

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Linda Dalecká**

Vztah kardiovaskulárních mikroRNA k těhotenským komplikacím  
Relation between cardiovascular microRNAs and pregnancy-related complications

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha, 2015

**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, 13.8.2015

Podpis

## Abstrakt

Během těhotenství se může objevit řada komplikací, které mohou mít vliv na vývoj plodu a posléze mohou dokonce ohrožovat jeho život a případně i život matky.

Mezi takové komplikace patří například preeklampsie. Jedná se o hypertenzní poruchu, která se objevuje během těhotenství. Dalším příkladem je intrauterinní růstová retardace. Jedná se o stav, kdy plod není schopen dosáhnout geneticky daného růstového potenciálu. Oba patologické jevy jsou doprovázeny změnami v genové expresi mikroRNA v placentě, například miR-16, miR-21, miR-210. Právě poznatky o změnách v genové expresi mikroRNA by mohly představovat unikátní nástroj na poli neinvazivní diagnostiky těchto onemocnění, což by bylo přínosem i vzhledem k faktu, že obě diagnózy jsou zodpovědné za zvyšování mateřské a perinatální morbidity a mortality.

Tato práce se zaměřuje právě na mikroRNA, jejich expresi ve výše zmíněných patologických stavech a výhody, které může přinášet v jejich diagnostice. V práci jsou popsány tato dvě onemocnění, je zde charakterizována mikroRNA a její biogeneze. MikroRNA jsou pro nás zajímavé jako potencionální biomarkery pro neinvazivní prenatalní diagnostiku právě proto, že se mohou vyskytovat v tělních tekutinách, jako je plazma, mateřské mléko nebo plodová voda, a nepodléhají okamžité degradaci.

**Klíčová slova:** Preeklampsie, IUGR, MikroRNA

## Abstract

During the pregnancy, there are many complications, which can affect a fetal development and eventually, its or mother's life.

Pre-eclampsia is one of these complications. It is a hypertensive disorder, which appears during the pregnancy. Another example of these complications is an intrauterine growth restriction. It is a condition, when the fetus is not able to reach its genetical growth potential. Both of those pathological disorders are accompanied by changes in microRNA gene expression in placenta, for example miR-16, miR-21, miR-210. Knowledge about these changes in gene expression could represent unique instruments in the field of noninvasive prenatal diagnosis of these disorders. This could be beneficial due to the fact, that both of these disorders are responsible for increasing maternal and perinatal morbidity and mortality.

This work focused on microRNAs, their expression in aforementioned disorders and benefits, which could bring in diagnostics. In this work these two disorders, characteristics of microRNAs and their biogenesis are described. MicroRNAs are interesting for us as potential biomarkers for noninvasive prenatal diagnostics because they are present in body fluids, such as plasma, breast milk or amniotic fluid and they are not subject of rapid degradation.

Key words: Preeclampsia, IUGR, MicroRNA

## Obsah

Úvod .....	1
Extracelulární nukleové kyseliny .....	2
Vznik extracelulárních NK.....	2
MikroRNA .....	3
Objev miRNA.....	3
Lokalizace genů pro miRNA.....	4
Biogeneze .....	4
Volné cirkulující miRNA .....	6
Vznik extracelulárních miRNA.....	7
Preeklampsie .....	8
Příznaky.....	8
Příčiny .....	8
Rizika a následky.....	10
Predispozice ke vzniku PE .....	10
Diagnostika.....	11
Fetální růstové poruchy .....	12
Dělení .....	12
IUGR .....	12
Příčiny .....	13
Následky.....	13
Diagnostika.....	14
Rizika PE a IUGR pro matku .....	15
miRNA a diagnostika .....	16
miRNA a kardiovaskulární onemocnění .....	16
miRNA asociované s kardiovaskulárními onemocněními a jejich význam v patogenezi PE a IUGR .....	18
Závěr.....	21
Seznam literatury:.....	22

## Seznam zkratek:

3'UTR	3' nepřekládaná oblast v mRNA (untranslated region)
Ago2	protein argonaut 2 (argonaute 2)
CVDs	kardiovaskulární onemocnění (cardiovascular diseases)
CPR	cerebroplacentární poměr
DGCR8	Di-Georgův syndrom kritického regionu genu 8 (DiGeorge syndrome chromosomal [or critical] region 8)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FGR	fetální růstová restrikce (fetal growth restriction)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IUGR	intrauterinní růstová restrikce (Intrauterine growth restriction)
LBW	nízká porodní hmotnost (low birth weight)
let-7	lethal-7 miRNA prekurzor
lin-4	lin-4 miRNA prekurzor
miRISC	miRNA-indukovaný umlčující protein (miRNA-induced silencing complex)
miRNA	mikroRNA
mRNA	mediátorová RNA
NPM	nukleofosmin/ jaderný fosfoprotein B23 (Nucleophosmin/nucleolar phosphoprotein B23)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PE	preeklampsie
PI	index pulzality
PP-13	placentární protein 13 (placental protein 13)
pre-miRNA	prekurzor miRNA
pri-miRNA	primární transkript miRNA
Ran-GTP	GTP-vazebný jaderný protein Ran (GTP-binding nuclear protein Ran)
Ran	G protein z Ras genové rodiny (Ras-related nuclear protein)
RNA	ribonukleová kyselina ( ribonucleic acid)
Rnáza	ribonukleáza
SGA	Malý oproti gestačnímu stáří (Small for Gestational Age)
TRBP	TAR RNA vazebný protein (TAR RNA binding protein)
XPO5	exportin-5 protein

## Úvod

MikroRNA (miRNA) jsou přibližně 22 nukleotidů dlouhé, nekódující ribonukleové kyseliny (RNA). Hrají významnou roli v regulaci genové exprese a tak ovlivňují většinu buněčných procesů (Lee et al. 1993; Lau et al. 2001; Rodriguez et al. 2004). miRNA na rozdíl od ostatních RNA odolávají ribonukleázám (RNázám) a díky tomu si zachovávají vysokou stabilitu v tělních tekutinách. Byly detekovány například v plasmě, plodové vodě a mateřském mléce (Lawrie et al., 2008; Pigati et al., 2010; Weber et al., 2010). Bylo zjištěno, že mnoho miRNA má pozměněnou expresi u různých patologických stavů (Petrocca et al. 2008; Volinia et al. 2006).

Bylo identifikováno mnoho miRNA, které mají vliv na kardiovaskulární onemocnění (např. miR-1-3p, miR-16-5p, miR-20a-5p atd.). Tato práce se zaměřuje na expresi těchto kardiovaskulárních miRNA v placentární insuficienci, mezi které se řadí například preeklampsie a intrauterinní růstová retardace.

Preeklampsie (PE) a intrauterinní růstová retardace (IUGR) jsou onemocnění spojené s placentární nedostatečností. Tato onemocnění mají vliv na mateřskou a perinatální morbiditu a mortalitu (Devor et al. 2013; McIntire et al. 1999; Sibai et al., 2003; Sterne et al. 2000). Jako možný diagnostický marker těchto onemocnění se jeví miRNA.

Cílem této práce je shrnout současné znalosti o miRNA a možnosti jejich potenciálního využití v diagnostice výše zmíněných onemocnění.

## Extracelulární nukleové kyseliny

Extracelulární nukleové kyseliny jsou mimobuněčné nukleové kyseliny, které se nacházejí v krevní plazmě a séru u lidí, živočichů a rostlin. Jedná se o volné fragmenty nukleových kyselin (DNA a RNA), jejichž velikost může být od 143bp do 30kB, ale i větší (Giacona et al, 1998). Mezi extracelulární nukleové kyseliny patří mimo jiné i mikroRNA (miRNA).

### Vznik extracelulárních NK

Nukleové kyseliny se do extracelulárního prostoru mohou uvolňovat několika způsoby. Jedním z významných mechanismů jejich vzniku je apoptóza. Ta hraje také roli při uvolňování nukleových kyselin fetálního/placentárního původu do oběhu matky. Při apoptóze dochází ke zmenšování buňky a kondenzaci chromatinu, což vede k následné fragmentaci buňky na apoptotická tělíška. Během tohoto procesu dochází také k fragmentaci DNA (Chan et al., 2004; Li et al., 2004). Extracelulární fetální nukleové kyseliny pocházejí většinou z apoptotických tělíšek trofoblastu, která se dostávají do mateřské cirkulace (Ng et al., 2003).

Dalším způsobem uvolňování nukleových kyselin je nekróza. Jedná se o intravitální odumírání tkáně, které může mít mnoho příčin například účinky toxických látek nebo infekčních agens a hypoxií. Při nekróze se uvolňují nukleové kyseliny přímo do krevního řečiště (Jahr et al., 2001).

Velmi významný proces uvolňování nukleových kyselin z buněk je také aktivní sekrece (Stroun et al., 2001). Jako aktivní sekrece je nazývána sekrece exosomů, což jsou membránové vesikly o velikosti 50-110 nm (Gallo et al., 2012). Tyto vesikly jsou sekretovány do extracelulárních prostorů a je možné je detekovat v různých tělních tekutinách včetně plodové vody (Keller et al., 2007) a mateřského mléka (Admyre et al., 2007).



