

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Veronika Marvanová

Postpartální expresní profil kardiovaskulárních microRNA ve vztahu
k těhotenským komplikacím – studie matek 3-10 let po porodu

Postpartal expression profile of cardiovascular microRNAs with regard to
occurrence of pregnancy-related complications – study on mothers 3-10 years
after the delivery

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, PhD.

Praha, 2018

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma: „Postpartální expresní profil kardiovaskulárních miRNA ve vztahu k těhotenským komplikacím – studie matek 3-10 let po porodu“ zpracovávala samostatně pod dohledem vedoucího práce. K vypracování byla použita dostupná odborná literatura, která je ve všech případech řádně citována a v závěru shrnuta do seznamu literatury. Dále prohlašuji, že při zpracovávání nebyla porušena autorská práva třetích osob. Tato práce, ani její podstatná část také nebyla předložena k získání stejného, ani jiného akademického titulu.

V Praze dne 23. 4. 2018

Podpis: _____

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky a čas, který mi věnovala při vypracovávání mé diplomové práce. Stejně tak bych ráda poděkovala i kolegyním z laboratoře, a to zvláště Mgr. Kateřině Kotlabové, PhD. za trpělivost a ochotnou pomoc při práci v laboratoři i zpracovávání dat a výsledků.

Abstrakt

Tato studie se zabývá genovou expresí kardiovaskulárních microRNA v periferní krvi matek po porodu. MiRNA jsou krátké nekódující RNA, které se významně podílejí na posttranskripčních úpravách mRNA a tím regulují expresi genů napříč biologickými procesy. Dysregulace miRNA provázejí různé patologické děje, díky čemuž se otevírá cesta ke snazší diagnostice a potenciálně i léčbě onemocnění pomocí manipulace s genovou expresí miRNA.

Cílem této práce bylo vysledovat, jak závisí exprese cirkulujících miRNA asociovaných s kardiovaskulárním rizikem na průběhu těhotenství a manifestaci různých těhotenských komplikací. Za tímto účelem byla zkoumána periferní krev 221 matek s odstupem 3-10 let od porodu, přičemž pacientky se shodnou těhotenskou komplikací byly vždy porovnávány se skupinou pacientek s fyziologickým průběhem gravidity. Genová exprese 29 kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi byla stanovena pomocí reverzní transkripce a kvantitativní PCR v reálném čase.

Bylo potvrzeno, že profil genové exprese miRNA se u jednotlivých diagnóz těhotenských komplikací liší od expresního profilu fyziologických kontrol. Také jsme prokázali, že profil miRNA matek s odstupem 3-10 let od porodu je odlišný od profilu právě těhotných žen s totožnou diagnózou těhotenské komplikace, a tudíž se s odstupem od porodu mění i míra rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Těhotenské komplikace skrze dysregulaci profilu miRNA tedy ovlivňují kardiovaskulární systém matek i s odstupem od porodu.

Zjištěné údaje mají velký potenciál pro budoucí diagnosticko/prognostické využití. MiRNA by se mohly stát novými markery pro kardiovaskulární onemocnění. Matkám s prodělanou těhotenskou komplikací pak mohou hladiny genové exprese těchto miRNA poskytnout cennou informaci o tom, jak průběh těhotenství ovlivnil jejich kardiovaskulární systém a jaké mají riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

Klíčová slova:

miRNA, kardiovaskulární onemocnění, těhotenské komplikace, gestační hypertenze, preeklampsie, fetální růstová restrikce

Abstract

The aim of this study was to investigate gene expression of cardiovascular miRNAs in peripheral blood of mothers after delivery. MiRNAs are small non-coding RNAs, which significantly modulate posttranscriptional adjustments of mRNA and thus regulate gene expression across biological processes. Dysregulation of miRNAs is associated with many pathological phenomena, thanks that we can use them for diagnosis and potentially we can treat these diseases by the manipulation of miRNA gene expression.

We examined gene expression of circulating miRNAs associated with cardiovascular diseases, and we investigated, how the expression profile depends on pregnancy course and manifestation of pregnancy-related complications. For this purpose we examined material from 221 mothers 3-10 years after delivery. A group with identical pregnancy-related complication was always compared with a group of mothers after physiological pregnancy. Gene expression of 29 cardiovascular miRNAs in peripheral blood was studied using reverse transcription and quantitative real-time PCR.

It was confirmed, that the expression profile of miRNAs differed between pregnancy-related complications and physiological controls. We also confirmed, that the profile of gene expression discovered at mothers 3-10 years after delivery was different from that found in pregnant women with the same diagnosis. As the expression profile is changing, the risk of the development of cardiovascular disease also changes after the delivery. Therefore, pregnancy related complications, due to dysregulation of miRNA profile, highly affect mothers cardiovascular system even years after delivery.

The experimental data we have acquired have enormous potential for future diagnostic and prognostic utilization. MiRNAs may become a modern diagnostic markers of cardiovascular diseases. For mothers after pregnancy-related complications the information concerning the cardiovascular state based on miRNA expression profile can be very valuable. This could reveal, how pregnancy course

influences mothers cardiovascular system, and how high is their own risk of later development of cardiovascular diseases.

Key words:

miRNA, cardiovascular diseases, pregnancy-related complications, gestational hypertension, preeclampsia, fetal growth restriction

Obsah

Čestné prohlášení	2
Poděkování:	3
Abstrakt.....	4
Klíčová slova:	5
Abstract	6
Key words:	7
Seznam použitých zkratk	10
1. Teoretický úvod	12
1.1 MicroRNA.....	12
1.1.1. Obecné informace	12
1.1.2. Biogeneze miRNA	13
1.1.3. Mechanismus RNA interference	17
1.1.4. Vybrané miRNA a jejich mechanismy působení v organismu	19
1.2 Onemocnění kardiovaskulárního systému a konsekvence s dysregulovaným expresním profilem miRNA	25
1.2.1. Ateroskleróza	25
1.2.2. Trombóza	29
1.2.3. Onemocnění koronárních tepen (CAD) a ischemická choroba srdeční (IHD).....	30
1.2.4. Infarkt myokardu (IM)	32
1.2.5. Srdeční hypertrofie.....	33
1.2.6. Srdeční arytmie	33
1.2.7. Cévní mozková příhoda (CMP)	34
1.3 Těhotenské komplikace.....	36
1.3.1. Gestační hypertenze	36

1.3.2.	Preeklampsie	37
1.3.3.	Fetální růstová restrikce	41
2.	Cíl práce	43
3.	Materiál a metody	44
3.1	Materiál	44
3.2	Metody	49
3.2.1.	Zpracování vzorku	49
3.2.2.	Izolace RNA obohacené o krátké RNA molekuly	50
3.2.3.	Reverzní transkripce.....	51
3.2.4.	Kvantitativní PCR v reálném čase	53
3.2.5.	Relativní kvantifikace	57
3.3	Statistické zpracování dat.....	58
3.3.1.	Shapiro-Wilkův test normality dat	58
3.3.2.	Kruskal-Wallisova analýza	62
4.	Výsledky	64
4.1	Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi fyziologických kontrol a těhotenských patologií.....	65
4.1.1.	Up-regulace miR-17-5p u GH.....	65
4.1.2.	Statisticky signifikantní up-regulace miR-20a-5p, miR-143-3p a miR- 499-5p u GH	65
4.1.3.	Trend k up-regulaci miR-29a-3p, miR-20b-5p, miR-146a-5p a miR- 199a-5p u GH a trend k up-regulaci miR-29a-3p u PE	68
4.2	Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi matek s ohledem na závažnost PE	71
4.2.1.	Signifikantní up-regulace miR-17-5p a miR-29a-3p u závažné PE....	71
4.2.2	Trend k up-regulaci miR-133-3p a miR-195-5p u závažné PE.....	72

4.3	Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi matek s preeklampsií s ohledem na dobu ukončení gravidity (před a po 34. gestačním týdnu).....	74
4.3.1.	Signifikantní up-regulace miR-133-3p u pacientek s časnou formou PE (porod před 34. gestačním týdnem)	74
4.3.2	Trend k up-regulaci miR-29a-3p u pacientek s pozdní formou PE (porod po 34. gestačním týdnu)	75
5.	Diskuse.....	76
5.1	Nově objevené dysregulace expresního profilu miRNA	77
5.2	MiRNA se změnou profilu genové exprese s odstupem 3-10 let od porodu	82
6.	Závěr	84
7.	Seznam použité literatury	85
7.1	Seznam internetových odkazů.....	101
7.2	Seznam obrázků	101
7.3	Seznam tabulek	102
7.4	Seznam grafů.....	103

Seznam použitých zkratek

Zkratka	plné znění v českém jazyce	plné znění v anglickém jazyce
Ago	Argonaut protein	Argonaute protein
BCL6	B-cell lymphoma 6 protein	B-cell lymphoma 6 protein
BMI	index tělesné hmotnosti	body mass index
CAD	onemocnění koronárních tepen	coronary artery disease
cDNA	komplementární DNA	complementary DNA
CNS	centrální nervový systém	central nervous system
CRP	C-reaktivní protein	C-reactive protein
CT	výpočetní tomografie	computed tomography
Ct	prahová hodnota	threshold
DIK	diseminovaná intravaskulární koagulace	disseminated intravascular coagulation
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleid acid
DNTP	deoxyribonukleotid trifosfát	deoxyribonucleotide triphosphate
DVT	hluboká žilní trombóza	deep venous thrombosis
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová	ethylenediaminetetraacetic acid
EFW	váhový odhad plodu	estimated fetal weight
EKG	elektrokardiogram	electrocardiogram
EL buffer	erytrocytový lyzační pufr	erythrocyte lysis buffer
EPC	endotelová progenitorová buňka	endothelial progenitor cell
FG	fyziologická gravidita	physiological gravidity
FGR	fetální růstová restrikce	fetal growth restriction
GDM	gestační diabetes mellitus	gestational diabetes mellitus
GH	gestační hypertenze	gestational hypertension
HAK	hormonální antikoncepce	hormonal contraception
HELLP	hemolýza, zvýšené jaterní enzymy, snížené krevní destičky	hemolysis, elevated liver enzymes, low plateletes
ICMP	ischemická cévní mozková příhoda	acute ischemic stroke
IHD	ischemická choroba srdeční	ischemic hearth disease
IUGR	intrauterinní růstová restrikce	intrauterine growth restriction
kreatinkináza MB	myokardiální izoenzym	myocardial isoenzyme
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou	low density lipoproteine

MGB	minor groove binder	minor groove binder
ICAM	mezibuněčná adhezní molekula	intercelluar adhesion molecule
IM	infarkt myokardu	myocardial infarction
MEF	myocyte enhancer factor	myocyte enhancer factor
mRNA	messenger RNA	messenger RNA
miRNA	mikroRNA	microRNA
NFQ	ne fluorescentní zhášec	non-fluorescent quencher
NTC	negativní kontrola bez templátu	no template controll
PE	preeklampsie	preeclampsia
poly (A)	poly(A) konec	poly(A) tail
PCR	polymerázová řetězová reakce	polymerase chain reaction
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleide acid
RNAi	RNA interference	RNA interference
RISC	RNA induced silencing complex	RNA induced silencing complex
RLT	RNA lyzační pufr	RNA lysis buffer
RT	reverzní transkripce	reverse transcription
SGA	malý ke gestačnímu věku	short to gestational age
SPECT	jedno-fotonová výpočetní tomografie	single-photon emission computed tomography
SRF	serum responsive factor	serum responsive factor
TNF	tumor nekrozní faktor	tumor necrosis factor
UNG	uracil – N – glykosyláza	uracil – N – glykosylase
UTR	nepřekládaná oblast	untranslated region
UV	ultrafialové světlo	ultraviolet light
VCAM	vaskulární adhezní molekula	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor	vascular endothelial growth factor
VSMC	buňka/y hladkého svalstva cévní stěny	vascular smooth muscle cell
VTE	žilní tromboembolismus	venous thromboembolism

1. Teoretický úvod

1.1 MicroRNA

1.1.1. Obecné informace

MicroRNA, zkráceně „miRNA“ jsou jednovláknové nekódující úseky RNA, jejichž délka se pohybuje v rozmezí 20-24 nukleotidů (Bartel et al., 2004), ale u jednotlivých miRNA může jejich délka vykazovat i mírnou heterogenitu (Starega-Roslan et al., 2010). Prekurzory miRNA vznikají transkripcí z DNA v jádře buněk, ve finální podobě se pak miRNA vyskytují v cytoplasmě (Bartel et al., 2009; Dangwal et al., 2011; Calin et Croce, 2006; Elton et al., 2011). Jejich hlavní známá funkce je regulace genové exprese přes vazbu na mRNA (messenger RNA), což určuje roli miRNA ve většině biologických procesů, jako je diferenciaci a proliferaci buněk, jejich vývoj, migrace, apoptóza (Bartel et al., 2009), odpověď na stresové situace, nebo tumorigeneze (Cordes et Srivastava, 2009). Studie na zvířecích modelech dokonce prokázaly, že některé fundamentální procesy jsou na miRNA absolutně závislé (Small et Olson, 2011).

Jako první byly objeveny miRNA lin-4 a let-7 u *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993), dnes jsou jich popsány tisíce u obratlovců, much, červů, rostlin i virů. Pro vyšší efektivitu výzkumu, zabránění překryvu výzkumů různých vědeckých týmů a zachování unikátních pojmenování jednotlivých miRNA je od roku 2004 vytvořena veřejně přístupná aktuální databáze (Griffiths-Jones, 2004). Množství informací stále narůstá. Například v této databázi „miRBase“ dostupné z odkazu <http://www.mirbase.org/> je možné nalézt všechny publikované sekvence jednotlivých miRNA u různých organismů, dále přesné pojmenování miRNA, jejich prekurzory, lokaci na chromozomu a anotaci. Pro lidské miRNA se používá označení „hsa“ (*Homo sapiens*) a každá miRNA má své přiřazené číslo, zapisujeme např. „hsa-miR-1“ (Griffiths-Jones et al., 2006). Podle chromozomu, ze kterého byly miRNA transkribovány se také rozdělují do klastrů. Například zkratka C19MC značí klastri miRNA nacházející se na chromozomu 19 (chromosome 19 miRNA cluster), který je 100 kilobází dlouhý a transkripce z této oblasti vzniká 46 pre-miRNA (Bentwich et al., 2005).

Jelikož jsou miRNA distribuovány pravděpodobně ve všech tkáních, mohou potenciálně hrát klíčovou roli ve fyziologii a patofyziologii téměř všech orgánových soustav (Dangwal et al., 2011) a proto jsou v posledních letech velmi diskutovaným tématem (Elton et al., 2011). Jedním z hlavních proudů je zkoumání funkce různých miRNA v kardiovaskulárním systému člověka (Cordes et Srivastava, 2009; Dangwal et al., 2011; Ono et al., 2011; Nishiguchi et al., 2015; Fernández-Hernando et Baldán, 2013; Elton et al., 2011). Dnes je již prokázán jejich vliv jak při vývoji kardiovaskulární soustavy, tak při vzniku některých onemocnění, například fibrózy srdce, nebo arytmie (Lin et al., 2009; Van Rooij et al., 2008 b).

Existuje však mnoho překážek, které limitují aplikační potenciál miRNA. Za prvé se u lidského genomu předpokládá, že kóduje více než 2 700 různých miRNA (<http://www.miRbase.org/>). Druhým problémem hned za množstvím miRNA je fakt, že každá z těchto miRNA může ovlivňovat široké spektrum mRNA a zároveň větší množství různých miRNA může cílit na tutéž mRNA. Regulace je tedy natolik komplexní, že navzdory intenzivnímu výzkumu je velice těžké objasnit mechanismy fungování konkrétních miRNA v konkrétních procesech (Cordes et Srivastava, 2009; Dangwal et al., 2011; Nishiguchi et al., 2015).

1.1.2. Biogeneze miRNA

Vznik miRNA začíná transkripcí z DNA pomocí RNA polymerázy II, čímž vzniká primární transkript, jako první prekurzor. Sekvence pro vznik miRNA má buď vlastní promotor a ostatní regulační oblasti a miRNA pak vzniká nezávisle, nebo se nachází v intronech protein-kódujících genů. Post-transkripčními úpravami vystřižené introny jsou pak v těchto případech použity jako základ pro miRNA (Bartel et al., 2004). Tyto miRNA transkribované společně s mRNA kódující protein pak často ovlivňují expresi právě té mRNA, která vznikla přepisem ze stejného genu (Fernández-Hernando et Baldán, 2013, Small et Olson, 2011).

První prekurzor miRNA vzniklý přepisem z DNA se nazývá pri-miRNA. Pri-miRNA je dlouhá v rozmezí stovek nukleotidů až po několik kilobází, bývá typicky uspořádaná do struktury zvané „stem-loop“ (stonek a smyčka) a na 5' konci

je krytá poly-(A) koncem (Cordes et Srivastava, 2009). Není výjimkou, že jedna pri-miRNA dá finálně vzniknout více funkčním miRNA (Siomi et Siomi, 2010).

Další úpravy miRNA odehrávající se v jádře buňky se účastní takzvaný „Microprocessing complex“. Ten se skládá z enzymu DROSHA, proteinu PASHA a dalších kofaktorů. DROSHA je enzym z III. řady RNáz a specificky reaguje s dvouvláknovými molekulami RNA. Gen pro tuto nukleázu se nazývá *DROSHA* (dříve *RNASEN*) a u člověka je lokalizován na 5. chromozomu. PASHA (jinak také DGCR8 – Di George syndrome critical region 8) je proteinová doména, která je schopna vázat dvouvláknové molekuly RNA. Na přítomnosti obou hlavních domén je funkce „Microprocessing complexu“ absolutně závislá. Tento komplex naváže molekulu pri-miRNA a sestříhne ji, čímž vzniká pre-miRNA. Pre-miRNA bývá dlouhá okolo 70 nukleotidů a stále jí zůstává struktura stem-loop (Denli et al., 2004).

V podobě pre-miRNA je budoucí miRNA transportována skrz jadernou membránu do cytoplasmy. K tomu je využíván transportní receptor exportin-5, který rozpozná pre-miRNA pomocí 2-3 basí, které zůstávají jako „převís“ na konci molekuly po sestříhu enzymem DROSHA. Pre-miRNA se skrz exportin-5 dostává ven z jádra a v cytosolu pokračuje její úprava (Siomi et Siomi, 2010).

Poslední úpravu týkající se délky vznikající miRNA má na starosti další komplex enzymu a vazebného proteinu. Jedná se o Dicer – enzym z III. řady RNáz, ve spolupráci s proteinem TRBP/PACT. Tento komplex zkracuje molekulu na finální délku, tedy 20-24 nukleotidů, s dvou-nukleotidovým přesahem na 3' koncích. Tím vzniká finální dvouvláknová miRNA, mezi jejími vlákny však nemusí být plná komplementarita (Carthew et Sontheimer, 2009).

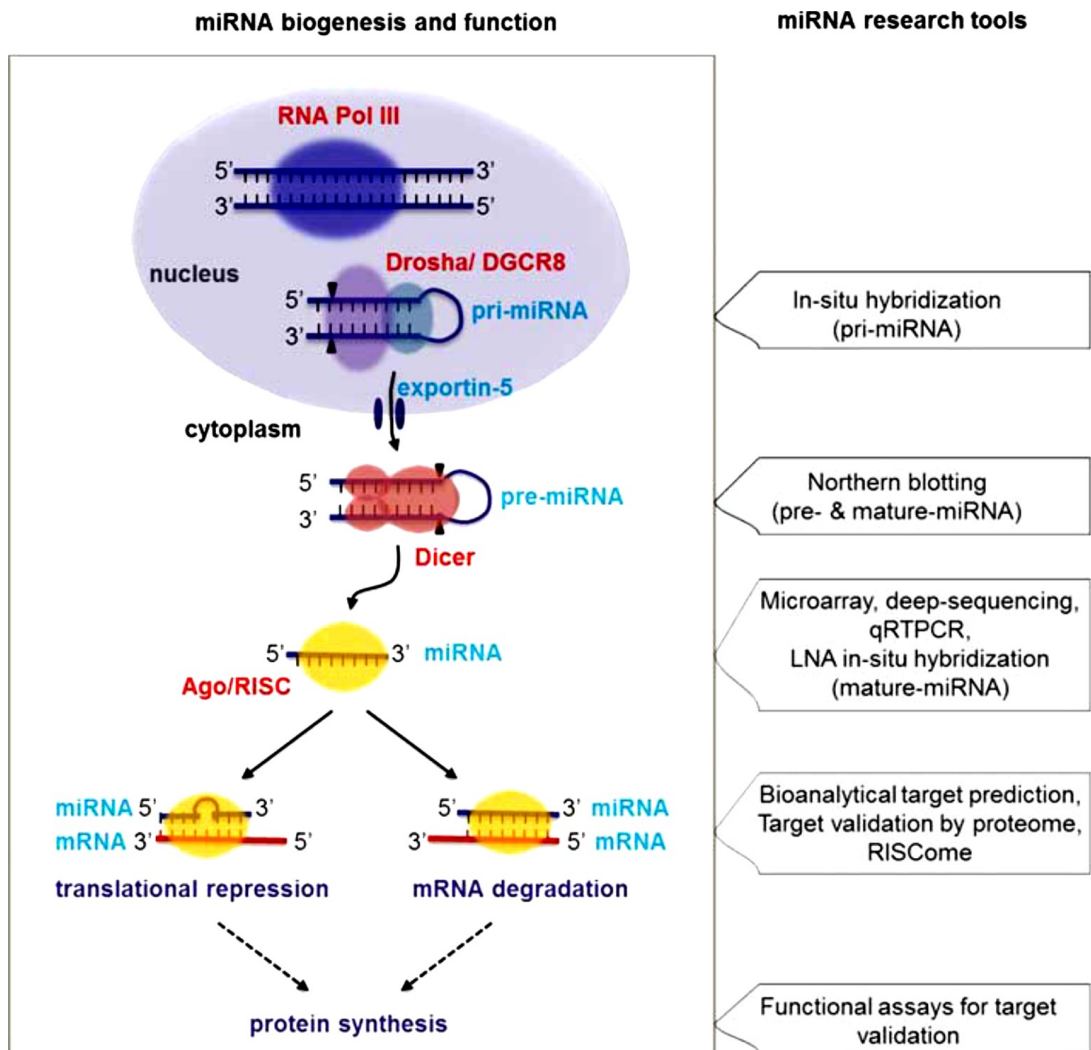
Dvouvláknová miRNA ještě neplní svoji funkci regulace genové exprese. Asymetrie v relativní termodynamické stabilitě 5' konců vláken vede k tomu, že méně stabilní vlákno (guide strand) se přednostně váže s RISC komplexem (RNA Induced Silencing Complex) a druhé vlákno (passenger strand) většinou degraduje, v některých případech se však také může vázat na RISC (Cordes et Srivastava, 2009; Siomi et Siomi, 2010). Potom se za název miRNA přidává „5p“ pro vlákno,

kteřé obsahuje 5' konec původní struktury stem-loop a „3p“ pokud obsahuje původní 3' konec. Teprve komplex RISC s navázaným vláknem miRNA (miRISC) je funkčním nástrojem regulace genové exprese (Fabian et Sonenberg, 2012).

Základem RISC je Argonaut protein (Ago), který tvoří jádro komplexu a váže na sebe finální vlákno miRNA, napomáhá stabilitě vlákna a udržuje ho v konformaci vhodné k navázání na cílovou mRNA. V lidském těle se nachází 8 typů proteinu Ago, přičemž k expresi čtyř z nich (hAgo1 – hAgo4) dochází v širokém spektru tkání a buněčných typů (Azuma-Mukai et al., 2008). Nejdůležitějšími částmi Ago jsou domény PAZ, MID a PIWI. PAZ doména je blíže N-terminálnímu konci proteinu a váže 3' konec vedoucího vlákna miRNA, doména MID váže 5' konec vlákna. PIWI doména tvoří C-terminální konec proteinu Ago, interaguje s 5' fosfátovým koncem vlákna a u Ago2 pomáhá hydrolyticky štěpit cílovou mRNA. Zvláštností je, že báze 11-18 navázané miRNA nejsou k Ago proteinu pevně navázány, čímž právě Ago protein pravděpodobně ovlivňuje délku přístupné části miRNA. Mimo protein z rodiny Argonautů obsahuje RISC i další pomocné molekuly, ale Ago je pro jeho funkci naprosto zásadní (Wang et al., 2008).

Vláknno miRNA jako součást komplexu RISC je plně funkční nástroj k regulaci genové exprese, který dokáže zásadně modulovat míru syntézy řady proteinů a tím zasahovat do biologických procesů v celém lidském těle (Nishiguchi et al., 2015; Dangwal et al., 2011). Celý proces biogeneze miRNA je pro přehlednost znázorněn na obrázku 1.

Obrázek 1: Schéma biogeneze miRNA a používaných výzkumných metod



Obrázek 1: Syntéza miRNA, zdroj Dangwal et al., 2011

1.1.3. Mechanismus RNA interference

RNA interference (RNAi) je post-transkripčním regulátorem genové exprese, který funguje na Watson-Crickovském principu párování basí mezi vláknem RNA v komplexu RISC a vláknem cílové mRNA. Následkem RNAi je zabránění translace konkrétní molekuly mRNA buď pomocí destrukce messenger RNA, nebo inhibicí procesu translace kvůli vazbě samotné (Cordes et Srivastava, 2009; Nishiguchi et al., 2015).

Pro navázání cílové kompatibilní molekuly mRNA je klíčový komplex RISC, který využívá hned dva systémy pro zvýšení účinnosti. Za prvé používá vyčnívající budoucí párovací oblast své miRNA jako iniciační sondu k rozpoznávání cílů, zatímco cestuje prostředím cytosolu buňky. Zároveň je schopen pouze volně přidružovat potenciální cílové krátké RNA molekuly, provést „scan“ cílových vazebných míst a tím ve velkém množství nevhodných mRNA rozpoznat specifické cílové mRNA vlákno. Díky těmto mechanismům je lidská miRNA navázaná na komplex RISC schopna najít a navázat svoji cílovou mRNA téměř 10x rychleji, než by bylo možné bez vazby na RISC (Ameres et al., 2007).

K vyhledání a vazbě na cílovou mRNA je použita jen volná část vlákna miRNA zvaná „seed region“, která je přichycena k proteinu Ago téměř výlučně pomocí své fosfodiesterové opory a báze jsou z prostoru volně přístupné (Ameres et al., 2007). Tento nejdůležitější region se nachází na 5'konci miRNA a zahrnuje 2.–7.(8.) bázi (Bartel et al., 2009). Na tuto sekvenci se principem komplementarity bázi naváže nejčastěji 3'UTR (3'nepřekládaná oblast) cílové mRNA, ale k navázání může dojít i v jiném místě (Siomi et Siomi, 2010). Je však typické, že komplementarita vláken miRNA a cílové mRNA nebývá úplná. Pokud je shoda absolutní a vazba vykazuje plnou komplementaritu, dochází k destrukci molekuly mRNA. Tento jev je však častější u nižších obratlovců. U savců je běžnější neúplná komplementarita bázi, kde dochází k inhibici translace, ale nikoli k destrukci cílové mRNA (Dangwal et al., 2011).

