z jaké buňky pochází a mohou ovlivnit sousední nebo i velmi vzdálené buňky. Expresní profil miRNA se tedy může lišit v závislosti na fyziologických podmínkách. U různých patologií byly zjištěny odlišné hladiny miRNA oproti zdravým jedincům - např. hladina exozomální miR-21 byla nižší u zdravých jedinců než u těch, u kterých byl diagnostikován s glioblastom (Skog a kol. 2008).

U pacientů s diabetem mellitem (DM) je prokázána souvislost mezi hladinou cukru v krvi a obranyschopností organismu vůči infekcím. Různé rány se proto hojí pomaleji než u zdravých jedinců. U těchto pacientů jsou exozómy silně obohaceny o miR-20b-5p, která je pomocí nich transferovaná do buněk cévního endotelu. Je tak schopná potlačit angiogenezi pomocí regulace Wnt9b/ β -katenin signální kaskády. Tento fakt podporují i následující zjištění. Aplikace miR-20b-5p nebo diabetických exozómů do místa rány zpomaluje hojení a delece miR-20b-5p genu u myši s diabetem vede k lepšímu hojení a podpoře angiogeneze v místě rány (McMurry 1984, Xiong a kol. 2019).

Ukázalo se, že některé exozómy jsou obohaceny o specifické RNA, což naznačuje, že jsou RNA kontrolovaně vybírány do exozómů. Přesný mechanismus zatím není známý. Byla popsána asociace a kolokalizace RISC s MVB (Gibbins a kol. 2010). První molekulou spojovanou s výběrem miRNA do exozómů byla neurální sfingomyelináza 2 (nSMÁza2). Nadměrná exprese nSMÁzy2 zvýšila množství miRNA v exozómech a inhibice naopak snížila jejich množství (Kosaka a kol. 2013). Villarroya-Beltri a kol. zjistili, že sumoylovaný heterogenní jaderný ribonukleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) rozeznává specifický motiv na

3'konci miRNA a způsobí tak zabalení do exozómu. Obdobně i hnRNPA1 nebo hnRNPC se dokáží vázat na miRNA (Villarroya-Beltri a kol. 2013). Obecně se zdá, že 3'konec hraje velkou roli v sortingu miRNA do exozomů. MiRNA s uridylovaným 3'koncem se hojně vyskytovaly v exozómech derivovaných z B lymfocytů, zatímco miRNA s adenylovaným 3'koncem byly převážně přítomny v B lymfocytech (Koppers-Lalic a kol. 2014).

5 Gestační diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) patří k chronickým onemocněním s vysokou morbiditou. Jeho hlavním a společným projevem je hyperglykémie, vznikající v důsledku absolutního či relativního nedostatku inzulínu. Rozlišujeme tři typy diabetu mellitu, diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu a gestační diabetes mellitus (GDM) (DeFronzo a kol. 2015).

Diabetes mellitus 1. typu je jedním z nejčastějších chronických onemocnění počínajících v dětství. Zpravidla okolo 5-7 let nebo kolem puberty. Jedná se o autoimunitní onemocnění. Ačkoli většina autoimunitních onemocnění postihuje více ženy, DM 1. typu postihuje naopak více muže. U tohoto onemocnění dochází pomocí vlastního imunitního systému k destrukci β buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, které sekretují hormon inzulín (Atkinson a kol. 2013).

Diabetes mellitus 2. typu je charakterizován dysregulací metabolismu karbohydrátů, lipidů a proteinů, což vede ke zhoršené sekreci inzulínu (dysfunkce β buněk), inzulínové rezistenci, chronickému zánětu nebo kombinaci těchto projevů. Inzulínová rezistence je stav, kdy fyziologické množství inzulínu nevyvolá adekvátní odpověď. Jedná se o komplexní chronické onemocnění, které je nejčastější ze všech 3 typů DM. Mezi hlavní rizikové faktory patří nadváha/obezita, špatné stravovací návyky, kouření a především nedostatek pohybu. DM 2. typu, oproti DM 1. typu, má většinou pozdější nástup. O to více je důležitější dbát na zdravý životní styl (DeFronzo a kol. 2015).

Pod pojmem **gestační diabetes mellitus (GDM)** se rozumí glukózová intolerance, která je poprvé detekovaná v průběhu těhotenství, odpovídá kritériím pro DM nebo pro porušenou glukózovou toleranci a po porodu sama od sebe odezní. (Metzger a Cousten 1998). Ženy s GDM mají hyperglykémii jako následek inzulínové rezistence. Jedná se o běžnou těhotenskou komplikaci. GDM ročně celosvětově postihuje ~16,5 % těhotenství a toto číslo neustále roste. Mezi rizikové faktory patří nadváha/obezita, špatné stravovací návyky, zvýšený reprodukční věk matek a rodinná historie inzulínové rezistence/diabetu (Plows a kol. 2018).

U zdravých osob se koncentrace glukózy v plazmě (glykémie) udržuje v úzkém rozmezí (5,6-7,0 mmol/l). Glykémie je regulovaná především inzulínem a glukagonem. Při lačnění se glukóza tvoří v játrech. Po jídle přichází do krevního oběhu monosacharidy. Jídlem je stimulována sekrece inzulínu, který tlumí produkci glukózy v játrech a stimuluje příjem

glukózy periferními tkáněmi, svaly a tukovou tkání. Glukagon naopak v játrech při lačnění stimuluje tvorbu glukózy (Gerich 2000).

Během těhotenství tělo matky prochází mnoha fyziologickými změnami pro zajištění růstu a vývoje plodu. Jednou z důležitých metabolických změn je schopnost tkání reagovat na produkovaný inzulín. Na začátku těhotenství se zvyšuje, což způsobuje zvýšení absorpce glukózy do tukové tkáně. Tímto se tělo připravuje na období pokročilejšího těhotenství, kdy je vyšší spotřeba energie (Di Cianni a kol. 2003). Jak těhotenství postupuje, nárůst lokálních a placentárních hormonů (estrogen, progesteron, leptin, kortizol, placentární laktogen a placentární růstový hormon) podněcuje stav inzulínové rezistence (Catalano a kol. 1991). Dochází ke zvýšení glukózy v krvi, která je transportována přes placentu, kde je jí potřeba pro růst plodu. Stav mírné inzulínové rezistence také zvyšuje endogenní produkci glukózy a dochází k ještě většímu zvýšení glukózy v krvi (Phelps a kol. 1981).

GDM má vliv rovněž na plod, zvýšená glukóza stimuluje endogenní produkci inzulínu a IGF-1 (insulin-like growth factor 1) u plodu. Častým výsledkem jsou děti s makrosomií (porodní váha více než 4000 gramů) (Schwartz a kol. 1994). Děti narozené matkám, které prodělaly GDM, mají dvojnásobné riziko vzniku obezity než děti zdravých matek (Vohr a Boney 2008).

Na vzniku GDM se pravděpodobně podílejí jak genetické, epigenetické, tak i environmentální faktory a zapojené mechanismy jsou komplexní. GDM zvyšuje riziko dalších těhotenských komplikací - např. preeklampsie (Hedderson a kol. 2003, Lee a kol. 2017).

6 Cíle práce

Je potvrzeno, že celá řada miRNA hraje roli v patogenezi diabetu mellitu a kardiovaskulárních onemocnění. Domníváme se, že u žen s anamnézou GDM, by mohlo docházet k modifikaci epigenetického profilu kardiovaskulárních miRNA, což by je mohlo predisponovat k pozdějšímu výskytu DM 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění.

Cílem mé práce je:

- zjistit, jaký je rozdíl v genové expresi miRNA mezi jednotlivými biologickými zdroji - plnou periferní žilní krví, plazmou a plazmatickými exozómy.
- zjistit, jak se liší genová exprese miRNA mezi pacientkami s anamnézou patologické a fyziologické gravidity postpartum v období 3-11 let po porodu. V případě patologické gravidity se jednalo o pacientky s anamnézou GDM.
- zjistit, zda jsou pacientky s anamnézou GDM ohroženy potenciálním rozvojem kardiovaskulárních onemocnění na základě přítomnosti aberantního expresního profilu miRNA asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními.

7 Biologický materiál

Zpracovávaným biologickým materiálem byla nesrážlivá plná periferní žilní krev odebraná postpartum 3-11 let po porodu do EDTA zkumavek (kyselina ethylendiamintetraoctová). Všechny vzorky byly získány s informovaným souhlasem pacientek i se souhlasem etické komise 3. lékařské fakulty UK a ÚPMD a pocházely z Ústavu pro péči o matku a dítě v Podolí. Celkem bylo zpracováno 52 vzorků plné periferní žilní krve. Z toho 25 pocházelo od žen s fyziologickým průběhem těhotenství a 27 od žen s anamnézou GDM. Ženy s fyziologickým průběhem těhotenství neměly žádné lékařské, těhotenské ani chirurgické komplikace a porodily zdravé dítě s váhou 2500-4000 gramů po ukončeném 37. týdnu gravidity.

8 Metody

Vzorky plné periferní žilní krve byly odebrány postpartum 3-11 let po porodu do 9ml zkumavek s protisrážlivým činidlem EDTA. Po příjmu do laboratoře byly ihned zpracovány.

Při prvotním zpracování vzorku pro izolaci RNA obohacené o krátké RNA z plné periferní žilní krve bylo k 200 μ l plné periferní žilní krve přidáno 1000 μ l pufru EL a vzorek byl inkubován na ledu po dobu 10 minut. Následně byl vzorek stáčen po dobu 10 minut v centrifuze vychlazené na 4 °C při 400 \times g. Poté byl odstraněn supernatant a opět přidán pufr EL o objemu 400 μ l. Následovala druhá centrifugace a odstranění supernatantu. Nakonec se k peletě buněk přidala směs pufru RLT a β -merkaptoethanolu (347:3). Vzorek byl zamrazen při teplotě -80 °C do doby dalšího zpracování.

Při prvotním zpracování vzorku pro izolaci RNA z plazmy a plazmatických exozómů byla zbývající plná periferní žilní krev 2x stočena při 1200 \times g po dobu 10 minut za pokojové teploty a zmrazena při teplotě -20°C do doby dalšího zpracování.

8.1 Izolace RNA obohacené o krátké RNA z plné periferní žilní krve

K izolaci byl použit mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion). Vzorky byly rozmrazeny při 37 °C po dobu 4 minut, následně bylo přidáno 600 μ l pufru (Lysis/Binding Buffer) a vzorek s pufrům byl promíchán. Poté byla přidána 1/10 objemu homogenizačního roztoku (miRNA Homogenate Additive), vzorek byl řádně promíchán a následovala inkubace na ledu po dobu 10 minut. Po inkubaci byl přidán 1 μ l 0,1nM syntetické miRNA *C. elegans* cel-miR-39 (vnitřní kontrola). Vzorek byl opět promíchán a byl přidán Acid-Phenol-Chloroform v objemu odpovídajícím původnímu lyzátu. Tuto směs bylo nutné promíchat minimálně po dobu 30s. Pro oddělení vodné a organické fáze byla směs následně centrifugována 5 minut při 10000 \times g. Vodná fáze (fáze obsahující pouze RNA) byla odebrána do čisté zkumavky a podle objemu naředěna 100% ethanolem (třetina původního objemu) a promíchána. Směs s ethanolem byla aplikována na kolonku pro odstranění nečistot a dlouhých RNA molekul a centrifugována po dobu 15 sekund při 10000 \times g. Vzniklý filtrát byl sbírán do nové zkumavky a naředěn 100% ethanolem (2/3 původního objemu) a promíchán. Vzorek byl aplikován na novou kolonku a centrifugován 15 sekund při 10000 \times g. Na kolonce došlo k zachycení krátkých RNA

molekul. Posléze byla kolonka promyta promývacími roztoky (miRNA Wash Solution 1 a miRNA Wash Solution 2/3) a zbavena reziduální tekutiny. V posledním kroku byla kolonka promyta 100 µl elučního roztoku ohřátého na 95 °C, čímž došlo k uvolnění RNA molekul do roztoku, ke kterému bylo přidáno ještě 5 µl pufru a 5 µl DNázy pro odstranění kontaminující DNA (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 30 minut. Nakonec bylo přidáno 5 µl EDTA a vzorek byl inkubován dalších 10 minut při teplotě 65 °C.

8.2 Izolace RNA z plazmy

Pro izolaci RNA z plazmy byl použit mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion). Plazma byla rozmrazena za pokojové teploty. K 500 µl plazmy bylo přidáno 1,50 ml Trizol LS Reagentu a promícháno. Tato směs byla inkubována po dobu 5 minut za pokojové teploty. Následně byl přidán 1 µl 0,1nM syntetické cel-miR-39 (vnitřní kontrola) a 0,40 ml chloroformu, to celé bylo promícháno a inkubováno 2-15 minut za pokojové teploty. Pro oddělení vodné a organické fáze byla směs následně centrifugována při 12000 g a 4°C po dobu 15 minut. Vodná fáze (fáze obsahující pouze RNA) byla odebrána do čisté zkumavky a podle objemu naředěna 100% ethanolem (2/3 původního objemu) a promíchána. Směs s ethanolem byla aplikována na kolonku, centrifugována po dobu 15 sekund při 10000 × g a filtrát byl odstraněn. Na kolonce došlo k zachycení RNA molekul. Posléze byla kolonka promyta promývacími roztoky (miRNA Wash Solution 1 a miRNA Wash Solution 2/3) a zbavena reziduální tekutiny. V posledním kroku byla kolonka promyta 100 µl elučního roztoku ohřátého na 95 °C, čímž došlo k uvolnění RNA molekul do roztoku, ke kterému bylo přidáno ještě 5 µl pufru a 5 µl DNázy pro odstranění kontaminující DNA (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 30 minut. Nakonec bylo přidáno 5 µl EDTA a vzorek byl inkubován dalších 10 minut při teplotě 65 °C.

8.3 Izolace RNA z plazmatických exozómů

Pro izolaci RNA z plazmatických exozómů byl použit Total Exosome Isolation kit (Invitrogen). Plazma byla rozmrazena za pokojové teploty. K 500 µl plazmy bylo přidáno 250 µl 1xPBS, promícháno, poté bylo přidáno 25 µl proteinázy K, opět promícháno a směs byla inkubována

10 minut při teplotě 37°C. Po inkubaci bylo přidáno 150ul Exosome Precipitation Reagentu, promícháno a opět inkubováno 45 minut při teplotě 2-8 °C. Následovala centrifugace při 10000g po dobu 5 minut za pokojové teploty. Exozómy byly obsaženy ve vzniklé peletě, proto byl odstraněn supernatant a peleta resuspendována ve 200 µl 1xPBS. Ke směsi bylo přidáno 200 µl 2x Denaturing Solution a promícháno. Poté byl přidán 1 µl 0,1nM syntetické cel-miR-39 (vnitřní kontrola). Vzorek byl opět promíchán a bylo přidáno 400 µl Acid-Phenol-Chloroform. Tuto směs bylo nutné promíchat minimálně po dobu 30s. Pro oddělení vodné a organické fáze byla směs následně centrifugována 5 minut při 10000 × g. Vodná fáze (fáze obsahující pouze RNA) byla odebrána do čisté zkumavky a naředěna 100% ethanolem (1,25x původní objem) a promíchána. Směs s ethanolem byla aplikována na kolonku, centrifugována po dobu 15 sekund při 10000 × g a filtrát byl odstraněn. Posléze byla kolonka promyta promývacími roztoky (miRNA Wash Solution 1 a miRNA Wash Solution 2/3) a zbavena reziduální tekutiny. V posledním kroku byla kolonka promyta 100 µl elučního roztoku ohřátého na 95 °C, čímž došlo k uvolnění RNA molekul do roztoku, ke kterému bylo přidáno ještě 5 µl pufru a 5 µl DNázy pro odstranění kontaminující DNA (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 30 minut. Nakonec bylo přidáno 5 µl EDTA a vzorek byl inkubován dalších 10 minut při teplotě 65 °C.

8.4 Reverzní transkripce

Ještě tentýž den byly RNA vzorky přepsány pomocí reverzní transkripce do cDNA. Reverzní transkripce byla provedena na přístroji 7500 Real-Time PCR Systém (Applied Biosystems, Branchburg, USA). K transkripci byl použit TaqMan Reverse Transcription Kit a TaqMan MicroRNA Assay. Součástí TaqMan MicroRNA Assay byly specifické RT primery s vlásenkou (tzv. stem-loop primery). Reakční objem pro všechny vzorky byl 7 µl a složení reakční směsi pro jednu jamku je zobrazeno v tabulce č. 2. Teplotní profil je uveden v tabulce č. 3.

Tabulka č. 2: Složení reakční směsi

Složení reakční směsi	Množství v μl
100 mM dNTPs	0,07
Reverzní transkriptáza	0,49
pufř	0,70
Inhibitor RNázy	0,07
voda	1,89
celkový objem	3,22
RT primer	1,40
vzorek	2,38
celkový reakční objem	7,00

Tabulka č.3: Teplotní profil reverzní transkripce

Čas (min)	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)
30	16
30	42
5	85
∞	4

8.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Po reverzní transkripci následovala kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) v reálném čase. Tato metoda je založená na principu sledování amplifikace DNA v reálném čase a je tedy možné určit absolutní a relativní množství detekovaných molekul.

MiRNA vykazují vysoké množství sekvenční homologie v rámci rodin a jsou zhruba stejné velikosti jako běžný primer pro PCR, proto existují modifikované formy PCR speciálně pro miRNA. V této studii probíhala analýza exprese miRNA za použití tzv. stem-loop primerů při reverzní transkripci. Tyto primery se váží na 3'konec miRNA a díky nim dojde k prodloužení maturované miRNA a vyšší specifity reakce. TaqMan sondy jsou vysoce specifické pro maturované miRNA (s přesností na 1 nukleotid). Při amplifikaci se ještě využívají dva druhy primerů – zpětný a přímý. Během reakce dochází ke štěpení TaqMan sondy Taq DNA polymerázou. Taq DNA polymeráza je stabilní za vysokých teplot a má mj. 5'→3' exonukleázovou aktivitu. TaqMan sonda se skládá z fluoforu kovalentně navázaného na 5'konec, oligonukleotidu a zhášeče na 3'konci, jejím štěpením dochází

k uvolnění fluorescence, což umožňuje měřit množství detekovaného templátu. Složení reakční směsi a objemy jednotlivých komponent jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Složení reakční směsi (qPCR v reálném čase)

Složení reakční směsi	Množství v μl
TaqMan univerzální PCR master mix	7,50
Voda (bez nukleáz)	3,75
TaqMan miRNA směs primerů + sondy	0,75
cDNA	3,00
Celkový objem	15,00

Součástí každé analýzy byl referenční vzorek (izolace miRNA z placentární tkáně ředěná na koncentraci 3 ng/ml) a vzorek nahrazený vodou - negativní kontrola (NTC). PCR byla provedena na přístroji 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems), nastavena na 50 cyklů (denaturace a anelace + elongace) a teplotní profil reakce je uveden v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Teplotní profil PCR v reálném čase

Čas	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Reakce
2 min	50	Aktivace enzymů
10 min	95	Aktivace enzymů
15 s	95	Denaturace
60 s	60	Anelace + elongace

8.6 Relativní kvantifikace

Relativní kvantifikace genové exprese 29 vybraných kardiovaskulárních miRNA byla provedena pomocí tzv. komparativní Ct metody (Ct – prahová hodnota). Tato metoda porovnává množství templátu v testovaném vzorku a referenčním vzorku. Referenčním vzorkem pro všechny biologické zdroje byla izolace miRNA z placentární tkáně ředěná na koncentraci 3 ng/ml. Dále je hodnota Ct normalizována na genovou expresi stabilních endogenních kontrol. V případě plné periferní žilní krve byly endogenní kontrolou dvě malé jadérové RNA - RNU38B a RNU58A, vybrané po předchozím otestování panelu endogenních kontrol. V případě plazmy a plazmatických exozómů byla použita jako endogenní kontrola syntetická miRNA *C. elegans* cel-miR-39. Pro každý vzorek byl vypočten rozdíl Ct hodnoty

příslušné miRNA a geometrického průměru Ct hodnot dvou endogenních kontrol (RNU38B a RNU58A) nebo Ct hodnoty cel-miR-39, totéž bylo spočteno pro referenční vzorek. Výsledná ΔCt referenčního vzorku byla odečtena od ΔCt konkrétního testovaného vzorku, čímž jsme získali výslednou hodnotu $\Delta\Delta Ct$, která byla přepočítána dle vzorce $2^{-\Delta\Delta Ct}$, s touto finální hodnotou byla provedena statistická analýza.