## MikroRNA

miRNA jsou krátké nekódující ribonukleové kyseliny (RNA) o délce přibližně 19-25 nukleotidů (Bartel, 2009; Castilla-Llorente et al., 2013; Lau et al., 2001; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Regulují expresi minimálně 60 lidských genů a tím se podílí na většině buněčných procesů jako je diferenciace, proliferace a apoptóza (Friedman et al., 2009). Hrají významnou roli v regulaci biochemických a fyziologických drah organismů a zejména v regulaci genové exprese (Van Empel et al., 2012), kterou ovlivňují negativně na posttranskripční úrovni. Váží se na komplementární sekvence nejčastěji v 3'UTR oblastech mediátorové RNA (mRNA), což vede k inhibici translace, k destabilizaci a postupné degradaci mRNA (Bartel, 2004).

miRNA se vyskytují v jednobuněčných i mnohobuněčných organismech a mezi taxony jsou vysoce konzervované (Friedman et al., 2009; Shukla et al., 2011; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Například let-7 RNA (dlouhá přibližně 21 nukleotidů) byla detekována u mnoha živočišných druhů včetně obratlovců, polostrunatců, měkkýšů a členovců, ale nebyla přítomna ve vzorcích RNA ze *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Escherichia coli* (Pasquinelli et al., 2000).

miRNA na rozdíl od ostatních RNA odolávají RNázám, které se nacházejí ve vysoké koncentraci v extracelulárních tekutinách. Zachovávají si stabilitu i za nepříznivých fyzikálních podmínek např. vysoké teploty a pH (Turchinovich et al., 2011). Díky tomu, že jsou takto stabilní se miRNA mohou vyskytovat také v různých tělních tekutinách, jako je například plazma, mateřské mléko nebo plodová voda (Lawrie et al., 2008; Pigati et al., 2010; Weber et al., 2010).

Bylo detekováno mnoho miRNA, jejichž exprese je pozměněna ve spojitosti s výskytem různých onemocnění, především nádorových (Esquela-Kerscher et al., 2006; Petrocca et al., 2008; Volinia et al., 2006). Tyto patologické stavy jsou také asociované se změnou hladin specifických miRNA v tělních tekutinách. Lze tedy předpokládat, že je bude možné využívat jako neinvazivní biomarkery pro stanovení diagnózy či sledování dalšího vývoje onemocnění.

## Objev miRNA

První miRNA byla objevena v roce 1993 při studiu vlivu genu *lin-4* na načasování larválního vývoje *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Její fyziologická funkce však

nebyla v té době známá. U miRNA se původně předpokládalo, že to jsou pouze degradační produkty jiných RNA.

Od roku 2001 jsou miRNA považovány za samostatnou podskupinu malých regulačních RNA (Lagos-Quintana et al., 2001; Lee et al., 2001) Dle databáze miRBase (mirbase.org) bylo dodnes identifikováno 2588 lidských maturovaných miRNA.

## Lokalizace genů pro miRNA

Geny miRNA lze dělit dle jejich umístění v genomu. Sekvence miRNA mohou být umístěny na nekódujících transkripčních jednotkách v intronech či exonech nebo na protein kódující transkripční jednotce v intronech (až 30%) (Rodriguez et al., 2004). Někdy může být sekvence lokalizovaná jak v intronu tak exonu nekódující transkripční jednotky, což závisí na jejím alternativním sestřihu (Saini et al., 2007). Až 60% savčích miRNA je organizováno do klastrů, což jsou úseky DNA obsahující více za sebou jdoucích genů. miRNA kódované v jednom klastru jsou přepisovány do dlouhého polycistronního primárního transkriptu (Lagos-Quintana et al. 2002). Tyto miRNA mají společnou regulaci exprese a velmi často spolu funkčně souvisí.

## Biogeneze

Biogeneze miRNA se dělí na dvě části, kdy jedna část probíhá v jádře a druhá v cytoplasmě (Obr. 3). MiRNA geny mohou být transkribovány třemi způsoby, jako samostatné transkripční jednotky, jako polycistronní primární transkripty nebo náhodně se svými „host“ geny (Lagos-Quintana et al. 2001; Saini et al., 2007).

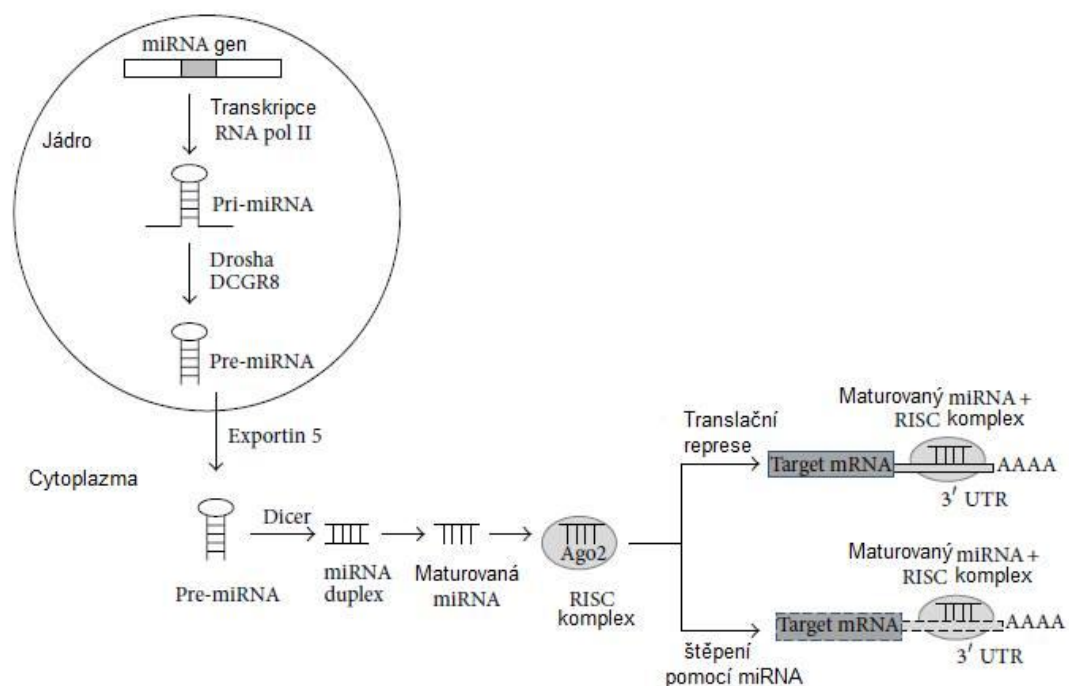
V jádře jsou geny kódující mikroRNA přepisovány RNA-polymerázou II do několik kilobází dlouhého primárního transkriptu - **pri-miRNA**, který je sbalen do vlásenkové struktury („hairpin“). Tento transkript je opatřen 5'čepičkou a 3'polyA koncem (Lee et al., 2004). První štěpení pri-miRNA je zprostředkováno mikroprocesorovým komplexem, který štěpí pri-miRNA na přibližně 60 nukleotidů dlouhý prekurzor miRNA - **pre-miRNA** (Finnegan al., 2013). Hlavní složkou tohoto mikroprocesorového komplexu je RNáza III Drosha, která štěpí samotný transkript (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Kofaktorem Droshy v tomto komplexu je Di-Georgův syndrom kritického regionu genu 8 (DGCR8), který směřuje Droshu k místu sestřihu. S mikroprocesorem dále asociují helikázy nebo heterogenní jaderné ribonukleoproteiny, které pravděpodobně slouží k usnadnění kotranslačních úprav (Finnegan

et al., 2013). Pri-miRNA může být však štěpena i nezávisle na mikroprocesoru (Krol et al., 2010).

Další úprava probíhá v cytoplasmě, kam je pre-miRNA aktivně transportována pomocí proteinu Exportin-5 (XPO5) (Kim et al., 2005; Kim et al., 2006). XPO5 váže a přenáší pre-miRNA přes nukleární membránu za přítomnosti Ran-GTP kofaktoru (Finnegan et al., 2013; Yi et al. 2003).

V cytoplasmě je z pre-mikroRNA odštěpena terminální smyčka a vzniká přibližně 22 nukleotidů dlouhý duplex miRNA/miRNA\* . (Carthew et al., 2009; Kim et al., 2005; Krol et al., 2010). Štěpení je zprostředkováno enzymatickým komplexem, jehož klíčové složky jsou endonukleáza Dicer (RNáza III) a RNA vazebný protein „TAR RNA binding protein“ (TRBP) (Finnegan et al., 2013; Kim et al., 2006). Duplex je tvořen hlavním a vedlejším vláknem (Takahashi et al., 2014). To, které vlákno je hlavní závisí na stabilitě 5'konců miRNA. Vlákno s méně stabilním 5'koncem je označeno za vlákno mateřské. Duplex je začleněn do ribonukleoproteinového komplexu „miRNA-induced silencing complex“ (miRISC) (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014; Takahashi et al., 2014). Vedlejší vlákno se uvolňuje a je následně pomocí několika procesů uvolněno a degradováno v cytoplasmě. V některých případech může být také začleněno do miRISC (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

Obr. 3



**Obr. 3: Biogeneze miRNA.** miRNA gen je transkribován pomocí RNA polymerázy II do pri-miRNA, které jsou dále štěpeny pomocí Droshy na pre-miRNA. Další úpravy probíhají v cytoplasmě, kam je pre-miRNA exportována pomocí XPO5. Zde se za pomoci Diceru formuje miRNA duplex obsahující maturovanou miRNA. Ta je následně vložena do miRISC komplexu. Převzato a upraveno z *Tsochandaridis et al., 2014* (Tsochandaridis et al., 2015)

### Volné cirkulující miRNA

Jak již bylo řečeno, extracelulární prostory a tekutiny jsou typické vysokým obsahem RNáz. Tyto RNázy slouží v organismu jako obrana proti cizorodým RNA (Tsui et al., 2002). V důsledku toho je RNA v extracelulárním prostoru rychle degradována, a tudíž je většina druhů RNA nedetekovatelná pomocí PCR a dalšími metodami. Právě proto je objev stabilních extracelulárních miRNA tak průlomový.