Po navázání cílového vlákna mRNA je dalším krokem mechanismus inhibice translace. Pokud vykazují vlákna plnou kompatibilitu v centrální části miRNA (nukleotid 9-11), pak může být cílová mRNA rozštěpena endonukleázovou aktivitou Ago2 proteinu. Většina lidských miRNA však postrádá plnou komplementaritu s mRNA v centrální oblasti a štěpení je mnohem komplikovanější. Ago protein je pak začleněn do komplexu cytoplasmatických P tělísek, kde dochází k odstranění poly(A) konce mRNA. Bez poly(A) konce je mRNA méně stabilní a eventuálně může dojít i k jejímu rozpadu. I pokud však zůstane nerozštěpena, nemůže mRNA bez poly(A) konce nasednout na ribozom, a tudíž nemůže dojít k její translaci v protein (Fabian et Sonenberg, 2012).

Mechanismus RNA interference za účasti miRNA utlumuje translaci a snižuje genovou expresi napříč lidským organismem. Existuje řada výzkumů, které prokazují, že expresní profil určitých miRNA v periferní krvi je specifický pro různá onemocnění (Calin et Croce, 2006; Chan et al., 2010). Mezi jinými je například popsán i profil kardiovaskulárních miRNA exprimovaných v periferní krvi těhotných žen s různými těhotenskými komplikacemi (Hromadníková et al., 2016).

1.1.4. Vybrané miRNA a jejich mechanismy působení v organismu

Je obecně známo, že různé miRNA vykazují zvýšenou či sníženou hladinu v periferní krvi pacientů s různými kardiovaskulárními onemocněními. Každá z 29 miRNA zkoumaných v této práci má svůj vlastní profil výskytu snížených či zvýšených hladin u různých onemocnění kardiovaskulárního systému, jako je ateroskleróza, arytmie, srdeční hypertrofie, infarkt myokardu, trombotické stavy nebo ischemická choroba srdeční (Zhao et al., 2007; Wu et al., 2015; Pueyo et al., 2000; Tatsuguchi et al., 2007). Níže jsou uvedeny detailní informace o funkcích vybraných miRNA a významu jejich dysregulací. Základní informace o všech miRNA zkoumaných v této studii pak shrnuje tabulka 1 (str. 23-24).

MiR-1 specificky exprimovaná ve svalové tkáni má velký význam ve vývoji srdce a kardiovaskulárního systému. Experimenty na myších modelech potvrdily, že dysregulace genové exprese miR-1 oběma směry (down-regulace i up-regulace) jsou neslučitelné se správným vývojem kardiovaskulární soustavy. Při zvýšené expresi této miRNA v embryonální fázi vývoje se u myši vyvinuly srdeční komory se ztenčenými stěnami a tato vada vyústila v srdeční selhání (Zhao et al., 2005). U modelů s kompletně zablokovanou genovou expresí miR-1 se vyskytly dva odlišné fenotypy. U poloviny těchto modelů byly pozorovány vážné defekty přepážky oddělující srdeční komory. U druhé poloviny modelů bez strukturálních abnormalit srdce docházelo k náhlým úmrtím kvůli chybné repolarizaci srdce a nedokonalému vedení vzruchů převodním systémem srdečním (Zhao et al., 2007). Stejně, jako ve vývoji kardiovaskulárního systému, miR-1 hraje roli při rozvoji řady kardiovaskulárních onemocnění. Jelikož tato miRNA reguluje geny pro iontové kanály a geny pro proteiny klíčové k mezibuněčné komunikaci (*KCNJ2* a *GJA1*), genová exprese miR-1 limituje potenciál vzniku srdeční arytmie. Nadměrná genová exprese této miRNA je mimo to pozorována u pacientů s onemocněním koronárních tepen a u zvířecích modelů s experimentálně vyvolaným infarktem myokardu (Yang et al., 2007), u lidských pacientů s infarktem myokardu je také pozorována výrazná up-regulace (Ai et al., 2010). U myších modelů je dále prokázána souvislost genové exprese miR-1 s hypertrofií srdce. Mir-1 negativně ovlivňuje geny spojené s hypertrofií, jako je například gen pro cyklin-dependentní kinázu 9. Proto byla u modelů s hypertrofií pozorována down-regulace miR-1

(Sayed et al., 2007). Další pozorovanou funkcí miR-1 je například i regulace genové exprese lidského genu *EDN-1*, který kóduje endotelin 1. Tento protein je produkován buňkami endotelu a má vasokonstriční účinky, miR-1 způsobuje snížení produkce tohoto endotelinu (Jacobs et al., 2013).

MiR-17 je miRNA působící jako regulátor exprese řady genů v lidském organismu. Jednou z klíčových funkcí této miRNA je regulace buněčného cyklu, a to pomocí usměrňování exprese více než 20 genů, které řídí přechod buňky z G1 do S fáze buněčného cyklu (Cloonan et al., 2008). Up-regulace miR-17 v lidských endotelových buňkách také souvisí se zvýšenou hladinou cytokinu TNF (tumor nekrotizující faktor) (Suárez et al., 2010). MiR-17-5p je mimo to prokazatelně up-regulovaná u pacientů s akutní ischemickou cévní mozkovou příhodou, a to tak výrazně a stabilně, že je zvažováno její využití jako biomarkeru tohoto onemocnění (Wu et al., 2015). Také je prokázána zvýšená genová exprese miR-17 u pacientů s hepatocelulárním karcinomem, u kterých je nadměrná genová exprese miR-17 spojena se zhoršenou prognózou přežití (Zheng et al., 2013). Oproti tomu snížení genové exprese miR-17 je pozorováno u pacientů s onemocněním koronárních tepen (Fichtlscherer et al., 2010). Down-regulace miR-17 je pozorována například i s věkem, což pravděpodobně souvisí s jednou z cílových molekul miR-17, kterou je mRNA vznikající transkripcí genu pro inhibitor cyklin-dependentní kinázy *p21/CDKN1A*. Čím méně je exprimována miR-17, tím více se tvoří tento inhibitor, který zpomaluje buněčný cyklus (Hackl et al., 2010). MiR-17 má tedy rozporuplné funkce, jelikož reguluje jak geny způsobující proliferaci, tak geny utlumující proliferaci. Stejně tak se účastní regulace onkogenů i genů suprimujících tumorigenezi (Cloonan et al., 2008).

MiR-155-5p je miRNA s mnoha funkcemi, která je exprimována v buňkách endotelu, cévních hladkosvalových buňkách, dendritických buňkách, lymfocytech, neutrofilech a makrofázích. Tato miRNA má kontroverzní úlohu při ateroskleróze. Někteří autoři uvádějí, že působí proti hromadění plaku v cévách a tlumí zánětlivou reakci organismu (Ma et al., 2013), jiní uvádějí, že přímo podporuje vznik aterosklerózy represí tvorby proteinu BCL6 v makrofázích (Nazari-Jahantigh et al., 2012). Dysregulace genové exprese miR-155 je také popsána u pacientů s hypertenzí. V systému renin-angiotenzin-aldosteron regulujícím krevní tlak je hlavním aktérem angiotenzin II, který má velký vliv na vlastnosti endotelových buněk. Například u nich indukuje produkci adhezních molekul, jako jsou VCAM a ICAM (vaskulární adhezní molekuly a intercelulární adhezní molekuly), a to tak, že aktivuje transkripční faktor, protein Ets-1 (Pueyo et al., 2000). Právě tvorba faktoru Ets-1 je však regulována pomocí miR-155, nebo také miR-221 a miR-222, které jsou exprimovány v buňkách endotelu. Nadměrná exprese miR-155 proto snižuje tvorbu adhezních molekul a na endotelové buňky má protektivní vliv (Zhu et al., 2011). To může být důvod, proč je u pacientů s onemocněním koronárních tepen pozorována down-regulace miR-155 (Fichtlscherer et al., 2010). Oproti tomu ale někteří autoři uvádějí, že up-regulace miR-155 je markerem endotelové dysfunkce. MiR-155 totiž tlumí tvorbu endoteliálního enzymu eNOS, který je klíčový pro tvorbu oxidu dusnatého v endotelových buňkách. Oxid dusnatý (NO) je důležitý pro správný tonus cév, a obecně pro správnou funkci endotelu, jeho nedostatek je proto brán za negativní jev provázející dysfunkci endotelové tkáně (Sun et al., 2012).

miR-499 je miRNA vznikající z intronu lidského genu *Myh7b*, který nese informaci pro tvorbu těžkého řetězce myosinu. MiR-499 je velice konzervativní miRNA, která se vyskytuje napříč živočišnými druhy. Funkcí miR-499 je inhibice proliferace progenitorových buněk kardiomyocytů a podpora diferenciaci těchto buněk (Chen et al., 2014). Obecně miR-499 podporuje diferenciaci kmenových buněk srdce v maturované kardiomyocyty a tím napomáhá zotavení myokardu a nápravě případného poškození (Hosoda et al., 2011). Také je známo, že tato miRNA svou činností zvyšuje produkci transkripčních faktorů, jako jsou například SRF a MEF2. Tím způsobí v kardiomyocytech zvýšení exprese genů kódujících

kontraktilní proteiny cytoskeletu, jako jsou například aktinová filamenta, což také napomáhá regeneraci (Wang et al., 2011). Je prokázáno, že hladiny miR-499 cirkulující v periferní krvi prudce narůstají v souvislosti s infarktem myokardu. Již jednu hodinu po prvních příznacích bolesti na hrudi byla v krevní plasmě pacientů s následným akutním infarktem myokardu významně zvýšená exprese této miRNA a v průběhu následujících 9 hodin genová exprese stále postupně stoupala (Zhang et al., 2015). Také je prokázáno, že u nestabilní anginy pectoris nedochází k elevaci hladin miR-499. Nestabilní angina pectoris má obdobné klinické symptomy jako infarkt myokardu, ale nedochází při ní k úplné obstrukci tepen, a tudíž ani k nekróze srdeční tkáně. Z periferní krve pacientů je tedy možné analýzou genové exprese miR-499 nestabilní anginu pectoris od infarktu myokardu rozeznat. V neposlední řadě množství miR-499 v periferní krvi odráží i míru poškození myokardu. Expresní profil této miRNA tedy může podat cennou informaci o závažnosti a rozsahu nekrózy srdečního svalu při infarktu myokardu, ale třeba i o míře obstrukce koronárních tepen při onemocnění koronárních tepen (CAD) (Chen et al., 2015).

Je klíčové pochopit složitou funkci, kterou každá miRNA má, aby bylo možno využít jejich hladiny genové exprese jako neinvazivního biomarkeru pro různá onemocnění kardiovaskulárního systému. MiRNA obecně mají v tomto směru obrovský potenciál využití. V tabulce 1 je znázorněn souhrn všech miRNA, jejichž exprese byla v této studii zkoumána. U každé z nich jsou rozvedené doplňující informace o funkci konkrétních miRNA v lidském těle, které tkáně a buňky je exprimují a již objevené konsekvence s kardiovaskulárními onemocněními.

Tabulka 1 (1. část): Zkoumané kardiovaskulární miRNA a jejich funkce

Kardio- vaskulární miRNA	Informace o funkcích a interakcích miRNA
miR-1-3p	exprese ve svalových buňkách, experimentální up-regulace u onemocnění koronárních cév a infarktu myokardu, anti-aterosklerotický účinek, zamezuje hypertrofii (Nishiguchi et al., 2015); prodlužuje repolarizaci membrány buňky (Ono et al., 2011)
miR-16-5p	anti-angiogenní účinek, indukuje apoptózu (Cimmino et al., 2005)
miR-17-5p	exprese v buňkách endotelu; reguluje angiogenezi (Suárez et al., 2008) up-regulace u ischemické cévní mozkové příhody (Wu et al., 2015), up-regulace u nádorových onemocnění (Zheng et al., 2013)
miR-20a-5p	potlačuje angiogenezi, down-regulace při hypoxii (Hua et al., 2006), up-regulace u tumorů (Dews et al., 2006)
miR-20b-5p	kontroverzní role v nádorových procesech, up-regulace u karcinomu žaludku (Xue et al., 2015), tumorsupresor pro karcinom ledvin (Li et al., 2016), suprimuje angiogenezi, down-regulace při hypoxii (Hua et al., 2006)
miR-21-5p	zvyšuje proliferaci hladkosvalových cévních buněk; snižuje apoptózu u všech buněk cévní stěny (Ji et al., 2007), snižuje rozsah nekrózy u infarktu myokardu, up-regulace při selhání srdce (Thum et al., 2008)
miR-23a-3p	indukuje srdeční hypertrofii (Lin et al., 2009)
miR-24-3p	exprese v endotelových buňkách, reguluje jejich proliferaci, diferenciaci, apoptózu a zánětlivou odpověď (Chen et Ou, 2016)
miR-26a-5p	předpokládaná tumor-supresorová miRNA, down-regulace u infarktu myokardu a u atriální fibrilace, pozitivní účinek na kardiovaskulární systém (Hsu et al., 2014; Liu et al., 2014)
miR-29a-3p	exprese v cévních hladkosvalových buňkách, snižuje tvorbu elastinu a kolagenu, up-regulace věkem a při ateroskleróze (Boon et al., 2011), inhibice fibrózy okrajů oblastí zasažených infarktem myokardu (Van Rooij et al., 2008b)
miR-92a-3p	exprese v endotelových buňkách, reguluje angiogenezi a růst endotelu, down-regulace v cévách s laminárním prouděním (Fernández-Hernando et Baldán, 2013)
miR-100-5p	up-regulace u aterosklerózy, destabilizuje plak (Cipollone et al., 2011)
miR-103-3p	snižuje reakci na inzulin, up-regulace u obezích (Trajkovski et al., 2011)
miR-125b-5p	down-regulace při kalcifikaci cév, inhibována při formování aterosklerotického plaku (Goettsch et al., 2011)
miR-126a-3p	exprese v endotelových buňkách, kontroluje zánětlivé procesy, snižuje produkci adhezních molekul, snižuje propustnost endotelu pro leukocyty, vyskytuje se v apoptotických tělískách, limituje aterosklerózu (Harris et al., 2008)

Tabulka 1 (2. část): Zkoumané kardiovaskulární miRNA a jejich funkce

Kardio- vaskulární miRNA	Informace o funkcích a interakcích miRNA
miR-130b-3p	tlumí zánětlivé procesy v cévní stěně, tlumí tumorigenní faktory (Wang et al., 2017)
miR-133-3p	inhibuje cyklickou aktivitu hladkosvalových buněk, zabraňuje vzniku srdeční hypertrofie (Liu et al., 2008)
miR-143-3p	určuje plasticitu a kontraktlní schopnost cévních hladkosvalových buněk, down-regulace při ateroskleróze (Cordes et al., 2009)
miR-145-5p	určuje diferenciaci, plasticitu a kontraktlní schopnost cévních buněk hladkého svalstva, down-regulace při ateroskleróze (Cordes et al., 2009)
miR-146a-5p	exprese v buňkách endotelu, snižuje počet endotelových buněk vykazujících známky senescence, down-regulace věkem (Vasa-Nicotera et al., 2011), protizánětlivé účinky (Cheng et al., 2013)
miR-155-5p	exprese v endotelových buňkách a cévních hladkosvalových buňkách; snižuje účinky angiotenzinu II, působí na uvedené buňky protektivně, podporuje růst plaku, down-regulace u pacientů s onemocněním koronárních tepen (Nishiguchi et al., 2015)
miR-181a-5p	reguluje aktivaci endotelových buněk, snižuje zánětlivou reakci (Fernández-Hernando et Baldán, 2013)
miR-195-5p	up-regulace při hypertrofii, způsobuje patologický nárůst srdečního svalu (Van Rooij et al., 2006)
miR-199a-5p	up-regulace při hypertrofii, inhibuje apoptózu u infarktu myokardu, down-regulace při hypoxii (Rane et al., 2009), snižuje proliferaci hladkosvalových buněk (Gheinani et al., 2015)
miR-210-3p	ovlivňuje endotelové buňky, reguluje novotvorbu kapilár, up-regulace při hypoxii (Chan et Loscalzo, 2010), nebo při selhání srdce (Ono et al., 2011)
miR-221-3p	exprese v buňkách endotelu, inhibuje jejich proliferaci (Liu et al., 2009), snižuje migraci endotelových progenitorových buněk, pro-aterosklerotický účinek (Nishiguchi et al., 2015)
miR-342-3p	tlumí růst, proliferaci a migraci buněk v nádorových procesech (Xue et al., 2018)
miR-499-5p	up-regulace při infarktu myokardu, zvažovaný diagnostický nástroj (Zhang et al., 2015)
miR-574-3p	<i>in vitro</i> tlumí růst buněk (Ishikawa et al., 2014), reguluje kontraktilitu myokardu, up-regulace v myokardu po zasažení infarkem (Boštjančič et al., 2012)

1.2 Onemocnění kardiovaskulárního systému a konsekvence s dysregulovaným expresním profilem miRNA

Kardiovaskulární systém v lidském organismu komunikuje se všemi orgánovými soustavami a zastává nejdůležitější roli v transportu látek, zásobení tkání a odvodu škodlivin. Jeho zdraví je proto pro organismus naprosto zásadní. V dnešní době jsou však v civilizovaném světě právě onemocnění kardiovaskulárního systému v čele s aterosklerózou hlavní příčinou morbidit a mortality (Kumar et al., 2014). Na vině je životní styl západních zemí, který způsobuje až pandemii obezity, diabetu mellitu 2. typu, hypercholesterolemie a hypertenze, tedy jevů významně zvyšujících pravděpodobnost patologických změn srdečně-cévního systému (Kumar et al. 2014; Tabas et al., 2015)

1.2.1. Ateroskleróza

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění cévní stěny, které je základní příčinou dalších kardiovaskulárních patologií. Principem vzniku aterosklerózy je postupné hromadění lipoproteinového plaku v sub-endoteliálním prostoru intimy cév, na což imunitní systém reaguje zánětlivou odpovědí (Libby et al., 2002).

Je prokázáno, že aterosklerotické plaky se nejčastěji tvoří ve středně velkých cévách v místech s vířivým prouděním krve, tedy v místech, kde se cévy větví a zatáčejí, přičemž rovné úseky s laminárním prouděním zůstávají bez patologických změn (Tabas et al., 2015). V počáteční fázi se v predispozičních místech s dysfunkcí endotelu dostávají do intimy cév lipoproteiny, hlavně v podobě cholesterolu. Jejich přítomnost stimuluje vstup monocytů, které se diferencují v makrofágy a cholesterol pohlcují. Stávají se z nich takzvané „pěnové buňky“, které zůstávají v intimě cévy a intracelulárně hromadí cholesterol. Zánětlivou reakci pak podporují sekretované cytokiny a chemokiny, které ovlivňují ostatní imunitní buňky a přispívají k chronickému narůstání plaku (Hartmann et al., 2015; Feinberg et Moore, 2016). V další fázi zánětlivé agens stimuluje buňky hladké svaloviny v cévní stěně (VSMC- „vascular smooth muscle cell“), které podléhají fenotypovým změnám a začnou tvořit kolagenní a elastická vlákna. Zároveň narůstá množství tukové tkáně zadržované extracelulárně v prostoru mezi

pěnovými buňkami, až vzniká lipidové jádro plaku. Ve finální podobě patologický útvar obsahuje rozsáhlé lipidové jádro, velké množství pěnových buněk, pozměněné VSMC a množství buněk imunitních, to vše zpevněné pouzdrém z kolagenních a elastických vláken, kterými VSMC buňky plak obalují (Tabas et al., 2015). V závažných případech může mít plak i nekrotizované jádro z odumřelých buněk. Jako taková ale jakákoli léze v lumen cév překáží toku krve a může způsobit ischemii různých orgánů. Největším nebezpečím však vždy byla (Fuster et al., 1990) a stále je ruptura plaku, uvolnění obsahu a následná trombóza (Bennett et al., 2016).

Endotelové buňky u zdravého kardiovaskulárního systému vytváří dynamické rozhraní, které komunikuje s krví, reaguje na humorální i mechanické stimuly a přispívá k homeostáze cévního systému (Tabas et al., 2015). Odolává delšímu kontaktu s leukocyty, produkuje endogenní vasodilatační molekuly, působí preventivně vůči trombóze a napomáhá fibrinolýze (Libby et al., 2010). Jakékoli fenotypové změny endotelových buněk proto představují potenciální riziko vzniku různých kardiovaskulárních chorob, včetně aterosklerózy. V predispozičních místech krevního řečiště jsou endotelové buňky vystaveny rozdílným biomechanickým silám a snadněji v průběhu času podléhají právě patologickým fenotypovým změnám, ztrácí své protektivní vlastnosti, a naopak vykazují znaky senescence až apoptózy (Tabas et al., 2015; Bennett et al., 2016). Následkem toho je LDL („low-density lipoprotein“) cholesterol snáze propouštěn do sub-endotelového prostoru (Tabas et al., 2015).

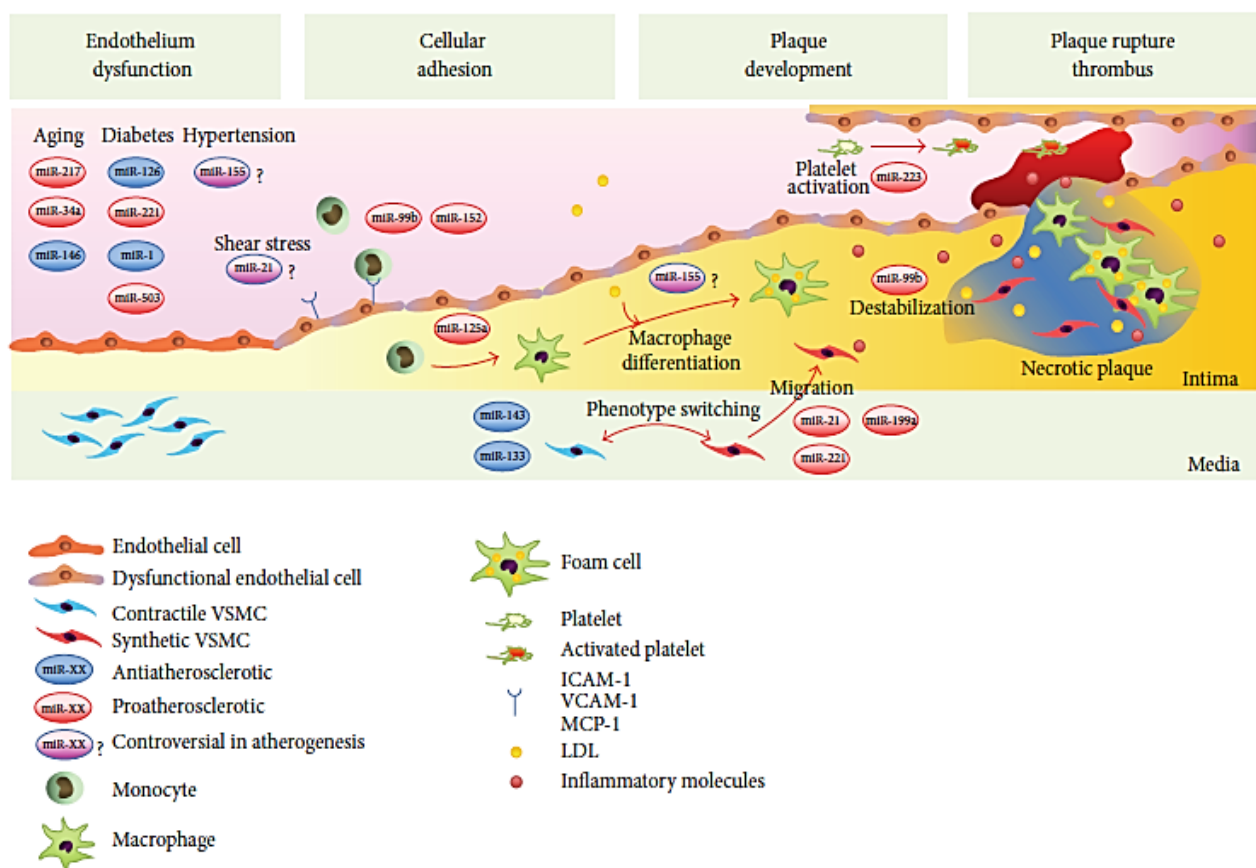
Zvýšené množství LDL cholesterolu pod vrstvou endotelu iniciuje tvorbu monocytů v kostní dřeni, jejich zrání ve slezině a následně vstup do cévní stěny v místech lézí. Zde se diferencují v makrofágy, které pohlcují a zadržují lipoproteiny. Nejnovější studie předpokládají, že navzdory původním předpokladům jsou makrofágy v aterosklerotických lézích schopny proliferace. Zvětšující se množství zadržovaného cholesterolu provokuje vstup dalších monocytů a společně s prostupem dalších lipoproteinů narůstá i aterosklerotická léze (Tabas et al., 2015). Snížená obranyschopnost plaků také umožňuje osídlení bakteriemi a viry, nebo jinými infekčními agens, jako je například *Chlamydia pneumoniae*. To vše zhoršuje průběh aterosklerózy. Kromě počátečních fází a

vytváření plaku se monocyty také uplatňují v akutní fázi aterosklerózy, po které následuje destabilizace plaku, ruptura a formace trombu. V případě, že dojde k trombóze koronárních cév, monocyty se ve fázi hypoxie usazují v místě poranění do myokardu. Zde pak pravděpodobně podporují akumulaci myofibroblastu, angiogenezi, remodelaci a uzdravení myokardu (Ghattas et al., 2013).

Na vzniku aterosklerózy mají podíl i cévní buňky hladkého svalstva (VSMC) a jejich fenotypové změny. Přestávají produkovat markery typické pro zdravé VSMC, jako je těžký řetězec myozinu, nebo takzvaný „smoothelin“, protein specifický pro cytoskelet buněk hladkého svalstva (Van Der Loop et al., 1996). Oproti tomu vykazují vyšší míru migrace, proliferace a syntézu extracelulární matrix, proteinů a cytokinů. Pozměněné VSMC také mohou nabýt takové vlastnosti, které připomínají aktivitu makrofágů. Mají však sníženou kapacitu fagocytózy a od monocytů, makrofágů a dendritických buněk se stále zásadně liší. Tyto VSMC mohou být důvodem, proč je v pokročilé aterosklerotické lézi snížená fagocytóza a dochází k nekróze jádra. Pozitivně ale na plak působí migrační schopnost VSMC, kterým je umožněn přestup z medie do intimy cévy, kde pomáhají vytvářet fibrilární pouzdro a udržet stabilitu plaku (Bennett et al., 2016).