8.7 Statistická analýza dat

Pro statistickou analýzu dat byl použit software Statistica (verze 11.0; StatSoft, Inc., USA). Ověření normality dat bylo provedeno pomocí Shapiro-Wilkova testu (Shapiro a Wilk, 1965), jelikož byla data nenormálně rozdělena, byly poté použity neparametrické testy. Pro porovnání 3 biologických zdrojů byly provedeny testy pro závislé vzorky. Nejprve Friedmanův test pro všechny tři biologické zdroje, a jelikož se jednotlivé vzorky lišily, byl poté pro porovnání jednotlivých dvojic biologických zdrojů použit Wilcoxonův párový test (Friedman 1937, Wilcoxon 1992). Pro porovnání dvou skupin žen (FG a GDM) v rámci stejných biologických zdrojů byl použit dvouvýběrový test pro nezávislé vzorky – Mann-Whitneův U test (Mann a Whitney 1947). Za signifikantní byly považovány výsledky s p-hodnotou nižší než 0,05 ($p < 0,05$). Korelace mezi dvěma proměnnými byl vypočítána pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (ρ) (Spearman 1904). Pokud je hodnota Spearmanova korelačního koeficientu $\rho = 0,5-1,0$ jedná se o silnou pozitivní korelaci, pokud je $\rho = 0-0,5$ hovoříme o slabé pozitivní korelaci. V případě, že je Spearmanův korelační koeficient $\rho = -0,5-(-1)$, jedná se o silnou negativní korelaci a pokud je $\rho = -0,5-0$, hovoříme o slabé negativní korelaci. Hladina významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

Výsledkem grafického zpracování byly krabicové grafy. Tmavá horizontální linie značila medián, horní a dolní linie znázorňovaly hodnoty, které nepřesáhly 1,5násobek interkvartilového rozpětí (25.-75. percentil). Odlehlé hodnoty byly označeny kroužkem a extrémní hodnoty křížkem.

9 Výsledky

V této práci byl na souboru 52 žen studován expresní profil 29 kardiovaskulárních miRNA. Expresní profil těchto miRNA byl porovnán mezi třemi biologickými zdroji – plná periferní žilní krev (plná PK), plazma a plazmatické exozómy. Zároveň byly porovnány 2 skupiny žen. První skupina čítala 25 žen, které měly fyziologický průběh těhotenství. Druhou skupinu představovalo 27 žen, které prodělaly GDM. Obě tyto skupiny tvořily ženy 3-11 let po porodu, který proběhl v 37. - 41. gestačním týdnu. V práci byla současně zkoumána korelace expresních profilů mezi plnou periferní žilní krví, plazmou a plazmatickými exozómy. Signifikantní výsledky jsou v tabulkách vyznačeny červeně.

9.1 Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích ve skupině žen s anamnézou fyziologické gravidity

Tabulka č. 6 zaznamenává srovnání expresních hladin 29 kardiovaskulárních miRNA ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi (plná PK), plazmě a plazmatických exozómech ve skupině žen s anamnézou fyziologické gravidity (FG). Všechny 29 testovaných miRNA mělo signifikantně vyšší hladiny v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmatickými exozómy. Kromě miR-23a-3p byla zjištěna signifikantně vyšší hladina všech testovaných miRNA v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmou. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmě v porovnání s plazmatickými exozómy pro miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p a miR-181a-5p. Ukázka signifikantního rozdílu v hladinách exprese kardiovaskulárních miRNA mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy viz grafy č. 1 – č. 6.

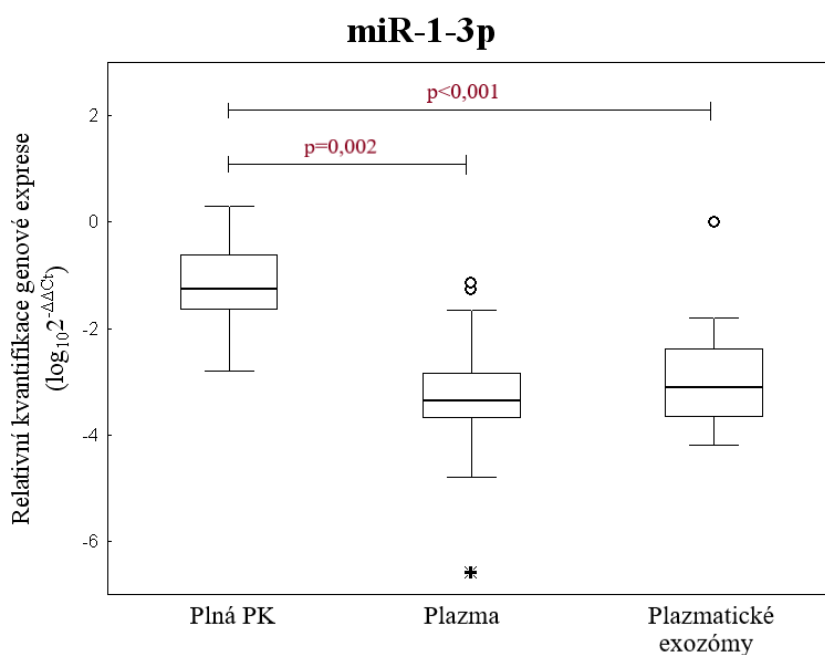
Tabulka č. 6: Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích ve skupině FG

miRNA	biologický materiál	počet (n)	p-hodnota
miR-1-3p	plná PK vs plazma	23	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	24	0,002
	plazma vs plazmatické exozómy	22	0,465
miR-16-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,051

miR-17-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,088
miR-20a-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,104
miR-20b-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,150
miR-21-5p	plná PK vs plazma	25	0,007
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	24	0,046
miR-23a-3p	plná PK vs plazma	25	0,221
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,058
miR-24-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,904
miR-26a-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,510
miR-29a-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,840
miR-92a-3p	plná PK vs plazma	25	0,025
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	<0,001
miR-100-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,061
miR-103a-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,397
miR-125b-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,353
miR-126-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,183
miR-130b-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001

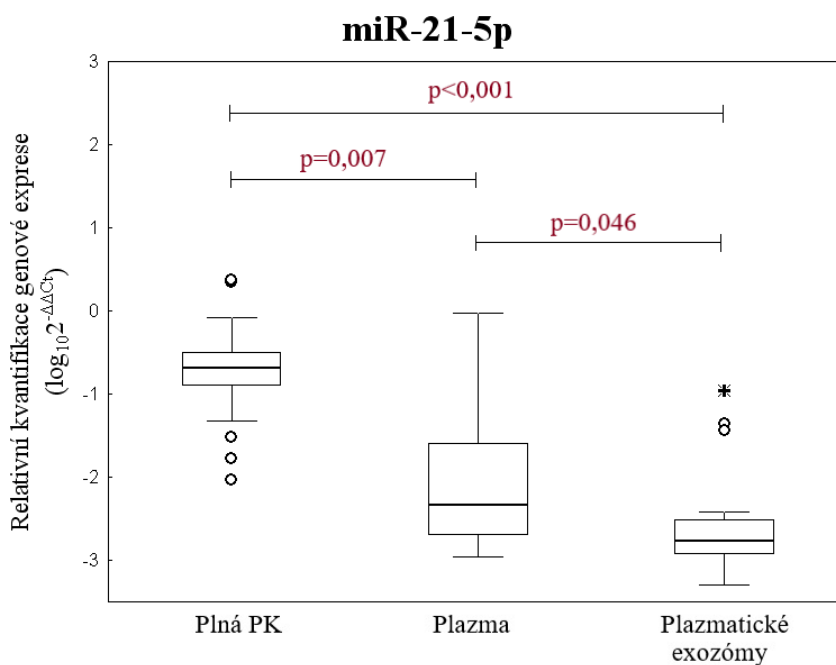
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,048
miR-133a-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,025
miR-143-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,510
miR-145-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,061
miR-146a-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,563
miR-155-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,412
miR-181a-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,009
miR-195-5p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,143
miR-199a-5p	plná PK vs plazma	22	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	22	0,355
miR-210-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,051
miR-221-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,510
miR-342-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,192
miR-499a-5p	plná PK vs plazma	19	0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	21	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	18	0,616
miR-574-3p	plná PK vs plazma	25	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	25	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	25	0,276

Graf č. 1: Srovnání expresních hladin miR-1-3p ve třech biologických zdrojích ve skupině FG



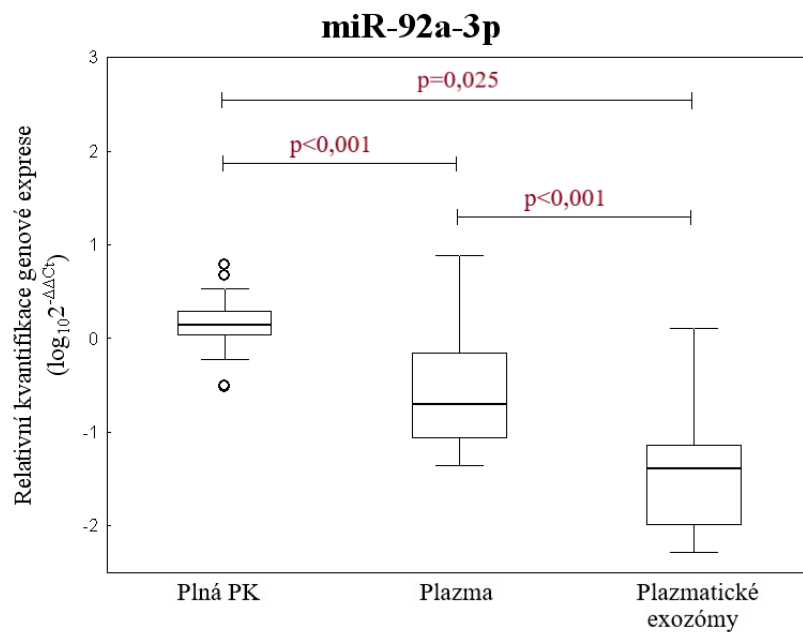
Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-1-3p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou a plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy.

Graf č. 2: Srovnání expresních hladin miR-21-5p ve třech biologických zdrojích ve skupině FG



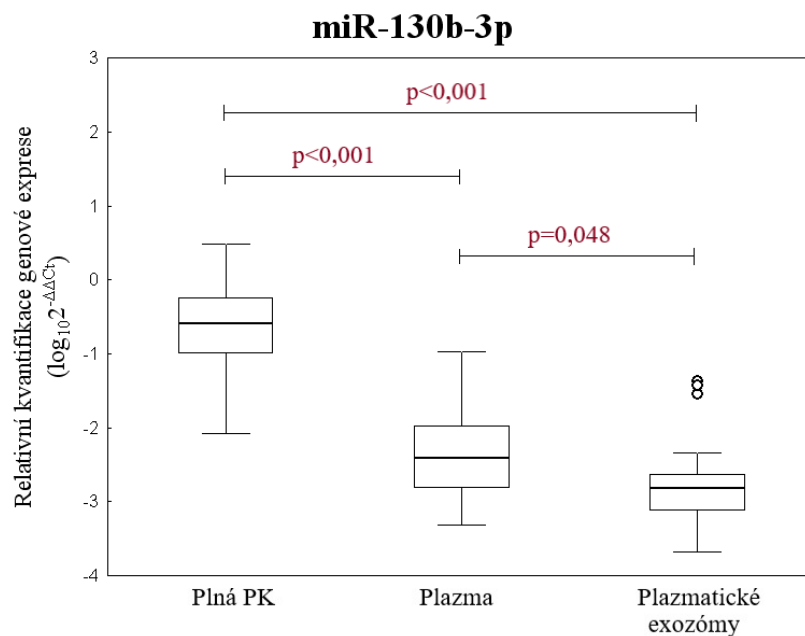
Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-21-5p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

Graf č. 3: Srovnání expresních hladin miR-92a-3p ve třech biologických zdrojích ve skupině FG



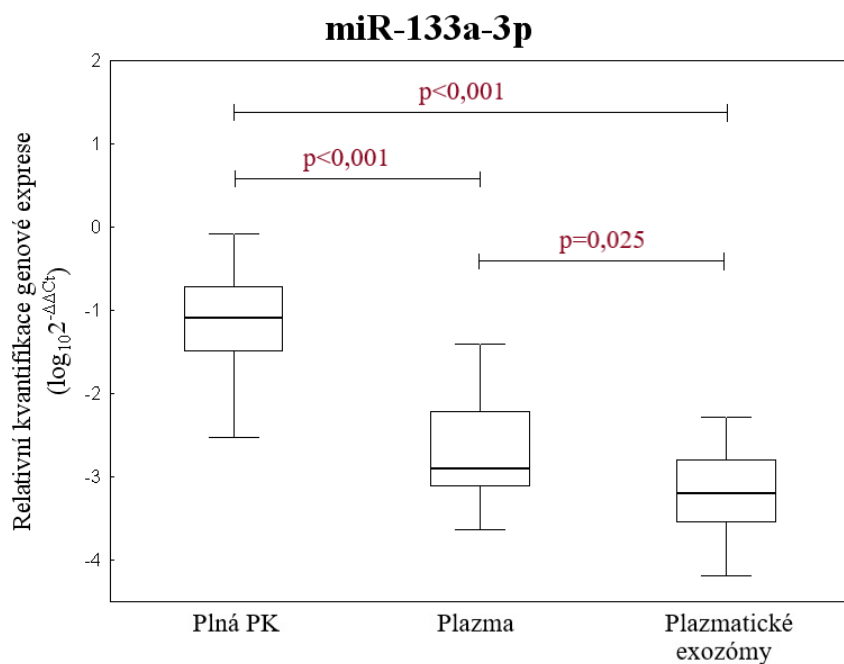
Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-92a-3p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

Graf č. 4: Srovnání expresních hladin miR-130b-3p ve třech biologických zdrojích ve skupině FG



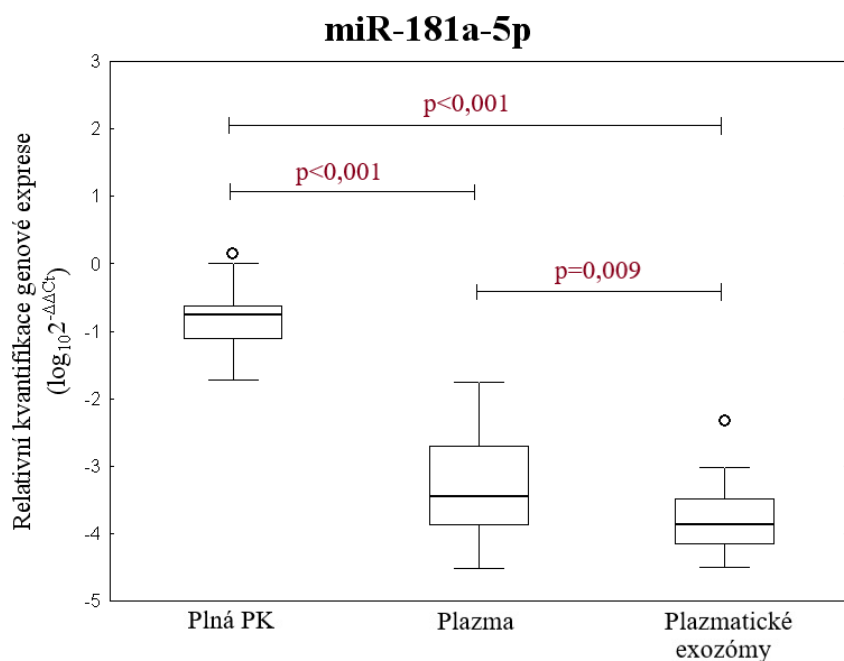
Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-130b-3p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

Graf č. 5: Srovnání expresních hladin miR-133a-3p ve třech biologických zdrojích ve skupině FG



Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-133a-3p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

Graf č. 6: Srovnání expresních hladin miR-181a-5p ve třech biologických zdrojích ve skupině FG



Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-181a-5p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

9.2 Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích ve skupině žen s anamnézou GDM

Tabulka č. 7 zaznamenává srovnání expresních hladin 29 kardiovaskulárních miRNA ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi (plná PK), plazmě a plazmatických exozómech ve skupině žen s anamnézou GDM. Kromě miR-199a-5p a miR-499a-5p byla zjištěna signifikantně vyšší hladina všech testovaných miRNA v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmou. S výjimkou miR-499a-5p byla zjištěna signifikantně vyšší hladina všech testovaných miRNA v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmatickými exozómy. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmatických exozómech ve srovnání s plazmou u miR-199a-5p. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmě ve srovnání s plazmatickými exozómy u miR-16-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-210-3p, miR-342-3p, a miR-574-3p. Ukázka signifikantního rozdílu v hladinách exprese kardiovaskulárních miRNA mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy ve skupině GDM viz grafy č. 7 – č. 10.