Extracelulární miRNA byly poprvé popsány roku 2008 v séru a plasmě několika vědeckými skupinami (např. Lawrie et al. 2008; Mitchell et al. 2008). Dále byly objeveny placentární miRNA v plasmě matky (Chim et al., 2008) a následovaly další tělní tekutiny včetně slin spermatu, moči a mateřského mléka (Hanke et al., 2010; Park et al., 2009; Pigati et al., 2010). miRNA v mimobuněčných tekutinách je stabilní (Chen et al., 2008). Tato stabilita byla dříve přisuzována enkapsulaci do membránových struktur, protože Hunter (Hunter et al.

2008) detekoval miRNA v mikrovezikulech a apoptotických tělískách ve vzorcích periferní krve. Později bylo zjištěno, že většina extracelulárních miRNA se nachází mimo membránové vezikuly a to v komplexu s proteiny Ago2 nebo NPM, které zajišťují její stabilitu a odolnost vůči RNázám. miRNA, které jsou volně v tělních tekutinách RNázám neodolají (Arroyo et al., 2011).

### Vznik extracelulárních miRNA

Již zmíněné mechanismy vzniku extracelulárních nukleových kyselin jsou založené na pasivním uvolňování nukleových kyselin do okolí v průběhu buněčné smrti (Turchinovich et al., 2012). Platí tedy, že zvýší-li se počet buněk nebo frekvence apoptózy v určité tkáni, zvýší se také hladiny tkáňově specifických miRNA v krvi (Laterza et al., 2009). Dle experimentu Wanga (Wang et al., 2010) je však možné, že by export miRNA-proteinových komplexů mohl být aktivní proces. V jeho experimentu se díky blokaci buněčného dýchacího řetězce zastavil nárůst hladiny miRNA v médiu, naopak po omezení sekrece proteinů z Golgiho aparátu a tvorby exosomů nebyla v sekreci zaznamenána změna. To naznačuje, že miRNA asociované s proteinovými komplexy se uvolňují bez využití exosomální dráhy (Wang et al., 2010). Výsledky experimentu však mohou být zkresleny různou stabilitou populací miRNA.

## Preeklampsie

Preeklampsie (PE) je závažné onemocnění objevující se v těhotenství. Postihuje přibližně 5-8 % gravidit. PE je charakterizována jako reakce mateřského organismu na abnormální placentaci, která je spojena se zvýšeným odporem cévního řečiště, zvýšenou agregací krevních destiček, endoteliální dysfunkcí a aktivací koagulačního systému (Konijnenberg et al., 1997; Roberts et al., 1989). Toto onemocnění může skončit smrtí matky nebo plodu (Devor et al., 2013).

### Příznaky

Mezi hlavní příznaky tohoto onemocnění patří hypertenze s hodnotami vyššími než 140/90 mmHg opakující se v měření s čtyřhodinovým odstupem spojená s proteinurií (výskyt bílkovin v moči) vyšší než 300mg za 24 hodin po 20. týdnu těhotenství (North et al., 2011). Tyto příznaky většinou doplňuje přítomnost edémů (Sibai, 2003). V současné době se však přistupuje k názoru, že edém by neměl být považován za součást diagnózy, neboť se běžně vyskytuje i v normální graviditě a u třetiny žen s PE se edém nikdy nevyskytuje (Gyrt et al., 2000). Existují případy, kdy je PE spojena s epigastrickou bolestí nebo bolestí v pravém horním kvadrantu břicha s nauseou nebo vomitem (Gyrt et al., 2000.; Sibai 2003).

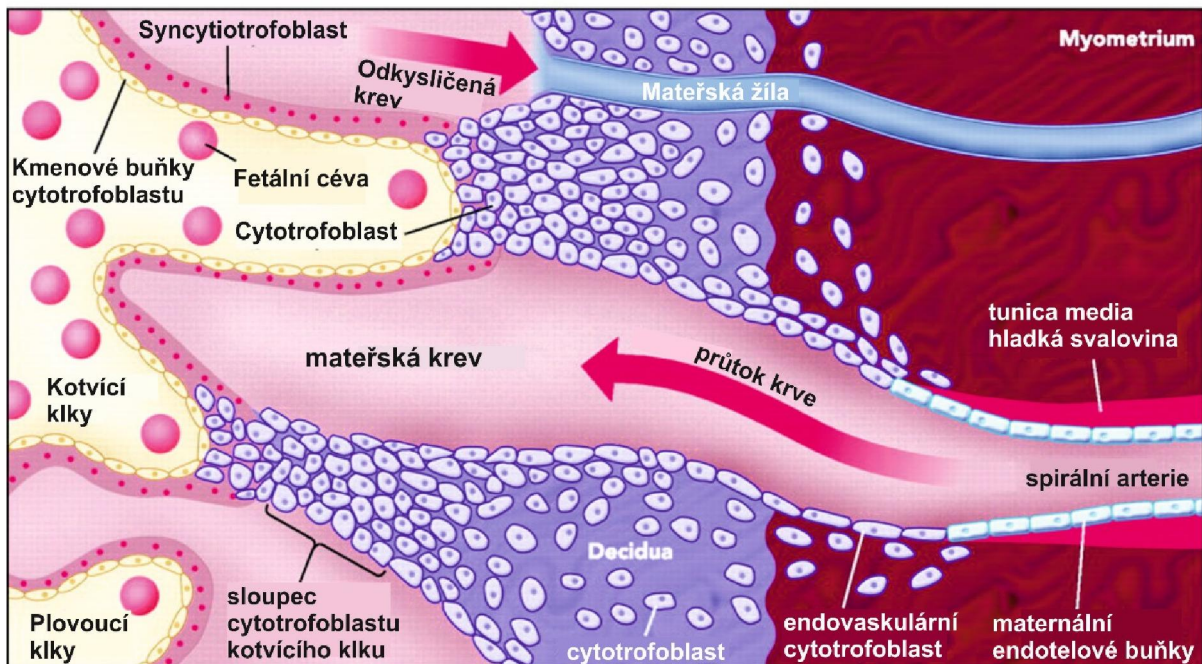
### Příčiny

Preeklampsie (PE) je multisystémové onemocnění, které stále nemá objasněnou příčinu. Při PE dochází k nedostatečné remodelaci mateřských spirálních arterií, což vede k hypoxii placenty. V důsledku toho dochází k nadměrné apoptóze placentárního trofoblastu a to přispívá k navození hypoxie v krevním oběhu plodu (Obr. 1) (DiFederico et al., 1999). S apoptózou placentárního trofoblastu také souvisí přítomnost abnormálních hladin extracelulární fetální DNA a některých placentárních mikroRNA (miRNA) v plodové vodě a periferní krvi matky.

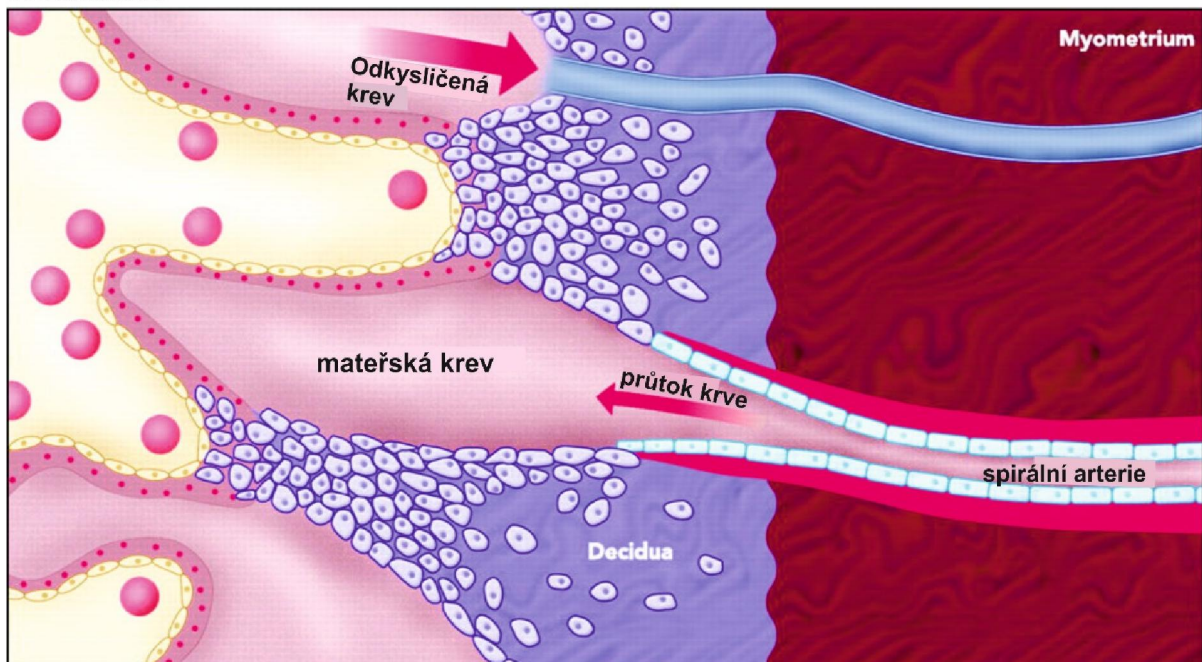


Obr.1

Normální stav



Preeklamsie



Obr. 1: Porovnání placentárního vývoje mezi fyziologickým a preeklamptickým těhotenstvím.