Ateroskleróza je běžným onemocněním cévní stěny, které narůstá s věkem a významně přispívá ke vzniku ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu a cévní mozkové příhody. Dnes běžné metody léčby zahrnují snížení LDL cholesterolu v krvi nebo odhalování kritických lézí pomocí zobrazovacích metod (CT, SPECT) (Khawaja et al., 2015). Vzhledem k pokrokům na poli výzkumu je však pravděpodobné, že bude brzy možno využívat cirkulujících miRNA jako neinvazivních biomarkerů pro diagnostiku aterosklerózy a případně i léčit toto onemocnění pomocí regulace jejich genové exprese (Feinberg et Moore, 2016).

Obrázek 2: Schéma vzniku aterosklerotického plaku a úloha miRNA



Obrázek 2: Formování aterosklerotického plaku v cévní stěně, úloha jednotlivých buněk a vliv miRNA, zdroj Nishiguchi et al., 2014

Na vznik aterosklerózy a na průběh tohoto onemocnění u pacientů mají miRNA cirkulující v periferní krvi významný vliv. Proto je u zvířecích modelů a aterosklerotických pacientů prokázáno široké spektrum miRNA vykazujících dysregulaci v periferní krvi. Jedná se o miRNA exprimované v endotelových buňkách, cévních hladkosvalových buňkách, imunitních buňkách, nebo například v kardiomyocytech a adipocytech (Cordes et al., 2009; Tatsuguchi et al., 2007). V endotelových buňkách exprimované miRNA působící protektivně proti vzniku aterosklerózy, mají protizánětlivý účinek a snižují migraci endotelových buněk. V zónách s vířivým prouděním krve některé tyto protektivní miRNA vykazují down-regulaci, v cévách s laminárním prouděním up-regulaci. Do této kategorie spadá například miR-10a, miR-23b a miR-101 (Fang et al., 2010; Wang et al., 2010 b; Chen et al., 2012). Naopak dysfunkci endotelu způsobují miRNA potlačující

angiogenezi nebo miRNA s prozánětlivým působením. *In vitro* i *in vivo* jsou v oblastech s vířivým prouděním krve pozorovány up-regulace těchto rizikových miRNA. Jedná se například o miR-17, miR-19a/b, miR-20a, miR-92a, miR-663 (Wang et al., 2010 b; Wu et al., 2011; Ni et al., 2011). Další miRNA ovlivňují funkci endotelu a cévních hladkosvalových buněk bez ohledu na mechanické působení proudu krve v cévách. Protektivní vliv na funkci endotelové bariéry mají miR-1, miR-146 a miR-181 (Wang et al., 2013; Cheng et al., 2013; Sun et al., 2013), protektivně na cévní buňky hladkého svalstva působí například miR-195 (Wang et al., 2012). Riziková pro rozvoj aterosklerózy je oproti tomu up-regulace miR-342-5p stimulující zánětlivou reakci makrofágů, nebo up-regulace miR-33, která také hraje významnou roli při zánětlivé reakci v cévní stěně (Rayner et al., 2011).

1.2.2. Trombóza

Trombóza je stav, kdy dochází k obstrukci arterií nebo vén sraženinou různého původu a složení, čímž dochází k nedostatečnému krevnímu zásobení různých částí těla.

Arteriální trombóza vzniká za účasti aktivovaných trombocytů a fibrinu často ve spojení se zánětlivým procesem v cévní stěně, což vysvětluje, proč mají pacienti se zvýšeným CRP (C-reaktivní protein) nebo hladinou leukocytů, neutrofilů a monocytů větší riziko vzniku ischemie způsobené trombózou. Významnou roli hraje také aktivovaný koagulační faktor II (trombin), který je klíčový pro aktivaci trombocytů a formaci fibrinu. Přítomnost plaku v arteriích zvyšuje produkci trombinu a tím i riziko vzniku arteriální sraženiny (Sexton et Smyth, 2014). Finálně arteriální trombóza většinou vede k ischemii orgánů, jejich nekróze a dysfunkci. To představuje velké zdravotní riziko obzvláště při zasažení srdce, kdy může dojít až k městnavému srdečnímu selhání, nebo při obstrukci cerebrální arterioly, kdy vzniká cévní mozková příhoda (Levi et al., 2011).

Venózní tromboembolismus (VTE) také představuje riziko poškození orgánů, které je ale způsobeno hromaděním odkysličené krve, což vede k přetížení, otokům a bolestem (Levi et al., 2011). K obstrukci může dojít téměř ve kterékoli větě. Nejčastěji jsou postiženy hluboké žíly dolních končetin (DVT), ale

tromboembolický stav může postihnout i plicní žíly, venu portae, žíly ledvin, jater a mesenteria, povrchové žíly, nebo žíly cerebrální (Heit et al., 2016). Příčinou vzniku tromboembolie může být vrozená trombofilie, imobilita pacienta, změny ve složení krve, nebo trauma cévní stěny v důsledku chirurgických intervencí. Také je prokázáno zvýšené riziko vzniku při současném výskytu maligních onemocnění (Sexton et Smyth, 2014; Heit et al., 2016). Léčba je možná pomocí antikoagulační terapie, statinů nebo podáním aspirinu, který má protizánětlivé účinky. Zánětlivá reakce vedoucí k poškození cévní stěny může provázet i žilní trombózu (Sexton et Smyth, 2014).

Navzdory rozdílnostem existuje několik konsekvencí spojujících arteriální a venózní trombózu. Už v roce 2003 byl popsán zvýšený výskyt aterosklerózy a jiných arteriálních komplikací u pacientů s VTE (Prandoni et al., 2003). Také je prokázáno, že trombofilní mutace mimo zvýšené riziko tromboembolie napomáhá i rozvoji aterosklerózy, a naopak mikroalbuminurie typicky řazená k rizikovým faktorům arteriální trombózy současně způsobuje i VTE (Levi et al., 2011).

Vzhledem k tomu, že arteriální trombóza vzniká nejčastěji na podkladě aterosklerózy, dysregulační profil miRNA je zde pravděpodobně shodný (Bennett et al., 2016). Například miR-100-5p, která destabilizuje aterosklerotický plak a bývá up-regulována u aterosklerózy (Cipollone et al., 2011), může představovat riziko i pro vznik arteriální trombózy. U pacientů s venózním tromboembolismem je oproti tomu prokázána například up-regulace miR-582, miR-195 a miR-532, které mají potenciál využití jako neinvazivní biomarkery pro VTE (Qin et al., 2015).

1.2.3. Onemocnění koronárních tepen (CAD) a ischemická choroba srdeční (IHD)

Onemocnění koronárních tepen (CAD) spočívá ve snížení průtoku koronárních tepen nejčastěji na podkladě přítomnosti aterosklerotického plaku. Jedná se o jednu z hlavních příčin úmrtí v západních zemích (Libby et al., 2002). Pokud je průtok koronárními tepnami snížen natolik, že dochází k nedostatečnému zásobení kardiomyocytů, jedná se o ischemickou chorobu srdeční (IHD) (Rosenman, 1982). Ischemie srdečního svalu je stav, kdy je kvůli nedostatečnému

zásobení kyslíkem snížená schopnost kontrakce srdečního svalu, který tak není schopen dostatečně zásobit krví ostatní tkáň. Intenzita ischemie se může různit, nejzávažnější je absolutní obstrukce koronárních tepen a nekróza srdeční tkáň neboli infarkt myokardu (Meade et al., 1986).

Snížený průtok koronárních cév může mít různé příčiny. Často je při ischemii pozorována stenóza nebo ateroskleróza a následná trombóza věnčitých tepen. Jsou ale také případy ischemií, při kterých není pozorována obstrukce, zúžení cév, ani jiná patrná příčina snižující průtok krve. V těchto případech je příčina patrně na úrovni koronární kapilární sítě (Petersen et Pepine, 2015). Mezi ischemické poruchy srdeční se řadí i angina pectoris charakteristická svíravou bolestí na hrudi. Obecně angina pectoris i jakákoli ischemická porucha může mít stabilní, nebo akutní charakter. Stabilní forma se zpravidla projevuje při zvýšené zátěži organismu a po snížení zátěže odeznívá. Akutní forma se objevuje náhle a mává závažnější charakter, dnes způsobuje polovinu ze všech kardiovaskulárních úmrtí (Stecker et al., 2014).

U pacientů s onemocněním koronárních tepen a ischemickou chorobou srdeční je také prokázán specificky dysregulovaný profil genové exprese miRNA cirkulujících v periferní krvi. Většinou se jedná o miRNA exprimované v buňkách cévní stěny a nejčastěji v endotelových buňkách. Down-regulace u pacientů s onemocněním koronárních tepen byly nalezeny například u miR-126, miR-17, miR-20a, miR-92, miR-21 a miR-221. Oproti tomu byly v porovnání se zdravými kontrolami nalezeny up-regulace miR-133a a miR-208a, které jsou typicky exprimovány ve svalech. (Fichtlscherer et al., 2010). Jako společný fenomén ischemických onemocnění, u kterých již dochází k zasažení tkáň myokardu (ischemická kardiomyopatie, dilatační kardiomyopatie, aortální stenóza) je označena výrazná up-regulace miR-214 související s hypertrofií a down-regulace miR-19 (Ikeda et al., 2007).

1.2.4. Infarkt myokardu (IM)

Akutní infarkt myokardu je život ohrožující stav dysfunkce koronárního zásobení a nekrózy srdeční tkáně. K příznakům se řadí bolesti na hrudi vystřelující do levého ramene a ruky, zvýšená kreatinkináza v séru a typické změny křivek na EKG. V roce 2007 byla definice upravena a k diagnóze byla místo kreatinkinázy doporučena hladina troponinů, jako markerů nekrózy myocytů (Yasuda et Shimokawa, 2009).

Pokud je infarkt myokardu zaznamenán včas, lze jej léčit reperfuční terapií. Ta spočívá v obnovení průtoku koronárních cév buď pomocí trombolýzy (Anzai et Ogawa, 2002), nebo perkutánní intervencí a mechanickým uvolněním cév. Jako prevence proti vzniku infarktu, nebo jeho recidivě, je možné rizikový plak v koronárních cévách chirurgicky odstranit, zavést stent (Yasuda et Shimokawa, 2009), nebo aplikovat antiagregační léčbu spočívající v blokaci shlukování trombocytů (Antiplatelet trialists' collaboration, et al., 1994). Obecná prevence vzniku infarktu je v praxi totožná s prevencí vzniku jakéhokoli kardiovaskulárního onemocnění, patří sem pravidelná fyzická aktivita, normální hladina cholesterolu v krvi a zdravá životospráva. Naopak riziko představuje obezita, stáří a metabolické syndromy.

Expresní profil miRNA u pacientů s infarktem myokardu se zásadně liší od expresního profilu zdravých lidí. Studie 93 pacientů s akutním infarktem myokardu ukázala výrazně zvýšené hladiny genové exprese miR-1 v porovnání s kontrolní skupinou (Ai et al., 2010). Tato studie také potvrdila korelaci mezi expresním profilem miR-1 a abnormálním prodloužením QRS intervalu, který značí prodlouženou repolarizaci srdečních komor. Oproti tomu s fází plateau (segment ST na elektrokardiogramu), ani s hladinou kreatinkinázy MB (myokardiální izoenzym) dle této studie hladiny miR-1 nekorelují (Ai et al., 2010). Jiné studie potvrzují souvislost hladin genové exprese miR-1 a akutním infarktem myokardu, ale oproti Ai et al., 2010 tvrdí, že existuje pozitivní korelace mezi hladinou genové exprese miR-1 a hladinou enzymu kreatinkinázy MB (Cheng et al., 2010). Dále existují studie prokazující dysregulaci hladin dalších miRNA u pacientů s infarktem myokardu a elevací v ST segmentu. Up-regulace byly u těchto pacientů objeveny u

miR-133a, miR-208b a miR-499 (Wang et al., 2010 a), oproti tomu miR-122, miR-223 a miR-375 vykazovaly v periferní krvi těchto pacientů snížení hladin genové exprese (d'Alessandra et al., 2010; Corsten et al., 2010).

1.2.5. Srdeční hypertrofie

Hypertrofie srdečního svalu může být fyziologická, nebo na podkladu přítomné patologie. Fyziologická forma se vyskytuje například u výkonnostních sportovců. Patologická srdeční hypertrofie vzniká kvůli kompenzaci poškození srdeční tkáně, ale v konečném důsledku způsobuje dysfunkci levé komory srdeční (Levy et al., 1990). Hypertrofie je tak průvodním jevem mnoha forem onemocnění srdce, jako je hypertenze, nebo ischemická choroba srdeční (Rajabi et al., 2007). Je prokázáno, že různé miRNA vykazují dysregulaci v periferní krvi pacientů s hypertrofií srdeční tkáně v porovnání s fyziologickými kontrolami. Například je u pacientů i myších modelů s hypertrofií v srdeční tkáni pozorována up-regulace miR-21, miR-23a, miR-125, miR-195, miR-199 a miR-208 (Van Rooij et al., 2006; Cheng et al., 2007; Tatsuguchi et al., 2007) a down-regulace miR-1, miR-29, miR-133 a miR-181a (Sayed et al., 2007; Van Rooij et al., 2006; Ikeda et al., 2007). Navíc je prokázáno, že navozená over-exprese miR-195 je u myšího modelu dostačující k navození hypertrofie. Oproti tomu zvýšení genové exprese miR-181b, která bývá v hypertrofovaných kardiomyocytech down-regulovaná, vyústilo v redukci velikosti kardiomyocytů u myšího modelu (Van Rooij et al., 2006). Vzhledem k tomu, že manipulace s hladinami genové exprese jednotlivých miRNA byla dostačující ke změně fenotypu, předpokládá se u nich intenzivní ovlivňování srdečních funkcí.

1.2.6. Srdeční arytmie

Základem rytmických kontrakcí srdce jsou změny akčního potenciálu na povrchu buněk, který je modulován pomocí řady kanálů a transporterů kontrolujících pohyb K^+ , Na^+ a Ca^{2+} iontů přes membránu. To určuje čtyři fáze elektrické aktivity srdce. Klidovou fází střídá prudká repolarizace následkem vstupu Na^+ do buňky, ve fázi plateau je potenciál balancován vstupem Ca^{2+} a výstupem K^+ . Po vhodné časové prodlevě, která je usměrňována aktivitou kanálů dochází k další repolarizaci, po které opět nastává klidová fáze. Jedná se o

vyladěný systém, který ale kardiovaskulární onemocnění silně ovlivňují a způsobují takzvaný „arytmogenní proces“ zahrnující změny exprese genů kódujících klíčové proteinové struktury (Nattel et al., 2007). Dysfunkci iontových kanálů ale způsobuje i řada geneticky podmíněných dědičných onemocnění, jako je například syndrom dlouhého QT intervalu, nebo Brugadaův syndrom (Delisle et al., 2004).

Srdeční arytmie vzniká nepravidelnou činností srdečního svalu, nebo jeho části. Často je arytmie důsledkem infarktu myokardu, nebo ischemické choroby srdeční a vyskytuje se současně s těmito onemocněními (Janse et Wit, 1989). Oproti normálnímu sinusovému rytmu rozlišujeme spektrum arytmií, jako je předčasná atriální kontrakce, předčasná ventrikulární kontrakce, ventrikulární tachykardie nebo bradykardie a fibrilace komor. Obzvláště tachykardie a ventrikulární fibrilace významně zhoršují hemodynamiku a jsou život ohrožujícím stavem (Ge et al., 2002).

Podobně jako u ostatních kardiovaskulárních onemocnění je i u arytmií prokázán vliv miRNA a jejich dysregulovaný profil genové exprese. Například molekuly mRNA vznikající transkripcí genu *GJAI* (kóduje protein mezerového vodivého spoje „gap-junction“) a genu *KCNJ2* (kóduje podjednotku draslíkového kanálu) jsou cílem pro miR-1. Jedná se o klíčové molekuly pro excitaci a řízení membránového potenciálu. U zvířecích modelů byla při navození zvýšené exprese miR-1 pozorována významně snížená rychlost vedení, prodloužená repolarizace membrány a arytmogenní sklony. Vyvolaná down-regulace miR-1 vedla k optimalizaci genové exprese cílových genů a působila proti prolongaci QRS a QT intervalů na elektrokardiogramu (Yang et al., 2007).

1.2.7. Cévní mozková příhoda (CMP)

Cévní mozková příhoda (cerebrální ictus), je akutní porucha části mozkové tkáně, která vzniká selháním cévního zásobení. Buď je zásobení přerušeno obstrukcí dotčené přírodní tepny a nastává ischemie části mozkové tkáně, nebo následkem ruptury přírodní tepny dojde k vnitřnímu krvácení a degradaci nervové tkáně zasažené hemoragií (Mackay et al., 2004). Ictus se ročně vyskytne u 15 mil. lidí po celém světě, přičemž se z 87 % jedná o obstruktivní ischemickou formu. Každopádně, pokud je mozková tkáň připravena o dodávky kyslíku a glukózy a

není odplavován oxid uhličitý a odpadní produkty, nervové buňky velice rychle degradují. Následky ictu pak mohou být trvalá postižení a invalidita, i smrt (Lloyd-Jones et al., 2010; Dahwan et al., 2010).

Mezi nejčastější příčiny ictu patří v první řadě ateroskleróza, která tvoří plaky mimo jiné i v krčních a mozkových arteriích. Omezeným průtokem cévy vzniká cerebrální ischemie. Pokud se plak odtrhne a způsobí obstrukci menší cévy v jiném místě, jedná se o cerebrální embolii. K ateroskleróze se často přidává i hyperlipidemie a hypertenze, které nejen zhoršují aterosklerotický stav cév, ale i samy napomáhají vzniku mozkové příhody (Rink et Khanna, 2011).

Stejně jako ostatní uvedená kardiovaskulární onemocnění ovlivňují miRNA cirkulující v periferní krvi i centrální nervovou soustavu a jsou prokázanými biomarkery různých neurologických onemocnění (Liu et al., 2010). Mohou tedy přispívat i ke vzniku cévní mozkové příhody, nebo naopak působit protektivně. Patří mezi ně takové, které ovlivňují činnost a vlastnosti endoteliálních buněk a VSMC, ale i ty miRNA regulující aktivaci imunitního systému, formaci trombu a extravazaci leukocytů. Pro akutní i chronický ictus je společným fenoménem například down-regulace miR-19a a miR-320d a up-regulace miR-363 a miR-487b, které se právě těchto procesů účastní (Jickling et al., 2014). V manipulaci s expresním profilem rizikových miRNA vidí někteří autoři budoucnost genové terapie cévní mozkové příhody (Rink et Khanna, 2011).

1.3 Těhotenské komplikace

1.3.1. Gestační hypertenze

Gestační hypertenze (GH) je jednou z nejčastějších zdravotních komplikací vyskytujících se v těhotenství. Je charakteristická *de novo* zvýšeným krevním tlakem u matky, který byl před nástupem těhotenství normotensivní. Mezní hodnota krevního tlaku pro diagnózu je uváděna takto: systolický tlak ≥ 140 mm Hg a/nebo diastolický tlak ≥ 90 mm Hg (Sibai et al., 2003; Brown et al., 2001). Zvýšený krevní tlak musí být naměřen opakovaně, a to po 20. gestačním týdnem. Kromě zvýšení krevního tlaku se však při gestační hypertenzi nevyskytují žádné další komplikace (Brown et al., 2001).

Do zvláštní kategorie hypertenze v těhotenství se řadí matky, které již dříve měly krevní tlak zvýšený (Rath et Fischer, 2009; Brown et al., 2001). Takzvaná chronická hypertenze vzniká, pokud se zvýšení tlaku objeví buď ještě před otěhotněním, nebo v první polovině těhotenství. Pokud je příčina hypertenze známa, označujeme ji jako „sekundární hypertenzi“, pokud je však etiologie neznámá, nazýváme takovou hypertenzi jako „esenciální“ (Brown et al., 2001).

Děti narozené z těhotenství s gestační hypertenzí u matky se obvykle rodí v termínu a jejich porodní parametry nijak nevybočují z norem (Valensise et al., 2001). Gestační hypertenze jako taková však ovlivňuje kardiovaskulární systém matky a je prokázáno, že přítomnost hypertenze v těhotenství zvyšuje pravděpodobnost vzniku ischemické choroby srdeční, cévní mozkové příhody, infarktu myokardu, nebo selhání srdce v pozdějším věku matky (Männistö et al., 2013).

1.3.2. Preeklampsie

Preeklampsie (PE) je multisystémové onemocnění s velice variabilními projevy. Jde o těhotenskou komplikaci s individuální mírou závažnosti, která obzvláště v těžších případech může i v dnešní době znamenat značné riziko pro matku i plod (Redman et Sargent, 2005). O preeklampsii se jedná, pokud se ve druhé polovině těhotenství vyskytuje u pacientky zvýšený krevní tlak zároveň s proteinurií, tedy s přítomností nadměrného množství bílkovin v moči (Levine et al., 2004; Powe et al., 2011; Backes et al., 2011; Uzan et al., 2011).

V rozvinutých zemích se procento výskytu preeklampsie pohybuje mezi 3–5 % a řadí se mezi nejčastější příčiny jak maternální, tak fetální morbidity a mortality (Levine et al., 2004; Powe et al., 2011; Uzan et al., 2011). Sibai et al., 2005 uvádí, že 15–20 % úmrtí matek souvisejících s těhotenstvím a porodem způsobuje preeklampsie. Také se statisticky značnou měrou podílí na morbiditě dětí narozených matkám s PE, jelikož může způsobit jak předčasný porod, tak i intrauterinní růstovou restrikcí (IUGR), nebo perinatální smrt.

Příčiny vzniku a rizikové faktory

Klinické symptomy asociované s preeklampsii jsou pravděpodobně způsobeny reakcí těla matky na placentární faktory, které se uvolňují z placenty do krevního oběhu matky. Následně dochází k endoteliální dysfunkci vedoucí k hypertenzi a proteinurii (Levine et al., 2004). Hypertenze je přítomna z důvodu periferní vasokonstrikce a snížené plasticity cév. S proteinurií pak souvisí jev zvaný glomerulární endotelióza, který je charakteristický mohutněním a otékáním endotelové tkáně. V glomerulech následkem toho dochází ke ztrátě fenestrace a snížení glomerulární filtrace, což může v závažných případech vést až k selhání ledvin matky (Levine et al., 2004; Powe et al., 2011).

Vzhledem k dysfunkci placenty je onemocněním samozřejmě ovlivněn i plod. Při preeklampsii je do stěny dělohy cytotrofoblast nedostatečně zanořen a jeho buňky se nacházejí jen v povrchových vrstvách deciduy, oproti fyziologicky probíhajícímu těhotenství, kdy pronikají až do myometria. Při PE pak nedojde ke kontaktu buněk cytotrofoblastu s endotelem mateřských deciduálních arterií, které

se v důsledku toho nepřizpůsobí plodu svojí kapacitou. Jejich průtok zůstává malý a nedostačuje potřebám vyvíjejícího se plodu (Powe et al., 2011). Výsledkem je mimo jiné i malnutrice plodu, hypoxie a fetální růstová restrikce.

Bylo objeveno několik faktorů, které zvyšují riziko vzniku preeklampsie. Zejména se jedná o přítomnost preeklampsie při předchozím těhotenství, genetické faktory, vícečetná těhotenství, primiparitu, odlišnou paternitu u dalšího dítěte, dlouhý interval mezi těhotenstvími, přítomnost hypertenze ještě před otěhotněním, obezitu a věk matky nad 40 let. Naopak je dokázáno, že například kouření působí preventivně proti vzniku preeklampsie (Levine et al., 2004; Powe et al., 2011). Mnoho z rizikových faktorů pro vznik PE je i samo o sobě spojováno s kardiovaskulárními onemocněními, viz dále (Powe et al., 2011; Levine et al., 2004; Rath et Fischer, 2009).

Klasifikace závažnosti

Preeklampsie se rozděluje podle míry závažnosti klinických projevů na formu mírnou a závažnou. Klasifikace je založena na hodnotě tlaku krve a na množství bílkovin přítomných v moči. Aby se jednalo o preeklampsii, musí se všechny symptomy manifestovat po 20. gestačním týdnu (Levine et al., 2004; Powe et al., 2011; Backes et al., 2011). Dále jsou shrnuty základní podmínky klasifikace. K určení závažnosti se používá jak systolický tlak krve, tak tlak diastolický a míra proteinurie (Levine et al., 2004; Backes et al., 2011).

Mírná preeklampsie je definována jako krevní tlak $>140/90$ mmHg naměřený dvakrát s odstupem 4 hodin spojený s proteinurií nad 300mg/24 h. Závažnou formu PE pak podmiňuje výskyt jednoho nebo více následujících jevů: systolický tlak nad 160 mmHg, diastolický tlak >110 mmHg, oligurie s exkrecí moči pod 500ml/24h, proteinurie nad 500mg/24 h, trombocytopenie, přítomnost pulmonálního edému nebo cyanózy plic, narušená funkce jater, těžké bolesti hlavy a poruchy zraku, bolest v epigastru či v pravém horním kvadrantu, nebo závažná růstová restrikce plodu (ACOG practice bulletin, 2002).

Příznaky a průběh nemoci

Protože je preeklampsie systémové zánětlivé onemocnění, jsou projevy velmi variabilní. Jak je uvedeno výše, kromě zvýšení krevního tlaku a proteinurie není u těžších případů výjimkou, že jsou zasažena i játra a centrální nervový systém (CNS) matky. V případě zasažení jater může být příznakem i nauzea až zvracení a zvýšená hladina jaterních enzymů v krvi. Silná bolest hlavy, poruchy zraku a hyperreflexie mohou signalizovat zasažení CNS, jako například přítomnost cerebrálního edému. Pulmonální edémy nebo cyanóza a následné dýchací obtíže pak nejčastěji doprovází ty nejzávažnější případy a souvisí s eklampsií samotnou a s HELLP syndromem (viz níže) (Powe et al., 2011; Rath et Fischer, 2009).

Je však třeba dodat, že ne vždy se vyskytnou všechny příznaky, proto je nutno brát výsledky vyšetření v kontextu ostatních. Například 12–18 % pacientek s HELLP syndromem má krevní tlak v normě a až u 34 % případů preeklampsie nemusí být přítomna proteinurie (Rath et Fischer, 2009). Tato variabilita pak může být překážkou pro správné určení diagnózy.

HELLP syndrom

Závažné formy preeklampsie mohou být provázeny takzvaným HELLP syndromem (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets), kdy se ke všem výše popsaným příznakům připojují hematologické problémy, jako je právě hemolýza a snížený počet krevních destiček (Levine et al., 2004; Powe et al., 2011; Uzan et al., 2011). HELLP syndrom provází přibližně 20 % těhotenství s těžkou preeklampsií. Může při něm také dojít k diseminované intravaskulární koagulaci (DIK), která je velice závažným stavem. Další vážné komplikace někdy doprovázející HELLP syndrom jako ascites, abrupce (odloučení) placenty, nebo vnitřní krvácení do dutiny břišní, mohou způsobit i úmrtí matky (Sibai et al., 1993).