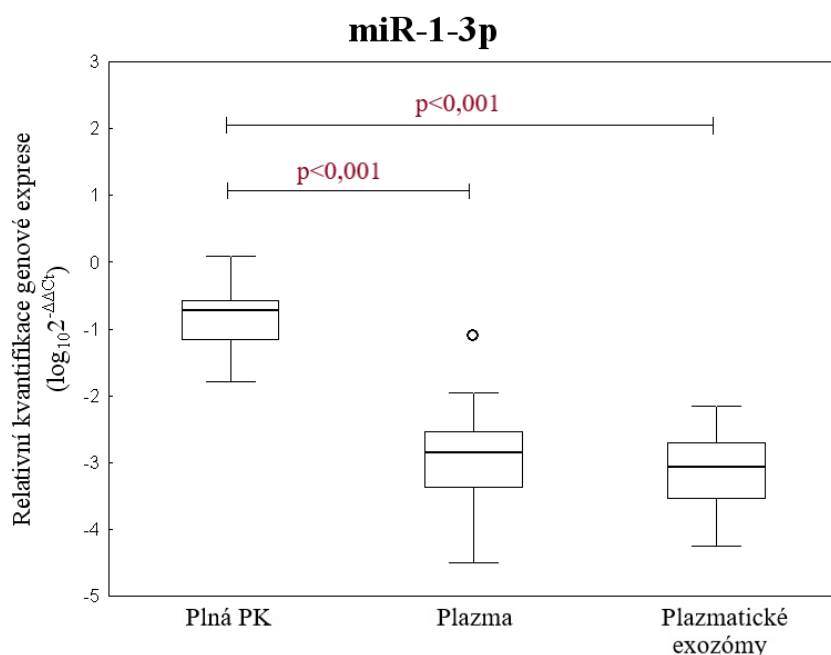
Tabulka č. 7: Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích ve skupině GDM

miRNA	biologický materiál	počet (n)	p-hodnota
miR-1-3p	plná PK vs plazma	23	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	23	0,073
miR-16-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,010
miR-17-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,061
miR-20a-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,003
miR-20b-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,005
miR-21-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001

	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,008
miR-23a-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,904
miR-24-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,683
miR-26a-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,084
miR-29a-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,792
miR-92a-3p	plná PK vs plazma	27	0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	<0,001
miR-100-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,442
miR-103a-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,072
miR-125b-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,186
miR-126-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,075
miR-130b-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,013
miR-133a-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	<0,001
miR-143-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,075
miR-145-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,002
miR-146a-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001

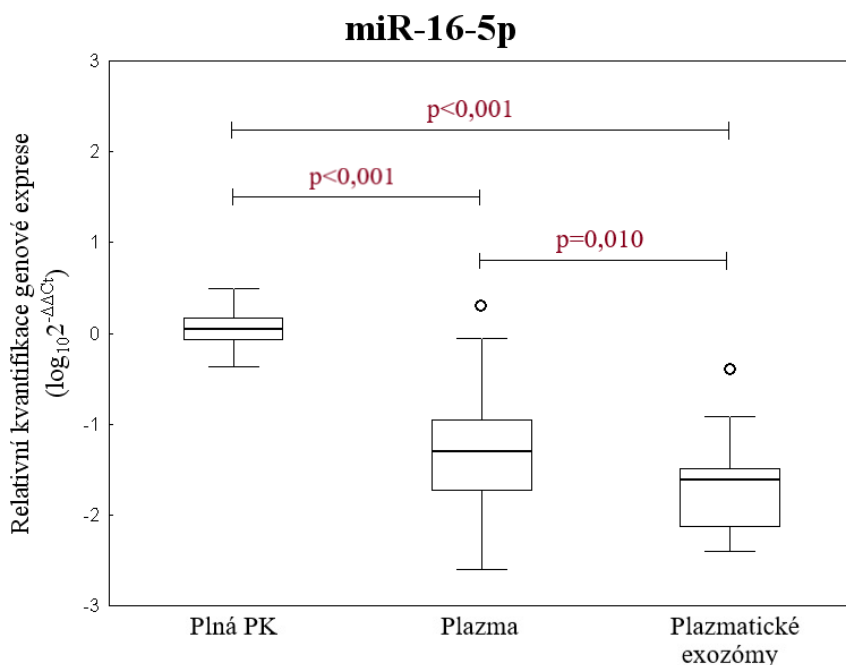
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,020
miR-155-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,486
miR-181a-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,156
miR-195-5p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,097
miR-199a-5p	plná PK vs plazma	27	0,981
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,037
miR-210-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	<0,001
miR-221-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,325
miR-342-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,032
miR-499a-5p	plná PK vs plazma	25	0,100
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	0,614
	plazma vs plazmatické exozómy	24	0,116
miR-574-3p	plná PK vs plazma	27	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	27	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	27	0,024

Graf č. 7: Srovnání expresních hladin miR-1-3p ve třech biologických zdrojích ve skupině GDM



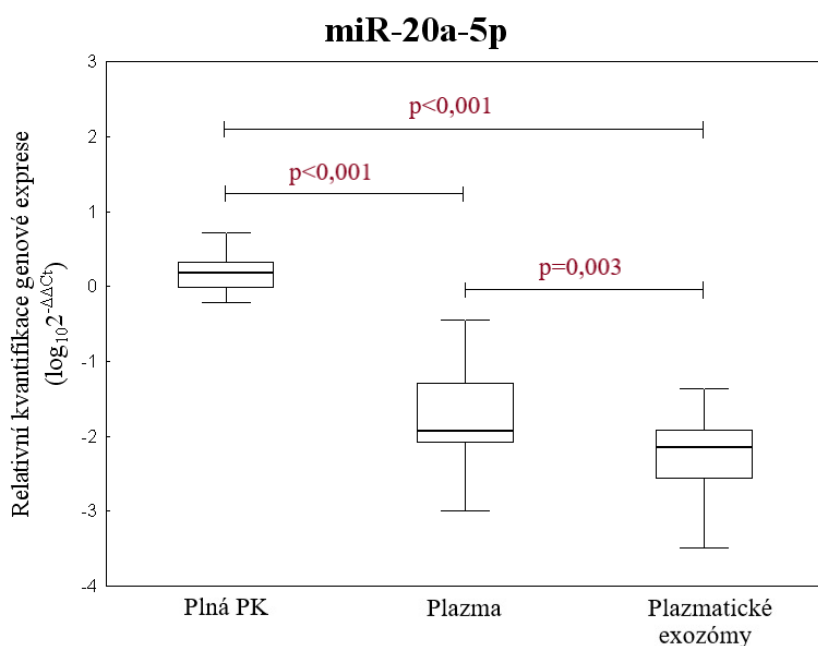
Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-1-3p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou a plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy.

Graf č. 8: Srovnání expresních hladin miR-16-5p ve třech biologických zdrojích ve skupině GDM



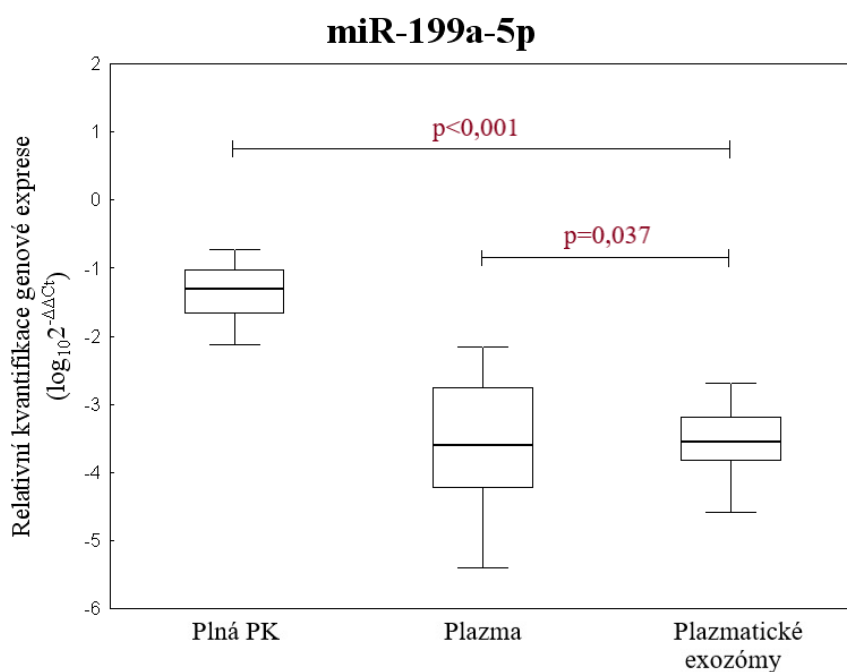
Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-16-5p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

Graf č. 9: Srovnání expresních hladin miR-20a-5p ve třech biologických zdrojích ve skupině GDM



Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-20a-5p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

Graf č. 10: Srovnání expresních hladin miR-199a-5p ve třech biologických zdrojích ve skupině GDM



Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-199a-5p mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

9.3 Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích u žen s anamnézou FG a GDM dohromady

Tabulka č. 8 zaznamenává srovnání expresních hladin 29 kardiovaskulárních miRNA ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi (plná PK), plazmě a plazmatických exozómech v celkové skupině žen s fyziologickým a patologickým průběhem těhotenství. Všechny 29 testovaných miRNA mělo signifikantně vyšší hladiny v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmou i v porovnání s plazmatickými exozómy. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmatických exozómech ve srovnání s plazmou u miR-126-3p. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmě ve srovnání s plazmatickými exozómy u miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-181a-5p, miR-195-5p, miR-210-3p, miR-342-3p, a miR-574-3p. Ukázka signifikantního rozdílu v hladinách exprese kardiovaskulárních miRNA mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy u žen s anamnézou FG a GDM dohromady viz grafy č. 11 – č. 14.

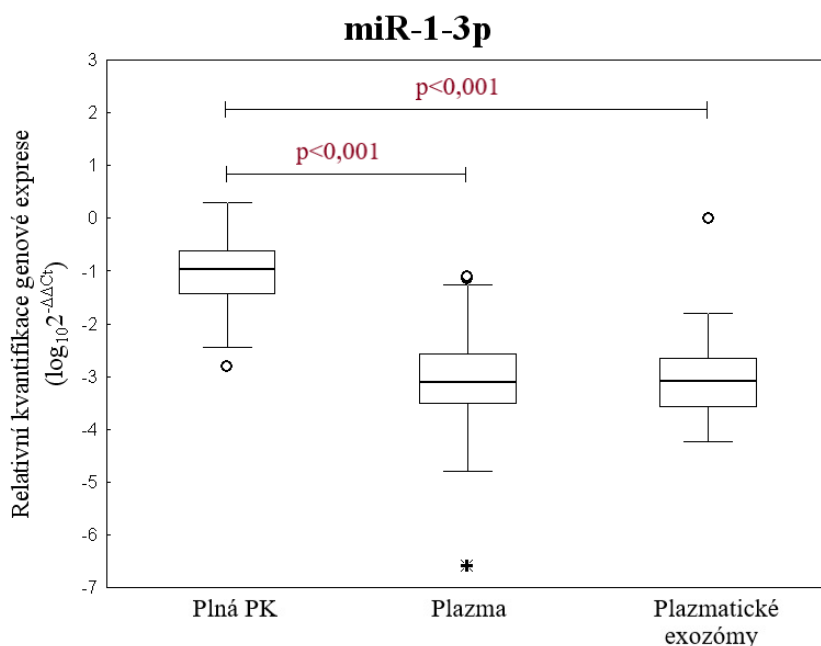
Tabulka č. 8: Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA ve třech biologických zdrojích u žen s anamnézou FG a GDM dohromady

miRNA	biologický materiál	počet (n)	p-hodnota
miR-1-3p	plná PK vs plazma	46	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	51	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	45	0,584
miR-16-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,001
miR-17-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,016
miR-20a-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,002
miR-20b-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,002
miR-21-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	51	0,002

miR-23a-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,115
miR-24-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,899
miR-26a-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,097
miR-29a-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,913
miR-92a-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	<0,001
miR-100-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,073
miR-103a-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,062
miR-125b-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,126
miR-126-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,045
miR-130b-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,002
miR-133a-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	<0,001
miR-143-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,105
miR-145-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,001
miR-146a-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001

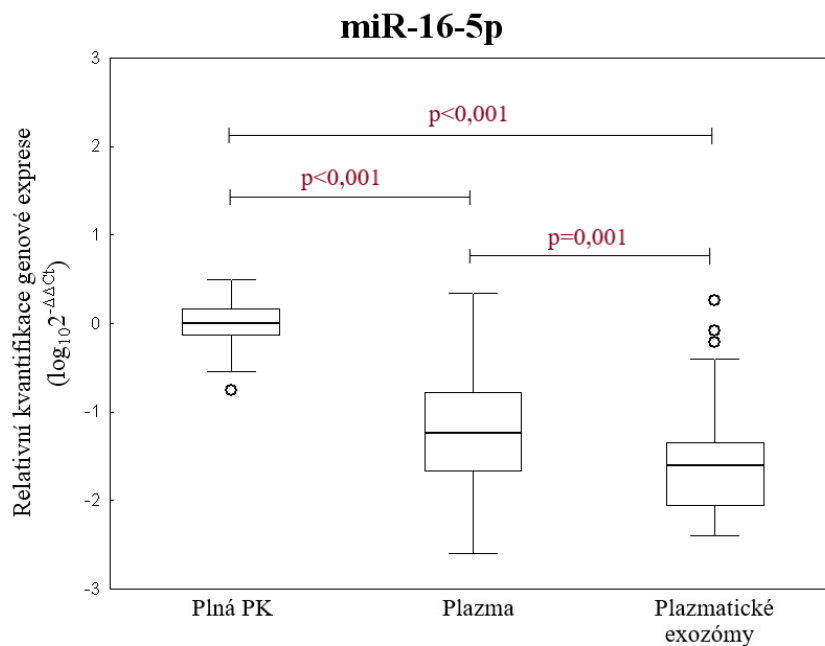
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,044
miR-155-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,180
miR-181a-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,007
miR-195-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,028
miR-199a-5p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,340
miR-210-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	<0,001
miR-221-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,229
miR-342-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,020
miR-499a-5p	plná PK vs plazma	33	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	41	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	26	0,328
miR-574-3p	plná PK vs plazma	52	<0,001
	plná PK vs plazmatické exozómy	52	<0,001
	plazma vs plazmatické exozómy	52	0,018

Graf č. 11: Srovnání expresních hladin miR-1-3p ve třech biologických zdrojích u žen s anamnézou fyziologické a patologické gravidity dohromady



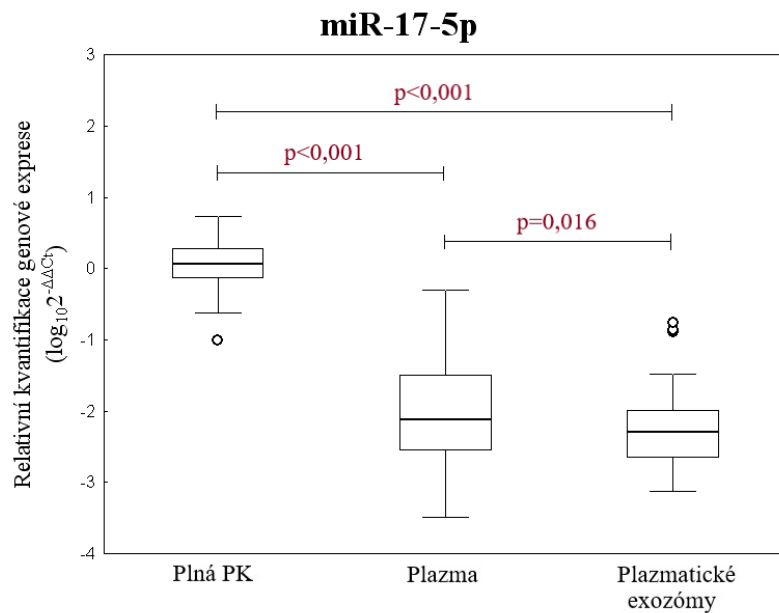
Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-1-3p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou a plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy.

Graf č. 12: Srovnání expresních hladin miR-16-5p ve třech biologických zdrojích u žen s anamnézou fyziologické a patologické gravidity dohromady



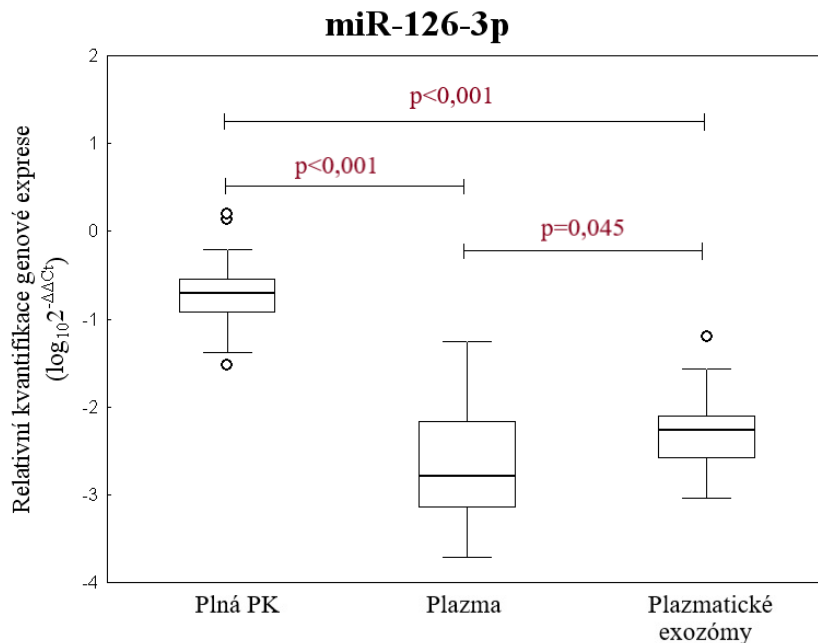
Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-16-5p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

Graf č. 13: Srovnání expresních hladin miR-17-5p ve třech biologických zdrojích u žen s anamnézou fyziologické a patologické gravidity dohromady



Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-17-5p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

Graf č. 14: Srovnání expresních hladin miR-126-3p ve třech biologických zdrojích u žen s anamnézou fyziologické a patologické gravidity dohromady



Ukázka signifikantního rozdílu v hladině exprese miR-126-3p mezi plnou periferní žilní krví a plazmou, plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy a plazmou a plazmatickými exozómy.

9.4 Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmou

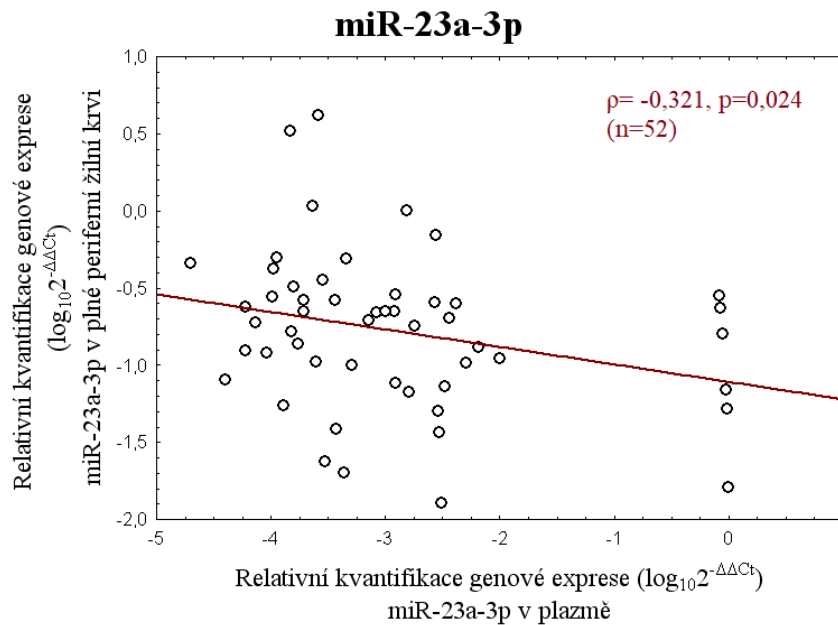
Následující tabulka č. 9 zaznamenává korelaci genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmou u 29 kardiovaskulárních miRNA na celém souboru žen s anamnézou FG a GDM.