V normálním placentárním vývoji, cytotrofoblasty vstupují do mateřských spirálních artérií a přizpůsobují jejich průtok tak, aby poskytovaly dostatečné prokrvení placenty. Zatímco během preeklamsie je invaze cytotrofoblastu nízká, dochází k nedostatečné remodelaci spirálních artérií a to vede k hypoxii plodu. Převzato a upraveno z Wang et al., 2009 (Wang et al., 2009)

## Rizika a následky

PE se vyskytuje u 5-8% zdravých žen. V porovnání s ženami, které trpěly PE v předchozím těhotenství, se u nich vyskytuje signifikantně menší množství nepříznivých perinatálních důsledků spojených s předčasným porodem v důsledku PE. Zvýšené riziko představuje PE také pro ženy s vícečetnou graviditou, chronickou hypertenzí, předchozí preeklampsií a gestačním diabetem melitem (Hnat et al., 2002; Mattar et al., 2000; Sibai et al., 1991). Zvýšené riziko při výskytu trombofilie se neprokázalo. V závažných případech může PE skončit smrtí matky či plodu.

## Predispozice ke vzniku PE

Pro některé ženy je riziko vzniku PE větší než pro jiné. Predispozici k PE v těhotenství mají například ženy, které mají záněty žil, onemocnění diabetes melitus či onemocnění asociovaná s oxidačním stresem. Vyšší riziko výskytu PE mají také ženy, které jí trpěly alespoň během jednoho z předchozích těhotenství (Devor et al., 2013). Z hlediska predispozic ke vzniku PE byl také hodnocen vliv intervalu mezi porody. Výsledky ukázaly, že pokud měla žena PE v prvním těhotenství, tak riziko vzniku PE v těhotenství dalším klesá s délkou intervalu mezi porody. Naopak u žen, které neonemocněly PE během první gravidity, se s prodlužujícím intervalem mezi porody riziko jejího vzniku zvyšuje (Skjaerven et al., 2002). V některých studiích je zmiňován i tzv. rizikový muž. Za něj je považován muž, který může vyvolat PE u více partnerek (Esplin et al., 2001; Lie et al., 1998). Muž, který měl podíl na preeklamptické graviditě, má téměř dvojnásobnou pravděpodobnost, že způsobí vznik PE u jiné ženy bez ohledu na její předchozí zdravotní stav (Lie et al., 1998).

Dalším rizikovým faktorem PE je obezita. S hodnotou body-mass indexu riziko onemocnění stoupá. Kromě obezity je PE spojována také s inzulinovou rezistencí (Brien et al., 2002; Cedergren, 2004).

Dle současných studií je pravděpodobné, že na vznik PE mohou mít vliv i mateřské infekce vyvolané chlamydiemi a cytomegaloviry (Haggerty et al., 2012).



## Diagnostika

PE lze diagnostikovat jako mírnou či závažnou formu (Hu et al., 2009). Je pro ni charakteristický výskyt hypertenze spojené s proteinurií. Tyto příznaky doplňuje přítomnost edémů. Mezi laboratorní ukazatele PE patří hyperurikemie (snížené odstraňování kyseliny močové, zhoršená funkce ledvin), zvýšení kreatininu v séru, hypoalbuminemie (pokles hladiny albuminu), hladina aminotrasferáz a hemokoncentrace (snížený objem a zvýšená viskozita plazmy). K diagnostice PE se obvykle přistupuje až po nástupu klinických příznaků, v současné době totiž neexistují žádné ověřené markery, které by umožňovaly spolehlivě diagnostikovat preeklampsii před projevem klinických symptomů. Mezi slibné markery pro včasnou diagnostiku PE patří například PP-13 (placentární protein 13) (Chafetz et al., 2007).

## Fetální růstové poruchy

Normální fetální růst je závislý na genetických, placentárních a maternálních faktorech (Bamberg et al., 2004). Jako fetální růstovou retardaci (FGR) označujeme skupinu onemocnění postihující plod. Charakteristickým rysem fetální růstové retardace je opožděný růst plodu proti gestačnímu stáří zapříčiněný různými faktory. Především se jedná o nedostatečnou funkci placenty a další maternální a fetální faktory. Nelze vyloučit ani faktory vnější a environmentální (Thompson et al., 2001).

Hlavní a nejčastější příčinou vzniku FGR je již zmíněná nedostatečná funkce placenty neboli placentární insuficience, která způsobuje nedostatečný přísun kyslíku a dalších živin k plodu (Higashijima et al., 2013). Mezi další příčiny můžeme zařadit genetické a nutriční faktory matky, její zdravotní stav, užívání návykových látek a předchozí výskyt těhotenských komplikací, také genetické syndromy a vícečetná těhotenství a infekce (Baschat et al., 2006). Se vznikem FGR bývá také spojeno množství chromozomálních abnormalit (Snijders et al., 1993).

U FGR stejně jako u PE je v porovnání s fyziologickou graviditou zaznamenán zvýšený počet apoptotických tělísek vypouštěných placentou do krevního oběhu matky (Crocker et al., 2004).

### Dělení

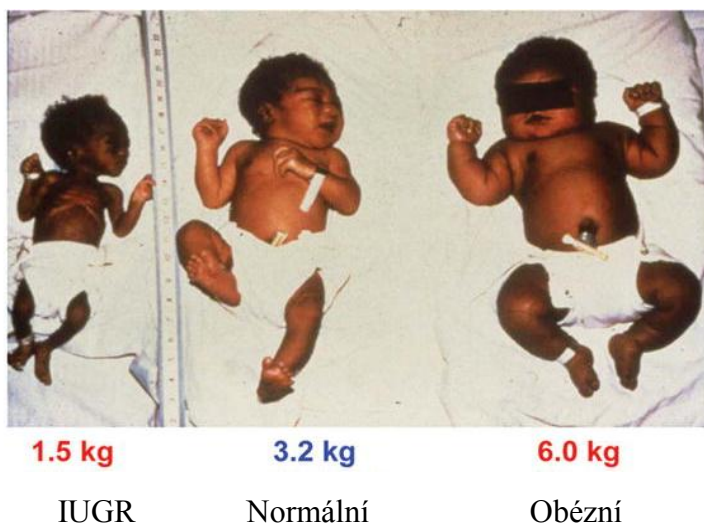
FGR lze rozdělit na tři rozdílné diagnózy. První z nich je těhotenství s plody s intrauterinní růstovou retardací (IUGR), dále pak těhotenství s malými plody vzhledem ke gestačnímu stáří (SGA) a těhotenství s nízkou porodní hmotností (LBW). Ve všech případech se jedná o situaci, kdy plod plně nevyužije veškerý svůj růstový potenciál (ACOG, 2013). Termíny IUGR a SGA uvedli do klinické praxe Battaglia a Lubchenco (1967)

### IUGR

IUGR (intrauterine growth restriction) je onemocnění, při kterém plod nedosahuje své geneticky podmíněné velikosti a které postihuje asi 8% všech těhotenství (Arroyo et al., 2008). Tento stav lze ale velmi těžko definovat, protože není možné přesně stanovit geneticky danou hmotnost a délku jedince. Jako IUGR jsou označovány plody, které své geneticky dané velikosti nedosáhly vlivem nějakého patologického procesu. Váhový odhad plodů s IUGR se vyskytuje pod 10. percentilem pro daný gestační věk a obvod břicha je pod percentilem 2,5 (Peleg et al.,

1998). Až 70% plodů s váhou pod 10. percentilem růstové křivky je však malých z důvodů konstitučních faktorů (SGA), jako je například výška a stavba těla rodičů nebo pohlaví plodu, a není přitom vystaveno riziku vyšší perinatální morbidity nebo mortality (Battaglia et al., 1967). V diagnostice a klasifikaci IUGR hraje významnou roli Dopplerovská flowmetrie. Z hlediska diagnózy IUGR je důležitá Dopplerovská flowmetrie pupečnickové artérie, pomocí které můžeme odlišit IUGR od konstitučního SGA stavu (Sterne et al., 2001).

Obr. 2



**Obr. 2: Hmotnostní porovnání mezi novorozenci.** Hmotnostní porovnání mezi novorozenci s IUGR, normálním a obézním. Převzato z *Hay et al., 2009* (Hay et al., 2009)

## Příčiny

Nejčastější příčinou vzniku IUGR je vaskulární onemocnění matky spojené s preeklampsií (Vatten et al., 2000). Při IUGR i PE dochází k ischemii placenty, což vede ke zhoršenému průtoku krve placentou a sníženému zásobení kyslíkem (Arroyo et al., 2008). Méně častou příčinou jsou mateřské zdravotní komplikace jako je chronická hypertenze (Vatten et al., 2000).

## Následky

Vyvíjející se plod má celé spektrum obranných mechanismů proti nedostatečné nutriční a kyslíkové dodávce. V první řadě dochází ke zpomalení až zastavení růstu plodu a k omezení jeho pohyblivosti. Následuje centralizace oběhu, tedy redistribuce krve k životně důležitým orgánům (mozek, srdce, nadledvinky) (Peleg et al., 1998). Dochází ke zvýšené

cirkulaci červených krvinek (hemokoncentrace), je nastartována jaterní glukoneogeneze a spuštěn anaerobní metabolismus glukózy, jehož výsledkem je zvýšená produkce laktátu. Chronická hypoxie plodu je vyvolána jakýmkoliv faktorem, který snižuje nebo omezuje fetoplacentární cirkulaci. Omezený koncový diastolický tok obvykle svědčí o závažném IUGR. Následkem nedostatečného přísunu kyslíku a dalších živin k plodu je špatný vývoj životně důležitých orgánů. Největším rizikem pro vývojový potenciál plodu je zastavení růstu hlavy. To může vést např. k mikrocefalii, nepříznivému vývoji nervové soustavy nebo mentální retardaci a také se tím zvyšuje pravděpodobnost perinatální morbidity a mortality (Bernstein et al. 1996; McIntire et al., 1999; Pardi et al., 2002; Sterne et al., 2000). IUGR děti jsou často podvyživené a dismorfické (Peleg et al., 1998).