Eklampsie

Prakticky nejobávanější komplikací preeklampsie je eklampsie samotná. Je charakteristická přítomností záchvatů a tonicko-klonických křečí a změněných neurologických stavů (Powe et al., 2011; Uzan et al., 2011). Eklampsii často doprovázejí cerebro-vaskulární problémy. Například mrtvice a krvácení do mozku mají největší podíl na počtu úmrtí matek s eklampsii (Powe et al., 2011).

Kvůli křečím je někdy u těžších forem preeklampsie doporučeno užívání magnesium sulfátu ($MgSO_4$) jako prevence nástupu eklampsie (Uzan et al., 2011).

Léčba

Optimální strategie léčby a univerzální postup nelze z důvodu variabilních projevů u preeklampsie definovat (Backes et al., 2011). Jediným definitivním způsobem léčby je porod, kdy se odstraní primární příčina preeklampsie, a to kontakt matky s placentou. Všechny příznaky PE pak většinou vymizí v řádu dní od porodu (Powe et al., 2011; Backes et al., 2011; Uzan et al., 2011; Rath et Fischer, 2009).

Načasování porodu u preeklamptického těhotenství je zde nejdůležitějším bodem. Často se totiž dostává do konfliktu potřeba *in utero* maturace plodu a riziko rozvoje a zhoršení příznaků preeklampsie, jako rozvinutí HELLP syndromu, eklampsie nebo abrupce placenty. Pokud je to možné, je v dnešní době u každého těhotenství s mírnou závažností doporučován porod v 37. gestačním týdnu, což je čas převážně výhodný pro plod (Backes et al., 2011). U závažnějších forem preeklampsie se k porodu přikračuje mezi 24. a 34. gestačním týdnem čistě v závislosti na závažnosti projevů onemocnění (Backes et al., 2011; Uzan et al., 2011). Uzan et al. 2011 dále uvádí, že okamžitý porod je nutný, pokud se vyskytuje některý z následujících příznaků: nekontrolovatelná těžká hypertenze, eklampsie, akutní edém plic, abrupce placenty, jaterní hematom nebo počet trombocytů pod $50\,000/mm^3$.

Pokud to podmínky dovolí, je také možné pomocí kortikoidů stimulovat vyzrání plic dítěte, aby bylo po porodu životaschopné a teprve následně přistoupit

k porodu. U nejméně závažnějších případů je však s rodiči diskutována i možnost interrupce (Uzan et al., 2011).

Preeklampsie a eklampsie mohou rovněž trvale ovlivnit kardiovaskulární systém matky. Je známo, že výskyt PE a/nebo eklampsie v těhotenství zvyšuje pravděpodobnost vzniku trvalé hypertenze, aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, cévní mozkové příhody, hluboké žilní trombózy, srdečního selhání nebo metabolických syndromů (Craici et al., 2008; McDonald et al., 2013).

1.3.3. Fetální růstová restrikce

Růstová restrikce je velice široký pojem, který zahrnuje všechny plody i novorozence s nízkou hmotností ve vztahu ke gestačnímu věku. Tento jev se vyskytuje u 10 % populace (Albu et al. 2014; Lausman et al., 2013), někteří autoři zde používají termín „SGA plody“ - plody malé ke gestačnímu věku, které nevykazují kromě malého vzrůstu žádnou další patologii (Albu et al., 2014; Clausson et al., 2001). Obecně platná hranice pro diagnózu růstové restrikce je 10. centil a spadají sem všechny plody nacházející se pod touto hranicí, pod 3. centilem se pak nacházejí nejzávažnější případy růstové restrikce (Tenhola et al., 2006; Uzan et al., 2011). Označení FGR (fetal growth restriction) se však používá pro případy, kdy k růstové restrikci došlo z různých patologických příčin. Nespádají sem proto plody konstitučně malého vzrůstu, přestože svou hmotností jsou pod hranicí 10. centilu (Clausson et al., 2001).

Mezi patologické příčiny FGR se řadí fetální infekce, chromosomální aberace, aneuploidie nebo vrozené malformace a v neposlední řadě i růstová restrikce s různou etiologií. Pokud je ale FGR způsobena placentárními abnormalitami nebo onemocněním matky, bývá růstová deprivace způsobena nedostatečným zásobením plodu a malnutricí, přičemž nejdůležitější roli hraje míra vzniklé hypoxie (Resnik, 2002).

Obecně se dnes pro diagnostiku používá váhový odhad plodu (EFW-estimated fetal weight) určený při ultrazvukovém vyšetření matky. K diagnostice FGR je potřeba, aby hmotnost plodu byla pod 10. centilem a zároveň byl přítomen některý z dalších patologických jevů: abnormální index pulsality umbilikální arterie, známky centralizace oběhu plodu jako obranného mechanismu plodu vůči hypoxii, nebo snížené množství plodové vody (anhydramnion, případně oligohydramnion). Co se týče rozlišení časně a pozdní formy FGR dle doby klinické manifestace je stanovenou hranicí 32. gestační týden (Figueras et Gratacós, 2014).

Nejčastější příčinou fetální růstové retardace jinak zdravého plodu je preeklampsie. Téměř všechny projevy PE způsobuje dysfunkce placenty, která mimo jiné nedokáže zajistit dostatečné zásobení plodu krví. Výsledkem je až hypoxie plodu a jeho růstová retardace (Backes et al., 2011). Fetální růstová retardace má samozřejmě vliv i na organismus matky. Mimo jiné je prokázáno, že u mateřského organismu může významně zvyšovat riziko vzniku ischemické choroby srdeční (Borna et al., 2012).

2. Cíl práce

Cílem této práce je vyhodnotit genovou expresi kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi matek po porodu a na základě těchto dat odhadnout riziko pozdějšího výskytu kardiovaskulárních onemocnění u žen s patologickým průběhem těhotenství. U preeklampsie a fetální růstové restrikce je cílem také zhodnotit vliv závažnosti těhotenské komplikace na pozdní postpartální expresní profil kardiovaskulárních miRNA v krevním oběhu matky. V neposlední řadě má tato práce za cíl porovnat epigenetický profil kardiovaskulárních miRNA u matek s časovým odstupem 3-10 let po porodu s expresí miRNA v periferní krvi matek v průběhu těhotenství v době výskytu těhotenských komplikací. Díky informacím z dřívějších výzkumů výskytu daných miRNA u kardiovaskulárních onemocnění (viz. kapitola 1.2. shrnující problematiku těchto onemocnění) je možné ze změn expresních profilů vyvozovat riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Ideálem je nalézt takové miRNA, které vykazují statisticky významnou a stabilní odchylku od zdravých kontrol a mohly by být do budoucna využity k diagnosticko/prognostickým účelům.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

Pro stanovení genové exprese kardiovaskulárních miRNA byla použita periferní žilní krev matek odebraná 3-10 let po porodu. Materiál byl odebrán na základě informovaného souhlasu od 221 pacientek, které porodily v Ústavu pro péči o matku a dítě (ÚPMD) v Praze Podolí. Z těchto pacientek 76 mělo průběh těhotenství fyziologický a 145 vykazovalo v rozdílném zastoupení různé těhotenské patologie. Za fyziologickou kontrolu byly považovány pacientky bez jakýchkoli těhotenských komplikací a kardiovaskulárních obtíží, které porodily po 37. gestačním týdnu a jejich plod ze sledovaného těhotenství přesahoval svou porodní hmotností 2,5 kg. Skupinu těhotenských komplikací tvořily ženy, u kterých se vyskytovala některá z následujících diagnóz:

1. Preeklampsie (PE n=86) (kritéria viz. str. 38)
2. Gestační hypertenze (GH n=31) (kritéria viz. str. 36)
3. Fetální růstová restrikce (FGR n=28) (kritéria viz. str. 42)

V rámci popsaných diagnóz byly ještě rozlišovány následující podskupiny. Dle závažnosti byly ženy s preeklampií rozděleny na pacientky s mírnou formou PE (n=22) a závažnou formou PE (n=64) a dle týdne porodu na pacientky, které porodily před 34. týdnem (n=31) a po 34. týdnu (n=55). Pacientky s FGR byly rozděleny podle výskytu anhydramnionu/oligohydramnionu (15 ano/13 ne) a podle týdne porodu, kdy 8 pacientek rodilo před 32. týdnem (časná forma FGR) a 16 rodilo po tomto termínu (pozdní forma FGR).

Další sledované parametry byly rozděleny do dvou skupin podle toho, zda se jednalo o údaje o aktuálním stavu matek, nebo o průběhu jejich gravidity. Mezi parametry o matkách byl zařazen jejich aktuální věk, počet gravidit, status kouření cigaret, primiparita (zda bylo sledované těhotenství první, či nikoliv), glukózový status (výskyt diabetu mellitu, nebo gestačního diabetu mellitu-GDM) a status předchozího užívání hormonální antikoncepce (HAK). Jako parametry týkající se těhotenství byly zařazeny krevní tlak (systolický a diastolický) zaznamenaný v těhotenství, věk matky při porodu, gestační týden porodu, váha novorozence,

způsob porodu, pohlaví dítěte a přítomnost anhydramnionu/oligohydramnionu a proteinurie. Všechny tyto informace shrnují následující tabulky. U číselných hodnot je uveden medián a rozsah (range), u ostatních hodnot početní a procentuální zastoupení jevů v daném souboru.

Tabulka 2: Vstupní údaje o matkách podle jednotlivých diagnóz

ÚDAJE O MATKÁCH PODLE DIAGNÓZ	FG (n=76) medián a rozpětí hodnot	PE (n=86) medián a rozpětí hodnot	FGR (n=28) medián a rozpětí hodnot	GH (n=31) medián a rozpětí hodnot
Věk (r)	38 (29 - 50)	38 (28-51)	38,5 (26-45)	39 (34-58)
Počet gravidit	2 (1 - 6)	2 (1-9)	2 (1-5)	2 (1-6)
Kouření cigaret	Ano: 13 (17,1%) Ex: 19 (25%) Ne: 44 (57,9%)	Ano: 15 (17,4%) Ex: 21 (24,4%) Ne: 50 (58,2%)	Ano: 2 (7,1%) Ex: 5 (17,9%) Ne: 21 (75%)	Ano: 5 (16,1%) Ex: 4 (12,9%) Ne: 22 (80%)
Primiparita	Ano: 35 (46%) Ne: 41 (54%)	Ano: 71 (82,6%) Ne: 15 (17,4%)	Ano: 27 (96,4%) Ne: 1 (3,6%)	Ano: 19 (61,3%) Ne: 12 (38,7%)
Glukózový status GDM/DM	DM: 1 (1,3%) GDM: 3 (3,9%) Ne: 72 (94,8%)	DM: 1 (1,2%) GDM: 5 (5,8%) Ne: 80 (93%)	DM: 1 (3,6%) GDM: 4 (14,3%) Ne: 23 (82,1%)	DM: 1 (3,2%) GDM: 3 (9,8%) Ne: 27 (87%)
Předchozí užívání HAK	Ne: 30 (39,5%) Ex: 24 (31,6%) Ano: 22 (28,9%)	Ne: 21 (24,4%) Ex: 45 (52,3%) Ano: 20 (23,3%)	Ne: 8 (28,6%) Ex: 14 (50%) Ano: 6 (21,4%)	Ne: 13 (42%) Ex: 13 (42%) Ano: 5 (16,1%)

Tabulka 2: u číselných hodnot uveden medián a rozpětí hodnot („range“); nečíselné hodnoty: „Ano“ = užívá právě teď, „Ex“ = užívala v minulosti, nyní ne, „Ne“ = neužívala nikdy; DM=diabetes mellitus, GDM= gestační diabetes mellitus, HAK=hormonální antikoncepce

Tabulka 3: Vstupní údaje o průběhu těhotenství dle jednotlivých diagnóz

ÚDAJE O TĚHOTENSTVÍCH	FG (n=76) medián a rozpětí hodnot	PE (n=86) medián a rozpětí hodnot	FGR (n=28) medián a rozpětí hodnot	GH (n=31) medián a rozpětí hodnot
Tlak systolický (mm/Hg)	120 (100-140)	160 (122-190)	130 (100-165)	146,5 (120-190)
Tlak diastolický (mm/Hg)	76,5 (60-90)	100 (62-130)	80 (60-101)	95 (70-120)
Věk matky při porodu (r)	33 (25-43)	33 (21-44)	32 (22-44)	35 (28-51)
Gestační týden porodu	39,93 (29,14 - 41,86)	37,43 (27,56- 41,72)	36,5 (28-40,14)	38,71 (33,43- 41,28)
Váha novorozence (g)	3 435 (2 530-4 450)	2 530 (610-4 110)	2 095 (650-2 690)	3 195 (1 940-4 310)
Proteinurie	Ano: 0 (0%) Ne: 76 (100%)	Ano: 72 (83,7%) Ne: 14 (16,3%)	Ano: 1 (3,6%) Ne: 27 (96,4%)	Ano: 0 (0%) Ne: 31 (100%)
Anhydramnion/ Oligohydramnion	Ano: 0 (0%) Ne: 76 (100%)	Ano: 16 (18,6%) Ne: 70 (81,4%)	Ano: 15 (53,6%) Ne: 13 (46,4%)	Ano: 3 (9,8%) Ne: 28 (90,2%)
Způsob porodu	Vaginální: 69 (90,8%) Sekce: 7 (9,2%)	Vaginální: 15 (17,4%) Sekce: 71 (82,6%)	Vaginální: 6 (21,4%) Sekce: 22 (78,6%)	Vaginální: 12 (38,7%) Sekce: 19 (61,3%)
Pohlaví dítěte	Chlapec: 41 (54%) Dívka: 35 (46%)	Chlapec: 38 (44,2%) Dívka: 48 (55,8%)	Chlapec: 15 (53,6%) Dívka: 13 (46,4%)	Chlapec: 14 (45,2%) Dívka: 17 (54,8%)

Tabulka 3: nečíselné hodnoty: „Ano“ = jev v těhotenství přítomen, „Ne“ = jev v těhotenství nepřítomen

U výše uvedených tabulkových hodnot byly vypočteny p-hodnoty pro ověření, že distribuce základních parametrů vykazuje ve všech skupinách dostatečnou shodu a skupiny jsou tudíž porovnatelné. U číselných parametrů, jako je věk, váha novorozence nebo krevní tlak byla p-hodnota spočítána metodou dle Kruskal-Wallise, p-hodnota u parametrů nečíselných, jako je například glukózový status nebo pohlaví dítěte, byl použit chí-kvadrátový test. Pro oba testy platí, že pokud vychází $p \geq 0,05$, skupiny se v daném parametru zásadně neliší a jsou porovnatelné. Niže uvedené tabulky potvrzují, že matky se všemi diagnózami jsou, co se týče věku, počtu gravidit, kouření cigaret, glukózového statusu a užívání HAK, srovnatelné. Jedinou vyčnívající hodnotou je primiparita, která je sama o sobě rizikovým faktorem pro vznik PE a FGR a u skupin s touto diagnózou tedy převažuje.

U parametrů těhotenství je samozřejmostí, že některé vykazují p-hodnotu menší než 0,05, tedy jejich distribuce závisí na diagnóze. Mezi ně patří zvýšený systolický a diastolický tlak u PE a GH, výskyt proteinurie u PE, výskyt anhyramnionu/oligohydramnionu u PE a FGR těhotenství a způsob vedení porodu a týden porodu u všech těhotenství. Tyto hodnoty jsou v tabulkách vyznačeny červeně. Oproti tomu věk matky při porodu a pohlaví dítěte jsou parametry napříč skupinami shodné. Statistické vyhodnocení parametrů matek shrnuje tabulka 4, zpracování údajů o těhotenstvích je v tabulce 5.

Tabulka 4: Statistické vyhodnocení vstupních údajů o matkách

ÚDAJE O MATKÁCH PODLE DIAGNÓZ	Kruskal-Wallis			
	Celková p-hodnota	FGxPE	FGxFGR	FGxGH
Věk (r)	p=0,37	p=1	p=1	p=1
Počet gravidit	p=0,58	p=0,063	p=1	p=1
Chí-kvadrát test				
Kouření cigaret	p=0,538	p=0,995	p=0,244	p=0,346
Primiparita	p=0,00	p=0,00	p=0,00	p=0,152
Glukózový status GDM/DM	p=0,506	p=0,858	p=0,125	p=0,394
HAK	p=0,132	p=0,023	p=0,223	p=0,341

Tabulka 4: $p > 0,05$ – distribuce v souboru nezávisí na diagnóze, $p < 0,05$ – distribuce je závislá na diagnóze (značeno červeně); primiparita je rizikovým faktorem pro vznik PE a FGR, u těchto skupin se proto vyskytuje častěji, ostatní parametry jsou kontinuálně rozloženy a diagnóza je neovlivňuje

Tabulka 5: Statistické vyhodnocení vstupních údajů o těhotenstvích

	Kruskal-Wallis			
ÚDAJE O TĚHOTENSTVÍ	Celková p-hodnota	FGxPE	FGxFGR	FGxGH
Tlak systolický (mm/Hg)	p=0,00	p=0,00	p=0,35	p=0,00
Tlak diastolický (mm/Hg)	p=0,00	p=0,00	p=1	p=0,00
Věk matky při porodu (r)	p=0,1	p=1	p=1	p=0,24
Gestační týden porodu	p=0,00	p=0,00	p=0,00	p=0,008
Váha novorozence (g)	p=0,00	p=0,00	p=0,00	p=0,85
	Chí-kvadrát test			
Proteinurie	p=0,00	p=0,00	p=0,097	p=1
Anhydramnion/Oligohydramnion	p=0,00	p=0,00	p=0,00	p=0,005
Způsob vedení porodu	p=0,00	p=0,00	p=0,00	p=0,00
Pohlaví dítěte	p=0,58	p=0,214	p=0,974	p=0,409

Tabulka 5: $p > 0,05$ – distribuce v souboru nezávisí na diagnóze, $p < 0,05$ – distribuce je závislá na diagnóze (značeno červeně); jevy související s patologií na diagnóze závisí, vypovídající hodnota výpočtů jimi ale není narušena; pohlaví dítěte a věk matky při porodu jsou u všech skupin srovnatelné

3.2 Metody

Periferní nesrážlivá krev pacientek (odebraná do zkumavek s EDTA) byla dopravena do laboratoře, uchována v chladu a zpracována co nejdříve, aby nedocházelo k degradaci RNA. Veškeré používané nástroje a pomůcky byly určeny ke zpracovávání biologických vzorků za účelem získání genetického materiálu. Veškerá manipulace se vzorky byla prováděna v boxu s laminárním prouděním po vyzáření UV světlem za dodržování všech potřebných opatření.

Kvantifikace konkrétních miRNA v periferní krvi matek byla prováděna ve 3 krocích: izolace RNA obohacené o krátké RNA, následně se jednotlivé miRNA reverzní transkripcí přepisovaly do cDNA a pomocí kvantitativní PCR v reálném čase bylo stanoveno množství miRNA, které se ve vzorku vyskytovalo. K relativní kvantifikaci miRNA byla použita komparativní delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metoda. Všechny tyto kroky jsou podrobně popsány v dalších kapitolách.

3.2.1. Zpracování vzorku

Po přijetí do laboratoře byl každý vzorek zaevidován a spolu s identifikačními údaji a informovaným souhlasem zařazen. Vzorku bylo přiděleno specifické kódové označení, pod kterým byl dále v laboratoři zpracováván.

Pro následnou izolaci RNA bylo použito 200 μ l periferní krve, která byla promíchána s 1 000 μ l pufru EL (erythrocyte lysis buffer) a pro účinnější lýzu erytrocytů 15 minut inkubována na ledu. Dále byl vzorek 10 min stáčen v centrifuze vychlazené na 4 °C při 400 g, kdy zbytky erytrocytů s pufrem zůstaly rozptýlené v supernatantu a ostatní krevní buňky vytvořily na dně zkumavky peletu. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 400 μ l pufru EL, vzorek byl opět 10 minut za stejných podmínek stáčen a supernatant podruhé odsát. K peletě jaderných krevních buněk bylo přidáno 350 μ l pufru RLT ředěného 99:1 s β -mercaptoethanolem, který umožnil vzorek uchovávat před dalším zpracováním zamrazený na -80 °C.

3.2.2. Izolace RNA obohacené o krátké RNA molekuly

Pro izolaci RNA obohacené o krátké RNA molekuly ze vzorku byl použit mirVana™ miRNA Isolation Kit firmy Ambion® life technologies™, který kombinuje fenol-chloroformovou extrakci RNA a izolaci na pevný nosič. Izolace byla provedena dle návodu výrobce.

Vzorek bylo nutné rozmrazit 4 min v termobloku při 37 °C, dále byly používány chemikálie z izolačního kitu. Ke vzorku bylo přidáno 600 µl Lysis/Binding buffer, který lyzuje buňky, stabilizuje RNA, inaktivuje RNázy a v dalších krocích napomáhá RNA navázat se na kolonku. Po pufru bylo přidáno 95 µl miRNA Homogenate Additive pro podporu lýzy buněk. Směs byla důkladně promíchána na vortexu a 10 minut byla inkubována na ledu. V dalším kroku byl do směsi přidán 1 µl syntetické miRNA cel-miR-39 v koncentraci 0,1 nM (běžně se vyskytuje u *Caenorhabditis elegans*), aby bylo později možno zkontrolovat úspěšnost izolace miRNA. Následně byla ke vzorku přidána 1/10 objemu (950 µl) Acid-Phenol:Chloroformu, který se dělí na organickou a vodnou fázi. Po důkladném zvortexování trvajícím 30-40 s a 5minutovém stočení při 10,000g se fáze oddělily, ve spodní organické části se nacházely odpadní zbytky buněk, proteiny a většina DNA, přičemž ve vrchní vodné fázi zůstala RNA. Vodná fáze byla odebrána a v poměru 1:3 byla naředěna 100 % ethanolem. Tato směs byla dále v centrifuze během 15s při 10,000g přefiltrována přes speciální kolonku se skelnými vlákny, kde při této koncentraci ethanolu zůstaly imobilizovány velké molekuly RNA (nad 200bp), ale kratší molekuly prošly s filtrátem skrz. Filtrát byl odebrán do zkumavky a zředěn v poměru 2:3 100 % ethanolem. Tím se koncentrace ethanolu zvýšila na 66 % a při filtrování přes druhou kolonku za stejných podmínek byly do skelných vláken zachyceny žádané malé molekuly RNA, filtrát byl odstraněn.

V předposlední fázi izolace byl filtr propláchnut promývacími roztoky. Nejdříve bylo přidáno 700 µl naředěného Wash Solution 1, vzorek byl stočen 5-10 s při 10,000g a filtrát odstraněn. Druhé a třetí promytí se stejnými parametry centrifugace a s následným odstraněním filtrátu bylo provedeno pomocí

naředěného Wash Solution 2/3. Posledním krokem promývací fáze bylo 1minutové stočení na maximální otáčky (14,500g) kvůli vysušení filtru.

Na závěr byl filtr přenesen do nové zkumavky (Collection Tube) a na něj bylo aplikováno 100 μ l Elution Solution ohřátého na 95 °C. Zkumavka byla centrifugována 20-30 s na maximální otáčky, aby došlo k uvolnění RNA obohacené o krátké úseky RNA z kolony do zkumavky. Pro definitivní vyčištění vzorku od DNA bylo následně přidáno 5 μ l Dnase pufru a 5 μ l DNázy I a směs byla 30 min inkubována v termobloku při 37 °C. Následně bylo pro stabilizaci RNA přidáno 5 μ l EDTA, s níž byl vzorek inkubován 10 minut při 65 °C. Takto izolovanou RNA bylo možno krátkodobě skladovat při -20 °C.

(Výrobce doporučený postup izolace: mirVana™ miRNA Isolation Kit protocol, dostupný z: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/fm_1560.pdf)

3.2.3. Reverzní transkripce

K přepisu miRNA do cDNA byl použit Taq Man® Reverse Transcription Kit společnosti Applied Biosystems, u reverzní transkripce byl taktéž dodržen výrobcem doporučený postup. Kvůli rychlému procesu degradace byla reverzní transkripce provedena ihned po izolaci, tedy týž den. Přepis probíhal v reakčním objemu 7 μ l. Do každé jamky byl pipetován namíchaný Master mix, esej pro přepis konkrétní miRNA a RNA templát. Zároveň byl v každé analýze kromě zkoumaných vzorků analyzován i vzorek referenční, a to RNA izolovaná výše uvedeným způsobem z vybrané fyziologické placenty ředěná na 3 ng/ μ l. V panelu 29 vybraných miRNA byly v každém vzorku také analyzovány i dvě endogenní kontroly (RNU58A a RNU38B), které v plné krvi matek vykazovaly největší stabilitu exprese napříč diagnózami.

RT Master mix byl namíchán z jednotlivých přísad pro každou analýzu vždy čerstvý. Na jednu jamku v reakčním stripu připadlo 3,22 namíchaného RT Master mixu. Konkrétní složky Master mixu a jejich množství shrnuje následující tabulka 6:

Tabulka 6: Složení Master Mixu pro reverzní transkripci

Komponenta	Množství na jamku (μl)	Koncentrace
volné DNTPs (deoxynukleotid trifosfát)	0,07	100 nM
MultiScribe reverzní transkriptáza	0,49	50 U/μl
Pufř pro reverzní transkriptázu	0,7	
inhibitor Rnáz	0,07	20 U/μl
Čištěná autoklátovaná voda bez DNáz a RNáz	1,89	

Dále bylo do reakčních jamek přidáno 1,4 μl miRNA Assay (koncentrace 5X), která obsahuje RT primer pro konkrétní miRNA. Kvůli malé velikosti byly miRNA RT primery stabilizovány pomocí struktury stem-loop přidané na 5' konec molekuly. Jako poslední byl do jamky přidán vzorek RNA v množství 2,38 μl. Strip byl uzavřen, promíchán, stočen a umístěn do cycleru. Parametry reakce shrnuje následující tabulka 7.

Tabulka 7: Teplotní profil a průběh reverzní transkripce

Délka trvání (min)	Teplota (°C)	Průběh reakce
30	16	navázání specifického stem-loop primeru k vybranému typu miRNA
30	42	aktivace reverzní transkriptázy, syntéza jednovláknové cDNA podle konkrétního templátu miRNA
5	85	inaktivace reverzní transkriptázy, denaturace (cDNA od RNA)
∞	4	konečná stabilizace cDNA

Po skončení RT přepisu byly vzorky cDNA zamrazeny na -20 °C a druhý den použity pro kvantitativní PCR v reálném čase.