Tabulka č. 9: Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmou (FG a GDM)

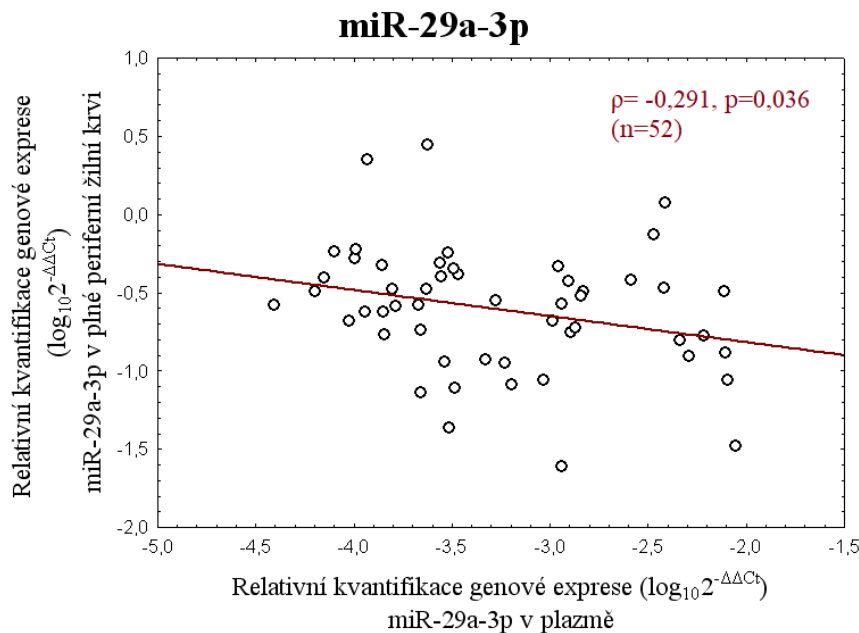
Kardiovaskulární miRNA	Počet (n)	Spearmanův korelační koeficient	p-hodnota
miR-1-3p	46	0,019	0,903
miR-16-5p	52	-0,249	0,075
miR-17-5p	52	-0,113	0,424
miR-20a-5p	52	-0,143	0,313
miR-20b-5p	52	-0,082	0,565
miR-21-5p	52	-0,243	0,082
miR-23a-3p	52	-0,312	0,024
miR-24-3p	52	0,035	0,803
miR-26a-5p	52	-0,063	0,658
miR-29a-3p	52	-0,291	0,036
miR-92a-3p	52	-0,228	0,104
miR-100-5p	52	0,083	0,559
miR-103a-3p	52	-0,099	0,486
miR-125b-5p	52	0,031	0,829
miR-126-3p	52	-0,206	0,143
miR-130b-3p	52	-0,168	0,233
miR-133a-3p	52	-0,251	0,073
miR-143-3p	52	-0,263	0,060
miR-145-5p	52	-0,091	0,521
miR-146a-5p	52	-0,015	0,913
miR-155-5p	52	0,056	0,693
miR-181a-5p	52	-0,220	0,118
miR-195-5p	52	-0,065	0,648
miR-199a-5p	49	-0,237	0,101
miR-210-3p	52	-0,043	0,763
miR-221-3p	52	-0,142	0,315
miR-342-3p	52	-0,145	0,304
miR-499a-5p	44	-0,091	0,557
miR-574-3p	52	0,045	0,750

Genová exprese v plné periferní žilní krvi korelovala slabě s genovou expresí v plazmě u miR-23a-3p a miR-29a-3p viz grafy č. 15 a 16.

Graf č. 15: Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmou u miR-23a-3p u žen s anamnézou FG a GDM



Graf č. 16: Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmou u miR-29a-3p u žen s anamnézou FG a GDM



9.5 Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy

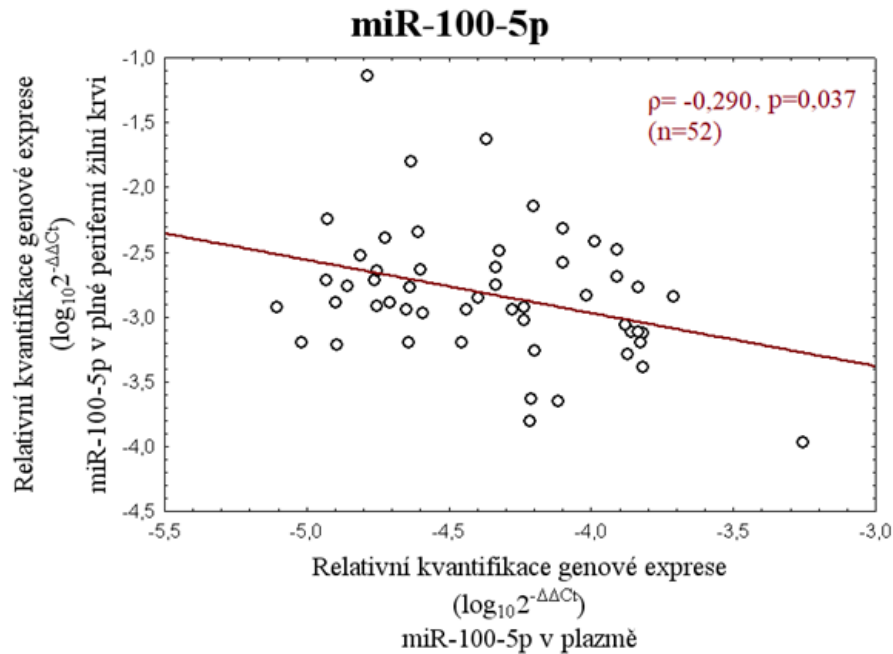
Následující tabulka č. 10 zaznamenává korelaci genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy u 29 kardiovaskulárních miRNA na celém souboru žen s anamnézou FG a GDM.

Tabulka č. 10: Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy (FG a GDM)

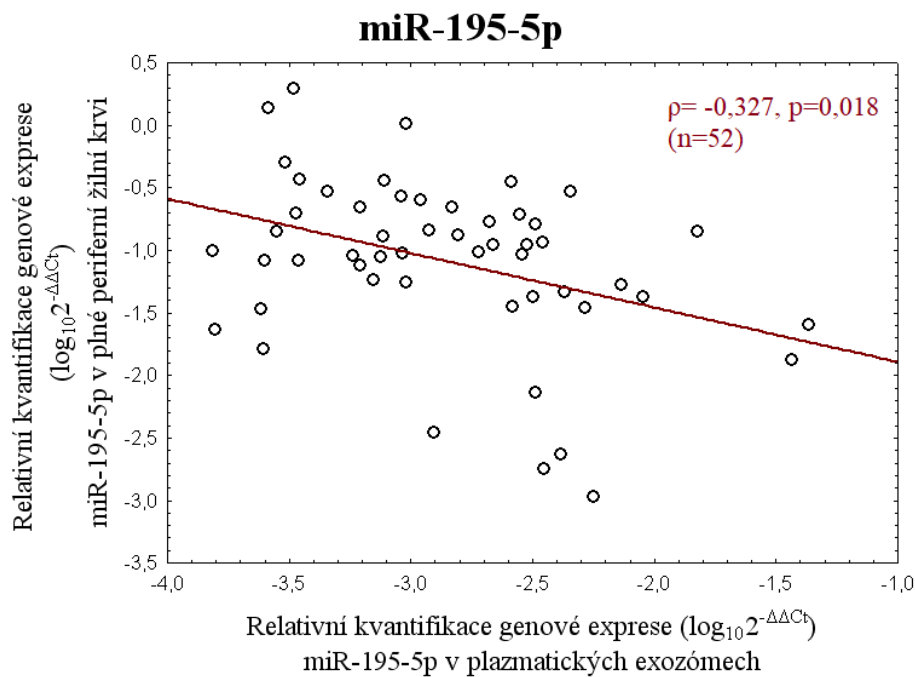
Kardiovaskulární miRNA	Počet (n)	Spearmanův korelační koeficient	p-hodnota
miR-1-3p	51	-0,016	0,912
miR-16-5p	52	-0,239	0,089
miR-17-5p	52	-0,192	0,172
miR-20a-5p	52	-0,255	0,068
miR-20b-5p	52	-0,140	0,322
miR-21-5p	52	-0,039	0,785
miR-23a-3p	52	-0,142	0,314
miR-24-3p	52	-0,024	0,864
miR-26a-5p	52	0,109	0,442
miR-29a-3p	52	-0,044	0,753
miR-92a-3p	52	0,020	0,889
miR-100-5p	52	-0,290	0,037
miR-103a-3p	52	0,146	0,302
miR-125b-5p	52	-0,125	0,376
miR-126-3p	52	-0,159	0,259
miR-130b-3p	52	-0,125	0,377
miR-133a-3p	52	-0,071	0,619
miR-143-3p	52	0,061	0,666
miR-145-5p	52	0,050	0,724
miR-146a-5p	52	0,084	0,552
miR-155-5p	52	0,050	0,724
miR-181a-5p	52	-0,098	0,488
miR-195-5p	52	-0,327	0,018
miR-199a-5p	52	-0,170	0,226
miR-210-3p	52	-0,108	0,446
miR-221-3p	52	-0,052	0,714
miR-342-3p	52	-0,232	0,097
miR-499a-5p	48	-0,235	0,108
miR-574-3p	52	0,013	0,927

Genová exprese v plné periferní žilní krvi korelovala slabě s genovou expresí v plazmatických exozómech u miR-100-5p a miR-195-5p viz grafy č. 17 a 18.

Graf č. 17: Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy u miR-100-5p u žen s anamnézou FG a GDM



Graf č. 18: Korelace genové exprese mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy u miR-195-5p u žen s anamnézou FG a GDM



9.6 Korelace genové exprese mezi plazmou a plazmatickými exozómy

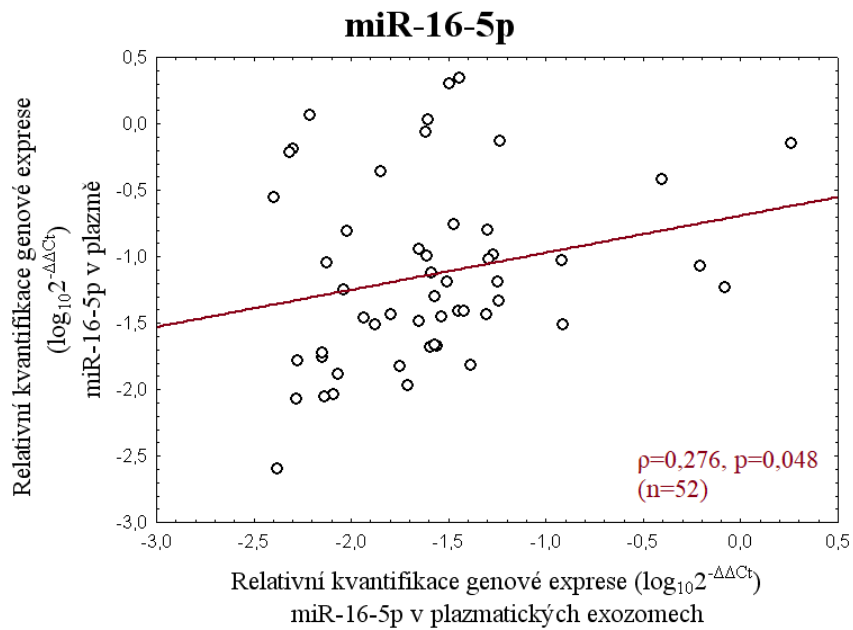
Následující tabulka č. 11 zaznamenává korelaci genové exprese mezi plazmou a plazmatickými exozómy u 29 kardiovaskulárních miRNA na celém souboru žen s anamnézou FG a GDM.

Tabulka č. 11: Korelace genové exprese mezi plazmou a plazmatickými exozómy (FG a GDM)

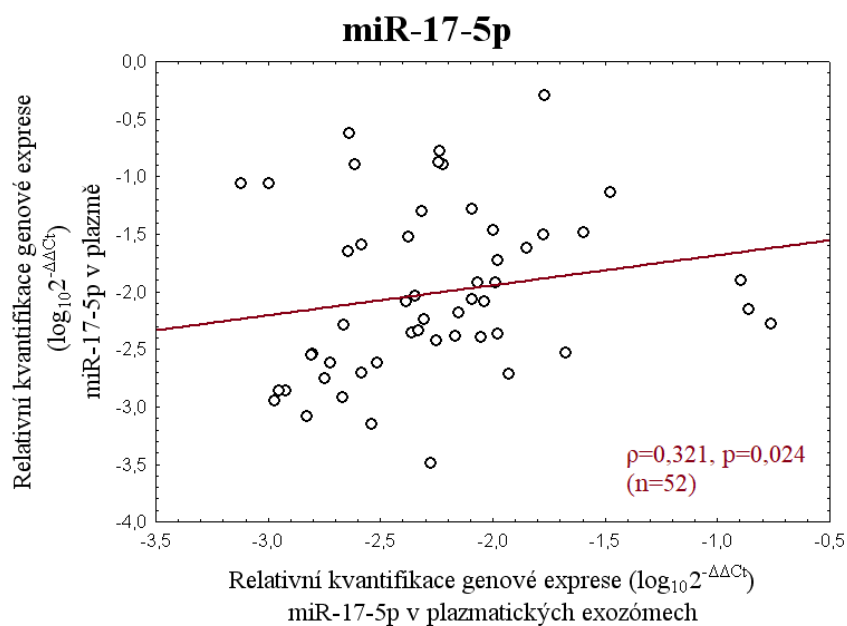
Kardiovaskulární miRNA	Počet (n)	Spearmanův korelační koeficient	p-hodnota
miR-1-3p	45	-0,196	0,198
miR-16-5p	52	0,276	0,048
miR-17-5p	52	0,312	0,024
miR-20a-5p	52	0,226	0,108
miR-20b-5p	52	0,343	0,013
miR-21-5p	52	-0,026	0,853
miR-23a-3p	52	0,181	0,200
miR-24-3p	52	0,204	0,147
miR-26a-5p	52	0,069	0,629
miR-29a-3p	52	0,146	0,301
miR-92a-3p	52	0,340	0,014
miR-100-5p	52	0,093	0,511
miR-103a-3p	52	0,113	0,424
miR-125b-5p	52	0,144	0,310
miR-126-3p	52	0,068	0,631
miR-130b-3p	52	0,123	0,386
miR-133a-3p	52	0,120	0,398
miR-143-3p	52	0,011	0,939
miR-145-5p	52	0,203	0,148
miR-146a-5p	52	0,107	0,450
miR-155-5p	52	-0,072	0,610
miR-181a-5p	52	0,272	0,051
miR-195-5p	52	-0,047	0,740
miR-199a-5p	49	0,161	0,269
miR-210-3p	52	0,171	0,225
miR-221-3p	52	0,208	0,140
miR-342-3p	52	0,173	0,220
miR-499a-5p	43	-0,148	0,344
miR-574-3p	52	0,145	0,306

Genová exprese v plazmě korelovala slabě s genovou expresí v plazmatických exozómech u miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20b-5p, miR-92-3p viz grafy č. 19-22.

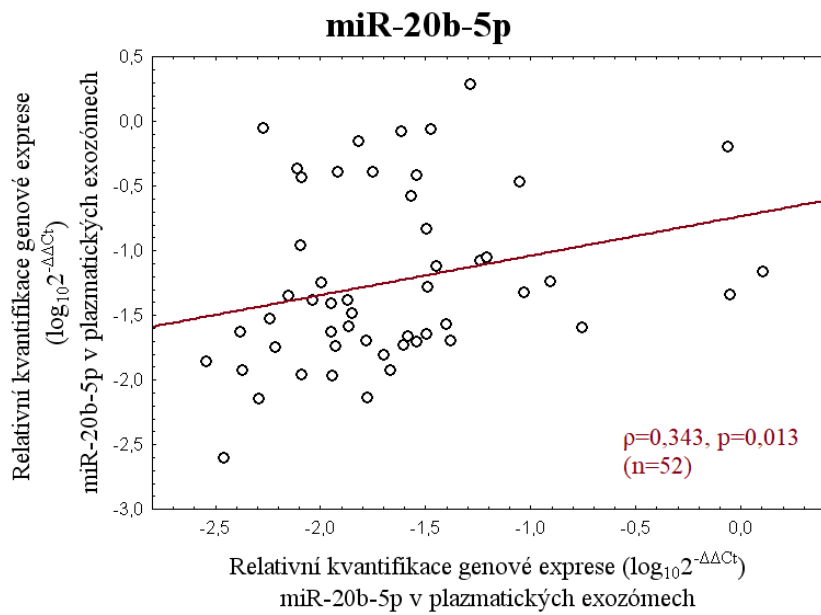
Graf č. 19: Korelace genové exprese mezi plazmou a plazmatickými exozómy u miR-16-5p u žen s anamnézou FG a GDM



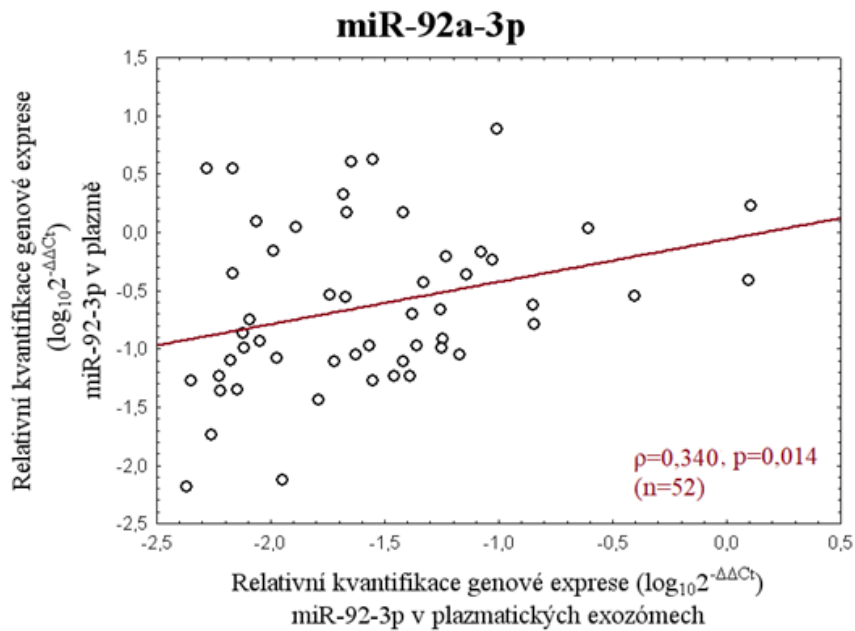
Graf č. 20: Korelace genové exprese mezi plazmou a plazmatickými exozómy u miR-17-5p u žen s anamnézou FG a GDM



Graf č. 21: Korelace genové exprese mezi plazmou a plazmatickými exozómy u miR-20b-5p u žen s anamnézou FG a GDM



Graf č. 22: Korelace genové exprese mezi plazmou a plazmatickými exozómy u miR-92a-3p u žen s anamnézou FG a GDM



9.7 Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA mezi skupinami FG a GDM ve třech biologických zdrojích