## Diagnostika

V diagnostice a klasifikaci IUGR hrají významnou roli ultrazvuková biometrie a Dopplerovská flowmetrie. Pomocí ultrazvukové biometrie odhadujeme velikost plodu. Dopplerovská flowmetrie měří krevní průtok placentou, cévami a žilami plodu. Nejčastěji se užívá flowmetrie pupečnickové artérie (arteria umbicalis), díky níž lze odlišit IUGR od SGA stavu. V důsledku centralizace krevního oběhu klesá vaskulární rezistence ve střední mozkové tepně (arteria cerebri media) a dochází ke snížení indexu pulzality (PI). V arteria umbicalis dochází ke zvýšení vaskulární rezistence a to se promítne do zvýšeného PI. Poměr mezi těmito indexy pulzality se nazývá cerebroplacentární poměr (CPR). Tento stav obvykle svědčí o závažném IUGR (Sterne et al., 2001)

Diagnosticky nejdůležitější pro stanovení IUGR je biometrie mezi 28. a 32. týdnem gravidity. Hodnotí se například rozměr a obvod hlavičky či délka femuru. Dále lze také vypočítat hmotnost plodu (Shepard et al. 1982).

Z hlediska výstupů biometrických měření lze IUGR dělit na proporcionální a disproporcionální. Proporcionální IUGR zahrnuje plody malé, ale s normálními proporcemi těla, zatímco disproporcionální IUGR zahrnuje plody, které mají normální velikost hlavičky a menší obvod břicha (Maulik et al., 2006). Tyto termíny poprvé použili Campbell a Thoms (1977).

## Rizika PE a IUGR pro matku

Výše zmíněná onemocnění sebou nesou riziko vzniku chronických onemocnění v pozdějším životě ženy. Toto riziko existuje v případě, že žena prodělala v průběhu těhotenství alespoň jedno z těchto onemocnění případně jejich kombinaci. U žen, které prodělali PE, opakované spontánní potraty, předčasné porody nebo porody plodů s IUGR byl zaznamenán pozdější výskyt kardiovaskulárních onemocnění. Nejčastější je výskyt onemocnění věnčitých tepen a kardiovaskulárních nebo tromboembolických příhod (Bonamy et al., 2011; Magnussen et al., 2009; Wilson et al., 2003). Ženy, které měly výše zmíněné těhotenské komplikace, mají 2,5krát větší riziko výskytu kardiovaskulárních onemocnění (CVDs), než ženy s fyziologickým průběhem těhotenství. Nízká porodní hmotnost dítěte nebo už jednou prodělaná PE zvyšuje u matky riziko onemocnění ischemickou chorobou srdeční (ICHS) (Lykke et al., 2012). Hlavním důvodem jsou ve většině případů trvalé změny krevního tlaku a metabolismu tuků po prodělané PE, které podporují rozvoj aterosklerotických změn (Irgens et al., 2001). V případě, že žena prodělala více než jedno komplikované těhotenství, je toto riziko ještě mnohem vyšší, než u žen s fyziologickou graviditou (Freibert et al., 2011).

Tato onemocnění jsou v neposlední řadě riziková také pro pozdější vývoj dětí narozených z těchto komplikovaných těhotenství. Děti, narozené z těhotenství s PE, mají v budoucnu obecně větší riziko kardiovaskulárních onemocnění, například mrtvice (Kajantie et al., 2009). Dále mají vyšší riziko metabolických onemocnění a onemocnění krve (Wu et al., 2009). Tato rizika jsou zkoumána především proto, že v posledních deseti letech narůstá počet úmrtí způsobených kardiovaskulárními onemocněními. U žen je kardiovaskulárním onemocněním způsobeno přibližně 50-60% úmrtí (Berks et al., 2013).

## miRNA a diagnostika

Objev přítomnosti genetické informace plodu v krevním oběhu matky byl zásadní pro rozvoj neinvazivních diagnostických metod v oblasti gynekologie a porodnictví (Lo et al., 1997). Genetická informace plodu se do krevního oběhu matky dostává díky fenoménu fetálního mikrochimérismu, díky němuž lze již od 4. týdne těhotenství detekovat genetickou informaci plodu v mateřské cirkulaci (Klonisch et al., 2009). S využitím tohoto systému lze neinvazivně určit pohlaví plodu nebo stanovit jeho Rh faktor (Lo et al., 1998; Hromadníková et al., 2003; Hromadníková et al., 2005). Později byla zjištěna přítomnost placentárně specifických miRNA v periferní krvi matky, což také napomohlo ke zkvalitnění diagnostiky (Chim et al., 2008; Kotlabová et al., 2011).

Genová exprese miRNA je v některých případech tkáňově specifická, popřípadě omezená pouze na určité období nebo stav organismu (Liang et al., 2007). Některé typy miRNA také ovlivňují expresi proteinů v lidské placentě (Enquobahrie et al., 2011; Higashijima et al., 2013; Hu et al., 2009; Zhu et al., 2009).

V lidské placentě je exprimováno více než 500 miRNA (Morales-Prieto et al., 2014). Většina z těchto miRNA se vyskytuje v klastrech. Dva z těchto klastrů jsou exprimovány v placentě, je to C19MC a C14MC (Donker et al., 2012). miR-371-3 klastr je přilehlý k C14MC. Exprese genů C19MC a miR-371-3 klastrů roste od prvního k třetímu trimestru těhotenství, zatímco exprese genů C14MC klastru ve stejném období klesá (Morales-Prieto et al., 2013). Některé z těchto miRNA lze detekovat během těhotenství v mateřské plasmě a periferní krvi, avšak po porodu jejich koncentrace klesají (Chim et al., 2008; Kotlabová et al., 2011; Luo et al., 2009). Exprese všech placentárních miRNA v placentě je v různých fázích těhotenství odlišná.

## miRNA a kardiovaskulární onemocnění

Jak již bylo řečeno, PE a IUGR s sebou nesou rizika pozdějšího rozvoje kardiovaskulárních onemocnění u matky. Mezi tato onemocnění patří například hypertenze, ateroskleróza či ICHS (Freibert et al., 2011; Irgens et al., 2001; Lykke et al., 2012). U těchto a dalších kardiovaskulárních onemocnění hraje roli pozměněná genová exprese některých miRNA. Vybraná kardiovaskulární a další s nimi spojené onemocnění a seznam miRNA, u nichž byla pozorována změna genové exprese, jsou uvedena v tabulce 1.

**Tab. 1: Onemocnění asociovaná s kardiovaskulárním systémem a miRNA**

onemocnění	miRNA	studie
dyslipidemie	miR-1-3p, miR-21-5p, miR-33a-5p, miR-122-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p	Elmén 2008, Chen 2009, Kida 2011, Rayner 2011, Yang 2011, Zhong 2013
hypertenze	miR-21-5p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-208a-3p	Callis 2009, Elia 2009, Thum 2008
vaskulární zánět	miR-126-3p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-195-5p	Harris 2008, Chen 2009, O'Connell 2007, Wang 2012
insulinová rezistence a diabetes	miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-126-3p	Zampetaki 2010
ateroskleróza	miR-21-5p, miR-33a-5p, miR-126-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-155-5p	Cordes 2009, Ji 2007, Rayner 2012, Yhu 2012
angiogeneze	miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-100-5p, miR-126-3p, miR-221-3p	Doebele 2010, Grundmann 2011, Poliseno 2006, Wang 2008
ICHS	miR-1-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-92-3p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-181a-5p, miR-195-5p, miR-208a-3p, miR-221-3p	Fichtlscherer 2010, Wang 2012, Xin 2009
infarkt myokardu a srdeční selhání	miR-1-3p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-92-3p, miR-100-5p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-103a-3p, miR-133a-3p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-208a-3p, miR-210-3p, miR-499a-5p	Adachi 2010, Catalucci 2009, D'Alessandra 2010, Ellis 2013, Fukushima 2010, Ji 2009, Sucharov 2008, van Rooij 2006, van Rooij 2008, Wei 2013

Tab. 1: Seznam vybraných onemocnění a s nimi asociovaných miRNA s aberantní genovou expresí.

## miRNA asociované s kardiovaskulárními onemocněními a jejich význam v patogenezi PE a IUGR

Placentárně specifické miRNA, které jsou přítomné v mateřské cirkulaci, by mohly mít význam pro diagnostiku a predikci gestační hypertenze a preeklampsie (Hromadníková et al., 2013; Hromadníková et al., 2014; Kotlabová et al., 2011). Když srovnáme expresi v placentách preeklamptických žen s kontrolní skupinou, zjistíme rozdílnou expresi u 34 miRNA. Jedenáct z těchto miRNA má zvýšenou expresi (up-regulované) a 23 sníženou (down-regulované) (Zhu et al., 2009). V případě IUGR byly také nalezeny miRNA s odlišnou expresí v placentě oproti kontrolní skupině (Maccani et al., 2011).