(Výrobcem doporučený postup: TaqMan[®] MicroRNA Assays protocol dostupný z: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042167.pdf)

3.2.4. Kvantitativní PCR v reálném čase

Relativní kvantifikace miRNA ve zkoumaném vzorku byla provedena pomocí systému 7 500 Fast Real-time PCR společnosti Applied Biosystems[®], celá analýza byla provedena dle pokynů výrobce. Pro každou miRNA byl v této analýze připraven vlastní Master mix (TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II), který obsahoval esej pro konkrétní miRNA (TaqMan[®] miRNA Assay, oboje Applied Biosystems[®]). Následně byl takto namíchaný PCR Master Mix s esejí pipetován do stripů a k němu byl přidán přepsaný vzorek cDNA odpovídající konkrétní miRNA. V každé analýze byly u zkoumaných vzorků analyzovány i dvě endogenní kontroly (RNU58A a RNU38B) a syntetická cel-miR-39 z *C. elegans*. Zároveň byly zařazeny negativní kontroly (NTC), kde analyzovaný vzorek nahrazovala čištěná autoklávovaná voda bez DNáz a RNáz.

Postup analýzy

Analýza byla provedena v reakčním objemu 15 μ l. Z toho 12 μ l představoval PCR Master Mix, jehož složení je shrnuto v tabulce 8:

Tabulka 8: Složení PCR Master Mixu

Komponenta	Množství na jamku (μ l)
TaqMan[®] 2X Universal PCR Master Mix (termostabilní AmpiTaq Gold [®] DNA polymeráza, volné dNTPs s uracilem, ROXTM Passive Reference, Uracil-N-glykosyláza (UNG) a optimalizované pufrové prostředí)	7,5
20X TaqMan[®] miRNA Assay mix (dopředný a reverzní primer, TaqMan [®] MGB fluorescenční sonda)	0,75
Čištěná autoklávovaná voda bez DNáz a RNáz	3,75

Tato směs byla 3x promíchána a stočena s odstupem 3 minut odležení mezi cykly. Do každé jamky byly ke 12 μ l Master Mixu přidány 3 μ l rozmrazeného a promíchaného vzorku cDNA. Uzavřené stripy byly před analýzou opět 3x vortexovány a stočeny s 3minutovým odstupem mezi cykly. Teplotní profil reakce je shrnut v tabulce 9.

Tabulka 9: Teplotní profil a průběh kvantitativní PCR v reálném čase

Délka trvání	Teplota (°C)	Průběh
2 min.	50	Optimální pro aktivaci UNG (vysvětleno níže)
10 min.	95	Aktivace enzymu Taq DNA polymerázy I
15 s	95	Denaturace, rozvolnění dvouvláknové molekuly DNA, nasednutí primerů
10 s	60	Elongace molekuly Taq DNA polymerázou I, vytváření komplementárního vlákna

První fáze probíhající při teplotě 50 °C je zařazena kvůli aktivaci uracil-N-glykosylázy (UNG). V živém organismu tento enzym štěpí DNA se zařazeným uracilem v sekvenci a tím chrání genetickou informaci před mutacemi (Hatahet et al., 1994). Přítomný templát cDNA má v sekvenci zařazován thymin, tudíž je před degradací ochráněn. V následné PCR reakci je ale zařazován uracil. Případná kontaminace z předchozích reakcí je tedy pomocí UNG odstraněna a nové amplikony s uracilem vznikají až v dalších fázích reakce, když je již UNG neaktivní.

Ve fázích denaturace a anelace se mírně lišil průběh prvního cyklu a dalších 49 cyklů. V prvním cyklu nasedl při 95 °C na 3'konec jednovláknového templátu cDNA dopředný primer a došlo k aktivaci Taq DNA polymerázy I. Následně při 60 °C směrem k 5'konci templátu polymeráza vytvářela první komplementární vlákno. Ve druhém a všech dalších cyklech probíhala amplifikace totožně, ale jelikož již byla k dispozici dvě templátová vlákna, nejdříve došlo k denaturaci vláken a následné reakce se účastnil i reverzní primer a MGB sonda. Fáze denaturace a anelace byly provedeny v 50 cyklech.

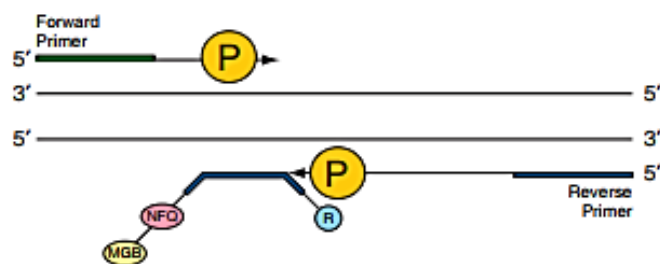
Úloha sondy a míra fluorescence

TaqMan[®] MGB fluorescenční sonda byla klíčovou částí, která umožnila měřit narůstající množství kopií pomocí fluorescence. Sonda obsahovala na 5'konci reporterové barvivo (R) a na 3'konci MGB (minor groove binder) a NFQ (non-fluorescent quencher), takzvaný „zhášec“. Sonda byla navržena tak, aby svou „seed

– oblastí“ mezi 5' a 3' koncem specificky nasedala na templát cDNA mezi dopředný a zpětný primer, a to k vláknu, které bylo templátem pro zpětný primer.

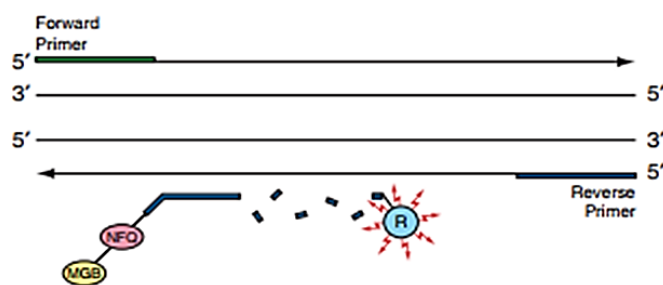
Dokud byla sonda intaktní, vzdálenost mezi reporterovým barvivem a zhášečem dostačovala k tomu, aby zhášeč (quencher) potlačoval fluorescenci reporteru (viz. obr. 3a). Na reverzní primer ale nasedla DNA polymeráza (P) a prodlužovala nově vznikající vlákno až k místu, kde byla hybridizovaná sonda. Aby mohla pokračovat, DNA polymeráza rozštěpila tělo sondy, čímž byl reporter oddělen od quencheru a výrazně se zvýšila fluorescence reporteru (viz obr. 3b).

Obrázek 3a: Úloha quencheru (NFQ) v potlačování fluorescence



Obrázek 3a: DNA polymeráza prodlužuje vlákno podle templátu, hybridizovaná sonda nevykazuje fluorescenci

Obrázek 3b: Úloha reporterového barviva (R)



Obrázek 3b: DNA polymeráza při syntetizování vlákna rozštěpila sondu, došlo k oddělení quencheru od reporteru, výrazně se zvýšila fluorescence reporteru

Protože fluorescenční signál se objevil pouze když byla sonda plně kompatibilní s templátem, bylo při tomto systému zabráněno nespecifické amplifikaci. Navíc byl pomocí MGB zablokován 3' konec sondy, takže během PCR nedocházelo k elongaci sond.

(Výrobce doporučený postup pro kvantitativní PCR v reálném čase: TaqMan[®] MicroRNA Assays protocol dostupný z:
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042167.pdf)

Výše popsaným principem byl při kvantitativní PCR v reálném čase amplifikován požadovaný úsek cDNA a úměrně s tím stoupala míra fluorescence. Tu detekoval přístroj, fluorescenci každé sondy normalizoval podle ROX[™] Passive Reference obsažené v PCR Master Mixu a data zaznamenával v podobě amplifikačního diagramu. Pro další zpracování byly zaznamenané křivky korigovány na Ct („threshold“), který představuje prahovou hodnotu. Klíčovou informací odrážející původní množství miRNA ve vzorku je, ve kterém cyklu přesáhla míra fluorescence tento threshold.

3.2.5. Relativní kvantifikace

Relativní kvantifikace byla provedena pomocí komparativní delta Ct metody ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Tato metoda umožnila korigovat výsledek podle endogenních kontrol a vztáhnout ho k referenčnímu vzorku, přičemž výsledná hodnota při následném zpracování vykazuje vysokou přesnost. V prvním kroku se od Ct vzorku odečítá geometrický průměr Ct endogenních kontrol ($Ct^{RNU\ 58A}$ a $Ct^{RNU\ 38B}$), vzniká ΔCt vzorku. Od této hodnoty je odečten rozdíl Ct referenčního vzorku a geometrického průměru endogenních kontrol (ΔCt reference). Vzniká hodnota $\Delta\Delta Ct$, kterou pro lepší zpracovatelnost převádíme do tvaru $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen, 2001).

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{\text{vzorek}} - G(Ct^{RNU\ 58A}, Ct^{RNU\ 38B})] - [Ct_{\text{reference}} - G(Ct^{RNU\ 58A}, Ct^{RNU\ 38B})]$$

(Livak et Schmittgen, 2001)

$$\text{kde } G(Ct^{RNU\ 58A}, Ct^{RNU\ 38B}) = \sqrt[2]{Ct^{RNU\ 58A} \times Ct^{RNU\ 38B}}$$

(Vandesompele et al., 2002)

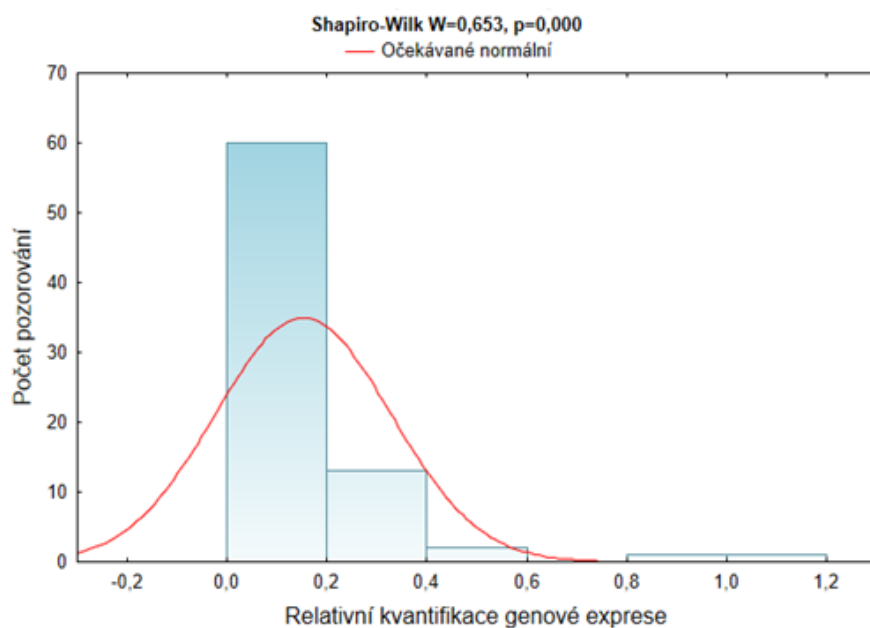
3.3 Statistické zpracování dat

Výsledná data byla zpracována v softwaru Statistica, verze 12 společnosti[®] StatSoft. Základní porovnatelnost skupin byla ověřena výpočtem p-hodnot u číselných hodnot dle Kruskal-Wallise a u stavových hodnot chí-kvadrátovým testem. Normalita dat byla ověřena Shapiro-Wilkovým testem a hlavní statistická analýza byla provedena s využitím metody dle Kruskal-Wallise. Na výsledné hodnoty byla aplikována Bonferoniho korekce.

3.3.1. Shapiro-Wilkův test normality dat

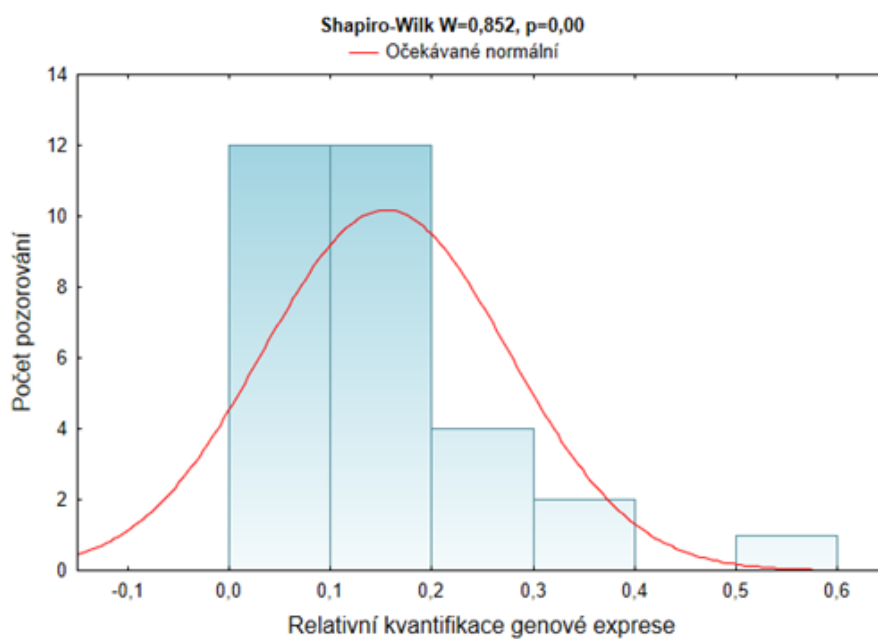
Data získaná pomocí relativní kvantifikace genové exprese byla nejprve otestována Shapiro-Wilkovým testem. Jedná se o test normality dat, který ověřuje, zda data odpovídají normálnímu rozdělení dle Gaussovy křivky, či nikoliv (Shapiro et Wilk, 1965). Tato analýza pracuje s hraniční p-hodnotou o velikosti 0,05. Pokud vyjde p-hodnota pro danou miRNA větší než 0,05, normalita dat není zamítnuta. V případě p-hodnoty nižší než 0,05 zamítáme normální rozdělení dat. Jako grafické znázornění analýzy dobře slouží histogram, kde jsou ve sloupcích znázorněny četnosti jednotlivých hladin genové exprese a červená linie znázorňuje křivku normálního rozdělení. Pro ilustraci jsou níže uvedeny příklady histogramů zpracovaných pro miR-23a-3p a výskytu hladin genové exprese této miRNA u fyziologických gravidit, pacientek s GH, PE a FGR. Všechny číselné údaje Shapiro-Wilkova testu o ostatních miRNA u jednotlivých diagnóz shrnuje tabulka 10, ukázkové hodnoty u miR-23a-3p jsou v ní zvýrazněny modře.

Graf 1: Histogram četností genové exprese miR-23a-3p u FG



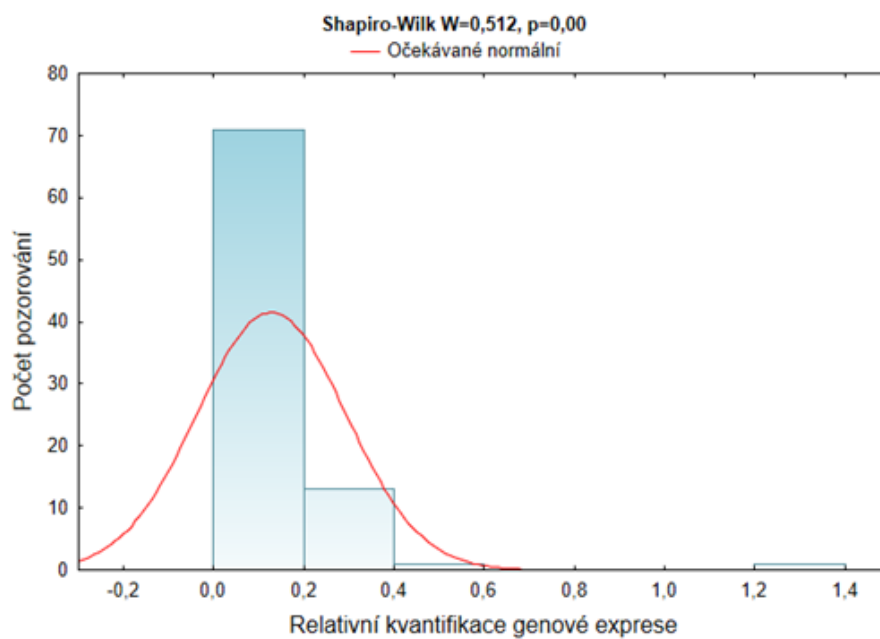
Graf 1: Z rozložení histogramu a z hodnot $W=0,653$ a $p<0,05$ vyvozujeme, že miR-23a-3p nemá u skupiny s FG normální rozdělení

Graf 2: Histogram četností genové exprese miR-23a-3p u GH



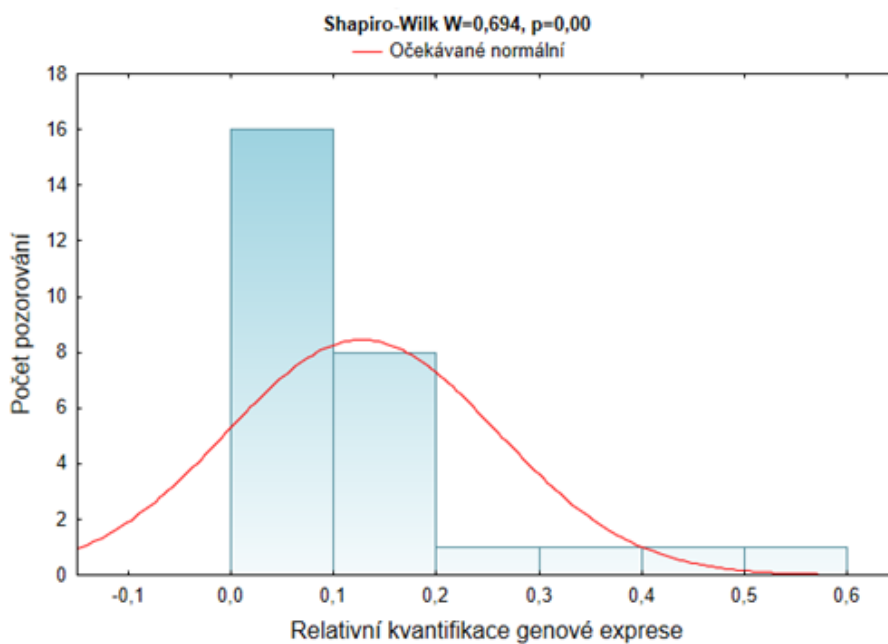
Graf 2: Z rozložení histogramu a z hodnot $W=0,852$ a $p<0,05$ vyvozujeme, že miR-23a-3p nemá u skupiny s GH normální rozdělení

Graf 3: Histogram četností genové exprese miR-23a-3p u PE



Graf 3: Z rozložení histogramu a z hodnot $W=0,512$ a $p<0,05$ vyvozujeme, že miR-23a-3p nemá u skupiny s PE normální rozdělení

Graf 4: Histogram četností genové exprese miR-23a-3p u FGR



Graf 4: Z rozložení histogramu a z hodnot $W=0,694$ a $p<0,05$ vyvozujeme, že miR-23a-3p nemá u skupiny s FGR normální rozdělení

Tabulka 10: Shrnutí Shapiro-Wilkovy analýzy pro jednotlivé miRNA u konkrétních diagnóz

Shapiro-Wilkův test pro miRNA	FG		PE		FGR		GH	
	W hodnota	p-hodnota	W hodnota	p-hodnota	W hodnota	p-hodnota	W hodnota	p-hodnota
miR-1-3p	0,556	0	0,843	0	0,551	0	0,512	0
miR-16-5p	0,905	0	0,875	0	0,511	0	0,964	0,381
miR-17-5p	0,786	0	0,886	0	0,846	0	0,77	0
miR-20a-5p	0,799	0	0,734	0	0,798	0	0,929	0,041
miR-20b-5p	0,837	0	0,835	0	0,792	0	0,857	0
miR-21-5p	0,821	0	0,861	0	0,551	0	0,958	0,265
miR-23a-3p	0,653	0	0,512	0	0,694	0	0,852	0
miR-24-3p	0,748	0	0,701	0	0,66	0	0,796	0
miR-26a-5p	0,783	0	0,889	0	0,655	0	0,951	0,176
miR-29a-3p	0,614	0	0,907	0	0,553	0	0,944	0,111
miR-92-3p	0,625	0	0,531	0	0,521	0	0,918	0,021
miR-100-5p	0,168	0	0,772	0	0,583	0	0,905	0
miR-103-3p	0,774	0	0,756	0	0,694	0	0,934	0,059
miR-125b-5p	0,124	0	0,759	0	0,79	0	0,625	0
miR-126-3p	0,762	0	0,869	0	0,461	0	0,911	0,014
miR-130b-3p	0,729	0	0,502	0	0,788	0	0,939	0,082
miR-133-3p	0,703	0	0,095	0	0,562	0	0,736	0
miR-143-3p	0,618	0	0,464	0	0,705	0	0,865	0,001
miR-145-5p	0,896	0	0,756	0	0,823	0	0,891	0,004
miR-146a-5p	0,672	0	0,791	0	0,749	0	0,853	0
miR-155-5p	0,474	0	0,797	0	0,98	0,864	0,894	0,005
miR-181a-5p	0,852	0	0,651	0	0,732	0	0,847	0
miR-195-5p	0,555	0	0,541	0	0,526	0	0,832	0
miR-199a-5p	0,454	0	0,476	0	0,574	0	0,823	0
miR-210-3p	0,805	0	0,718	0	0,875	0,003	0,819	0
miR-221-3p	0,707	0	0,706	0	0,648	0	0,953	0,19
miR-342-3p	0,76	0	0,696	0	0,847	0	0,751	0
miR-499a-5p	0,675	0	0,697	0	0,643	0	0,927	0,037
miR-574-3p	0,778	0	0,616	0	0,747	0	0,952	0,184

Tabulka 10: $p < 0,05$ – zamítnuto normální rozdělení dat; $p > 0,05$ – data vykazují normální rozdělení (vyznačeno červeně); hodnoty u miR-23a-3p výše znázorněné v grafech zde označeny modře; většina dat nevykazuje normální rozdělení

Vyhodnocení Shapiro-Wilkovy analýzy svědčilo pro fakt, že naprostá většina experimentálních dat nevykazovala normální rozdělení. U některých miRNA, zvláště u skupiny s gestační hypertenzí, byly objeveny případy, kdy p-hodnota je větší než 0,05 a normální rozdělení zde nezamítáme. Další kroky však bylo nutné podřídit většině ostatních výsledků s rozdělením neodpovídajícím Gaussově křivce. Vzhledem k tomu, že exprese jednotlivých miRNA byly nezávislé jevy, data nevykazovala normální rozdělení a byl patrný podobný tvar rozdělení ve zkoumaných skupinách, byly dále aplikovány neparametrické testy porovnávající více proměnných. Jako hlavní nástroj pro statistické zpracování byla zvolena neparametrická Kruskal-Wallisova analýza, pro kterou byly splněny všechny předpoklady.

3.3.2. Kruskal-Wallisova analýza

Prvním krokem pro Kruskal-Wallisovu analýzu bylo stanovení nulové hypotézy (H_0), jejíž platnost bylo třeba ověřit, a alternativní hypotézy (H_1), která byla doplňkovou hypotézou k H_0 . V tomto případě H_0 předpokládala, že genová exprese jednotlivých kardiovaskulárních miRNA je stejná v periferní krvi zdravých pacientek, i u všech pacientek s předchozím výskytem těhotenských komplikací. Alternativní hypotéza H_1 oproti tomu předpokládala, že alespoň jedna skupina (pacientky se shodnou diagnózou) se od ostatních liší, tedy má významně rozdílnou hladinu genové exprese. Kruskal-Wallisův test proto mohl mít pouze dva odlišné výsledky. Pokud se neukázal žádný významný rozdíl mezi skupinami, vyvodili jsme, že H_0 nelze zamítnout, genová exprese je tedy u všech skupin podobná. Pokud však alespoň jedna skupina vykazovala výraznou odchylku, hypotézu H_0 jsme zamítli a přijali jsme hypotézu H_1 . Pak je prokázáno, že genová exprese microRNA je u dané skupiny ovlivněna diagnózou (Kruskal et Wallis, 1952).

Tímto testem nebyla zkoumána shoda jednotlivých parametrů, ale náhodných výběrů průměrného pořadí hodnot. Obor hodnot, který obsáhl všechny výsledky, byl rozdělen na dvě části, a to obor hodnot přijetí (V) a kritický obor (W). Pokud výsledek náhodného výběru spadl do oboru hodnot V , nezamítli jsme hypotézu H_0 . Pokud výsledek spadl do kritického oboru hodnot W , přijali jsme hypotézu H_1 . (Kruskal et Wallis, 1952). Tyto dva obory hodnot rozdělovala

hladina spolehlivosti α , která byla stanovena na $\alpha=0,05$ (Fisher, 1925). Výsledkem analýzy byla konkrétní p-hodnota, která vyjadřovala, s jakou pravděpodobností zamítneme hypotézu H_0 , přestože je ve skutečnosti pravdivá. Jinými slovy p-hodnota značila míru pravděpodobnosti vzniku chyby I. druhu. Pokud tedy p-hodnota pro porovnání souborů genové exprese konkrétní miRNA vyšla nižší, než hladina spolehlivosti α (0,05), rozdíl mezi soubory byl považován za statisticky signifikantní a přijali jsme hypotézu H_1 (Kruskal et Wallis, 1952).

S násobným testováním hypotéz se však zvyšovala pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku, proto byla na data z Kruskal-Wallisovy analýzy použita Bonferoniho korekce. Tímto způsobem poprvé popsáním C. E. Bonferroniem byla upravena hladina významnosti testu podle počtu provedených testů. Z výsledků s patrnou odchylkou Bonferroniho korekce oddělila ty skutečně statisticky signifikantní, jejichž p-hodnota musela být menší, než α /počet skupin (Bonferroni, 1939). O výsledcích nacházejících se mezi touto korigovanou hodnotou a samotnou hodnotou α o stanovené hladině 0,05 jsme uváděli, že vykazují trend. V této práci byla pomocí Bonferroniho korekce v případě srovnávání tří skupin hraniční p-hodnota stanovena na $p<0,017$, v případě porovnávání čtyř skupin na $p<0,013$.

4. Výsledky

Byla studována postpartální (s odstupem 3-10 let od porodu) genová exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi u matek s fyziologickým a patologickým průběhem těhotenství. Z celkového počtu 221 pacientek bylo 76 fyziologických kontrol (fyziologický průběh gravidity). V 86 případech se jednalo o preeklampsii, kde mírnou formu mělo 22 pacientek a závažnou formu 64 pacientek, 31 pacientek s PE rodilo před 34. týdnem a 55 pacientek s PE rodilo po 34. týdnu. Případů gestační hypertenze bylo celkem 31, žádná z pacientek netrpěla primární, nebo sekundární hypertenzí. Fetální růstová restrikce byla přítomna u 28 matek, přičemž u 15 těhotenství s FGR se vyskytoval anhydramnion nebo oligohydramnion a u 13 těhotenství s FGR nikoliv. Pouze 5 matek s FGR rodilo před 32. týdnem (časná forma FGR), zbylých 23 žen rodilo po 32. týdnu (pozdní forma FGR).