Následující tabulka č. 12 zaznamenává srovnání expresních hladin 29 kardiovaskulárních miRNA u dvou skupin žen (FG a GDM), a to ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi (plná PK), plazmě a plazmatických exozómech. Zvýšená exprese miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-130b-3p, miR-181a-5p, miR-221-3p a miR-499a-5p byla pozorována v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM ve srovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství. Zvýšená exprese miR-499a-5p byla pozorována v plazmě u žen s anamnézou GDM ve srovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství. Zvýšená exprese miR-181a-5p byla pozorována v plazmatických exozómech u žen s anamnézou GDM ve srovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Tabulka č. 12: Srovnání expresních hladin kardiovaskulárních miRNA mezi skupinami FG a GDM ve třech zdrojích

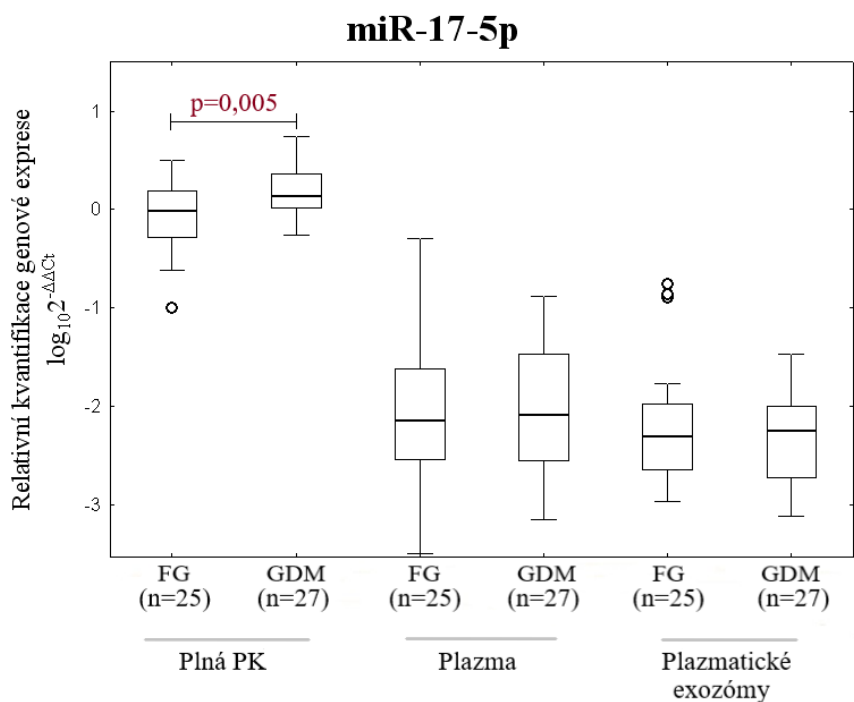
miRNA	biologický zdroj	počet (n) FG	počet (n) GDM	p-hodnota
miR-1-3p	plná PK	25	27	0,054
	plazma	23	23	0,147
	plazmatické exozómy	24	27	0,685
miR-16-5p	plná PK	25	27	0,070
	plazma	25	27	0,288
	plazmatické exozómy	25	27	0,360
miR-17-5p	plná PK	25	27	0,005
	plazma	25	27	0,798
	plazmatické exozómy	25	27	0,812
miR-20a-5p	plná PK	25	27	0,022
	plazma	25	27	0,898
	plazmatické exozómy	25	27	0,714
miR-20b-5p	plná PK	25	27	0,009
	plazma	25	27	0,559
	plazmatické exozómy	25	27	0,256
miR-21-5p	plná PK	25	27	0,009
	plazma	25	27	0,079
	plazmatické exozómy	25	27	0,133

miR-23a-3p	plná PK	25	27	0,280
	plazma	25	27	0,052
	plazmatické exozómy	25	27	0,971
miR-24-3p	plná PK	25	27	0,128
	plazma	25	27	0,621
	plazmatické exozómy	25	27	0,927
miR-26a-5p	plná PK	25	27	0,010
	plazma	25	27	0,971
	plazmatické exozómy	25	27	0,062
miR-29a-3p	plná PK	25	27	0,032
	plazma	25	27	0,985
	plazmatické exozómy	25	27	0,798
miR-92a-3p	plná PK	25	27	0,400
	plazma	25	27	0,410
	plazmatické exozómy	25	27	0,111
miR-100-5p	plná PK	25	27	0,070
	plazma	25	27	0,227
	plazmatické exozómy	25	27	0,884
miR-103a-3p	plná PK	25	27	0,009
	plazma	25	27	0,370
	plazmatické exozómy	25	27	0,442
miR-125b-5p	plná PK	25	27	0,044
	plazma	25	27	0,533
	plazmatické exozómy	25	27	0,985
miR-126-3p	plná PK	25	27	0,193
	plazma	25	27	1,000
	plazmatické exozómy	25	27	0,714
miR-130b-3p	plná PK	25	27	0,022
	plazma	25	27	0,621
	plazmatické exozómy	25	27	0,884
miR-133a-3p	plná PK	25	27	0,784
	plazma	25	27	0,350
	plazmatické exozómy	25	27	0,840
miR-143-3p	plná PK	25	27	0,546
	plazma	25	27	0,784
	plazmatické exozómy	25	27	0,687
miR-145-5p	plná PK	25	27	0,583
	plazma	25	27	0,942
	plazmatické exozómy	25	27	0,971

miR-146a-5p	plná PK	25	27	0,082
	plazma	25	27	0,898
	plazmatické exozómy	25	27	0,498
miR-155-5p	plná PK	25	27	0,187
	plazma	25	27	0,769
	plazmatické exozómy	25	27	0,798
miR-181a-5p	plná PK	25	27	0,042
	plazma	25	27	0,927
	plazmatické exozómy	25	27	0,040
miR-195-5p	plná PK	25	27	0,111
	plazma	25	27	0,660
	plazmatické exozómy	25	27	0,985
miR-199a-5p	plná PK	25	27	0,170
	plazma	22	27	0,062
	plazmatické exozómy	25	27	0,264
miR-210-3p	plná PK	25	27	0,769
	plazma	25	27	1,000
	plazmatické exozómy	25	27	0,869
miR-221-3p	plná PK	25	27	0,027
	plazma	25	27	0,742
	plazmatické exozómy	25	27	0,608
miR-342-3p	plná PK	25	27	0,234
	plazma	25	27	0,963
	plazmatické exozómy	25	27	0,826
miR-499a-5p	plná PK	23	27	0,031
	plazma	20	25	0,010
	plazmatické exozómy	23	27	0,640
miR-574-3p	plná PK	25	27	0,621
	plazma	25	27	1,000
	plazmatické exozómy	25	27	0,360

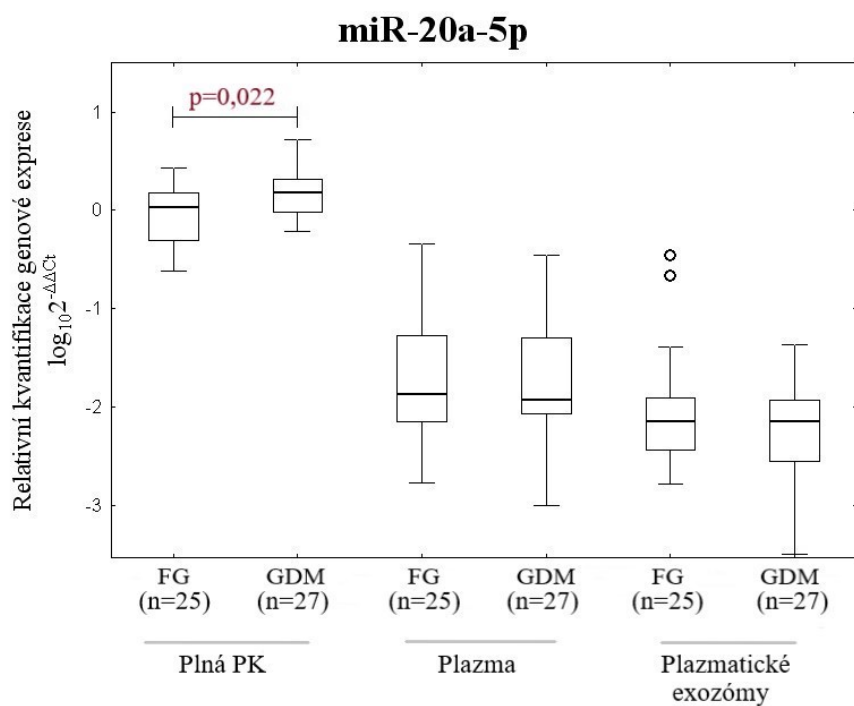
Grafy č. 23-34 zaznamenávají zvýšenou expresi kardiovaskulárních miRNA v plné periferní krvi u žen, které prodělaly GDM, v porovnání s ženami s fyziologickým průběhem těhotenství. Na grafu č. 32 je zaznamenána rovněž zvýšená exprese kardiovaskulárních miRNA v plazmatických exozómech a na grafu č. 34 zvýšená exprese kardiovaskulárních miRNA v plazmě.

Graf č. 23: Genová exprese miR-17-5p u žen s anamnézou FG a GDM



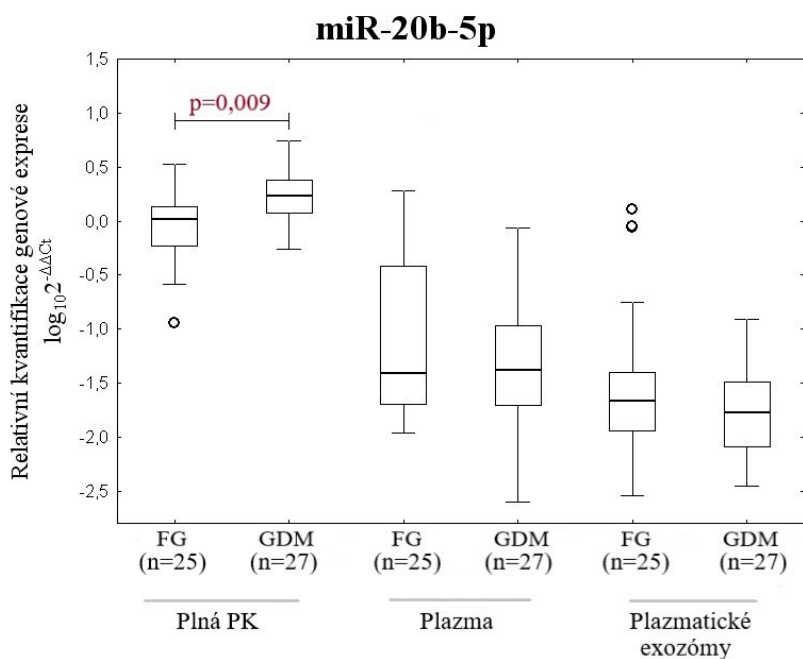
Up-regulace miR-17-5p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 24: Genová exprese miR-20a-5p u žen s anamnézou FG a GDM



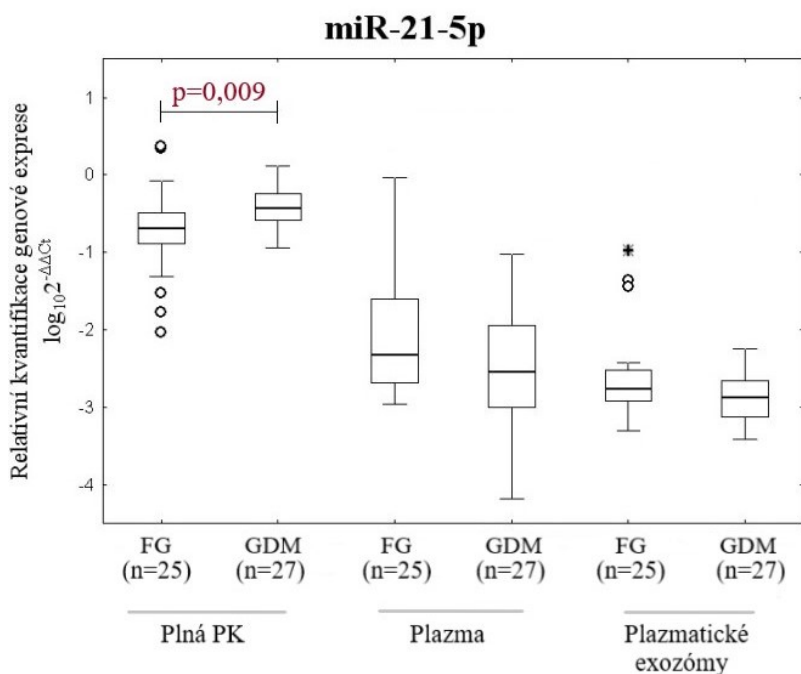
Up-regulace miR-20a-5p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 25: Genová exprese miR-20b-5p u žen s anamnézou FG a GDM



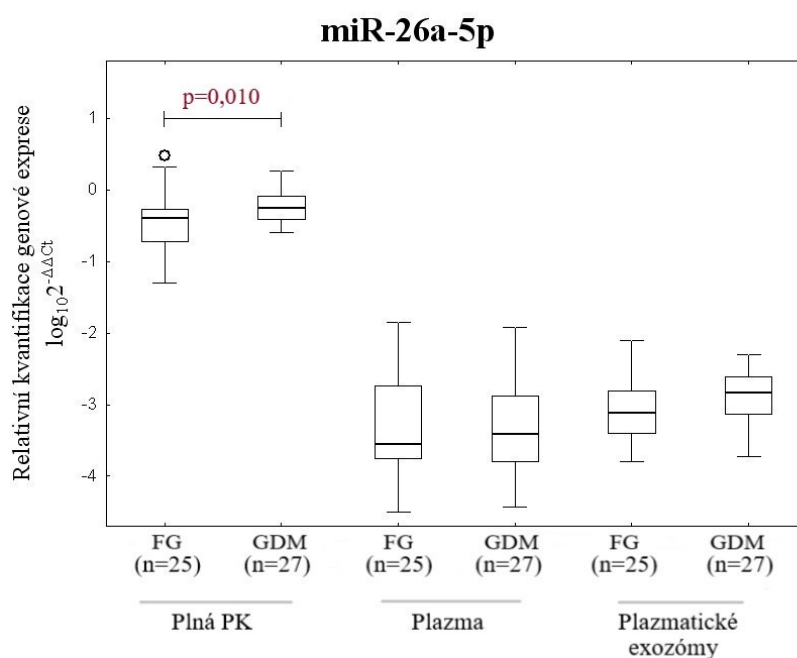
Up-regulace miR-20b-5p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 26: Genová exprese miR-21-5p u žen s anamnézou FG a GDM



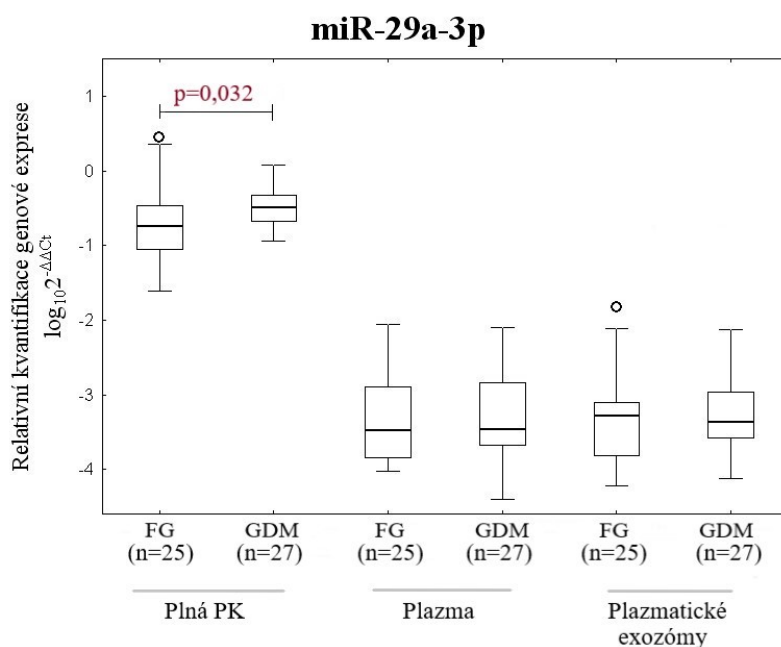
Up-regulace miR-21-5p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 27: Genová exprese miR-26a-5p u žen s anamnézou FG a GDM



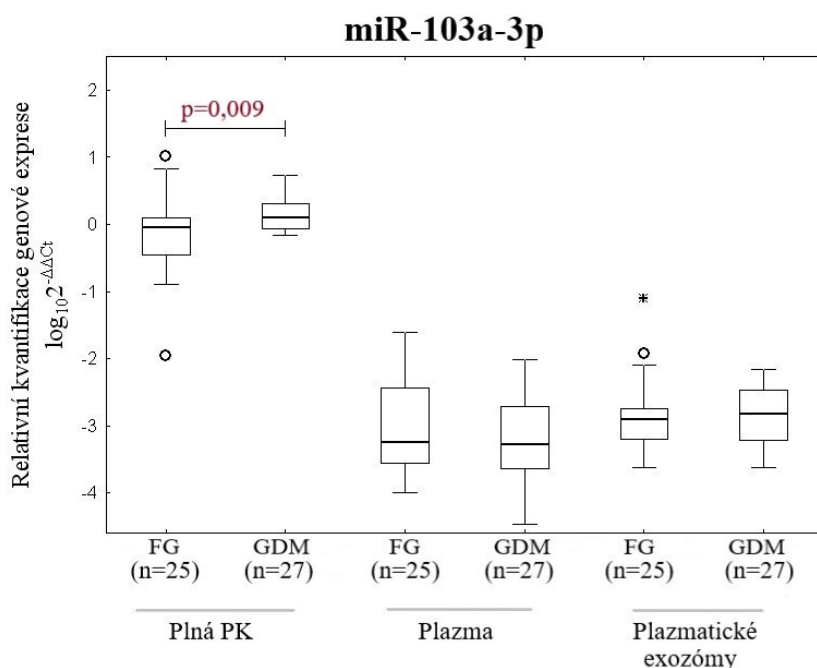
Up-regulace miR-26a-5p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 28: Genová exprese miR-29a-3p u žen s anamnézou FG a GDM



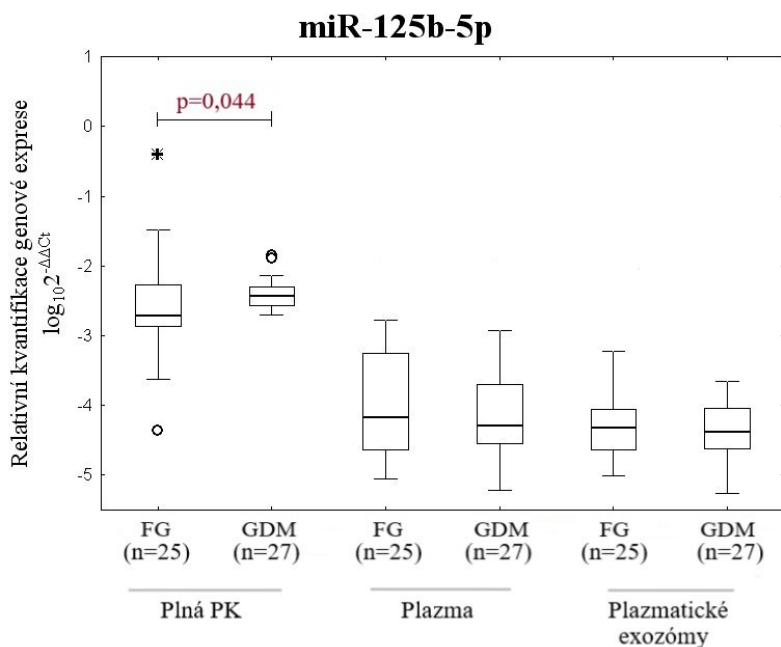
Up-regulace miR-29a-3p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 29: Genová exprese miR-103a-3p u žen s anamnézou FG a GDM