Jedna ze studií testovala také placentárně specifické miRNA, z nichž se čtyři vyskytovaly hojně v mateřské plazmě (miR-141, miR-149, miR-299-5p a miR-135b) (Chim et al., 2008). Polemizuje se o rozdílné expresi mezi placentou a mateřskou krví. Zatímco některé studie rozdíl potvrzují, jiné ho vyvracejí (Li et al., 2013; Mouillet et al., 2010).

Vztah placentárně specifických miRNA k potencionálnímu rozvoji kardiovaskulárních onemocnění matky nebo u narozených dětí nebyl zatím studován.

Některé z miRNA, které měly změněnou genovou expresi u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními, byly dále testovány u pacientek s PE a IUGR. miRNA, které měly změněnou genovou expresi u daných patologických stavů, jsou podrobně popsány v tabulce 2.

Některými miRNA se zabýval větší počet studií, které ne vždy měly stejné závěry. Zatímco Zhu et al. (Zhu et al., 2009) zjistil down-regulaci miR-1-3p, ve studii Hromadníkové et al. (Hromadníková et al., v recenzním řízení) byla zjištěna u stejné miRNA v daném onemocnění up-regulace. Další rozpor se týká miR-126-3p nebo miR-195-5p. Tyto rozdíly v naměřených hodnotách mohou mít různé příčiny, například rozdílné experimentální postupy (Hromadníková et al., v recenzním řízení). Lze také pozorovat rozdíly mezi mírnou a těžkou formou PE, například u miR-17-5p nebo miR-26a-5p.



**Tab. 2: Změna genové exprese u kardiovaskulárních miRNA**

miRNA	onemocnění	up/down regulace (↑/↓)	tkáň	období (ukončení těhotenství po/před 34. týdnem)	studie
miR-1-3p	PE	↓	placenta	po 34.	Zhu 2009; Enquobahrie 2011
	PE,IUGR	↑	placenta	po 34.	Hromadníková v recenzním řízení
miR-16-5p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
	SGA	↓	placenta	po 34.	Maccani 2011
	těžká PE	↑	placenta	po 34.	Hu 2009
miR-17-5p	PE	↑	placenta		Wang 2012
	těžká PE	↓	placenta	po 34.	Xu 2014
miR-20a-5p	PE	↑	placenta		Wang 2012, Wang 2014
	těžká PE	↑	placenta		Zhang 2015
miR-20b-5p	PE	↑	placenta		Wang 2012
	těžká PE	↑	placenta		Zhang 2015
miR-21-5p	PE	↓	placenta	po 34.	Choi 2013
miR-26a-5p	PE	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
	těžká PE	↑	placenta, plazma	po 34.	Choi 2013, Wu 2012
miR-100-5p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
miR-103a-3p	PE	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
miR-122-5p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
miR-125b-5p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
miR-126-3p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
	PE	↓	placenta	po 34.	Hong 2014, Xu 2014, Yan 2013
	PE	↑	placenta	po 34.	Hu 2009

miR-143-3p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
miR-145-5p	PE,IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
	těžká PE	↑	plazma	po 34.	Wu 2012
miR-146a-5p	IUGR	↓	placenta	po 34.	Maccani 2011
miR-155-5p	PE	↑	placenta	po 34.	Li 2014, Pineles 2007
miR-181a-5p	PE	↑	placenta	po 34.	Hu 2009
	těžká PE	↑	plazma	po 34.	Wu 2012
miR-195-5p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
	PE	↓	placenta	po 34.	Hong 2014, Xu 2014, Yan 2013
	PE	↑	placenta	po 34.	Hu 2009
miR-199a-5p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
miR-210-3p	PE	↑	placenta	po 34.	Muralimanoharam 2012, Pineles 2007, Xu 2014
	těžká PE	↑	placenta	po 34.	Luo 2014, Zhu 2009
miR-221-3p	IUGR	↓	placenta	před 34.	Hromadníková v recenzním řízení
	těžká PE	↑	plazma	po 34.	Wu 2012
miR-499a-5p	PE,IUGR	↑	placenta	po 34.	Hromadníková v recenzním řízení

Tab 2.: V tabulce jsou uvedeny miRNA, které mají význam v kardiovaskulárních onemocněních a které mají pozměněnou expresi alespoň v jednom ze zkoumaných prenatálních patologických stavů. Je zde uvedena tkáň, ve které byly dané miRNA testovány a pokud je ze studie zjevné i gestační stáří, v němž byla gravidita ukončena.

## Závěr

Od objevu miRNA (1993) urazila věda velký kus cesty a poznatky o její funkci, biogenezi a regulaci se podstatně rozšířily. K jedné z nejdůležitějších informací o vlastnostech a chování miRNA patří fakt, že nepodléhají téměř žádné degradaci v extracelulární matrix. Navíc byla detekována jejich přítomnost v tělních tekutinách jako např. krevní plasma, plodová voda atd. Proto se o miRNA začalo v této souvislosti uvažovat jako o možných biomarkerech v oblasti neinvazivní prenatální diagnostiky.

Tato bakalářská práce shrnuje poznatky o miRNA asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními a jejich zvýšené/snížené expresi ve vybraných onemocněních objevujících se během těhotenství – preeklampsie a intrauterinní růstová retardace. Rozdílná exprese jednotlivých miRNA závisí také na gestačním stáří a pravděpodobně jsou zde rozdíly mezi expresí v placentě, v plasmě či periferní krvi. Obě poruchy jsou závažné a mohou ohrožovat život matky nebo jejího nenarozeného dítěte. Proto je nanejvýš nutné hledat možnosti včasné a neinvazivní diagnostiky.

Zatím se možnost využití miRNA jako diagnostické metody stále testuje, ale na základě dosavadních vědeckých poznatků na poli prenatální diagnostiky je nadějným příslibem do budoucnosti.

U preeklampsie s ukončeným těhotenstvím po 34. gestačním týdnu byla v placentě zjištěna up-regulace miRNA, jenž hrají roli v patogenezi některých kardiovaskulárních onemocnění (např. miR-1-3p, miR-126-3p, miR-155-5p, miR-181a-5p a dalších). Dále byla zjištěna down-regulace u některých miRNA (např. miR-21-5p, miR-126-3p, miR-195-5p). U některých miRNA byla zjištěna up-regulace v plasmě (miR-26a-5p, miR-181a-5p a miR-221-3p). U stejného patologického s ukončeným těhotenstvím před 34. gestačním týdnem byla zjištěna up-regulace (miR-1-3p) a down-regulace (např. miR-26a-5p, miR-103a-35).

U IUGR s ukončeným těhotenstvím po 34. gestačním týdnu byla v placentě zjištěna up-regulace miRNA, jenž hrají roli v patogenezi některých kardiovaskulárních onemocnění (např. miR-1-3p, miR-499a-5p). Dále byla zjištěna down-regulace miRNA (miR-146a-5p). U téhož onemocnění s ukončeným těhotenstvím před 34. týdnem byla také zjištěna down-regulace některých miRNA (např. miR-103a-3p, miR-122-5p, miR-125b-5p miR-126-3p a další).

## Seznam literatury:

- ACOG (2013). ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstetrics and gynecology*, 121(5), 1122.
- Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Z, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, et al. (2010) Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*;56:1183-85.
- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., ... Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(3), 1969–1978.
- Arroyo, J. A., & Winn, V. D. (2008). Angiogenesis in the IUGR Placenta, *PNAS*, 172–177.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., ... Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5003–5008.
- Bamberg, C., & Kalache, K. D. (2004). Prenatal diagnosis of fetal growth restriction, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 387–394.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233.
- Baschat, a. a., Galan, H. L., Bhide, a., Berg, C., Kush, M. L., Oepkes, D., Harman, C. R. (2006). Doppler and biophysical assessment in growth restricted fetuses: Distribution of test results. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 27(1), 41–47.
- Battaglia, F. C., & Lubchenco, L. O. (1967). A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *The Journal of pediatrics*, 71(2), 159-163.
- Berks, D., Hoedjes, M., Raat, H., Duvekot, J. J., & Steegers, E. A. P. (2013). Risk of cardiovascular disease after pre-eclampsia and the effect of lifestyle interventions : a literature-based study, *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 924–931.
- Bernstein, I. M., Horbar, J. D., Ms, J. B., Ohlsson, A., Golan, A., & Network, O. (1996). Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction, *Am J Obstet Gynecol*, 198–206.
- Bonamy, A. K. E., Parikh, N. I., Cnattingius, S., Ludvigsson, J. F., & Ingelsson, E. (2011). Birth characteristics and subsequent risks of maternal cardiovascular disease effects of gestational age and fetal growth. *Circulation*, 124(25), 2839-2846.
- Brien, T. E. O., Ray, J. G., & Chan, W. (2002). Maternal Body Mass Index and the Risk of, *Epidemiology*, 368–374.

- Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, et al. (2009) MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*;119(9):2772-86.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655.
- Castilla-Llorente, V., Nicastro, G., & Ramos, A. (2013). Terminal loop-mediated regulation of miRNA biogenesis: selectivity and mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, 41(4), 861–5.
- Catalucci D, Gallo P, Condorelli G. (2009) MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. *Circ Cardiovasc Genet*;2:402-8.
- Cedergren, M. I. (2004). Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstetrics and Gynecology*, 103(2), 219–24.
- Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth Musile cell fate and plasticity. *Nature*;460:705-10.
- Crocker, I. P., Tansinda, D. M., & Baker, P. N. (2004). Altered cell kinetics is cultured placental villous explants in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Journal of Pathology*, 204(1), 11–18.
- D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. (2010) Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*;31(22):2765-73.
- Devor, E. J., Santillan, D. a, & Santillan, M. K. (2013). Preeclampsia and MicroRNAs, 3(1), *Proceedings in Obstetrics and Gynecology*, 1–10.
- DiFederico, E., Genbacev, O., & Fisher, S. J. (1999). Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *The American Journal of Pathology*, 155(1), 293–301.
- Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, et al. (2010) Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood*;115(23):4944-50.
- Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Hubel, C. a., Stolz, D. B., Morelli, a. E., & Sadovsky, Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular Human Reproduction*, 18(8), 417–424.
- Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MV, et al. (2009) The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ*;16(12):1590-8.
- Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. (2013) Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart Fail*;15(10):1138-47.