Výsledky statistických analýz jsou graficky zpracovány v podobě krabicových grafů neboli boxplotů. Střední linie v každém boxplotu značí medián, samotné krabicové ohraničení představuje dole 25. a nahoře 75. centil. Prodloužené linie představují hodnoty do velikosti 1,5násobku rozpětí boxplotu, kroužky jsou označeny odlehlé hodnoty a hvězdičkami extrémní hodnoty. P-hodnoty znázorněné v grafech jsou pro přehlednost zaokrouhleny na tři desetinná místa.

Nejprve byly srovnávány výsledky analýz genové exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi fyziologických kontrol a těhotenských patologií, tedy PE, GH a FGR. Dále pak byly výsledky pacientek s PE zkoumány s ohledem na závažnost onemocnění a také s ohledem na dobu porodu. Porod před 34. týdnem byl označen za časnou formu PE, porod po 34. týdnu za pozdní formu PE. U pacientek s FGR byl v pokročilejších analýzách zohledňován výskyt anhydramnionu/oligohydramnionu a doba porodu (před a po 32. týdnu – časná a pozdní forma FGR). Dále jsou rozvedeny a diskutovány pouze ty výsledky, které vykazovaly statisticky významnou dysregulaci, nebo trend ke zvýšení či snížení genové exprese. Jelikož u FGR, ani u žádné podskupiny FGR nebyl zaznamenán statisticky signifikantní výsledek, nejsou výsledky této skupiny dále rozebírány.

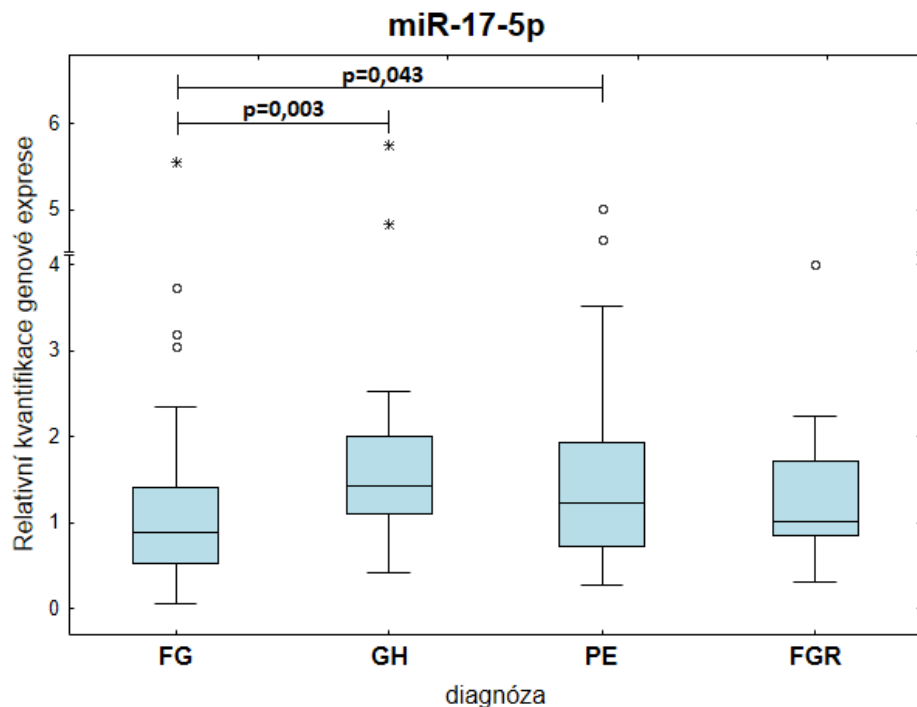
4.1 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi fyziologických kontrol a těhotenských patologií

V rámci rozdělení do čtyř základních skupin (FG, GH, PE a FGR) byly zaznamenány významné rozdíly v genové expresi různých miRNA. Analýza podle Kruskal-Wallise po aplikaci Bonferroniho korekce ukázala ve čtyřech případech statistickou signifikanci a v šesti případech trend k dysregulaci genové exprese.

4.1.1. Up-regulace miR-17-5p u GH

Testování genové exprese miR-17-5p u čtyř základních skupin ukázalo i po Bonferroniho korekci na hladinu významnosti $\alpha=0,013$ hned dvě závislosti. Za prvé je patrná statisticky významná up-regulace miR-17-5p ($p=0,003$) u skupiny gravidit s GH oproti zdravým kontrolám. Zároveň vykazuje trend k upregulaci miR-17-5p ($p=0,043$) skupina pacientek s PE (viz. Graf 5).

Graf 5: Genová exprese miR-17-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)

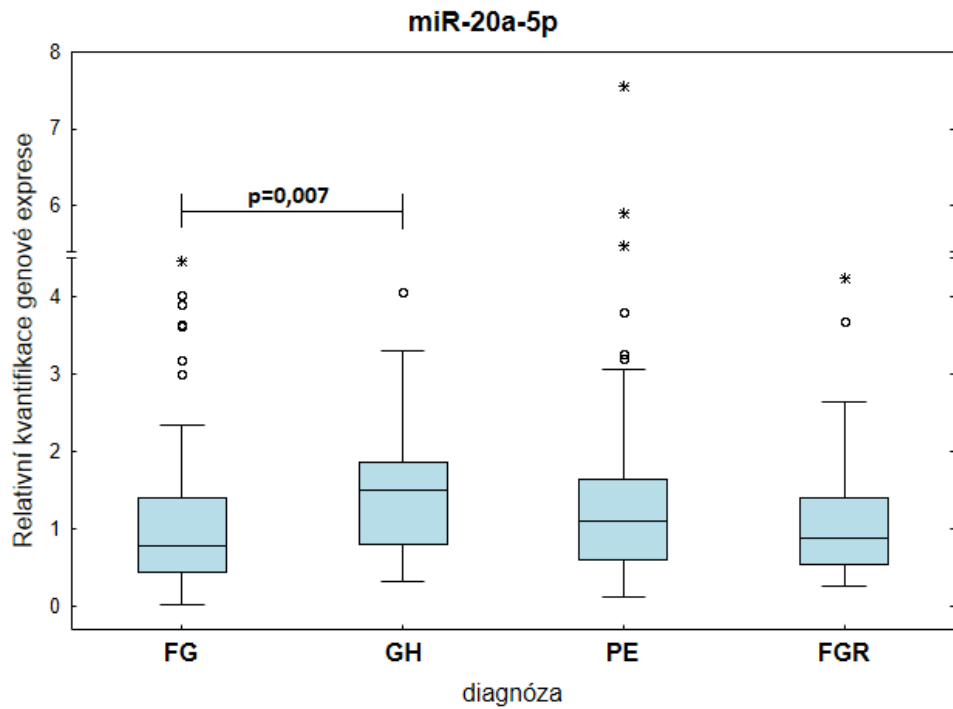


Graf 5: Signifikantní up-regulace miR-17-5p ($p=0,003$) u pacientek s GH v porovnání s FG, trend k up-regulaci miR-17-5p ($p=0,043$) u pacientek s PE v porovnání s FG

4.1.2. Statisticky signifikantní up-regulace miR-20a-5p, miR-143-3p a miR-499-5p u GH

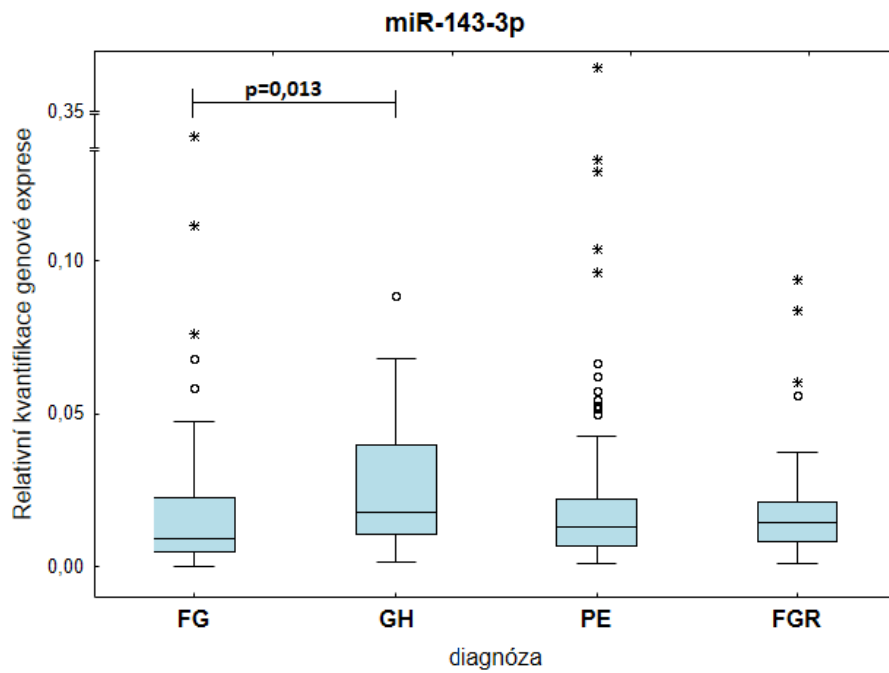
Další statisticky významné dysregulace v rámci rozdělení do základních skupin byly objeveny pouze u skupiny pacientek s gestační hypertenzí. Jedná se o miR-20a-5p ($p=0,007$) (viz. Graf 6), miR-143-3p ($p=0,013$) (viz. Graf 7) a miR-499-5p ($p=0,012$) (viz. Graf 8). U všech tří případů lze potvrdit signifikantní up-regulaci i po aplikaci Bonferroniho korekce na $p<0,013$.

Graf 6: Genová exprese miR-20a-5p u u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)



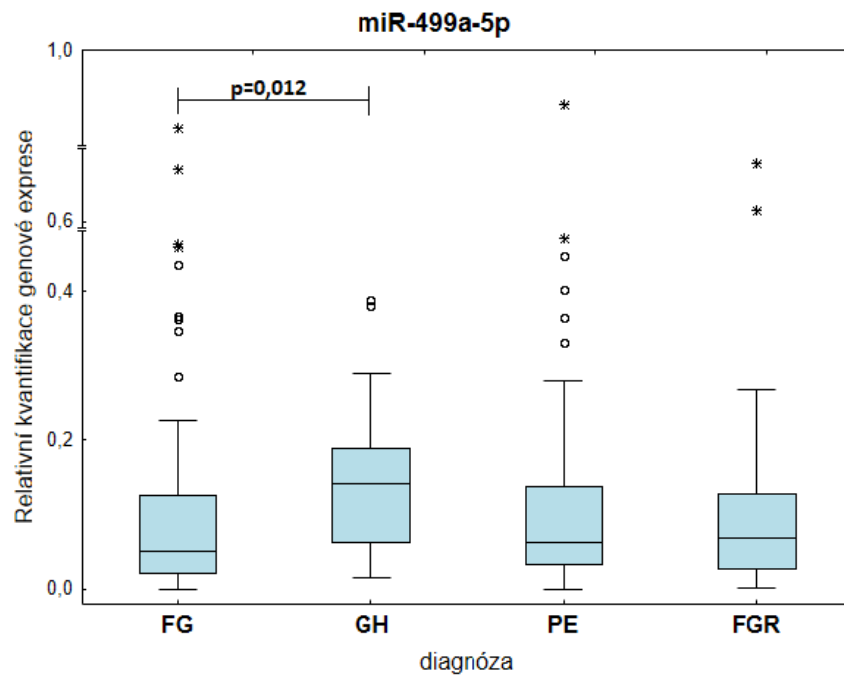
Graf 6: Signifikantní up-regulace miR-20a-5p ($p=0,007$) u pacientek s GH v porovnání s FG

Graf 7: Genová exprese miR-143-3p u u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)



Graf 7: Signifikantní up-regulace miR-143-3p ($p=0,013$) u skupiny s GH v porovnání s FG

Graf 8: Genová exprese miR-499a-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)

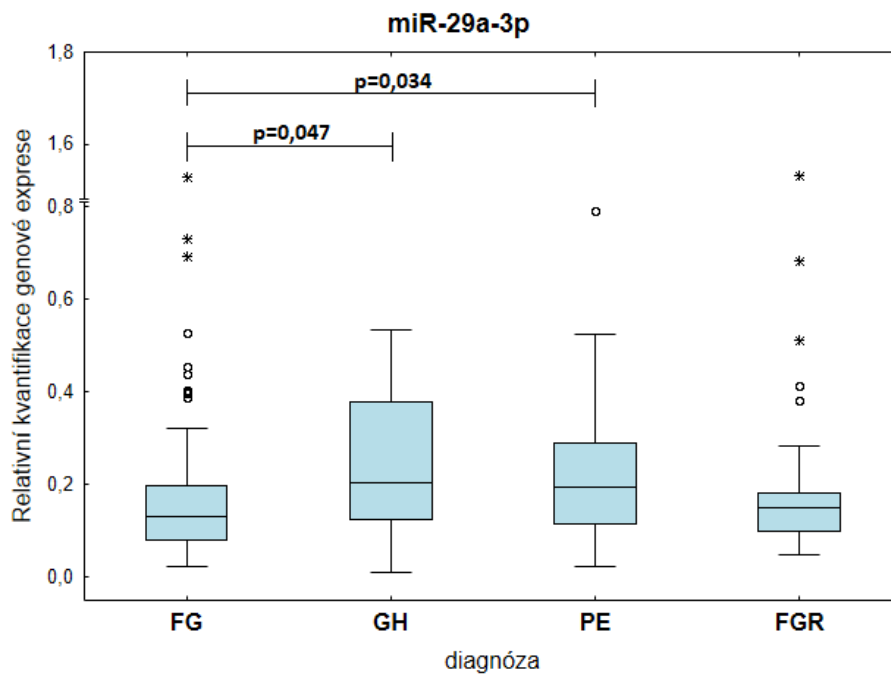


Graf 8: Signifikantní up-regulace miR-499-5p ($p=0,012$) u skupiny s GH v porovnání s FG

4.1.3. Trend k up-regulaci miR-29a-3p, miR-20b-5p, miR-146a-5p a miR-199a-5p u GH a trend k up-regulaci miR-29a-3p u PE

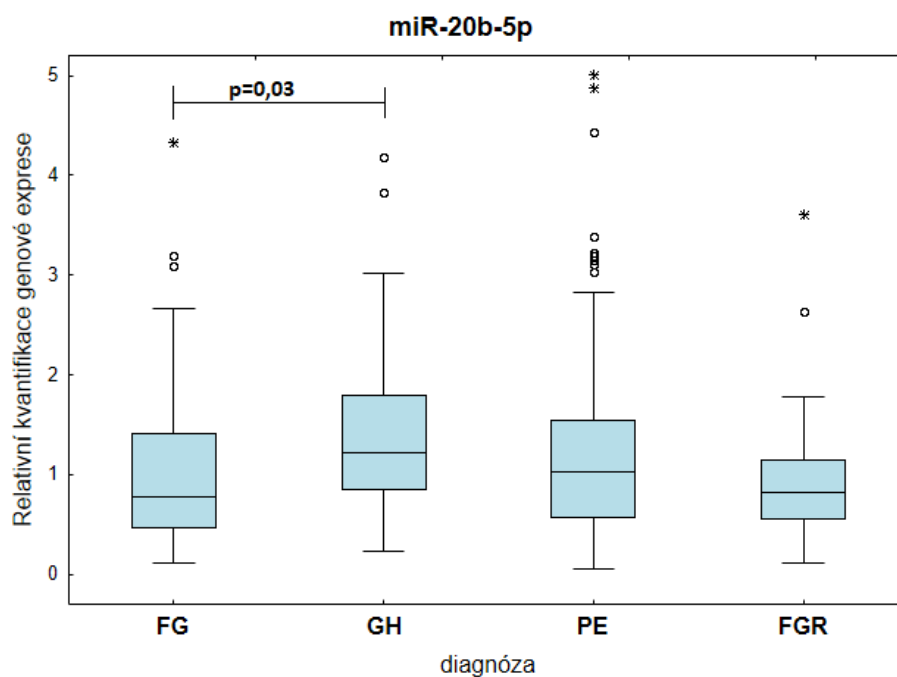
Další soubor výsledků z analýzy genové exprese čtyř základních skupin diagnóz představují ty výsledky, jejichž p-hodnota se nachází pod zadanou $\alpha=0,05$, ale zároveň přesahuje korigovanou p-hodnotu pro 4 skupiny ($p=0,013$). V této skupině jsou čtyři kardiovaskulární miRNA, které vykazují trend k up-regulaci u gestační hypertenze: miR-29a-3p ($p=0,047$) (viz. Graf 9), miR-20b-5p ($p=0,03$) (viz. Graf 10), miR-146a-5p ($p=0,028$) (viz. Graf 11) a miR-199a-5p ($p=0,027$) (viz. Graf 12), přičemž miR-29a-3p ($p=0,034$) vyazuje zároveň trend k up-regulaci u preeklampsie.

Graf 9: Genová exprese miR-29a-3p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)



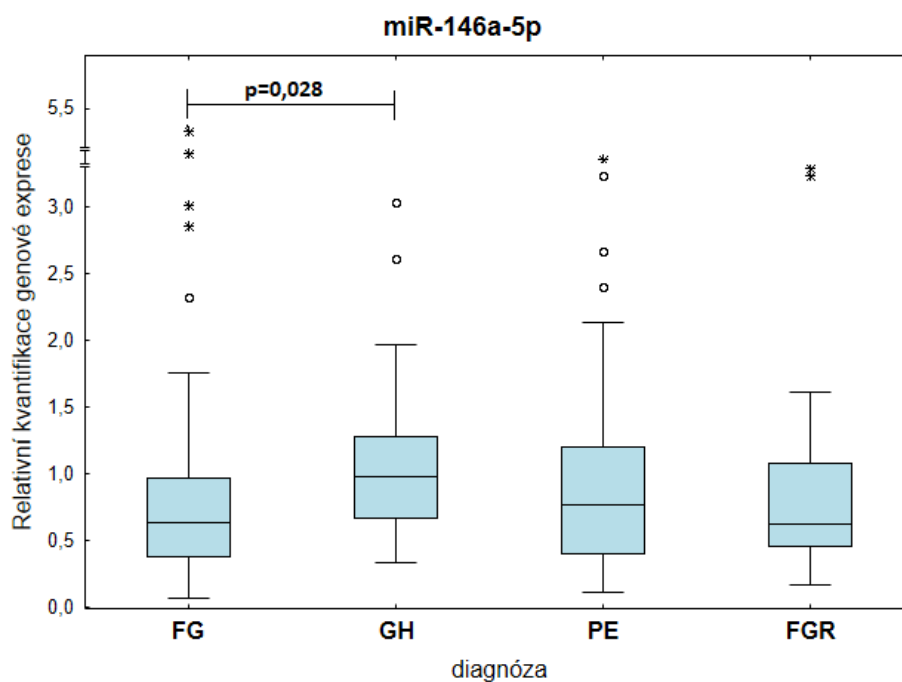
Graf 9: Trend k up-regulaci miR-29a-3p ($p=0,047$) u skupiny s GH v porovnání s FG a trend k up-regulaci miR29a-3p ($p=0,034$) u skupiny s PE v porovnání s FG

Graf 10: Genová exprese miR-20b-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)



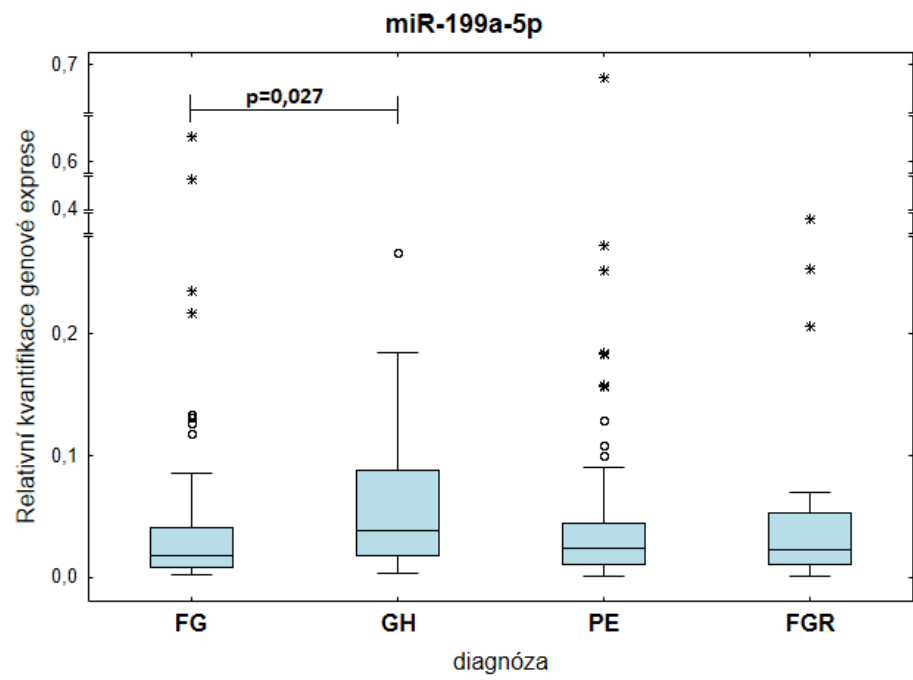
Graf 10: Trend k up-regulaci miR-20b-5p ($p=0,03$) u pacientek s GH v porovnání s FG

Graf 11: Genová exprese miR-146a-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)



Graf 11: Trend k up-regulaci miR-146a-5p ($p=0,028$) u skupiny s GH v porovnání s FG

Graf 12: Genová exprese miR-199a-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)



Graf 12: Trend k up-regulaci miR-199a-5p ($p=0,027$) u pacientek s GH v porovnání s FG

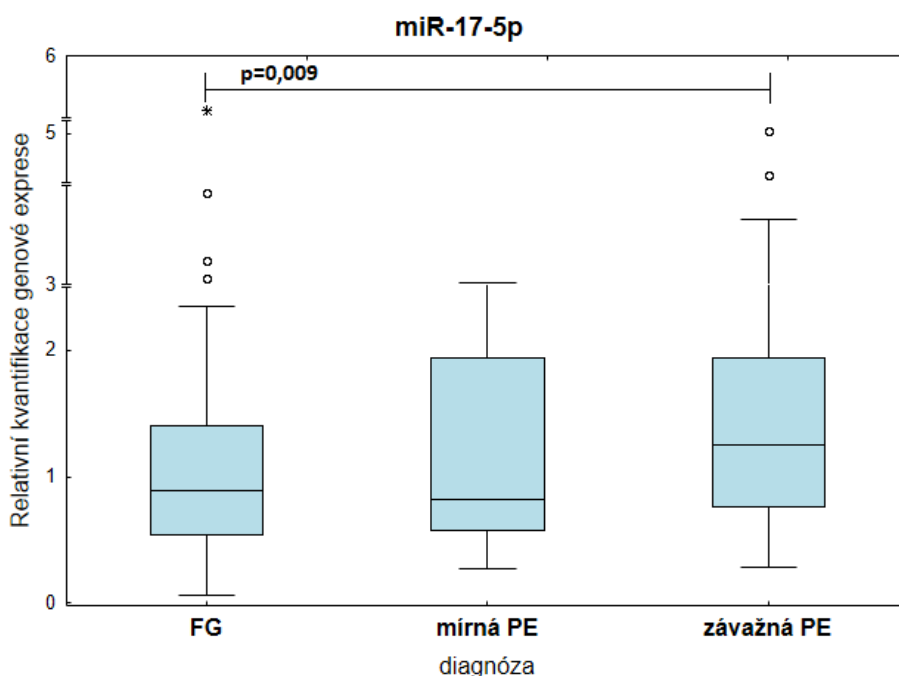
4.2 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi matek s ohledem na závažnost PE

Při porovnání genové exprese kardiovaskulárních miRNA fyziologických gravidit s graviditami s mírnou a závažnou formou preeklampsie byly zaznamenány statisticky signifikantní výsledky, které spadaly do této kategorie i po Bonferroniho korekci hladiny významnosti na hodnotu $p=0,017$. Také byly objeveny takové miRNA, jejichž p-hodnota spadala do intervalu mezi 0,017 a 0,05, a které tudíž vykazují pouze trend k up-regulaci v periferní krvi matek v postpartálním období.

4.2.1. Signifikantní up-regulace miR-17-5p a miR-29a-3p u závažné PE

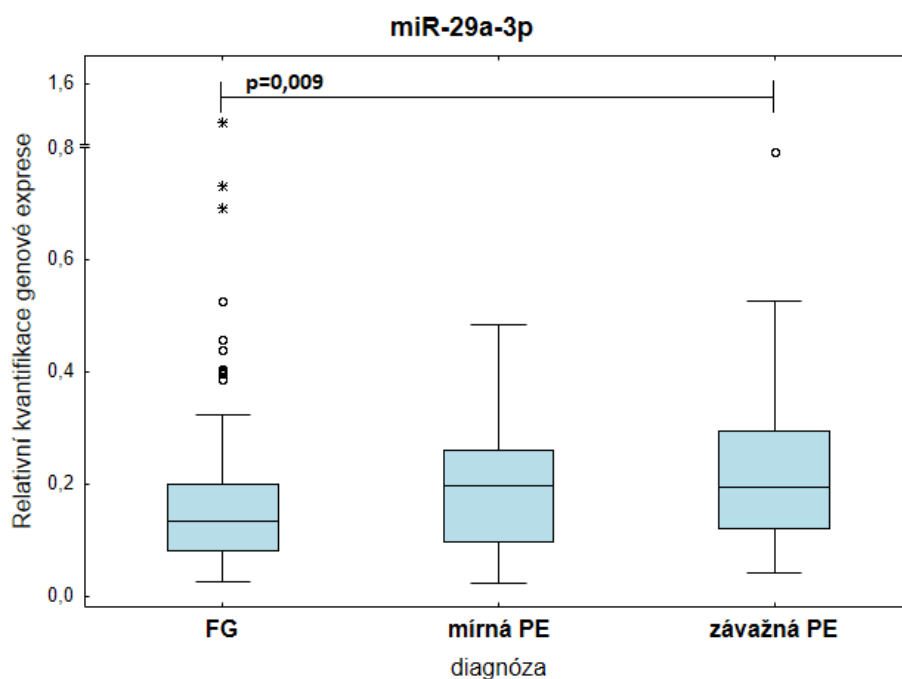
Všechny výsledky v rámci tří výše uvedených skupin pacientek jsou up-regulace zaznamenané u závažné formy PE v porovnání s fyziologickými graviditami. Statisticky signifikantní up-regulace byly zaznamenány u miR-17-5p ($p=0,009$) (viz. Graf 13) a u miR-29a-3p ($p=0,009$) (viz. Graf 14).