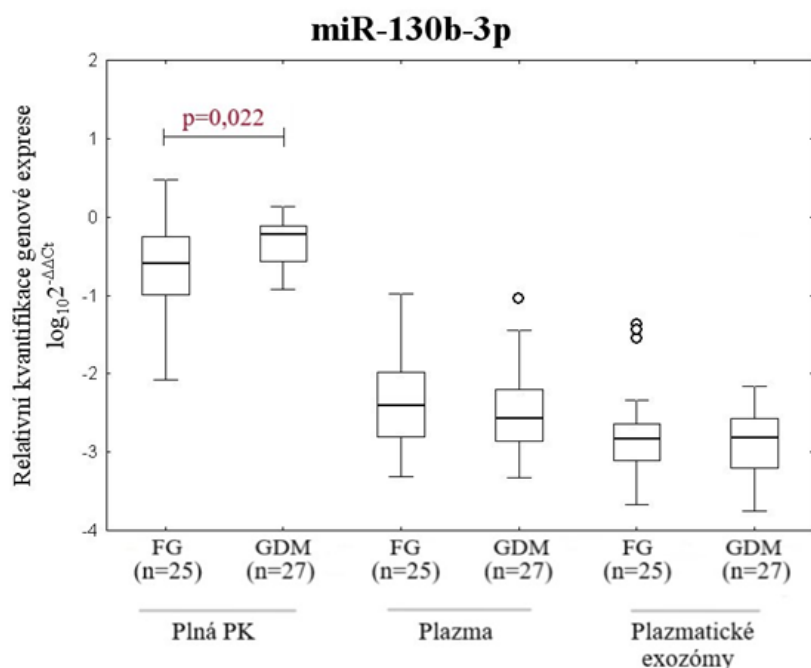
Up-regulace miR-103a-3p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 30: Genová exprese miR-125b-5p u žen s anamnézou FG a GDM



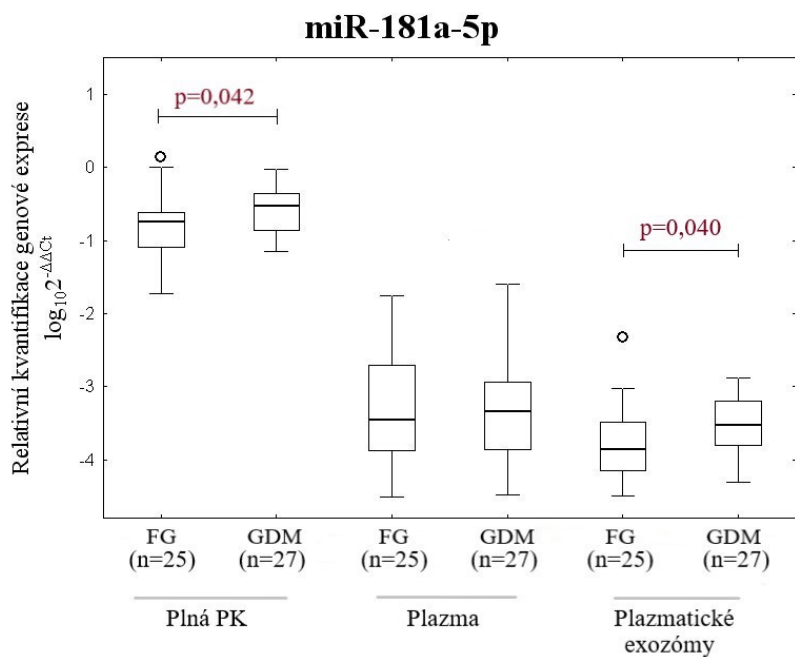
Up-regulace miR-125b-5p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 31: Genová exprese miR-130b-3p u žen s anamnézou FG a GDM



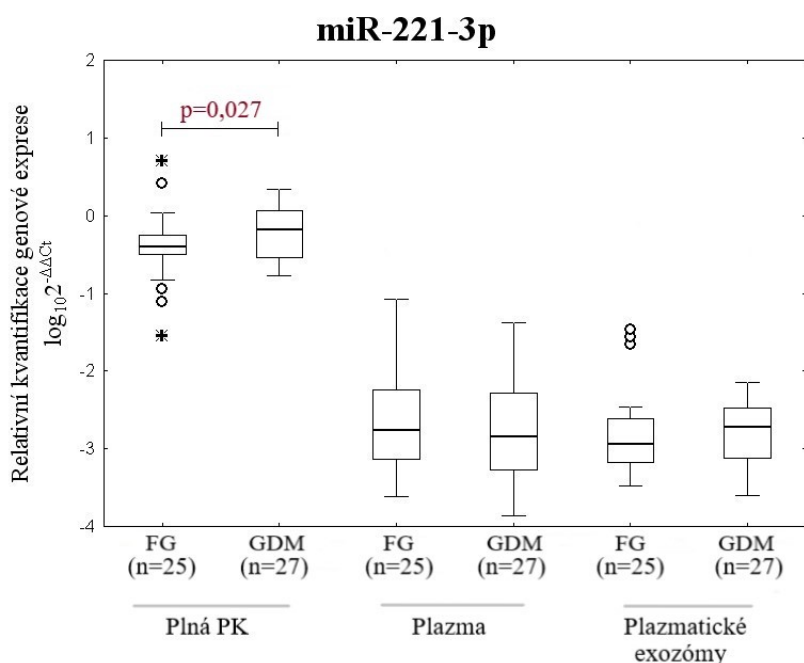
Up-regulace miR-130b-3p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 32: Genová exprese miR-181a-5p u žen s anamnézou FG a GDM



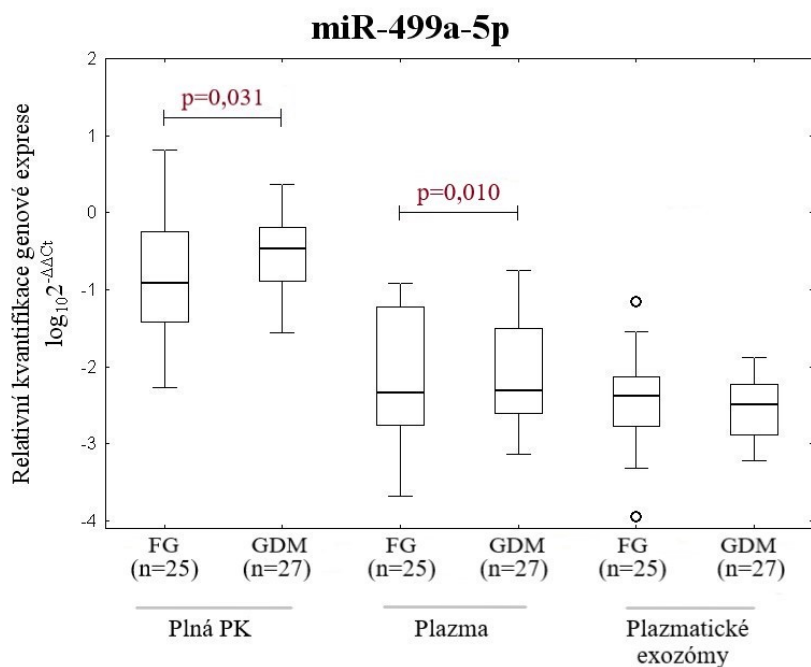
Up-regulace miR-181a-5p v plné periferní žilní krvi a v plazmatických exozómech u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 33: Genová exprese miR-221-3p u žen s anamnézou FG a GDM



Up-regulace miR-221-3p v plné periferní žilní krvi u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

Graf č. 34: Genová exprese miR-499a-5p u žen s anamnézou FG a GDM



Up-regulace miR-499a-5p v plné periferní žilní krvi a v plazmě u žen s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou fyziologického průběhu těhotenství.

10 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem analyzovala a porovnávala expresní profil 29 kardiovaskulárních miRNA (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-92a-3p, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-181a-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-342-3p, miR-499a-5p, miR-574-3p) ve 3 vybraných biologických zdrojích – plné periferní žilní krvi, plazmě a plazmatických exozómech. Poté jsem zjišťovala, zda existuje korelace mezi expresními hladinami kardiovaskulárních miRNA mezi plnou periferní žilní krví, plazmou a plazmatickými exozómy. Následně jsem v rámci těchto biologických zdrojů srovnávala expresní profil kardiovaskulárních miRNA u žen s anamnézou GDM a FG.

Ve skupině žen s anamnézou FG jsem porovnávala expresní hladiny 29 kardiovaskulárních miRNA ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi, plazmě a plazmatických exozómech. Všechny 29 testovaných miRNA mělo signifikantně vyšší hladiny v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmatickými exozómy. Kromě miR-23a-3p byla zjištěna signifikantně vyšší hladina všech testovaných miRNA v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmou. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmě v porovnání s plazmatickými exozómy u miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p a miR-181a-5p.

Ve skupině žen s anamnézou GDM jsem porovnávala expresní hladiny 29 kardiovaskulárních miRNA ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi, plazmě a plazmatických exozómech. Kromě miR-199a-5p a miR-499a-5p byla zjištěna signifikantně vyšší hladina všech testovaných miRNA v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmou. S výjimkou miR-499a-5p byla zjištěna signifikantně vyšší hladina všech testovaných miRNA v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmatickými exozómy. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmatických exozómech ve srovnání s plazmou u miR-199a-5p. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmě v porovnání s plazmatickými exozómy u miR-16-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-210-3p, miR-342-3p, a miR-574-3p.

Dále jsem srovnávala expresní hladiny 29 kardiovaskulárních miRNA ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi, plazmě a plazmatických exozómech v celkové skupině žen s fyziologickým a patologickým průběhem těhotenství (FG a GDM). Všech 29 testovaných miRNA mělo signifikantně vyšší hladiny v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmou či plazmatickými exozómy. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmatických exozómech ve srovnání s plazmou u miR-126-3p. Signifikantně vyšší hladina byla detekována v plazmě ve srovnání s plazmatickými exozómy u miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-181a-5p, miR-195-5p, miR-210-3p, miR-342-3p, a miR-574-3p.

Rozdíl v expresi mezi jednotlivými zkoumanými biologickými zdroji je zřejmě způsoben tím, že se jedná o intracelulární a extracelulární miRNA. V případě plné periferní žilní krve (intracelulární miRNA) vycházely obecně vyšší hladiny exprese miRNA oproti plazmě a plazmatickým exozómům (extracelulární miRNA). Jednak se mírně lišil způsob izolace miRNA u plné periferní žilní krve (izolace miRNA obohacených o krátké miRNA), jednak se v obou případech jednalo o extracelulární miRNA, které jsou nejspíše speciálním způsobem vybírány do extracelulárního prostoru. Kromě miR-199a-5p u žen s anamnézou GDM a miR-126-3p u celého souboru žen byly v plazmě detekovány vyšší hladiny exprese miRNA v porovnání s plazmatickými exozómy. Příčinou tohoto rozdílu je pravděpodobně skutečnost, že z plazmy byly izolovány miRNA z extracelulárních vezikulů (EV) včetně plazmatických exozómů (subtyp EV), zatímco z plazmatických exozómů byly izolovány pouze miRNA z tohoto subtypu EV.

Následně jsem zkoumala korelace expresních profilů mezi plnou periferní žilní krví, plazmou a plazmatickými exozómy v celkové skupině žen s fyziologickým a patologickým průběhem těhotenství (FG a GDM). U miR-23a-3p a miR-29a-3p byla zaznamenána slabá negativní korelace mezi plnou periferní žilní krví a plazmou. U miR-100-5p a miR-195-5p byla zaznamenána rovněž slabá negativní korelace, ale mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy. U miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20b-5p a miR-92a-3p byla naopak zaznamenána slabá pozitivní korelace mezi plazmatickými exozómy a plazmou.

Tyto výsledky naznačují, že čím vyšší je hladina intracelulárních miRNA, tím nižší je hladina extracelulárních miRNA v plazmě či plazmatických exozómech. A čím vyšší je expresní hladina extracelulárních miRNA v plazmě, tím vyšší je expresní hladina

extracelulárních miRNA v plazmatických exozómech. V buňkách jsou pravděpodobně intracelulární miRNA, alespoň částečným způsobem, specificky vybírány do extracelulárních vezikulů. U karcinomu prsu byla naopak popsána silná pozitivní korelace expresních profilů miR-21, miR-126 a miR-199a mezi krevním sérem a maligním nádorem (Wang a kol. 2010). Mikrovezikuly a plazmatické exozómy obsahují extracelulární miRNA, které mohou být uvolňovány z buněk periferní žilní krve. Směs extracelulárních vezikulů cirkulujících v krvi může však pocházet z různých typů buněk, nelze tedy jednoznačně konstatovat, zda profil miRNA v extracelulárních vezikulech opravdu odráží profil pozorovaný v plné periferní žilní krvi.

V této práci byly porovnány expresní hladiny 29 kardiovaskulárních miRNA u dvou skupin žen s anamnézou FG a GDM, a to ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi, plazmě a plazmatických exozómech. Nejvíce signifikantních rozdílů v genové expresi miRNA mezi pacientkami s anamnézou GDM a FG bylo zaznamenáno v plné periferní žilní krvi. V plné periferní žilní krvi bylo up-regulováno 12 miRNA (miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-130b-3p, miR-181a-5p, miR-221-3p a miR-499a-5p) z 29 testovaných u žen s anamnézou GDM. MiR-181a-5p byla up-regulována v plazmatických exozómech a miR-499a-5p v plazmě u žen s anamnézou GDM. Všech 12 kardiovaskulárních miRNA je signifikantně up-regulováno u žen s anamnézou GDM a jejich expresní profil je zvýšen v plné periferní žilní krvi několik let po patologickém průběhu těhotenství (Hromadníková a kol. 2020).

Několik studií potvrdilo, že miR-17-5p má spojitost s ischemickou chorobou srdeční. Během tohoto kardiovaskulárního onemocnění jsou aktivované různé signalizační dráhy (např. v důsledku oxidativního stresu). MiR-17-5p byla up-regulována v kardiomyocytech u myši s ischemickou chorobou srdeční po oxidativním stresu. Nadměrná exprese miR-17-5p snižovala životaschopnost kardiomyocytů, zvyšovala míru jejich poškození a výskyt programované buněčné smrti, což výrazně přispívá k rozvoji tohoto onemocnění (Du a kol. 2014). Bylo zjištěno, že miR-17-5p je up-regulována v plazmě u pacientů s difúzní fibrózou myokardu (Fang a kol. 2015). U pacientek s diagnostikovaným GDM je miR-17-5p signifikantně up-regulována v plné periferní žilní krvi v průběhu těhotenství, ale i postpartum 3-11 let po porodu (Cao a kol. 2017, Hromadníková a kol. 2020)

U pacientů s plicní arteriální hypertenzí je popsána mutace v BMPR2 (receptor typu II pro kostní morfogenetický protein). BMPR2 je členem rodiny TGF- β (transformující růstový faktor) exprimované na povrchu endoteliálních buněk a buněk cévní hladké svaloviny v plicích.

Léčba pomocí antagomiR-20a, které specificky vyvazují miR-20a, měla za následek obnovení hladin BMPR2 v plicních cévách a zabránění vaskulární remodelace (Brock a kol. 2012).

Diabetická retinopatie je onemocnění oční sítnice, které je důsledkem celkového postižení cév vyživujících sítnici a je zároveň jednou z nejčastějších příčin slepoty. Při diabetu dochází k up-regulaci miR-20b-5p, což má za následek proliferaci, migraci a formaci lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk retiny. Některé molekuly se mohou chovat jako „houby“ a vychytávat specifické miRNA. Při diabetu je v mikrovaskulárních endoteliálních buňkách retiny down-regulován circDNMT3B, který vychytává právě miR-20b-5p. Pokud ale dochází k jeho nadměrné expresi, jsou škody na zraku zmírněny (Zhu a kol. 2019).

Vedle žen s anamnézou GDM (Hromadníková a kol. 2020), je miR-21-5p up-regulována i u pacientů se srdečním selháním a hraje roli v dalších kardiovaskulárních onemocněních jako je srdeční fibróza, hypertrofie a ischemická choroba srdeční (Zhang a kol. 2017, Kura a kol. 2020). U miR-21 korelují hladiny v plně periferní žilní krvi a koronárních žilách s mírou závažnosti prognózy u pacientů se srdečním selháním. Dařilo se rovněž předpovídat, zda bude pacient znovu hospitalizován s identickou diagnózou (Zhang a kol. 2017).

MiR-21-5p a miR-26a-5p jsou up-regulovány v krevním séru u infarktu myokardu (Velle-Forbord a kol. 2019). Bylo zjištěno, že miR-26a-5p také reguluje expresi genu ULK1 (kináza aktivující autofagii jako unc-51), který je klíčovým komponentem signální dráhy autofagie. Pokud dochází k nadměrné expresi miR-26a-5p v srdečních fibroblastech, je snížena exprese ULK1 a naopak. MiR-26a-5p se taktéž váže přímo na 3'UTR mRNA ULK1, čímž může daná miRNA regulovat autofagii u srdečních fibroblastů, což může hrát roli v srdeční fibróze (Zheng a kol. 2018).

Nadměrná exprese miR-29a-3p v atriálních myocytech způsobuje sníženou expresi genu CACNA1C (podjednotka alfa1 C pro vápníkový napěťově řízený kanál) tím, že se váže na jeho 3'UTR mRNA. Protein CaV1.2 kódovaný CACNA1C je α 1-podjednotka vápníkového kanálu L-typu, který se nachází primárně na T-tubulech ve svalech. Dysregulace CACNA1C je zodpovědná za vznik fibrilace síní, jelikož snížená denzita těchto vápníkových kanálů je pozorována u pacientů s touto diagnózou (Zhao a kol. 2016).

MiR-103a je up-regulována v plazmě a hraje důležitou roli v regulaci homeostázy glukózy u pacientů s DM 2. typu. MiR-103a se váže na 3'UTR mRNA kaveolinu-1, tím pádem hladiny miR-103a negativně korelují s hladinami plazmatického membránového proteinu

kaveolinu-1. Kaveolin je jeden ze strukturních a regulačních proteinů kaveol. Kaveoly jsou známé tím, že se účastní signální transdukce mnoha molekul, metabolismu lipidů a endocytózy. Některé studie popsaly, že Cav-1 participuje na vývoji DM 2. typu u obézních jedinců (Cohen a kol. 2003, Briand a kol. 2011, Luo a kol. 2019).

U pacientů s akutní ischemickou cévní mozkovou příhodou je signifikantně up-regulována miR-125a-5p, miR-125b-5p a miR-143-3p v plazmě. Hladina miR-125b-5p a miR-143-3p se navrácí do normálních hodnot již během dvou dnů po akutní ischemické cévní mozkové příhodě, avšak hladina miR-125a-5p zůstává zvýšená po delší dobu. Expresní profil kombinace těchto 3 miRNA je specifický pro toto onemocnění a epigenetické profily těchto 3 kardiovaskulárních miRNA se liší od epigenetických profilů pacientů s cévní mozkovou příhodou a infarktem myokardu, čímž mají vysoký potenciál jako kardiovaskulární biomarkery (Tiedt a kol. 2017).