- Elmén J, Lindow M, Silaharoglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, et al. (2008) Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res*;36(4):1153-62.
- Enquobahrie, D. A., Abetew, D. F., Sorensen, T. K., Willoughby, D., Chidambaram, K., & Williams, M. A. (2011). Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Esplin, M. S., Fausett, M. B., Fraser, A., Kerber, R., Mineau, G., Carrillo, J., & Varner, M. W. (2001). Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, 344(12), 867-872.
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(4), 259–269.
- Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. (2010) Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*;107(5):677-84.
- Finnegan, E. F., & Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(1), 51–68.
- Freibert, S. M., Mannino, D. M., Bush, H., Ph, D., & Crofford, L. J. (2011). The Association of Adverse Pregnancy Events and Cardiovascular Disease in Women 50 Years of Age and Older, 20(2).
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105.
- Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. (2010) Assessment of plasma Midas in congestive heart failure. *Circ J*;75:336-40.
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., & Illei, G. G. (2012). The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes, *Plos One*, 7(3), 1–5.
- Giacona, M. B., Ruben, G. C., Iczkowski, K. A., Roos, T. B., Porter, D. M., & Sorenson, G. D. (1998). Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17(1), 89-97.
- Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, et al. (2011) MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation*;123(9):999-1009.
- Gyrt, N. Z. J. O., Brown, M. A., Hague, W. M., Higgins, J., Lowe, S., Mccowan, L., Walters, B. N. J. (2000) The detection , investigation and management of hypertension in pregnancy : executive summary, *Aust NZ J Obstet Gynecol*,133–138.

- Haggerty, C. L., Panum, I., Uldum, S. a., Bass, D. C., Olsen, J., Darville, T., Ness, R. B. (2012). Chlamydia trachomatis infection may increase the risk of preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 3(1), 28–33.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A. C., Kausch, I., Jocham, D., Sczakiel, G. (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 28(6), 655–661.
- Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. (2008) MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*;105:1516-21.
- Hauth, J. C., Ewell, M. G., Levine, R. J., Esterlitz, J. R., Sibai, B., Curet, L. B., Morris, C. D. (2000). Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. *Obstetrics and Gynecology*, 95(1), 24–28.
- Hay, W. W. (2009). American Pediatric Society Presidential Address 2008: Research in early life - Benefit and promise. *Pediatric Research*, 65(1), 117–122.
- Higashijima, A., Miura, K., Mishima, H., Kinoshita, A., Jo, O., Abe, S., Masuzaki, H. (2013). Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenatal Diagnosis*, 33(3), 214–222.
- Hnat, M. D., Sibai, B. M., Caritis, S., Hauth, J., Lindheimer, M. D., MacPherson, C., ... Dombrowski, M. (2002). Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparas. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 186(3), 422–426.
- Hong F, Li Y, Xu Y. (2014) Decreased placental miR-126 expression and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia. *J Int Med Res*;42(6):1243-51.
- Hromadnikova, I., Houbova, B., Hridelova, D., Voslarova, S., Kofer, J., Komrska, V., & Habart, D. (2003). Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenatal diagnosis*, 23(3), 235-238.
- Hromadnikova, I., Vechetova, L., Vesela, K., Benesova, B., Doucha, J., Kulovany, E., & Vlk, R. (2005). Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal diagnosis and therapy*, 20(4), 275-280.
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Ondrackova, M., Kestlerova, A., Novotna, V., Hympanova, L., & Krofta, L. (2013). Circulating C19MC microRNAs in preeclampsia, gestational hypertension, and fetal growth restriction. *Mediators of inflammation*, 2013.
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Hympanova, L., Doucha, J., & Krofta, L. (2014). First Trimester Screening of Circulating C19MC microRNAs Can Predict Subsequent Onset of Gestational Hypertension. *PLoS ONE*, 9(12), e113735.

- Hromadníková I, Kotlabová K, Hympanová L, Krofta L. Cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs are dysregulated in placental tissues affected with gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction. V recenzním řízení.
- Hu, Y., Li, P., Hao, S., Liu, L., Zhao, J., & Hou, Y. (2009). Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(8), 923–929.
- Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., & Marsh, C. B. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS one*, 3(11), e3694.
- Chafetz, I., Kuhnreich, I., Sammar, M., Tal, Y., Gibor, Y., Meiri, H., & Wolf, M. (2007). First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *American journal of obstetrics and gynecology*, 197(1), 35-e1.
- Chan, K. C. A., Zhang, J., Hui, A. B. Y., Wong, N., Lau, T. K., Leung, T. N., Lo, Y. M. D. (2004). Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma, *Clinical Chemistry*, 92, 88–92.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Zhang, C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997–1006.
- Chen T, Huang Z, Wang L, Wang Y, Wu F, Meng S, et al. (2009) MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocytes/macrophages. *Cardiovasc Res*;83:131-9.
- Chim, S. S. C., Shing, T. K. F., Hung, E. C. W., Leung, T.-Y., Lau, T.-K., Chiu, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 54(3), 482–90.
- Choi SY, Yun J, Lee OJ, Han HS, Yeo MK, Lee MA, et al. (2013) MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a PNA-based microarray. *Placenta*;34(9):799-804.
- Irgens, H. U., Reisaeter, L., Irgens, L. M., & Lie, R. T. (2001). Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia : population based cohort study, *BMJ*, 1213–1217.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R., & Knippers, R. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells 1, 1659–1665.
- Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. (2007) MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*;100:1579-88.
- Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. (2009) Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*;55:1944-49.



- Kajantie, E., Eriksson, J. G., Osmond, C., Thornburg, K., & Barker, D. J. P. (2009). Preeclampsia is associated with increased risk of stroke in the adult offspring the helsinki birth cohort study. *Stroke*, 40(4), 1176–1180.
- Keller, S., Rupp, C., Stoeck, A., Runz, S., Fogel, M., Lugert, S., Gutwein, P. (2007). CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid, (i), 1095–1102.
- Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T, et al. (2011) PPAR $\alpha$  is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharm Res*;28:2467-76.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(5), 376–385.
- Kim, V. N., & Nam, J. W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends in Genetics*, 22(3), 165–173.
- Klonisch, T., & Drouin, R. (2009). Fetal-maternal exchange of multipotent stem/progenitor cells: microchimerism in diagnosis and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 15(11), 510–518.
- Konijnenberg, a, Stokkers, E. W., van der Post, J. a, Schaap, M. C., Boer, K., Bleker, O. P., & Sturk, a. (1997). Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 176(2), 461–469.
- Kotlabova, K., Doucha, J., & Hromadnikova, I. (2011). Placental-specific microRNA in maternal circulation - identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *Journal of Reproductive Immunology*, 89(2), 185–191.
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics*, 11(9), 597–610.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 853–858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. *Current Biology*, 12(9), 735–739.
- Laterza, O. F., Lim, L., Garrett-Engle, P. W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W. K., Glaab, W. E. (2009). Plasma microRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clinical Chemistry*, 55(11), 1977–1983.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 858–862.

- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., Harris, A. L. (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), 672–675.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–54.
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 862–864. doi:10.1126/science.1065329
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060.
- Li, Y., Zimmermann, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2004). Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clinical Chemistry*, 50(6), 1002–1011.
- Li X, Li C, Dong X, Gou W. (2014) MicroRNA-155 inhibits migration of trophoblast cells and contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia by regulating endothelial nitric oxide synthase. *Mol Med Rep*;10(1):550-4.
- Li, H., Ge, Q., Guo, L., & Lu, Z. (2013). Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *BioMed Research International*, 2013.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., & Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues, *BMC Genomics*, 20, 1–20.
- Lie, R. T., Rasmussen, S., Brunborg, H., Gjessing, H. K., Lie-Nielsen, E., & Irgens, L. M. (1998). Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *Bmj*, 316(7141), 1343–1347.
- Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., & Redman, C. W. G. (1997). Early report Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum, *The Lancet*, 350, 485–487.
- Lo, Y. D., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., & Hjelm, N. M. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*, 62(4), 768-775.
- Luo, S.-S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T. (2009). Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biology of Reproduction*, 81(4), 717–29.