Graf 13: Genová exprese miR-17-5p u FG (n=76), mírné PE (n=22) a závažné PE (n=64)



Graf 13: Signifikantní up-regulace miR-17-5p u skupiny se závažnou PE v porovnání s FG

Graf 14: Genová exprese miR-29a-3p u FG (n=76), mírné PE (n=22) a závažné PE (n=64)

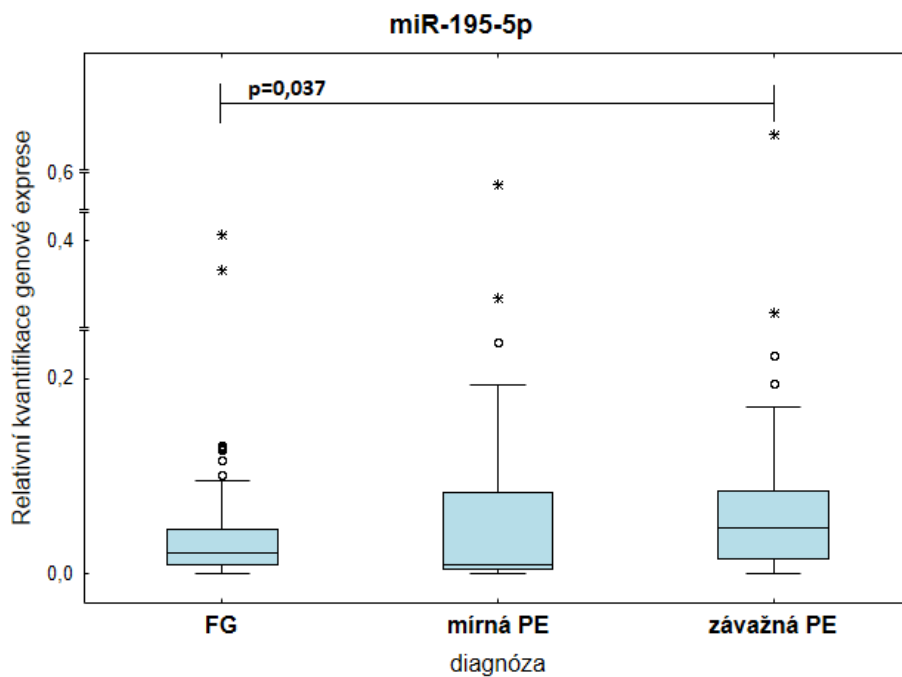


Graf 14: Signifikantní up-regulace miR-29a-3p ($p=0,009$) u pacientek se závažnou PE v porovnání s FG

4.2.2 Trend k up-regulaci miR-133-3p a miR-195-5p u závažné PE

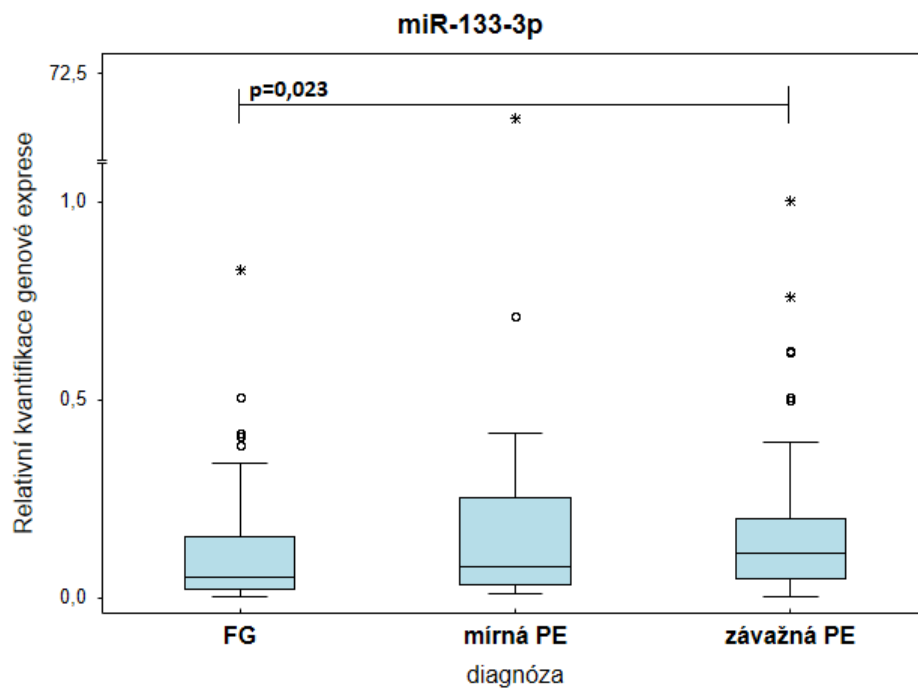
U dalších dvou kardiovaskulárních miRNA byla při srovnání FG se závažnou PE zjištěna up-regulace, ale po aplikaci Bonferroniho korekce ji lze označovat pouze jako trend k up-regulaci. Jedná se o miR-195-5p ($p=0,037$) (viz. Graf 15) a miR-133-3p ($p=0,023$) (viz. Graf 16).

Graf 15: Genová exprese miR-195-5p u FG (n=76), mírné PE (n=22) a závažné PE (n=64)



Graf 15: Trend k up-regulaci miR-195-5p ($p=0,037$) u skupiny se závažnou PE v porovnání s FG

Graf 16: Genová exprese miR-133-3p u FG (n=76), mírné PE (n=22) a závažné PE (n=64)



Graf 16: Trend k up-regulaci miR-133-3p ($p=0,023$) u pacientek se závažnou PE v porovnání s FG

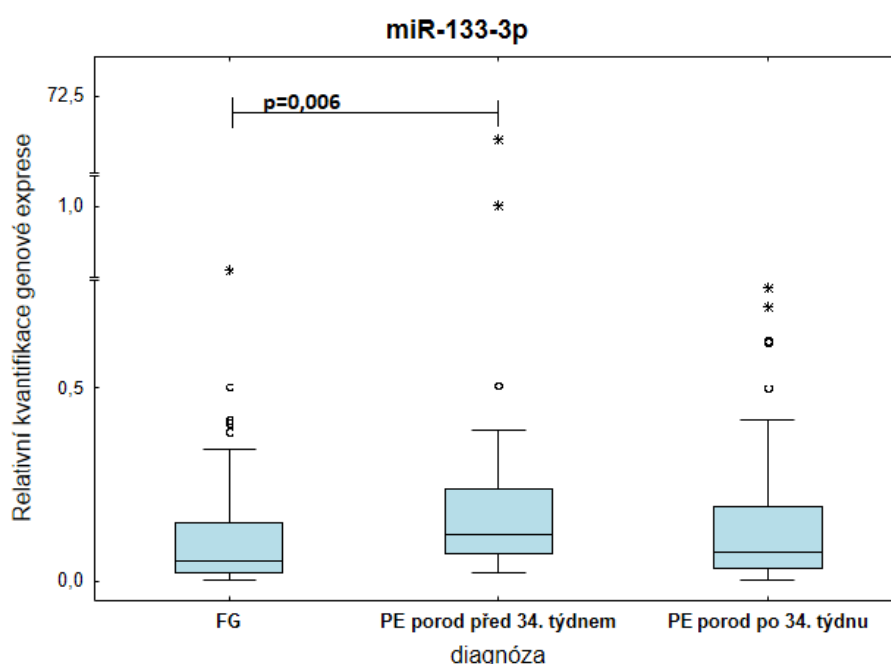
4.3 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi matek s preeklampií s ohledem na dobu ukončení gravidity (před a po 34. gestačním týdnu)

Stejně jako při analýze genové exprese miRNA fyziologických gravidit a případů mírné a závažné preeklampsie, i v rozdělení do skupin podle týdne porodu na časnou a pozdní PE (před 34. a po 34. gestačním týdnem), byly zaznamenány signifikantní výsledky. S FG skupinou čítající 76 matek byly porovnávány dvě skupiny pacientek s preeklampií, a to skupina s časnou formou PE (31 matek), které rodily před 34. gestačním týdnem a skupina s pozdní formou PE (55 matek), které rodily po 34. týdnem. Shodně s analýzou podle závažnosti onemocnění se i v tomto případě jedná o porovnávání 3 skupin, výsledky proto byly korigovány dle Bonferroniho na p-hodnotu 0,017.

4.3.1. Signifikantní up-regulace miR-133-3p u pacientek s časnou formou PE (porod před 34. gestačním týdnem)

Signifikantní zvýšení genové exprese miR-133-3p ($p=0,006$) oproti fyziologickým kontrolám bylo zjištěno u skupiny pacientek s PE, které porodily před 34. týdnem (viz. Graf 17).

Graf 17: Genová exprese miR-133-3p u FG ($n=76$), PE s porodem před 34. týdnem ($n=31$) a PE s porodem po 34. týdnem ($n=55$)

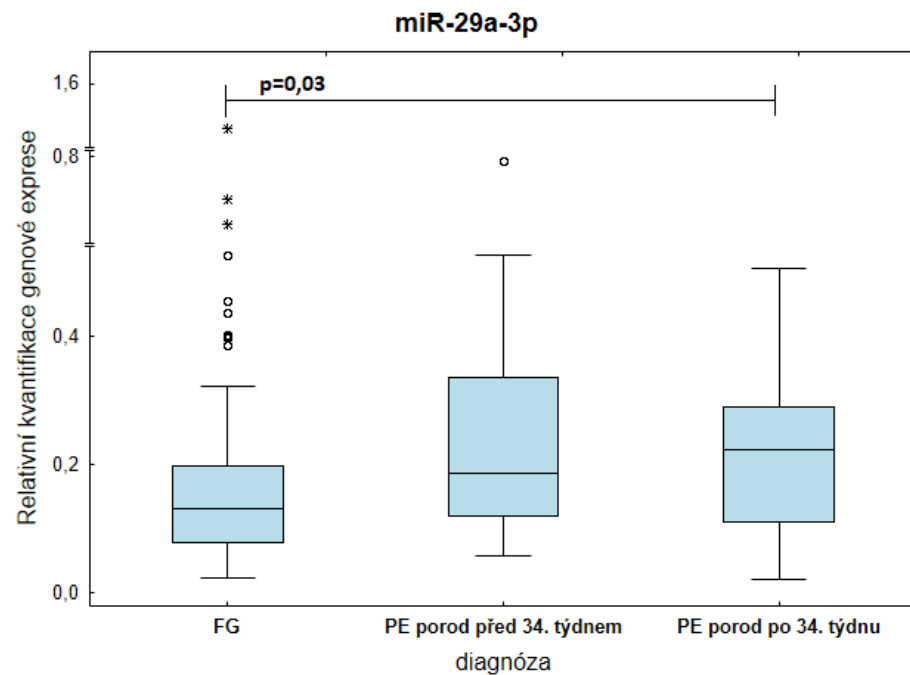


Graf 17: Signifikantní up-regulace miR-133-3p ($p=0,006$) u skupiny s PE a porodem před 34. týdnem v porovnání s FG

4.3.2 Trend k up-regulaci miR-29a-3p u pacientek s pozdní formou PE (porod po 34. gestačním týdnu)

Trend k up-regulaci byl u miR-29a-3p ($p=0,03$) oproti fyziologickým graviditám zaznamenán u skupiny matek s pozdní formou PE, které rodily až po 34. gestačním týdnu (viz. Graf 18).

Graf 18: Genová exprese miR-29a-3p u FG ($n=76$), PE s porodem před 34. týdnem ($n=31$) a PE s porodem po 34. týdnem ($n=55$)



Graf 18: Trend k up-regulaci miR-29a-3p ($p=0,03$) u skupiny s PE a porodem po 34. týdnem v porovnání s FG

5. Diskuse

V této práci byla studována genová exprese 29 miRNA, u kterých je prokázán jejich vliv na funkci kardiovaskulárního systému. Jednalo se o 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-92-3p, miR-100-5p, miR-103-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-133-3p, 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 a miR-574-3p. O těchto miRNA je obecně známo, že vykazují dysregulaci u různých kardiovaskulárních onemocnění. Posttranskripční regulací exprese různých genů buď napomáhají vzniku a rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (Zhao et al., 2005; Suárez et al., 2010), nebo působí proti těmto onemocněním protektivně (Chen et al., 2014; Harris et al., 2008; Cheng et al., 2013).

Kardiovaskulární systém je klíčovým nástrojem homeostázy lidského organismu a jeho správná funkce je pro zdraví člověka nezbytná. V poslední době narůstají počty pacientů s různými kardiovaskulárními onemocněními, které jsou často asociovány s civilizačními chorobami. Jedná se o aterosklerózu, ischemickou chorobu srdeční, infarkt myokardu, cerebrální ictus, srdeční arytmií a trombotické stavy (Ge et al., 2002; Kumar et al., 2014). Je prokázáno, že u různých onemocnění kardiovaskulárního systému je odlišný profil genové exprese různých miRNA. Vzhledem k tomu, že miRNA jsou významným nástrojem posttranskripčních úprav mRNA, zásadně svou činností regulují genovou expresi a tvorbu proteinů v buňce (Cordes et Srivastava, 2009).

Těhotenství představuje pro matku a její kardiovaskulární systém zátěž, a to i v případě, kdy těhotenství probíhá naprosto fyziologicky a bez komplikací. Vzniká nový orgán v podobě placenty a plod vyžaduje dostatečné zásobení kyslíkem a živinami. Pokud ještě navíc některé mechanismy selhávají a nastoupí těhotenské komplikace jako PE, GH nebo FGR, kardiovaskulární systém matky je ještě více zatěžován a profil genové exprese miRNA asociovaných s kardiovaskulárním systémem se mění (Hromadníková et al., 2016). Existují i studie o expresním profilu miRNA v placentě (Hromadníková et al., 2015)

a pupečnickové krvi (Hromadníková et al., 2017), ale hlavním bodem je srovnání našich výsledků s výzkumem periferní krve právě těhotných žen se shodnou diagnózou těhotenské komplikace (Hromadníková et al., 2016). Předmětem diskuse se stává, zda dysregulovaný epigenetický profil v řádu let od porodu v periferní krvi matek zůstává, nebo se opět změní. Objasnění změn expresního profilu miRNA má velký potenciál pro odhad kardiovaskulárního rizika pozdějšího výskytu konkrétních kardiovaskulárních onemocnění v závislosti na průběhu předchozích těhotenství.

5.1 Nově objevené dysregulace expresního profilu miRNA

MiR-17-5p vykazuje zajímavé změny v expresi v periferní krvi matek v těhotenství a po porodu. Jedná se o miRNA exprimovanou v endotelových buňkách, která reguluje angiogenezi (Suárez et al., 2008), urychluje buněčný cyklus (Cloonan et al., 2008) a je up-regulovaná u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními, jako je například ischemická cévní mozková příhoda (Wu et al., 2015). Dřívější studie odhalila down-regulaci této miRNA v periferní krvi právě těhotných žen s FGR, u kterých bylo nutné přistoupit k porodu před 34. týdnem (Hromadníková et al., 2016). V periferní krvi matek s odstupem od porodu ale analýza ukázala významnou změnu genové exprese. Zatímco pacientky po prodělané FGR mají s odstupem od porodu hladinu miR-17-5p v normě, matky po PE vykazují trend k up-regulaci a matky po GH dokonce statisticky významné zvýšení hladiny genové exprese. Při rozlišení závažnosti navíc matky po závažné preeklampsii vykazují také významnou up-regulaci a po zohlednění týdne porodu se trend ke zvýšení genové exprese miR-17-5p ukazuje u matek s porodem po 34. týdnu. Pro matky po prodělané gestační hypertenzi, závažné preeklampsii a preeklampsii s porodem po 34. týdnu to může znamenat větší riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění asociovaných s up-regulací mir-17-5p. Vzhledem k funkcím této miRNA popsaným na str. 20 mohou tyto pacientky mít zvýšené riziko vzniku například ischemické cévní mozkové příhody a různých nádorových onemocnění.

MiR-20a-5p a miR-20b-5p působí jako regulátory angiogeneze. Pravděpodobně suprimují tvorbu VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), který podporuje růst cév. Proto je pod vlivem hypoxie prokázáno snížení miR-20a/b-5p a následné zvýšení hladin VEGF, aby docházelo k neovaskularizaci. (Hua et al., 2006). V krvi těhotných žen při onsetu všech zkoumaných komplikací nebyla nalezena žádná dysregulace miR-20a-5p ani miR-20b-5p (Hromadníková et al., 2016). Naše práce ale odhalila u obou zmíněných miRNA up-regulaci (miR-20a-5p signifikantně, miR-20b-5p v trendu) v periferní krvi matek po porodu s prodělanou gestační hypertenzí. Je tedy možné, že s odstupem od porodu tělo matky zvyšuje expresi miR-20a-5p a miR-20b-5p a tím intenzivně suprimuje angiogenezi. Up-regulace miR-20a-5p i miR-20b-5p je ale mimo jiné asociována se zvýšeným rizikem tumorigeneze (Dews et al., 2006), je tedy možné, že gestační hypertenze predisponuje matky i ke vzniku nádorových onemocnění.

MiR-29a-3p je exprimována v cévních hladkosvalovinových buňkách, kde snižuje tvorbu elastinu a kolagenu a napomáhá i apoptóze myocytů. Bývá up-regulována věkem a při ateroskleróze, může ale i zabraňovat postupu fibrózy (Boon et al., 2011). U právě těhotných žen s různými patologiemi nebyla prokázána žádná dysregulace miR-29a-3p (Hromadníková et al., 2016), ale u matek s prodělanou PE a GH s odstupem od porodu byl objeven trend k up-regulaci této miRNA. S odlišením mírné a závažné preeklampsie se objevuje signifikantní up-regulace u závažných případů PE a po rozdělení skupin s PE dle týdne porodu vykazují trend k up-regulaci pacientky, které rodily po 34. týdnu. Zvýšená genová exprese miR-29a-3p umocňuje snížení hladin kolagenu a elastinu a může znamenat větší riziko vzniku kardiovaskulárních chorob, jako je například ateroskleróza.

MiR-133-3p je spolu s miR-1-3p exprimována v myocytech a kardiomyocytech (Van Rooij et al., 2008 a). Tato miRNA je důležitá pro správnou funkci srdce. Na zvířecích modelech je prokázáno, že absolutní nedostatek miR-133-3p způsobí defekty srdce, aberantní kontraktilitu myokardu a více než dvojnásobně zvýšenou proliferaci kardiomyocytů. Patologickým jevem je ale i up-regulace miR-133-3p. U zvířecích modelů vedlo 15násobné zvýšení genové exprese k embryonální letalitě. Byly zde pozorovány silné defekty srdce, o dvě třetiny tenčí stěny srdečních komor (pravděpodobně kvůli nedostatečné proliferaci)

a zvětšené srdeční síně v porovnání s kontrolami. Dále bylo potvrzeno, že cílem pro miR-133-3p jsou cykliny D1, D2 a B1, což jen potvrzuje, že miR-133-3p suprimuje proliferaci myocytů a kardiomyocytů (Liu et al., 2008). U lidí je pozorována down-regulace miR-133-3p s věkem a výraznější snížení hladin genové exprese je patrné u pacientů s fibrilací síní. To je dáváno do souvislosti s přítomností výrazně většího počtu hyperpolarizačních Ca^{2+} kanálů v myokardu pacientů s fibrilací síní. Předpokládá se, že miR-133-3p suprimuje tvorbu těchto proteinových kanálů (Li et al., 2015). V periferní krvi právě těhotných žen s rozličnými patologiemi nebyl nalezen aberantní profil genové exprese miR-133-3p (Hromadníková et al., 2016), ale naše studie odhalila s odstupem let od porodu signifikantní up-regulaci u pacientek s časnou formou PE (porod před 34. týdnem) a trend k up-regulaci u pacientek po prodělané závažné formě preeklampsie. Je možné, že silná up-regulace u pacientek s časnou formou PE negativně ovlivňuje funkci a stavbu myokardu.

MiR-143-3p je miRNA, která pomocí regulace tvorby myocardinu umožňuje diferenciaci cévních buněk hladkého svalstva, dále podmiňuje kontraktilní schopnost a plasticitu těchto buněk a omezuje jejich nadměrnou proliferaci. Down-regulace miR-143-3p je pozorována u aterosklerózy a poškozených, málo diferencovaných cév (Cordes et al., 2009). Studie periferní krve těhotných žen s těhotenskými komplikacemi neukázala žádné dysregulace miR-143-3p (Hromadníková et al., 2016). Periferní krev matek po prodělané GH ale vykazuje s odstupem od porodu v porovnání s periferní krví matek po fyziologické graviditě signifikantní up-regulaci miR-143-3p. Je možné, že se jedná o kompenzační mechanismus organismu matky po náhlé hypertenzi prodělané v těhotenství.

MiR-146a-5p je exprimována v buňkách endotelu a má *in vitro* prokázané protizánětlivé účinky. Hladina této miRNA u buněk stimulovaných zánětlivým cytokinem IL-1 β prudce narůstá. Zároveň buňky s navozenou genovou over-expresí miR-146a-5p vykazují redukci tvorby adhezních molekul (ICAM-1, VCAM-1), které jsou klíčové pro rozvoj zánětlivé reakce v cévní stěně (Cheng et al., 2013). Další studie popisuje miR-146a-5p jako důležitou agens limitující senescenci endotelových buněk a spojuje down-regulaci této miRNA s postupujícím věkem (Vasa-Nicotera et al., 2011). V periferní krvi matek v průběhu těhotenství byla nalezena down-regulace miR-146a-5p u případů fetální růstové restrikce (Hromadníková et al., 2016), ale s odstupem od porodu se expresní profil matek po prodělané FGR neliší od matek po fyziologické graviditě. Oproti tomu matky, které v těhotenství měly gestační hypertenzi, vykazují s odstupem od porodu trend up-regulaci miR-146a-5p. Vzhledem k protektivnímu vlivu, který má miR-146a-5p na endotelovou tkáň, můžeme předpokládat, že se jedná o kompenzační mechanismus mateřského organismu po odeznění příznaků gestační hypertenze.

Nadměrná exprese miR-195-5p v kardiomyocytech způsobuje patologicky zvýšený nárůst hmoty srdečního svalu, je to tedy miRNA typicky up-regulovaná u hypertrofie (Van Rooij et al., 2006). Studie matek v průběhu těhotenství neodhalila u žádné z těhotenských patologií dysregulaci miR-195-5p v periferní krvi (Hromadníková et al., 2016). U matek po závažné formě PE jsme v periferní krvi s odstupem 3-10 let od porodu ale objevili trend k up-regulaci miR-195-5p. Může se jednat o náznak hypertrofie srdce vzniklé z důvodu zvýšené námahy, kterou způsobovalo těhotenství se závažnou patologií. Je otázkou, proč up-regulace miR-195-5p vzniká až s výrazným časovým odstupem od porodu. Může se jednat o kumulativní efekt postupného nárůstu hmoty srdečního svalu a s tím spjaté up-regulace miR-195-5p, která ještě v průběhu těhotenství není zaznamatelná.

MiR-199a-5p snižuje proliferaci a reguluje velikost buněk hladkého svalstva (Gheinani et al., 2015), lze tedy předpokládat, že obdobný účinek má i na cévní hladkosvalové buňky (VSMC). MiR-199a-5p také inhibuje apoptózu, bývá up-regulována při srdeční hypertrofii, a down-regulována při hypoxii (Rane et al., 2009). V periferní krvi těhotných žen byly objeveny down-regulace miR-199a-5p u skupin s FGR a GH (Hromadníková et al., 2016). U všech těchto případů může nedostatek miR-199a-5p signalizovat odpověď na hypoxii. U matek s FGR ale s odstupem od porodu není patrná dysregulace, jejich hladina miR-199a-5p je srovnatelná s genovou expresí u fyziologických gravidit. Největším zvratem je ovšem situace u pacientek s GH, kde down-regulace při onsetu hypertenze v těhotenství s odstupem od porodu dokonce přerůstá ve trend k up-regulaci. To může být způsobeno tím, že po prodělané hypertenzi v těhotenství za snížené genové exprese miR-199a-5p až mohutní srdeční sval matky.

MiR-499-5p je miRNA vykazující velice slibnou korelaci s výskytem infarktu myokardu a kardiovaskulárních chorob. Je dokonce jedním z potenciálních markerů poškození myokardu cirkulujících v periferní krvi. Oproti troponinu a kreatin-kináze MB vykazuje miR-499-5p stabilnější korelaci s mírou poškození srdeční tkáně a má potenciál být ještě přesnějším biomarkerem. Studie na zvířecích modelech potvrdily, že tato miRNA je specificky exprimována v kardiomyocytech a vykazuje up-regulaci při poškození srdečního svalu (Zhang et al., 2015). Žádná ze skupin těhotenských komplikací v průběhu těhotenství nevykazovala dysregulaci této miRNA (Hromadníková et al., 2016), ale pacientky po gestační hypertenzi mají s odstupem od porodu v periferní krvi miR-499-5p signifikantně up-regulovanou. Je otázkou, proč se profil této miRNA mění až s odstupem od porodu, jisté ale je, že může signalizovat poškození tkáně myokardu a významně zvyšovat riziko vzniku ischemické choroby srdeční a infarktu myokardu u matek po prodělané gestační hypertenzi.

5.2 MiRNA se změnou profilu genové exprese s odstupem 3-10 let od porodu

U dvou miRNA (miR-100-5p a miR-125b-5p) byly ve studii zkoumající expresní profil u právě těhotných žen zaznamenány dysregulace (Hromadníková et al., 2016). Naše studie však potvrdila, že tento dysregulovaný epigenetický profil se u pacientek s odstupem od porodu již nevyskytuje.

MiR-100-5p má anti-angiogenní účinky a zhoršuje příznaky aterosklerózy, protože působí destabilizačně na plak v cévách (Cipollone et al., 2011). Down-regulace miR-100-5p byla pozorována v periferní krvi těhotných žen se všemi těhotenskými komplikacemi (GH, PE i FGR) v porovnání s fyziologickými graviditami, a tím představuje společný fenomén pro patologie v těhotenství (Hromadníková et al., 2016). Je otázkou, proč je přítomnost těhotenských komplikací v tomto smyslu protektivní proti negativnímu účinku miR-100-5p. Jisté ale je, že tato protektivní down-regulace se již po porodu nevyskytuje. Genová exprese miR-100-5p je s časovým odstupem srovnatelná u matek po prodělané těhotenské komplikaci s expresním profilem matek po fyziologické graviditě.

MiR-125b-5p ovlivňuje svou činností kalcifikaci cévních buněk hladkého svalstva, konkrétně bývá down-regulována při kalcifikaci cév, proti které působí protektivně (Goettsch et al., 2011). Ve dřívější studii byly v periferní krvi matek s onsetem preeklampsie, FGR i gestační hypertenze oproti fyziologickým graviditám objeveny down-regulace miR-125-b (Hromadníková et al., 2016). V periferní krvi matek po porodu jsme však prokázali, že genová exprese miR-125b-5p se u matek s prodělanou těhotenskou komplikací neliší od fyziologických kontrol. Lze tedy předpokládat, že v průběhu těhotenství s různými těhotenskými komplikacemi jsou mateřské cévy vystaveny riziku ztráty plasticity a progresu kalcifikace z důvodu nedostatku miR-125b-5p. Po porodu se již ale dysregulace u žádného souboru nevyskytují. S odstupem od porodu se tedy případná down-regulace vyrovná a na postpartální riziko kalcifikace cév nemá miR-125b-5p vliv.