Mezi 8 miRNA (miR-30c-5p, miR-452-5p, miR-452-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-148a-3p, miR-let-7a-5p, miR-let-7g-5p), které byly up-regulovány u pacientek s GDM v endoteliálních buňkách v pupečníku, najdeme i miR-130b-3p. U buněk transfekovaných miR-130b byl deficit katalytických podjednotek AMP-aktivované proteinkinázy $\alpha 1$ (AMPK $\alpha 1$). AMPK $\alpha 1$ je také snížena v placentě a v buněčné linii trofoblastu u pacientek s GDM. Zajímavé je, že i u dětí žen s GDM byla pozměněna exprese těchto miRNA *in utero*, a tyto děti mají sníženou β -oxidaci mastných kyselin. Pokles AMPK $\alpha 1$, zprostředkovaný miR-130b, je tedy potenciálním mechanismem, jakým může být ovlivněna metabolická aktivita u dětí z těhotenství, ve kterých matka byla diagnostikována s GDM (Tryggestad a kol. 2016).

Hladiny miR-181a-5p, detekované v plazmě ihned po příjmu do nemocnice, byly zvýšené u pacientů, diagnostikovaných s akutním infarktem myokardu, oproti skupině s nestabilní anginou pectoris (NAP). NAP považujeme za nově vzniklou bolest na hrudi nebo zhoršení stávajících bolestí. MiR-181a-5p se zapojuje do regulace oxidativního stresu (nadbytek kyslíkových radikálů), který hraje důležitou roli v remodelaci buněk myokardu (včetně buněčné smrti), což vyústí v neschopnost kontrakce během infarktu myokardu (Zhu a kol. 2015, Magenta a kol. 2016).

V několika studiích již byla miR-221-3p dána do souvislosti s aterosklerózou, ale přesný mechanismus zůstával neobjasněn. Zhuang a kol. (2019) zjistili, že cílem této miRNA je disintegrin a metaloproteáza-22 (ADAM22). Umlčení ADAM22 u makrofágů vedlo ke snížené tvorbě pěnových buněk a apoptóze a při transfekci miR-221-3p byla výrazně snížena tvorba

pěnových buněk a exprese lipidových biomarkerů; po přidání inhibitoru nastal opačný efekt. Na patogenezi aterosklerózy se podílí více po sobě jdoucích událostí, vedoucích k rozvoji chronického zánětlivého procesu stěny arterií, což je odpověď na hemodynamické poškození cévní stěny v nejvíce namáhaných místech. Aktivované endotelové buňky přitahují do místa léze monocyty/makrofágy a T-lymfocyty z krevní cirkulace apod. Subendotelový prostor se postupně zvětšuje a současně dochází ke zvýšení permeability endotelové výstelky, což umožňuje pronikání lipoproteinových částic do tohoto prostoru. Uvolněný cholesterol je pohlcován makrofágy za vzniku pěnových buněk. Stěna cév se v místě poškození ztlušťuje a dostává prokoagulační vlastnosti. Celý proces končí tvorbou aterómového plátu. U miR-221-3p bylo navíc zjištěno, že inhibuje i apoptózu u makrofágů (Zhuang a kol. 2019).

Je možné, že miR-499a-5p má protektivní účinky při ischemicko-reperfúzním poškození myokardu. MiR-499a-5p má nízké hladiny u kardiomyocytů za stavu hypoxie i u těch reoxygenovaných. Její nadměrná exprese vede k poklesu aktivity laktátové dehydrogenázy (LDH) a apoptózy tím, že dochází k inhibici CD38 (klastr diferenciace 38) a potažmo k redukcii rozsahu poškození buněk myokardu způsobeného anoxií nebo reoxygenací (Zhao a kol. 2020).

Pozměněný expresní profil kardiovaskulárních miRNA, které byly up-regulovány u žen s anamnézou GDM, je spojován i s dalšími kardiovaskulárními patologiemi. Je tedy zřejmé, že ženy, které v minulosti prodělaly GDM, mají pozměněný epigenetický profil kardiovaskulárních miRNA, a tím pádem mohou mít zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění.

Navíc byla již zjištěna up-regulace kardiovaskulárních miRNA v plné periferní žilní krvi u 26 z 29 v této práci zkoumaných miRNA (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-181a-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-221-3p, miR-342-3p, miR-499a-5p, miR-574-3p) u pacientek s anamnézou GDM na větším souboru žen (Hromadníková a kol. 2020). Je zřejmé, že kdyby byla moje diplomová práce provedena na větším souboru žen, projevil by se rozdíl mezi pacientkami s anamnézou GDM a fyziologickým průběhem těhotenství u více miRNA, a to nejen v plné periferní žilní krvi, ale zřejmě i v plazmatických exozómech a plazmě.

Je možné, že změna expresních profilů v plné periferní žilní krvi odráží systémovou komplexní reakci jedince na změny, odehrávající se v organismu, a ty jsou pak přítomny i u žen s anamnézou těhotenských komplikací postpartum. Plná periferní žilní krev proto představuje výborný biologický materiál pro monitoring změn genové exprese intracelulárních miRNA, zatímco v plazmě a plazmatických exozómech se mohou lépe projevit změny genové exprese extracelulárních miRNA z dalších orgánů, které je secernují do krevního oběhu (plíce, srdce atd.).

Identifikace rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění výrazně napomáhá predikci kardiovaskulárních onemocnění. I když v poslední dekádě, především díky GWAS (celogenomové asociační studie), došlo k identifikování nových genů a jejich variant asociovaných s těmito kardiovaskulárními onemocněními, stále existují rizikové jedinci, které tento systém nezachytí (Vrablik a kol. 2021). Většinou také není dysregulována pouze jediná miRNA, což souvisí s tím, že je většina onemocnění multifaktoriálně podmíněná. Často je proto lepší použít jako biomarker sérii miRNA dysregulovaných při dané diagnóze např. ještě v kombinaci s dalšími markery (Fang a kol. 2015, Velle-Forbord a kol. 2019).

11 Souhrn

Ve své diplomové práci jsem analyzovala expresní profil 29 kardiovaskulárních miRNA ve 3 biologických zdrojích – v plné periferní žilní krvi, plazmě a plazmatických exozómech. Následně jsem zkoumala korelace mezi hladinami vybraných miRNA v plné periferní žilní krvi, plazmě a plazmatických exozómech. V rámci těchto zdrojů jsem porovnávala 2 skupiny žen. Obě skupiny tvořily mladé ženy a ženy středního věku, které byly 3-11 let po porodu. První a kontrolní skupinou byly ženy, u nichž těhotenství probíhalo fyziologicky. Druhou skupinou byly ženy, které prodělaly GDM.

Na celém souboru žen s anamnézou FG a GDM byla zaznamenána zvýšená genová exprese většiny testovaných kardiovaskulárních miRNA v plné periferní žilní krvi v porovnání s plazmou či plazmatickými exozómy, kromě miR-23a-3p v plazmě ve skupině s anamnézou FG, miR-199a-5p a miR-499a-5p v plazmě a miR-499a-5p v plazmatických exozómech ve skupině s anamnézou GDM. Na celém souboru žen s anamnézou FG a GDM byly zaznamenány vyšší expresní hladiny většiny miRNA v plazmě v porovnání s plazmatickými exozómy, s výjimkou miR-126-3p (celý soubor FG a GDM dohromady) a miR-199a-5p (skupina s anamnézou GDM), kde byla detekována vyšší hladina v plazmatických exozómech ve srovnání s plazmou. Je tedy patrné, že se hladiny miRNA mezi zkoumanými biologickými zdroji liší. Tento rozdíl je nejspíše založen na skutečnosti, že se jedná o intracelulární miRNA v případě plné periferní žilní krve a v případě plazmy a plazmatických exozómů o miRNA extracelulární.

Na celém souboru žen s anamnézou FG a GDM byla zaznamenána slabá negativní korelace mezi plnou periferní žilní krví a plazmou pouze u miR-23a-3p a miR-29a-3p. U miR-100-5p a miR-195-5p byla zaznamenána rovněž slabá negativní korelace, avšak mezi plnou periferní žilní krví a plazmatickými exozómy. U miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20b-5p a miR-92a-3p byla naopak zaznamenána slabá pozitivní korelace mezi plazmatickými exozómy a plazmou. MiRNA jsou pravděpodobně specificky vybírány do extracelulárních vezikulů. Expresní hladiny extracelulárních miRNA v plazmě však nemusí nutně odrážet expresní profil intracelulárních miRNA v plné periferní žilní krvi, neboť extracelulární vezikuly v plazmě mohou být secernovány různými orgány.

Ze všech 3 zdrojů miRNA bylo zachyceno nejvíce změn expresních profilů v plné periferní žilní krvi u pacientek s anamnézou GDM v porovnání s ženami s anamnézou FG, což

zřejmě odráží komplexní systémovou reakci organismu na změny, které nastaly v důsledku klinické manifestace GDM. U 12 miRNA (miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-130b-3p, miR-181a-5p, miR-221-3p, miR-499a-5p) z 29 testovaných byla zjištěna up-regulace u žen s anamnézou GDM. U plazmatických exozómů byla up-regulována pouze miR-181a-5p a v případě plazmy pouze miR-499a-5p u pacientek s anamnézou GDM.

Zvýšené hladiny miRNA jsou asociovány s celou řadou kardiovaskulárních onemocnění, a proto je zřejmé, že existuje u žen s anamnézou GDM zvýšené kardiovaskulární riziko a bylo by vhodné tyto ženy zařadit do programu primární preventivní péče. Epigenetické změny, navozené klinickou manifestací GDM, zřejmě přetrvávají i několik let po porodu a je otázkou, zda jsou přenášeny napříč generacemi.

12 Přehled použité literatury

- Ambros, V., 1989. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*, 57(1), pp.49-57.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S.A.M., Marshall, M. and Matzke, M., 2003. A uniform system for microRNA annotation. *Rna*, 9(3), pp.277-279.
- Ameres, S.L., Martinez, J. and Schroeder, R., 2007. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 130(1), pp.101-112.
- Amin, N., McGrath, A. and Chen, Y.P.P., 2019. Evaluation of deep learning in non-coding RNA classification. *Nature Machine Intelligence*, 1(5), pp.246-256.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L. and Tait, J.F., 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), pp.5003-5008.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S. and Michels, A.W., 2014. Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), pp.69-82.
- Azuma-Mukai, A., Oguri, H., Mituyama, T., Qian, Z.R., Asai, K., Siomi, H. and Siomi, M.C., 2008. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(23), pp.7964-7969.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), pp.281-297.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*, 136(2), pp.215-233.
- Baskerville, S. and Bartel, D.P., 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna*, 11(3), pp.241-247.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and Görlich, D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, 10(2), pp.185-191.
- Boon, R.A. and Dimmeler, S., 2015. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology*, 12(3), pp.135-142.
- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M. and Nigg, E.A., 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56(3), pp.379-390.
- Borchert, G.M., Lanier, W. and Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), pp.1097-1101.
- Bortolin-Cavaille, M.L., Dance, M., Weber, M. and Cavaille, J., 2009. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic acids research*, 37(10), pp.3464-3473.
- Bras, J.P., Silva, A.M., Calin, G.A., Barbosa, M.A., Santos, S.G. and Almeida, M.I., 2017. miR-195 inhibits macrophages pro-inflammatory profile and impacts the crosstalk with smooth muscle cells. *PloS one*, 12(11), p.e0188530.
- Briand, N., Dugail, I. and Le Lay, S., 2011. Cavin proteins: New players in the caveolae field. *Biochimie*, 93(1), pp.71-77.

- Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R.E., Michel, B.A., Gay, S., Fischler, M., Ulrich, S., Speich, R. and Huber, L.C., 2009. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3–microRNA cluster 17/92 pathway. *Circulation research*, 104(10), pp.1184-1191.
- Bukauskas, T., Mickus, R., Cereskevicius, D. and Macas, A., 2019. Value of serum miR-23a, miR-30d, and miR-146a biomarkers in ST-elevation myocardial infarction. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, p.3925.
- Cao, Y.L., Jia, Y.J., Xing, B.H., Shi, D.D. and Dong, X.J., 2017. Plasma microRNA-16-5p,-17-5p and-20a-5p: Novel diagnostic biomarkers for gestational diabetes mellitus. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 43(6), pp.974-981.
- Caroli, A., Cardillo, M.T., Galea, R. and Biasucci, L.M., 2013. Potential therapeutic role of microRNAs in ischemic heart disease. *Journal of cardiology*, 61(5), pp.315-320.
- Catalano, P.M., Tyzbit, E.D., Roman, N.M., Amini, S.B. and Sims, E.A., 1991. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*, 165(6), pp.1667-1672.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D. and Wolfe, S.A., 2010. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*, 328(5986), pp.1694-1698.
- Cohen, A.W., Razani, B., Wang, X.B., Combs, T.P., Williams, T.M., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P., 2003. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285(1), pp.C222-C235.
- Comelli, L., Rocchiccioli, S., Smirni, S., Salvetti, A., Signore, G., Citti, L., Trivella, M.G. and Cecchetti, A., 2014. Characterization of secreted vesicles from vascular smooth muscle cells. *Molecular BioSystems*, 10(5), pp.1146-1152.
- DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R.R., Herman, W.H., Holst, J.J., Hu, F.B., Kahn, C.R., Raz, I., Shulman, G.I. and Simonson, D.C., 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), pp.1-22.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. and Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), pp.231-235.
- Di Cianni, G., Miccoli, R., Volpe, L., Lencioni, C. and Del Prato, S., 2003. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 19(4), pp.259-270.
- Dickinson, B.A., Semus, H.M., Montgomery, R.L., Stack, C., Latimer, P.A., Lewton, S.M., Lynch, J.M., Hullinger, T.G., Seto, A.G. and van Rooij, E., 2013. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *European journal of heart failure*, 15(6), pp.650-659.
- Du, W.W., Yang, W., Fang, L., Xuan, J., Li, H., Khorshidi, A., Gupta, S., Li, X. and Yang, B.B., 2014. miR-17 extends mouse lifespan by inhibiting senescence signaling mediated by MKP7. *Cell death & disease*, 5(7), pp.e1355-e1355.
- Edgar, J.R., Eden, E.R. and Futter, C.E., 2014. Hrs-and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic*, 15(2), pp.197-211.
- Faccini, J., Ruidavets, J.B., Cordelier, P., Martins, F., Maoret, J.J., Bongard, V., Ferrières, J., Roncalli, J., Elbaz, M. and Vindis, C., 2017. Circulating miR-155, miR-145 and let-7c as diagnostic biomarkers of the coronary artery disease. *Scientific reports*, 7(1), pp.1-10.

- Fang, L., Ellims, A.H., Moore, X.L., White, D.A., Taylor, A.J., Chin-Dusting, J. and Dart, A.M., 2015. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of translational medicine*, 13(1), pp.1-12.
- Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V. and Kirchhoff, F., 2006. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(4), pp.642-648.
- Flowers, E. and Aouizerat, B.E., 2013. MicroRNA associated with dyslipidemia and coronary disease in humans. *Physiological genomics*, 45(24), pp.1199-1205.
- Friedman, M., 1937. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *Journal of the american statistical association*, 32(200), pp.675-701.
- Gerich, J.E., 2000. Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2(6), pp.345-350.
- Ghasemi, H., Sabati, Z., Ghaedi, H., Salehi, Z. and Alipoor, B., 2019. Circular RNAs in β -cell function and type 2 diabetes-related complications: a potential diagnostic and therapeutic approach. *Molecular biology reports*, 46(5), pp.5631-5643.
- Ghorai, A. and Ghosh, U., 2014. miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. *Frontiers in genetics*, 5, p.100.
- Gibbins, D. and Voinnet, O., 2010. Control of RNA silencing and localization by endolysosomes. *Trends in cell biology*, 20(8), pp.491-501.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), pp.235-240.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Bateman, A. and Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34(suppl_1), pp.D140-D144.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G. and Mello, C.C., 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), pp.23-34.
- Guo, L., Zhao, Y., Yang, S., Cai, M., Wu, Q. and Chen, F., 2013. Genome-wide screen for aberrantly expressed miRNAs reveals miRNA profile signature in breast cancer. *Molecular biology reports*, 40(3), pp.2175-2186.
- Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.K., Yeom, K.H., Yang, W.Y., Haussler, D., Bilello, R. and Kim, V.N., 2009. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell*, 136(1), pp.75-84.
- Han, L., Witmer, P.D.W., Casey, E., Valle, D. and Sukumar, S., 2007. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer biology & therapy*, 6(8), pp.1290-1294.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M. and Sczakiel, G., 2010, November. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. In *Urologic oncology: seminars and original investigations* (Vol. 28, No. 6, pp. 655-661). Elsevier.
- Harding, C., Heuser, J. and Stahl, P., 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *Journal of cell biology*, 97(2), pp.329-339.

- Hedderson, M.M., Ferrara, A. and Sacks, D.A., 2003. Gestational diabetes mellitus and lesser degrees of pregnancy hyperglycemia: association with increased risk of spontaneous preterm birth. *Obstetrics & Gynecology*, 102(4), pp.850-856.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J. and Sixma, J.J., 1999. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and-Granules. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 94(11), pp.3791-3799.
- Hessvik, N.P. and Llorente, A., 2018. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), pp.193-208.
- Holmberg, J., Bhattachariya, A., Alajbegovic, A., Rippe, C., Ekman, M., Dahan, D., Hien, T.T., Boettger, T., Braun, T., Swärd, K. and Hellstrand, P., 2018. Loss of vascular myogenic tone in miR-143/145 knockout mice is associated with hypertension-induced vascular lesions in small mesenteric arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 38(2), pp.414-424.
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Dvorakova, L. and Krofta, L., 2020. Diabetes mellitus and cardiovascular risk assessment in mothers with a history of gestational diabetes mellitus based on postpartal expression profile of micrnas associated with diabetes mellitus and cardiovascular and cerebrovascular diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(7), p.2437.
- Hsu, A., Chen, S.J., Chang, Y.S., Chen, H.C. and Chu, P.H., 2014. Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *BioMed research international*, 2014.
- Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.L.T., Schmittgen, T.D. and Nana-Sinkam, S.P., 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS one*, 3(11), p.e3694.
- Huotari, J. and Helenius, A., 2011. Endosome maturation. *The EMBO journal*, 30(17), pp.3481-3500.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, É., Tuschl, T. and Zamore, P.D., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531), pp.834-838.
- Hwang, H.W. and Mendell, J.T., 2006. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British journal of cancer*, 94(6), pp.776-780.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), pp.740-744.
- Chim, S.S., Shing, T.K., Hung, E.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W. and Dennis Lo, Y.M., 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical chemistry*, 54(3), pp.482-490.
- Cho, H., Kim, S.J., Park, H.W., Oh, M.J., Yu, S.Y., Lee, S.Y., Park, C., Han, J., Oh, J.H., Hwang, S.Y. and Yoon, S.J., 2010. A relationship between miRNA and gene expression in the mouse Sertoli cell line after exposure to bisphenol A. *BioChip Journal*, 4(1), pp.75-81.
- Jackson, R.J. and Standart, N., 2007. How do microRNAs regulate gene expression?. *Science's STKE*, 2007(367), pp.re1-re1.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.D. and Knippers, R., 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*, 61(4), pp.1659-1665.