- Luo R, Shao X, Xu P, Liu Y, Wang Y, Zhao Y, et al. (2014) MicroRNA-210 contributes to preeclampsia by downregulating potassium channel modulatory factor 1. *Hypertension*;64(4):839-45.
- Lykke, J. A., Paidas, M. J., Triche, E. W., & Langhoff-roos, J. (2012). Fetal growth and later maternal death , cardiovascular disease and diabetes, *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 91, 503–510.
- Maccani, M. a., Padbury, J. F., & Marsit, C. J. (2011). miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth. *PLoS ONE*, 6(6).
- Magnussen, E. B., Vatten, L. J., Smith, G. D., & Romundstad, P. R. (2009). Hypertensive disorders in pregnancy and subsequently measured cardiovascular risk factors. *Obstetrics and Gynecology*, 114(5), 961–970.
- Mattar, F., & Sibai, B. M. (2000). VIII. Risk factors for maternal morbidity.
- Maulik, D. (2006). Fetal growth compromise: definitions, standards, and classification. *Clinical obstetrics and gynecology*, 49(2), 214-218.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513–10518.
- Morales-Prieto, D. M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Schoenleben, M., & Markert, U. R. (2013). Pregnancy-associated miRNA-clusters. *Journal of Reproductive Immunology*.
- Morales-Prieto, D. M., Ospina-Prieto, S., Schmidt, a., Chaiwangyen, W., & Markert, U. R. (2014). Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta*, 35(SUPPL), S39–S45.
- Mouillet, J.-F., Chu, T., Hubel, C. a, Nelson, D. M., Parks, W. T., & Sadovsky, Y. (2010). The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta*, 31(9), 781–4.
- Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, Guo C, Myatt LG, Myatt L. (2012) MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. *Placenta*;33(10):816-23.
- Ng, E. K. O., Leung, T. N., Tsui, N. B. Y., Lau, T. K., Panesar, N. S., Chiu, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2003). The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clinical Chemistry*, 49(5), 727–731.
- North, R. a, McCowan, L. M. E., Dekker, G. a, Poston, L., Chan, E. H. Y., Stewart, A. W., ... Kenny, L. C. (2011). Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: development of model in international prospective cohort. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 342, d1875.

- O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*;104:1604-9.
- Pardi, G., Marconi, A. M., & Cetin, I. (2002). Placental-fetal Interrelationship in IUGR Fetuses - A Review, *Placenta*, 136–141.
- Park, N. J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B. S., Kastratovic, D. a., Abemayor, E., & Wong, D. T. (2009). Salivary microRNA: Discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research*, 15(17), 5473–5477.
- Pasquinelli, a E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), 86–89.
- Peleg, D., Kennedy, C. M., & Hunter, S. K. (1998). Intrauterine growth restriction: identification and management. *American family physician*, 58, 453-470.
- Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M. R., Shah, M. H., Nicoloso, M. S., de Martino, I., Vecchione, A. (2008). E2F1-Regulated MicroRNAs Impair TGFβ-Dependent Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Gastric Cancer. *Cancer Cell*, 13(3), 272–286.
- Pigati, L., Yaddanapudi, S. C. S., Iyengar, R., Kim, D. J., Hearn, S. a., Danforth, D., Duelli, D. M. (2010). Selective release of MicroRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS ONE*, 5(10).
- Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, et al. (2007) Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 196(3):261.e261-266.
- Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. (2006) MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*;108:3068-71.
- Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, Ray TD, et al. (2011) Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*;478(7369):404-7.
- Rayner KJ, Moore KJ. (2012) The plaque “micro” environment: microRNAs control the risk and the development of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*;14:413-21.
- Roberts, J. M., Taylor, R. N., Musci, T. J., Rodgers, G. M., Hubel, C. A., & McLaughlin, M. K. (1989). Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161(5), 1200–1204.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14(10A), 1902–10.

- Saini, H. K., Griffiths-Jones, S., & Enright, A. J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45), 17719–17724.
- Shepard, M. J., Richards, V. A., Berkowitz, R. L., Warsof, S. L., & Hobbins, J. C. (1982). An evaluation of two equations for predicting fetal weight by ultrasound. *American journal of obstetrics and gynecology*, 142(1), 47-54.
- Shukla, G. C., Singh, J., & Barik, S. (2011). MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 3(3), 83–92.
- Sibai, B. M., Mercer, B., & Sarinoglu, C. (1991). Severe preeclampsia in the second trimester: Recurrence risk and long-term prognosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165(5), 1408–1412.
- Sibai, B. (2003). Diagnosis and Management of Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, 102(1), 181–192.
- Skjærven, R., Wilcox, A. J., & Lie, R. T. (2002). The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, 346(1), 33-38.
- Snijders, R. J., Sherrod, C., Gosden, C. M., & Nicolaidis, K. H. (1993). Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 168(2), 547–555.
- Sterne, G., Shields, L. E., & Dubinsky, T. J. (2000). Abnormal Fetal Cerebral and Umbilical Doppler Measurements in Fetuses with Intrauterine Growth Restriction Predicts the Severity of Perinatal Morbidity.
- Sterne, G., Shields, L. E., & Dubinsky, T. J. (2001). Abnormal fetal cerebral and umbilical Doppler measurements in fetuses with intrauterine growth restriction predicts the severity of perinatal morbidity. *Journal of clinical ultrasound*, 29(3), 146-151.
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., & Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica chimica acta*, 313(1), 139-142.
- Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A., & Krzyzosiak, W. J. (2014). The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(12), 2253–2270.
- Sucharov C, Bristow MR, Port JD. (2008) miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J Mol Cell Cardiol*;45(2):185-92.
- Takahashi, R.-U., Miyazaki, H., & Ochiya, T. (2014). The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Frontiers in Genetics*, 4(January), 295.

- Thompson, J. M. D., Clark, P. M., Robinson, E., Becroft, D. M. O., Pattison, N. S., Glavish, N., Mitchell, E. a. (2001). Risk factors for small-for-gestational-age babies: The Auckland birthweight collaborative study. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 37(4), 369–375.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*;456(7224):980-4.
- Tsochandaridis, M., Nasca, L., Toga, C., & Levy-Mozziconacci, A. (2015). Circulating MicroRNAs as Clinical Biomarkers in the Predictions of Pregnancy Complications. *BioMed Research International*, 2015(Figure 1), 1–8.
- Tsui, N. B. Y., Ng, E. K. O., & Lo, Y. M. D. (2002). Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clinical Chemistry*, 48(10), 1647–1653.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7223–7233.
- Turchinovich, A., Weiz, L., & Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: The mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(11), 460–465.
- Van Empel, V. P. M., De Windt, L. J., & Da Costa Martins, P. a. (2012). Circulating miRNAs: Reflecting or affecting cardiovascular disease. *Current Hypertension Reports*, 14(6), 498–509.
- Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. (2006) A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*;103:18255-60.
- van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al.(2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*;105:13027-32.
- Vatten, L. J., Nilsen, S. T., & Austgulen, R. (n.d.). Preeclampsia and Fetal Growth, *Obstetrics & Gynecology*, 7844(00), 950–955.
- Volinia, S., Calin, G. a, Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., ... Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2257–2261.
- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. (2008) The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*;15:261-71.
- Wang, A., Rana, S., & Karumanchi, S. A. (2009). The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. *Int.Union.Physiol.Sci*, 24(16), 147–158.

- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., & Galas, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 7248–7259.
- Wang YS, Wang HY, Liao YC, Tsai PC, Chen KC, Cheng HY, et al. (2012) MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovasc Res*;95:517-26.
- Wang W, Feng L, Zhang H, Hachy S, Satohisa S, Laurent LC, Parast M, Zheng J, Chen DB. (2012) Preeclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*;97(6):E1051-9.
- Wang Y, Zhang Y, Wang H, Wang J, Zhang Y, Wang Y, et al. (2014) Aberrantly up-regulated miR-20a in pre-eclamptic placenta compromised the proliferative and invasive behaviors of trophoblast cells by targeting forkhead box protein A1. *Int J Biol Sci*;10(9):973-82.
- Weber, J. a., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741.
- Wei C, Kim IK, Kumar S, Jayasinghe S, Hong N, Castoldi G, et al. (2013) NF-κB mediated miR-26a regulation in cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*;228(7):1433-42.
- Wilson, B. J., Watson, M. S., Prescott, G. J., Sunderland, S., Campbell, D. M., Hannaford, P., & Smith, W. C. S. (2003) Hypertensive diseases of pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: results from cohort study, *BMJ*, 1–7.
- Wu, C. S., Nohr, E. a., Bech, B. H., Vestergaard, M., Catov, J. M., & Olsen, J. (2009). Health of children born to mothers who had preeclampsia: a population-based cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(3), 269.e1–269.e10.
- Wu, L., Zhou, H., Lin, H., Qi, J., Zhu, C., Gao, Z., & Wang, H. (2012). Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction*, 143(3), 389-397.
- Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, et al. (2009) MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells *Indry. Gens Dev*;23:2166-78.
- Xu P, Zhao Y, Liu M, Wang Y, Wang H, Li YX, et al. (2014) Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension* ;63(6):1276-84.
- Yan T, Liu Y, Cui K, Hu B, Wang F, Zou L. (2013) MicroRNA-126 regulates EPCs function: implications for a role of miR-126 in preeclampsia. *J Cell Biochem*;114(9):2148-59.
- Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, et al. (2011) Mir-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting Toll-like receptor 4. *FEBS Lett*;585:854-60.

- Yhu J, Chen T, Yang L, Li Z, Wong MM, Zheng X, et al. (2012) Regulation of microRNA-155 in atherosclerotic inflammatory responses by targeting MAP3K10. *PLoS ONE*;7:e46551.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, 3011–3016.
- Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. (2010) Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*;107(6):810-7.
- Zhang, C., Li, Q., Ren, N., Li, C., Wang, X., Xie, M., Yang, W. (2015). Placental miR-106a~363 cluster is dysregulated in preeclamptic placenta, *Placenta*
- Zhong D, Huang G, Zhang Y, Zeng Y, Xu Z, Zhao Y, et al. (2013) MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR $\alpha$ -induced lipogenesis in hepatocytes. *Cell Signaling*;25:1429-37.
- Zhu, X., Han, T., Sargent, I. L., Yin, G., & Yao, Y. (2009). Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(6), 661.e1–7.