Zkoumaný profil kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi matek po porodu vykazuje značné odchylky v závislosti na prodělané komplikaci. Změny ve formě up-regulací, či trendů k up-regulaci, související s preeklampsií byly pozorovány u miR-17-5p, miR-29a-3p, miR-133-3p a miR-195-5p. Up-regulace, či trend k up-regulaci u matek po gestační hypertenzi vykazovaly miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-29a-3p, miR-143a-3p, miR-146a-5p, miR-199a-5p a miR-499-5p. U fetální růstové restrikce nebyly nalezeny žádné dysregulace zkoumaných miRNA.

Všechny výše uvedené dysregulace mají potenciál využití k diagnostickým účelům. Je reálně možné matkám po prodělané preeklampsii a gestační hypertenzi doporučit vyšetření genové exprese těchto kardiovaskulárních miRNA v jejich periferní krvi a na základě této neinvazivní metody odhadnout riziko vzniku chorob kardiovaskulárního systému. Nebyla nalezena miRNA natolik specificky a spolehlivě dysregulovaná, aby mohla sama sloužit jako biomarker onemocnění. Otestování panelu vybraných miRNA ale může v kombinaci podat spolehlivou informaci o kardiovaskulárním stavu matky a jejích predispozicích ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Díky tomuto vyšetření by bylo možné matkám s predispozicí doporučit častější kontroly na kardiologii a angiologii a zdůraznit význam preventivních opatření, jako je pravidelná fyzická aktivita, udržení nízké hladiny LDL-cholesterolu v krvi, omezení kouření, redukce břišního typu obezity a prevence vzniku diabetu mellitu. Dodržování těchto doporučení může matkám s nově objevenou predispozicí závisující na proběhlé těhotenské komplikaci značně pomoci v udržení kardiovaskulárního zdraví.

6. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se zabývala studiem genové exprese kardiovaskulárních miRNA v periferní krvi matek po porodu. Pomocí zjištěných hladin genové exprese byly úspěšně vyhodnoceny takové miRNA, které i po letech od porodu vykazují značnou dysregulaci v závislosti na průběhu těhotenství a ovlivňují zdravotní stav matky. Patří mezi ně up-regulace, či trend k up-regulaci miR-17-5p, miR-29a-3p, miR-133-3p a miR-195-5p u matek, které v těhotenství prodělaly preeklampsii a up-regulace (miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-143-3p, miR-499a-5p), či trend k up-regulaci (miR-20b-5p, miR-29a-3p, miR-146a-5p, miR-199a-5p) u pacientek po gestační hypertenzi.

Zároveň bylo zjištěno, že u preeklampsie je profil kardiovaskulárních miRNA ovlivněn jak závažností onemocnění, tak týdnem porodu. U fetální růstové restrikce nebyla v profilu zkoumaných kardiovaskulárních miRNA zjištěna žádná významná dysregulace oproti fyziologickým graviditám, ani žádná z podskupin FGR se neliší svým expresním profilem vybraných miRNA.

Všechny objevené dysregulace v periferní krvi matek po porodu mají potenciál k využití pro diagnostické účely a na základě genové exprese těchto miRNA je možné odhadovat kardiovaskulární riziko v závislosti na prodělané těhotenské komplikaci. Do budoucna je tedy reálně možné využít tento výzkum v klinické praxi. Dále by bylo vhodné se zabývat i expresí kardiovaskulárních miRNA u dětí a porovnávat jejich profil podle fyziologických, či patologických podmínek, kterým byly vystaveny v prenatální fázi vývoje. I u nich by dysregulace těchto miRNA v periferní krvi mohly předznamenávat kardiovaskulární obtíže a po vyšetření genové exprese by bylo možné řešit tyto problémy u dětí pomocí prevence.

7. Seznam použité literatury

AI, Jing, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010, 391.1: 73-77.

ALBU, A. R., et al. Predictive factors for intrauterine growth restriction. *Journal of medicine and life*, 2014, 7.2: 165.

AMERES, Stefan Ludwig; MARTINEZ, Javier; SCHROEDER, Renée. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 2007, 130.1: 101-112.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG), et al. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet. Gynecol.*, 2002, 99: 159-167.

ANTIPLATELET TRIALISTS' COLLABORATION, et al. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Bmj*, 1994, 308.6921: 81-106.

ANZAI, Toshihisa; OGAWA, Satoshi. Key Points and Pitfalls in Electrocardiographic Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *JAPAN MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL*, 2002, 45.4: 135-142.

AZUMA-MUKAI, Asuka, et al. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105.23: 7964-7969.

BACKES, Carl H., et al. Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. *Journal of pregnancy*, 2011, 2011.

BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116.2: 281-297.

- BARTEL, David P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136.2: 215-233.
- BENNETT, Martin R.; SINHA, Sanjay; OWENS, Gary K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circulation research*, 2016, 118.4: 692-702.
- BENTWICH, Isaac, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics*, 2005, 37.7: 766.
- BONFERRONI, C. E. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilita Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze. 1936, *Google Scholar*, 1959, 8: 3-62.
- BOON, Reinier A., et al. MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circulation research*, 2011, CIRCRESAHA. 111.255737.
- BORNA, Sedigheh; NEAMATIPOOR, Ebrahim; RADMAN, Narges. Risk of coronary artery disease in women with history of pregnancies complicated by preeclampsia and LBW. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2012, 25.7: 1114-1116.
- BOŠTJANČIČ, Emanuela; ZIDAR, Nina; GLAVAČ, Damjan. MicroRNAs and cardiac sarcoplasmic reticulum calcium ATPase-2 in human myocardial infarction: expression and bioinformatic analysis. *BMC genomics*, 2012, 13.1: 552.
- BROWN, Mark A., et al. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). 2001.
- CALIN, George A.; CROCE, Carlo M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews cancer*, 2006, 6.11: 857-866.
- CARTHEW, Richard W.; SONTHEIMER, Erik J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136.4: 642-655.

CIMMINO, Amelia, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102.39: 13944-13949.

CIPOLLONE, Francesco, et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke*, 2011, 42.9: 2556-2563.

CLAUSSON, Britt, et al. Perinatal outcome in SGA births defined by customised versus population-based birthweight standards. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2001, 108.8: 830-834.

CLOONAN, Nicole, et al. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome biology*, 2008, 9.8: R127.

CORDES, Kimberly R., et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, 2009, 460.7256: 705-710.

CORDES, Kimberly R.; SRIVASTAVA, Deepak. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circulation research*, 2009, 104.6: 724-732.

CORSTEN, Maarten F., et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, 2010, CIRCGENETICS. 110.957415.

CRAICI, Iasmina M., et al. Pre-eclamptic pregnancies: an opportunity to identify women at risk for future cardiovascular disease. *Women's Health*, 2008, 4.2: 133-135.

DANGWAL, S.; BANG, C.; THUM, T. Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research. *Cardiovascular research*, 2011, 93.4: 545-554.

D'ALESSANDRA, Yuri, et al., Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European heart journal*, 2010, 31.22: 2765-2773.

DELISLE, Brian P., et al. Biology of cardiac arrhythmias. *Circulation research*, 2004, 94.11: 1418-1428.

DENLI, Ahmet M., et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 2004, 432.7014: 231.

DEWS, Michael, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nature genetics*, 2006, 38.9: 1060.

ELTON, Terry S.; KHAN, Mahmood; TARENTYEV, Dmitry. MicroRNAs in cardiovascular disease. *F1000 medicine reports*, 2011, 3.

FABIAN, Marc R.; SONENBERG, Nahum. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2012, 19.6: 586.

FANG, Yun, et al. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107.30: 13450-13455.

FIGUERAS, Francesc; GRATACÓS, Eduard. Update on the diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage-based management protocol. *Fetal diagnosis and therapy*, 2014, 36.2: 86-98.

FICHTLSCHERER, Stephan, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease: novelty and significance. *Circulation research*, 2010, 107.5: 677-684.

FISHER, Ronald Aylmer. Theory of statistical estimation. In: *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*. Cambridge University Press, 1925. p. 700-725.

FEINBERG, Mark W.; MOORE, Kathryn J. MicroRNA regulation of atherosclerosis. *Circulation research*, 2016, 118.4: 703-720.

FERNÁNDEZ-HERNANDO, Carlos; BALDÁN, Ángel. MicroRNAs and cardiovascular disease. *Current genetic medicine reports*, 2013, 1.1: 30-38.

FUSTER, Valentin, et al. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation*, 1990, 82.3 Suppl: II47-59.

GE, Dingfei; SRINIVASAN, Narayanan; KRISHNAN, Shankar M. Cardiac arrhythmia classification using autoregressive modeling. *Biomedical engineering online*, 2002, 1.1: 5.

GHATTAS, Angie, et al. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now?. *Journal of the American College of Cardiology*, 2013, 62.17: 1541-1551.

GHEINANI, Ali Hashemi, et al. MicroRNA MiR-199a-5p regulates smooth muscle cell proliferation and morphology by targeting WNT2 signaling pathway. *Journal of biological chemistry*, 2015, 290.11: 7067-7086.

GOETTSCHE, Claudia, et al. miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells. *The American journal of pathology*, 2011, 179.4: 1594-1600.

GRIFFITHS-JONES, Sam. The microRNA registry. *Nucleic acids research*, 2004, 32.suppl_1: D109-D111.

GRIFFITHS-JONES, Sam, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 2006, 34.suppl_1: D140-D144.

HACKL, Matthias, et al. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging cell*, 2010, 9.2: 291-296.

HARRIS, Tamia A., et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105.5: 1516-1521.

HARTMANN, Petra; SCHOBER, Andreas; WEBER, Christian. Chemokines and microRNAs in atherosclerosis. *Cellular and molecular life sciences*, 2015, 72.17: 3253-3266.

HATAHET, Zafer, et al. New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269.29: 18814-18820.

HEIT, John A.; SPENCER, Frederick A.; WHITE, Richard H. The epidemiology of venous thromboembolism. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 2016, 41.1: 3-14.

HOSODA, Toru, et al. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Circulation*, 2011, CIRCULATIONAHA. 110.982918.

HROMADNÍKOVÁ, Ilona, et al. Cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs are dysregulated in placental tissues affected with gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction. *PloS one*, 2015, 10.9: e0138383.

HROMADNÍKOVÁ, Ilona, et al. Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. *Thrombosis research*, 2016, 137: 126-140.

HROMADNÍKOVÁ, Ilona, et al. Profiling of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNA expression in umbilical cord blood in gestational hypertension, preeclampsia and fetal growth restriction. *International journal of cardiology*, 2017, 249: 402-409.

HSU, An, et al. Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *BioMed research international*, 2014, 2014.

HUA, Zhong, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PloS one*, 2006, 1.1: e116.

CHAN, Stephen Y.; LOSCALZO, Joseph. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell cycle*, 2010, 9.6: 1072-1083.

CHEN, Kui, et al. MicroRNA-101 mediates the suppressive effect of laminar shear stress on mTOR expression in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2012, 427.1: 138-142.

CHEN, Chen, et al. Meta-analysis of Hsa-mir-499 polymorphism (rs3746444) for cancer risk: evidence from 31 case-control studies. *BMC medical genetics*, 2014, 15.1: 126.

CHEN, Xi, et al. Kinetics of plasma microRNA-499 expression in acute myocardial infarction. *Journal of thoracic disease*, 2015, 7.5: 890.

CHEN, Wei; OU, He-Sheng. Regulation of miR-24 on vascular endothelial cell function and its role in the development of cardiovascular disease. *Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]*, 2016, 68.2: 201-206.

CHENG, Yunhui, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy?. *The American journal of pathology*, 2007, 170.6: 1831-1840.

CHENG, Yunhui, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clinical Science*, 2010, 119.2: 87-95.

CHENG, Henry S., et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO molecular medicine*, 2013, 5.7: 1017-1034.

IKEDA, Sadakatsu, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological genomics*, 2007, 31.3: 367-373.

ISHIKAWA, Ken-ichi, et al. A genotoxic stress-responsive miRNA, miR-574-3p, delays cell growth by suppressing the enhancer of rudimentary homolog gene in vitro. *International journal of molecular sciences*, 2014, 15.2: 2971-2990.

JACOBS, Mollie E.; WINGO, Charles S.; CAIN, Brian D. An emerging role for microRNA in the regulation of endothelin-1. *Frontiers in physiology*, 2013, 4: 22.

JANSE, Michiel J.; WIT, Andre L. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiological reviews*, 1989, 69.4: 1049-1169.

JI, Ruirui, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circulation research*, 2007, 100.11: 1579-1588.

JICKLING, Glen C., et al. microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets. *PloS one*, 2014, 9.6: e99283.

KHAWAJA, Tuba, et al. Increased regional epicardial fat volume associated with reversible myocardial ischemia in patients with suspected coronary artery disease. *Journal of Nuclear Cardiology*, 2015, 22.2: 325-333.

KRUSKAL, William H.; WALLIS, W. Allen. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 1952, 47.260: 583-621.

KUMAR, Sandeep, et al. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2014, 34.10: 2206-2216.

LAUSMAN, Andrea, et al. Intrauterine growth restriction: screening, diagnosis, and management. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 2013, 35.8: 741-748.

LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75. 5: 843-854.

LEVI, M., et al. Arterial and venous thrombosis: more in common than previously thought. *Arterial and venous thrombosis: more in common than previously thought*, 2011, 3.

LEVINE, Richard J., et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *New England journal of medicine*, 2004, 350.7: 672-683.

LEVY, Daniel, et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *New England Journal of Medicine*, 1990, 322.22: 1561-1566.

LIBBY, Peter; RIDKER, Paul M.; MASERI, Attilio. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002, 105.9: 1135-1143.

LIBBY, Peter; DICARLI, Marcelo; WEISSLEDER, Ralph. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. *Journal of Nuclear Medicine*, 2010, 51.Supplement 1: 33S-37S.

LI, Yao-Dong, et al. Altered expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and microRNA-1 and-133 in patients with age-associated atrial fibrillation. *Molecular medicine reports*, 2015, 12.3: 3243-3248.

LI, Yifan, et al. MicroRNA-20b-5p functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by regulating cellular proliferation, migration and apoptosis. *Molecular medicine reports*, 2016, 13.2: 1895-1901.

LIN, Zhiqiang, et al. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.29: 12103-12108.

LIU, Ning, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & development*, 2008, 22.23: 3242-3254.

LIU, Xiaojun, et al. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circulation research*, 2009, 104.4: 476-487.

LIU, Da-Zhi, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2010, 30.1: 92-101.

LIU, Hai, et al. Atrial fibrillation alters the microRNA expression profiles of the left atria of patients with mitral stenosis. *BMC cardiovascular disorders*, 2014, 14.1: 10.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 2001, 25.4: 402-408.

LLOYD-JONES, D., et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2010, 121.7: e46.

MA, Xiaochun; MA, Chi; ZHENG, Xia. MicroRNA-155 in the pathogenesis of atherosclerosis: a conflicting role?. *Heart, Lung and Circulation*, 2013, 22.10: 811-818.

MACKAY, Judith; MENSAH, George A.; GREENLUND, Kurt. *The atlas of heart disease and stroke*. 2004, World Health Organization.

MÄNNISTÖ, Tuija, et al. Elevated blood pressure in pregnancy and subsequent chronic disease risk. *Circulation*, 2013, 127.6: 681.

MCDONALD, Sarah D., et al. Measures of cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis in a cohort of women with a remote history of preeclampsia. *Atherosclerosis*, 2013, 229.1: 234-239.

MEADE, T. W., et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *The Lancet*, 1986, 328.8506: 533-537.

NATTEL, Stanley, et al. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiological reviews*, 2007, 87.2: 425-456.

NAZARI-JAHANTIGH, Maliheh, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *The Journal of clinical investigation*, 2012, 122.11: 4190-4202.

NI, Chih-Wen; QIU, Haiwei; JO, Hanjoong. MicroRNA-663 upregulated by oscillatory shear stress plays a role in inflammatory response of endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2011, 300.5: H1762-H1769.

NISHIGUCHI, Tsuyoshi; IMANISHI, Toshio; AKASAKA, Takashi. MicroRNAs and cardiovascular diseases. *BioMed research international*, 2015, 2015.

ONO, Koh; KUWABARA, Yasuhide; HAN, Jiahuai. MicroRNAs and cardiovascular diseases. *The FEBS journal*, 2011, 278.10: 1619-1633.

PETERSEN, John W.; PEPINE, Carl J. Microvascular coronary dysfunction and ischemic heart disease: where are we in 2014?. *Trends in cardiovascular medicine*, 2015, 25.2: 98-103.

POWE, Camille E.; LEVINE, Richard J.; KARUMANCHI, S. Ananth. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium. *Circulation*, 2011, 123.24: 2856-2869.

PRANDONI, Paolo, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *New England Journal of Medicine*, 2003, 348.15: 1435-1441.

PUEYO, Maria E., et al. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000, 20.3: 645-651.

QIN, Jizheng, et al. A panel of microRNAs as a new biomarkers for the detection of deep vein thrombosis. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 2015, 39.2: 215-221.

RAJABI, Mitra, et al. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart failure reviews*, 2007, 12.3-4: 331-343.

RANE, Shweta, et al. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 α and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circulation research*, 2009, 104.7: 879-886.

RATH, Werner; FISCHER, Thorsten. The diagnosis and treatment of hypertensive disorders of pregnancy: new findings for antenatal and inpatient care. *Deutsches Ärzteblatt International*, 2009, 106.45: 733.

RAYNER, Katey J., et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 2011, 121.7: 2921-2931.

REDMAN, Christopher W.; SARGENT, Ian L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 2005, 308.5728: 1592-1594.

RESNIK, Robert. Intrauterine growth restriction. *Obstetrics & Gynecology*, 2002, 99.3: 490-496.

RINK, Cameron; KHANNA, Savita. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. *Physiological genomics*, 2011, 43.10: 521-528.

SAYED, Danish, et al. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circulation research*, 2007, 100.3: 416-424.

SEXTON, Travis; SMYTH, Susan S. Novel mediators and biomarkers of thrombosis. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 2014, 37.1: 1-3.

SHAPIRO, Samuel Sanford; WILK, Martin B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 1965, 52.3/4: 591-611.

SIBAI, Baha; DEKKER, Gus; KUPFERMINC, Michael. Preeclampsia. *The Lancet*, 2005, 365.9461: 785-799.

SIBAI, Baha M. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, 2003, 102.1: 181-192.

SIBAI, Baha M., et al. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 1993, 169.4: 1000-1006.

SIOMI, Haruhiko; SIOMI, Mikiko C. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular cell*, 2010, 38.3: 323-332.

SMALL, Eric M.; OLSON, Eric N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*, 2011, 469.7330: 336-342.

STAREGA-ROSLAN, Julia, et al. Structural basis of microRNA length variety. *Nucleic acids research*, 2010, 39.1: 257-268.

STECKER, Eric C., et al. Ischemic heart disease diagnosed before sudden cardiac arrest is independently associated with improved survival. *Journal of the American Heart Association*, 2014, 3.5: e001160.

SUÁREZ, Yajaira, et al. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105.37: 14082-14087.

SUÁREZ, Yajaira, et al. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on

human endothelial cells: feedback control of inflammation. *The journal of immunology*, 2010, 184.1: 21-25.

SUN, Hai-Xiang, et al. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*, 2012, HYPERTENSIONAHA. 112.197301.

SUN, Xinghui, et al. Systemic Delivery of MicroRNA-181b Inhibits NF- κ B Activation, Vascular Inflammation, and Atherosclerosis in Apoe^{-/-} Mice. *Circulation research*, 2013, CIRCRESAHA. 113.302089.

TABAS, Ira; GARCÍA-CARDEÑA, Guillermo; OWENS, Gary K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol*, 2015, 209.1: 13-22.

TATSUGUCHI, Mariko, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2007, 42.6: 1137-1141.

TENHOLA, Sirpa, et al. Maternal preeclampsia predicts elevated blood pressure in 12-year-old children: evaluation by ambulatory blood pressure monitoring. *Pediatric research*, 2006, 59.2: 320-324.

THUM, Thomas, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 2008, 456.7224: 980.

TRAJKOVSKI, Mirko, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, 2011, 474.7353: 649-653.

UZAN, Jennifer, et al. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular health and risk management*, 2011, 7: 467.

VALENSISE, Herbert, et al. Maternal diastolic dysfunction and left ventricular geometry in gestational hypertension. *Hypertension*, 2001, 37.5: 1209-1215.

VANDESOMPELE, Jo, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 2002, 3.7: research0034. 1.

VAN DER LOOP, Frank TL, et al. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, 1996, 134.2: 401-411.

VAN ROOIJ, Eva, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103.48: 18255-18260.

VAN ROOIJ, Eva; LIU, Ning; OLSON, Eric N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics*, 2008, 24.4: 159-166. (a)

VAN ROOIJ, Eva, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105.35: 13027-13032. (b)

VASA-NICOTERA, Mariuca, et al. miR-146a is modulated in human endothelial cell with aging. *Atherosclerosis*, 2011, 217.2: 326-330.

WANG, Yanli, et al. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 2008, 456.7219: 209.

WANG, Guo-Kun, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European heart journal*, 2010, 31.6: 659-666. (a)

WANG, Kuei-Chun, et al. Role of microRNA-23b in flow-regulation of Rb phosphorylation and endothelial cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107.7: 3234-3239. (b)

WANG, Jian-Xun, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nature medicine*, 2011, 17.1: 71.

WANG, Yung-Song, et al. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovascular research*, 2012, 95.4: 517-526.

WANG, Hua, et al. MicroRNA-1 prevents high-fat diet-induced endothelial permeability in apoE knock-out mice. *Molecular and cellular biochemistry*, 2013, 378.1-2: 153-159.

WANG, Peng, et al. MiR-130b attenuates vascular inflammation via negatively regulating tumor progression locus 2 (Tpl2) expression. *International immunopharmacology*, 2017, 51: 9-16.

WU, Wei, et al. Flow-dependent regulation of Krüppel-like factor 2 is mediated by microRNA-92a. *Circulation*, 2011, CIRCULATIONAHA.110.005108

WU, Jin; DU, Kang; LU, Xiang. Elevated expressions of serum miR-15a, miR-16, and miR-17-5p are associated with acute ischemic stroke. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2015, 8.11: 21071.

XUE, Tong-min, et al. miR-20b overexpression is predictive of poor prognosis in gastric cancer. *OncoTargets and therapy*, 2015, 8: 1871.

XUE, Xiaofeng, et al. miR-342-3p suppresses cell proliferation and migration by targeting AGR2 in non-small cell lung cancer. *Cancer letters*, 2018, 412: 170-178.

YANG, Baofeng, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature medicine*, 2007, 13.4: 486.

YASUDA, Satoshi; SHIMOKAWA, Hiroaki. Acute myocardial infarction. *Circulation Journal*, 2009, 73.11: 2000-2008.

ZHANG, Lizhu, et al. Circulating miR-499 are novel and sensitive biomarker of acute myocardial infarction. *Journal of thoracic disease*, 2015, 7.3: 303.

ZHAO, Yong; SAMAL, Eva; SRIVASTAVA, Deepak. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 2005, 436.7048: 214.

ZHAO, Yong, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007, 129.2: 303-317.

ZHENG, Jianjian, et al. High expression of serum miR-17-5p associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60.123: 549-552.

ZHU, Ni, et al. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*, 2011, 215.2: 286-293.

7.1 Seznam internetových odkazů

<http://www.mirbase.org/>

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/fm_1560.pdf

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042167.pdf

7.2 Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma biogeneze miRNA a používaných výzkumných metod.....16

Obrázek 2: Schéma vzniku aterosklerotického plaku a úloha miRNA.....28

Obrázek 3a: Úloha quencheru (NFQ) v potlačování fluorescence.....55

Obrázek 3b: Úloha reporterového barviva (R).....55

7.3 Seznam tabulek

Tabulka 1: Zkoumané kardiovaskulární miRNA a jejich funkce	23-24
Tabulka 2: Vstupní údaje o matkách podle jednotlivých diagnóz.....	45
Tabulka 3: Vstupní údaje o průběhu těhotenství dle jednotlivých diagnóz.....	46
Tabulka 4: Statistické vyhodnocení vstupních údajů o matkách.....	47
Tabulka 5: Statistické vyhodnocení vstupních údajů o těhotenstvích.....	48
Tabulka 6: Složení Master Mixu pro reverzní transkripci.....	52
Tabulka 7: Teplotní profil a průběh reverzní transkripce	52
Tabulka 8: Složení PCR Master Mixu.....	53
Tabulka 9: Teplotní profil a průběh kvantitativní PCR v reálném čase.....	54
Tabulka 10: Shrnutí Shapiro-Wilkovy analýzy pro jednotlivé miRNA u konkrétních diagnóz	61

7.4 Seznam grafů

Graf 1: Histogram četností genové exprese miR23a u FG	59
Graf 2: Histogram četností genové exprese miR23a u PE	59
Graf 3: Histogram četností genové exprese miR23a u FGR	60
Graf 4: Histogram četností genové exprese miR23a u GH	60
Graf 5: Genová exprese miR-17-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)	65
Graf 6: Genová exprese miR-20a-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)	66
Graf 7: Genová exprese miR-143-3p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)	67
Graf 8: Genová exprese miR-499a-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)	67
Graf 9: Genová exprese miR-29a-3p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)	68
Graf 10: Genová exprese miR-20b-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)	69
Graf 11: Genová exprese miR-146a-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)	69
Graf 12: Genová exprese miR-199a-5p u FG (n=76), GH (n=31), PE (n=86) a FGR (n=28)	70
Graf 13: Genová exprese miR-17-5p u FG (n=76), mírné PE (n=22) a závažné PE (n=64)	71

Graf 14: Genová exprese miR-29a-3p u FG (n=76), mírné PE (n=22) a závažné PE (n=64)	72
Graf 15: Genová exprese miR-195-5p u FG (n=76), mírné PE (n=22) a závažné PE (n=64)	73
Graf 16: Genová exprese miR-133-3p u FG (n=76), mírné PE (n=22) a závažné PE (n=64)	73
Graf 17: Genová exprese miR-133-3p u FG (n=76), PE s porodem před 34. týdnem (n=31) a PE s porodem po 34. týdnu (n=55)	74
Graf 18: Genová exprese miR-29a-3p u FG (n=76), PE s porodem před 34. týdnem (n=31) a PE s porodem po 34. týdnu (n=55)	75