- Jiang, Q., Lyu, X.M., Yuan, Y. and Wang, L., 2017. Plasma miR-21 expression: an indicator for the severity of Type 2 diabetes with diabetic retinopathy. *Bioscience reports*, 37(2), p.BSR20160589.
- Johnston, F., Ponnambalam, S. and Busby, S., 1987. Binding of Escherichia coli RNA polymerase to a promoter carrying mutations that stop transcription initiation. *Journal of molecular biology*, 195(3), pp.745-748.
- Juzenas, S., Venkatesh, G., Hübenthal, M., Hoepfner, M.P., Du, Z.G., Paulsen, M., Rosenstiel, P., Senger, P., Hofmann-Apitius, M., Keller, A. and Kupcinskis, L., 2017. A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic acids research*, 45(16), pp.9290-9301.
- Kan, C., Cao, J., Hou, J., Jing, X., Zhu, Y., Zhang, J., Guo, Y. and Chen, X., 2019. Correlation of miR-21 and BNP with pregnancy-induced hypertension complicated with heart failure and the diagnostic value. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(4), pp.3129-3135.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), pp.209-216.
- Kok, K.H., Ng, M.H.J., Ching, Y.P. and Jin, D.Y., 2007. Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), pp.17649-17657.
- Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I.V., van Eijndhoven, M.A., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., de Menezes, R.X. and Würdinger, T., 2014. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell reports*, 8(6), pp.1649-1658.
- Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T., 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*, 101(10), pp.2087-2092.
- Kramer, C.K., Campbell, S. and Retnakaran, R., 2019. Gestational diabetes and the risk of cardiovascular disease in women: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, 62(6), pp.905-914.
- Kuhn, D.E., Martin, M.M., Feldman, D.S., Terry Jr, A.V., Nuovo, G.J. and Elton, T.S., 2008. Experimental validation of miRNA targets. *Methods*, 44(1), pp.47-54.
- Kumar, S., Tessarek, C., Christiansen, S. and Singh, R., 2014. A comparative study of β -Ga₂O₃ nanowires grown on different substrates using CVD technique. *Journal of alloys and compounds*, 587, pp.812-818.
- Kura, B., Kalocayova, B., Devaux, Y. and Bartekova, M., 2020. Potential clinical implications of miR-1 and miR-21 in heart disease and cardioprotection. *International journal of molecular sciences*, 21(3), p.700.
- Kurzynska-Kokorniak, A., Pokornowska, M., Koralewska, N., Hoffmann, W., Bienkowska-Szewczyk, K. and Figlerowicz, M., 2016. Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro. *Scientific reports*, 6(1), pp.1-13.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), pp.853-858.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), pp.858-862.
- Lau, P.W., Guiley, K.Z., De, N., Potter, C.S., Carragher, B. and MacRae, I.J., 2012. The molecular architecture of human Dicer. *Nature structural & molecular biology*, 19(4), pp.436-440.

- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S. and Hatton, C.S., 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 141(5), pp.672-675.
- Lee, J., Ouh, Y.T., Ahn, K.H., Hong, S.C., Oh, M.J., Kim, H.J. and Cho, G.J., 2017. Preeclampsia: A risk factor for gestational diabetes mellitus in subsequent pregnancy. *PLoS One*, 12(5), p.e0178150.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75(5), pp.843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. and Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), pp.415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. and Kim, V.N., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 21(17), pp.4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), pp.4051-4060.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W., 2004. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), pp.69-81.
- Lee, Y.S., Pressman, S., Andress, A.P., Kim, K., White, J.L., Cassidy, J.J., Li, X., Lubell, K., Lim, D.H., Cho, I.S. and Nakahara, K., 2009. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nature cell biology*, 11(9), pp.1150-1156.
- Li, Y., Li, M., Liu, Y., Song, G. and Liu, N., 2012. A microarray for microRNA profiling in spermatozoa from adult men living in an environmentally polluted site. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(6), pp.1111-1114.
- Li, Y., Yan, C., Fan, J., Hou, Z. and Han, Y., 2021. MiR-221-3p targets Hif-1 α to inhibit angiogenesis in heart failure. *Laboratory Investigation*, 101(1), pp.104-115.
- Libby, P., Ridker, P.M. and Maseri, A., 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), pp.1135-1143.
- Lou, Y.L., Guo, F., Liu, F., Gao, F.L., Zhang, P.Q., Niu, X., Guo, S.C., Yin, J.H., Wang, Y. and Deng, Z.F., 2012. miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia. *Molecular and cellular biochemistry*, 370(1), pp.45-51.
- Lu, T.Y., Lin, B., Li, Y., Arora, A., Han, L., Cui, C., Coronello, C., Sheng, Y., Benos, P.V. and Yang, L., 2013. Overexpression of microRNA-1 promotes cardiomyocyte commitment from human cardiovascular progenitors via suppressing WNT and FGF signaling pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 63, pp.146-154.
- Luo, Y., Fu, Y., Huang, R., Gao, M., Liu, F., Gui, R. and Nie, X., 2019. CircRNA_101505 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to cisplatin by sponging miR-103 and promotes oxidored-nitro domain-containing protein 1 expression. *Cell death discovery*, 5(1), pp.1-9.
- MacRae, I.J., Zhou, K. and Doudna, J.A., 2007. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature structural & molecular biology*, 14(10), pp.934-940.
- Magenta, A., Dellambra, E., Ciarapica, R. and Capogrossi, M.C., 2016. Oxidative stress, microRNAs and cytosolic calcium homeostasis. *Cell Calcium*, 60(3), pp.207-217.

- Mahdavi, R., Ghorbani, S., Alipoor, B., Panahi, G., Khodabandehloo, H., Esfahani, E.N., Razi, F. and Meshkani, R., 2018. Decreased serum level of miR-155 is associated with obesity and its related metabolic traits. *Clin. Lab*, 64, pp.77-84.
- Mann, H.B. and Whitney, D.R., 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The annals of mathematical statistics*, pp.50-60.
- Massart, J., Sjögren, R.J., Lundell, L.S., Mudry, J.M., Franck, N., O’Gorman, D.J., Egan, B., Zierath, J.R. and Krook, A., 2017. Altered miR-29 expression in type 2 diabetes influences glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Diabetes*, 66(7), pp.1807-1818.
- McMurry Jr, J.F., 1984. Wound healing with diabetes mellitus. Better glucose control for better wound healing in diabetes. *The Surgical Clinics of North America*, 64(4), pp.769-778.
- Metzger, B.E., Coustan, D.R. and Organizing Committee, 1998. Summary and recommendations of the fourth international workshop-conference on gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*, 21, p.B161.
- Miyoshi, K., Okada, T.N., Siomi, H. and Siomi, M.C., 2009. Characterization of the miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the *Drosophila* miRNA pathway. *Rna*, 15(7), pp.1282-1291.
- Morello, M., Minciocchi, V., De Candia, P., Yang, J., Posadas, E., Kim, H., Griffiths, D., Bhowmick, N., Chung, L., Gandellini, P. and Freeman, M., 2013. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell cycle*, 12(22), pp.3526-3536.
- Naruse, K., Matsuura-Suzuki, E., Watanabe, M., Iwasaki, S. and Tomari, Y., 2018. In vitro reconstitution of chaperone-mediated human RISC assembly. *RNA*, 24(1), pp.6-11.
- Nouraei, N. and Mowla, S.J., 2015. miRNA therapeutics in cardiovascular diseases: promises and problems. *Frontiers in genetics*, 6, p.232.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y. and Tsukihara, T., 2009. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*, 326(5957), pp.1275-1279.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M. and Lai, E.C., 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), pp.89-100.
- Olivieri, F., Spazzafumo, L., Bonafè, M., Recchioni, R., Prattichizzo, F., Marcheselli, F., Micolucci, L., Mensà, E., Giuliani, A., Santini, G. and Gobbi, M., 2015. MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications. *Oncotarget*, 6(34), p.35372.
- Pakravan, K., Babashah, S., Sadeghizadeh, M., Mowla, S.J., Mossahebi-Mohammadi, M., Ataei, F., Dana, N. and Javan, M., 2017. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cellular oncology*, 40(5), pp.457-470.
- Pan, B.T. and Johnstone, R.M., Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes.
- Park, N.J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B.S., Kastratovic, D.A., Abemayor, E. and Wong, D.T., 2009. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research*, 15(17), pp.5473-5477.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P. and Spring, J., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), pp.86-89.

- Pek, S.L.T., Sum, C.F., Lin, M.X., Cheng, A.K.S., Wong, M.T.K., Lim, S.C. and Tavintharan, S., 2016. Circulating and visceral adipose miR-100 is down-regulated in patients with obesity and Type 2 diabetes. *Molecular and cellular endocrinology*, 427, pp.112-123.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M. and Russo, J.J., 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature methods*, 2(4), pp.269-276.
- Phelps, R.L., Metzger, B.E. and Freinkel, N., 1981. Carbohydrate metabolism in pregnancy: XVII. Diurnal profiles of plasma glucose, insulin, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, and individual amino acids in late normal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 140(7), pp.730-736.
- Pigati, L., Yaddanapudi, S.C., Iyengar, R., Kim, D.J., Hearn, S.A., Danforth, D., Hastings, M.L. and Duelli, D.M., 2010. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PloS one*, 5(10), p.e13515.
- Pinchi, E., Frati, P., Aromatario, M., Cipolloni, L., Fabbri, M., La Russa, R., Maiese, A., Neri, M., Santurro, A., Scopetti, M. and Viola, R.V., 2019. miR-1, miR-499 and miR-208 are sensitive markers to diagnose sudden death due to early acute myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(9), pp.6005-6016.
- Plows, J.F., Stanley, J.L., Baker, P.N., Reynolds, C.M. and Vickers, M.H., 2018. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*, 19(11), p.3342.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Friendewey, D., Samuelsson, B. and Rådmark, O., 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *The EMBO journal*, 21(21), pp.5864-5874.
- Reed, J.C., 2000. Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157(5), pp.1415-1430.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 403(6772), pp.901-906.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. and Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14(10a), pp.1902-1910.
- Shapiro, S.S. and Wilk, M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), pp.591-611.
- Schwartz, R., Gruppuso, P.A., Petzold, K., Brambilla, D., Hiilesmaa, V. and Teramo, K.A., 1994. Hyperinsulinemia and macrosomia in the fetus of the diabetic mother. *Diabetes care*, 17(7), pp.640-648.
- Skog, J., Würdinger, T., Van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M. and Breakefield, X.O., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10(12), pp.1470-1476.
- Skoglund, C., Carlsen, A.L., Weiner, M., Kurz, T., Hellmark, T., Eriksson, P., Heegaard, N.H. and Segelmark, M., 2015. Circulating microRNA expression pattern separates patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis from healthy controls. *Clin Exp Rheumatol*, 33(Suppl 89), pp.64-71.
- Spearman, C., 1987. The proof and measurement of association between two things. *The American journal of psychology*, 100(3/4), pp.441-471.

- Stefan-Lifshitz, M., Karakose, E., Cui, L., Ettela, A., Yi, Z., Zhang, W. and Tomer, Y., 2019. Epigenetic modulation of β cells by interferon- α via PNPT1/mir-26a/TET2 triggers autoimmune diabetes. *JCI insight*, 4(5).
- Štrauskienė, A., Navickas, R., Laucevičius, A., Krilavičius, T., Užupytė, R., Zdanytė, M., Ryliškytė, L., Jucevičienė, A. and Holvoet, P., 2021. Mir-1, miR-122, miR-132, and miR-133 are related to subclinical aortic atherosclerosis associated with metabolic syndrome. *International journal of environmental research and public health*, 18(4), p.1483.
- Tabet, F., Vickers, K.C., Torres, L.F.C., Wiese, C.B., Shoucri, B.M., Lambert, G., Catherinet, C., Prado-Lourenco, L., Levin, M.G., Thacker, S. and Sethupathy, P., 2014. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nature communications*, 5(1), pp.1-14.
- Tiedt, S., Prestel, M., Malik, R., Schieferdecker, N., Duering, M., Kautzky, V., Stoycheva, I., Böck, J., Northoff, B.H., Klein, M. and Dorn, F., 2017. RNA-Seq identifies circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as potential biomarkers for acute ischemic stroke. *Circulation research*, 121(8), pp.970-980.
- Tryggstad, J.B., Vishwanath, A., Jiang, S., Mallappa, A., Teague, A.M., Takahashi, Y., Thompson, D.M. and Chernausk, S.D., 2016. Influence of gestational diabetes mellitus on human umbilical vein endothelial cell miRNA. *Clinical science*, 130(21), pp.1955-1967.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langhein, A. and Burwinkel, B., 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*, 39(16), pp.7223-7233.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J. and Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), pp.654-659.
- Velle-Forbord, T., Eidlaug, M., Debik, J., Sæther, J.C., Follestad, T., Nauman, J., Gigante, B., Røsjø, H., Omland, T., Langaas, M. and Bye, A., 2019. Circulating microRNAs as predictive biomarkers of myocardial infarction: Evidence from the HUNT study. *Atherosclerosis*, 289, pp.1-7.
- Vohr, B.R. and Boney, C.M., 2008. Gestational diabetes: the forerunner for the development of maternal and childhood obesity and metabolic syndrome?. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 21(3), pp.149-157.
- Vrablik, M., Dlouha, D., Todorovova, V., Stefler, D. and Hubacek, J.A., 2021. Genetics of Cardiovascular Disease: How Far Are We from Personalized CVD Risk Prediction and Management?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), p.4182.
- Wakabayashi, I., Eguchi, R., Sotoda, Y., von Lewinski, D., Sourij, H., Daimon, T., Groschner, K. and Rainer, P.P., 2020. Blood levels of microRNAs associated with ischemic heart disease differ between Austrians and Japanese: a pilot study. *Scientific reports*, 10(1), pp.1-12.
- Wang, F., Zheng, Z., Guo, J. and Ding, X., 2010. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecologic oncology*, 119(3), pp.586-593.
- Wang, G. and Reinke, V., 2008. A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Current Biology*, 18(12), pp.861-867.
- Wang, Q., Lu, G. and Chen, Z., 2019. MALAT1 promoted cell proliferation and migration via MALAT1/miR-155/MEF2A pathway in hypoxia of cardiac stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 120(4), pp.6384-6394.
- Wang, W., Feng, L., Zhang, H., Hachy, S., Satohisa, S., Laurent, L.C., Parast, M., Zheng, J. and Chen, D.B., 2012. Preeclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (ie., miR-17,-20a, and-20b)

- that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(6), pp.E1051-E1059.
- Weinmann, R. and Roeder, R.G., 1974. Role of DNA-dependent RNA polymerase III in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(5), pp.1790-1794.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), pp.855-862.
- Wilcoxon, F., 1992. Individual comparisons by ranking methods. In *Breakthroughs in statistics* (pp. 196-202). Springer, New York, NY.
- Wu, L. and Belasco, J.G., 2008. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell*, 29(1), pp.1-7.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A. and Carrington, J.C., 2005. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant physiology*, 138(4), pp.2145-2154.
- Xiong, W., Qu, Y., Chen, H. and Qian, J., 2019. Insight into long noncoding RNA–miRNA–mRNA axes in myocardial ischemia-reperfusion injury: the implications for mechanism and therapy. *Epigenomics*, 11(15), pp.1733-1748.
- Xue, S., Zhu, W., Liu, D., Su, Z., Zhang, L., Chang, Q. and Li, P., 2019. Circulating miR-26a-1, miR-146a and miR-199a-1 are potential candidate biomarkers for acute myocardial infarction. *Molecular Medicine*, 25(1), pp.1-12.
- Yang, F., Wang, W., Zhou, C., Xi, W., Yuan, L., Chen, X., Li, Y., Yang, A., Zhang, J. and Wang, T., 2015. MiR-221/222 promote human glioma cell invasion and angiogenesis by targeting TIMP2. *Tumor Biology*, 36(5), pp.3763-3773.
- Yang, K., Wang, M., Zhao, Y., Sun, X., Yang, Y., Li, X., Zhou, A., Chu, H., Zhou, H., Xu, J. and Wu, M., 2016. A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nature communications*, 7(1), pp.1-16.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), pp.3011-3016.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R., 2006. The biogenesis and function of MicroRNAs. In *Gene Expression and Regulation* (pp. 481-492). Springer, New York, NY.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E. and Filipowicz, W., 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO journal*, 21(21), pp.5875-5885.
- Zhang, J., Xing, Q., Zhou, X., Li, J., Li, Y., Zhang, L., Zhou, Q. and Tang, B., 2017. Circulating miRNA-21 is a promising biomarker for heart failure. *Molecular medicine reports*, 16(5), pp.7766-7774.
- Zhang, L., Zhou, M., Qin, G., Weintraub, N.L. and Tang, Y., 2014. MiR-92a regulates viability and angiogenesis of endothelial cells under oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 446(4), pp.952-958.
- Zhang, R., Wang, Y.Q. and Su, B., 2008. Molecular evolution of a primate-specific microRNA family. *Molecular biology and evolution*, 25(7), pp.1493-1502.
- Zhao, L., Wang, B., Zhang, W. and Sun, L., 2020. Effect of miR-499a-5p on damage of cardiomyocyte induced by hypoxia-reoxygenation via downregulating CD38 protein. *Journal of cellular biochemistry*, 121(2), pp.996-1004.

Zhao, Y., Yuan, Y. and Qiu, C., 2016. Underexpression of CACNA1C caused by overexpression of microRNA-29a underlies the pathogenesis of atrial fibrillation. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 22, p.2175.

Zheng, L., Lin, S. and Lv, C., 2018. MiR-26a-5p regulates cardiac fibroblasts collagen expression by targeting ULK1. *Scientific reports*, 8(1), pp.1-7.

Zhou, H., Hu, H. and Lai, M., 2010. Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biology of the Cell*, 102(12), pp.645-655.

Zhou, S.S., Jin, J.P., Wang, J.Q., Zhang, Z.G., Freedman, J.H., Zheng, Y. and Cai, L., 2018. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), pp.1073-1084.

Zhu, K., Hu, X., Chen, H., Li, F., Yin, N., Liu, A.L., Shan, K., Qin, Y.W., Huang, X., Chang, Q. and Xu, G.Z., 2019. Downregulation of circRNA DMNT3B contributes to diabetic retinal vascular dysfunction through targeting miR-20b-5p and BAMBI. *EBioMedicine*, 49, pp.341-353.

Zhu, Y., Tian, F., Li, H., Zhou, Y., Lu, J. and Ge, Q., 2015. Profiling maternal plasma microRNA expression in early pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 130(1), pp.49-53.

Zhuang, X., Li, R., Maimaitijiang, A., Liu, R., Yan, F., Hu, H., Gao, X. and Shi, H., 2019. miR-221-3p inhibits oxidized low-density lipoprotein induced oxidative stress and apoptosis via targeting a disintegrin and metalloprotease-22. *Journal of cellular biochemistry*, 120(4), pp.6304-6314.

Internetové zdroje: www.mirbase.org, www.who.int