

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Biologie  
Antropologie a genetika člověka



**Bc. Andrea Semencová**

Postnatální skrínink kardiovaskulárních mikroRNA u dětí narozených z těhotenských komplikací

Postnatal screening of cardiovascular microRNAs in children descending from pregnancy-related complications

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha, 2020

## **Prohlášení**

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

V Kladně dne 14.2.2020

.....  
podpis

## **Poděkování**

Své školitelce prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. bych ráda poděkovala za odborné vedení mé práce, za připomínky k jejímu vypracování a za její trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Kotlabové, Ph.D. za pomoc v laboratoři i při statistickém zpracování dat. Za pomoc a preciznost při vypracování grafů děkuji Ing. Jakubovi Stejskalovi.

Studie byla financována grantem č. AZV 16-27761A a Progres Q34. Úřadem průmyslového vlastnictví byl udělen národní patent (PV2018-595).

## **Abstrakt**

U dětí, které se narodily z těhotenství komplikovaného gestační hypertenzí, preeklampií nebo fetální růstovou restrikcí, přetrvává po celý život zvýšené riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob. Tato studie se zkoumá expresní profil 29 kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních mikroRNA u dětí ve věku 3–11 let.

MikroRNA jsou krátké nekódující molekuly RNA ovlivňující expresi genů pomocí posttranskripčních úprav mRNA. Abnormální hladiny mikroRNA mohou vést k patologickým stavům jedince.

Tato práce zkoumá vztah mezi dysregulovanými hladinami mikroRNA v plné periferní žilní krvi dětí a přítomností těhotenských komplikací. Dále se tato studie věnuje specifickým expresním profilům mikroRNA v závislosti na přítomnosti patologie v kardiovaskulárním aparátu dítěte zjištěném při klinickém vyšetření sestávajícím ze stanovení a vyhodnocení BMI, vyšetření krevního tlaku a echokardiografického vyšetření srdce.

Dysregulovaný postpartální profil byl přítomen u dětí narozených z těhotenství komplikovaného gestační hypertenzí (miR-1-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-181a-5p, miR-199a-5p, miR-342-3p a miR-499-5p). U dětí narozených z těhotenství komplikovaného preeklampií byly zjištěny dysregulace u miR-1-3p a miR-103a-3p. Děti postižené fetální růstovou restrikcí měly abnormální hladinu miR-17-5p, miR-21-5p a miR-126-3p.

Dlouhotrvající dysregulace mikroRNA s sebou nesou zvýšené riziko rozvoje kardiovaskulárního nebo cerebrovaskulárního onemocnění. Zavedení screeningu expresního profilu mikroRNA v plné periferní žilní krvi má potenciál pro odhalení rizikových dětí a mohla by se tak u nich snížit pravděpodobnost rozvoje onemocnění zavedením primární prevence.

## **Klíčová slova**

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

## **Abstract**

Children descending from pregnancy complicated by gestational hypertension, preeclampsia or fetal growth restriction have a lifelong increased risk of development of cardiovascular disease. This study investigates the expression profile of 29 cardiovascular and cerebrovascular microRNAs in children at the age of 3 to 11 years.

MicroRNAs are short non-coding RNA molecules affecting gene expression by posttranscriptional modifications of mRNA, which affects biological processes. Abnormal microRNA levels can lead to pathological conditions of the individual. This study explores the relationship between dysregulated microRNA levels in whole peripheral venous blood of children and the presence of complications during pregnancy. Furthermore, this study looks at expression profile specificities depending on the presence of pathology in the child's cardiovascular system, as found in a clinical examination consisting of BMI assessment and evaluation, blood pressure testing and ultrasound examination of the heart.

Dysregulated profile was present in children with gestational hypertension in miR-1-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-181a-5p, miR-199a-5p, miR-342-3p and miR-499-5p. In children with preeclampsia, dysregulation was found with miR-1-3p and miR-103a-3p. Infants affected by fetal growth restriction had abnormal levels of miR-17-5p, miR-21-5p and miR-126-3p.

Long-lasting dysregulation carries an increased risk of development of cardiovascular or cerebrovascular disease. The implementation of a microRNA expression profile screening has the potential to detect high-risk children and could reduce the likelihood of developing disease by introducing primary prevention.

## **Keywords**

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

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce .....	10
3	MikroRNA.....	11
4	Komplikace v těhotenství.....	19
4.1	Gestační hypertenze.....	19
4.2	Preeklampsie.....	19
4.3	Fetální růstová restrikce.....	22
5	Onemocnění kardiovaskulárního aparátu .....	25
6	Materiál .....	28
7	Metody.....	32
7.1	Zpracování biologického materiálu.....	32
7.2	Izolace miRNA .....	32
7.3	Reverzní transkripce .....	33
7.4	Kvantitativní PCR v reálném čase.....	34
7.5	Relativní kvantifikace.....	35
7.6	Statistické zpracování.....	36
8	Výsledky.....	37
8.1	Porovnání skupin dětí dle průběhu těhotenství .....	37
8.2	Porovnání skupin dětí dle přítomnosti nálezu .....	42
8.3	Porovnání skupin dětí dle průběhu těhotenství a přítomnosti nálezu .....	42
8.4	Porovnání podskupin dětí z těhotenství s preeklampsí .....	50
9	Diskuze.....	53
10	Závěr.....	65
11	Seznam použitých zkratk .....	66
12	Seznam použité literatury.....	67
13	Seznam obrázků .....	87

14	Seznam tabulek .....	87
15	Seznam grafů.....	87

# 1 ÚVOD

Děti narozené z komplikovaných těhotenství jsou predisponovány pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, a to již v dětském a dospívajícím věku. Získaná epidemiologická a experimentální data ukazují, že přítomnost gestační hypertenze, preeklampsie nebo fetální růstové restrikce v průběhu těhotenství jedince přináší zvýšené riziko pro rozvoj kardiovaskulárního onemocnění v celém průběhu života již od narození.

U těchto dětí je zvýšený index BMI a hodnota obvodu pasu, je přítomen vyšší systolický a/nebo diastolický krevní tlak (Davis et al., 2012; Alsnes et al., 2017; Tenhola et al., 2003; Øglænd et al., 2009; Fraser et al., 2013). Zvýšený krevní tlak u těchto dětí oproti dětem pocházejícím z normálního těhotenství přetrvává do 18 let (Staley et al., 2015). Zvýšený krevní tlak je předpokládán u matky i potomstva na základě genetických faktorů, př. sdíleného společného prostředí (Fraser et al., 2013).

Děti s prenatálním výskytem fetální růstové restrikce mají až do věku 8–12 let odlišnou morfologii srdce: jejich srdce jsou menší, více sférická, jejich pohyb v longitudinálním směru je při činnosti zmenšen a schopnost relaxace myokardu je omezena (Sarvari et al., 2017).

Při preeklampsii matky nebo patologiích placenty vedoucích k nedostatečné výživě plodu se může objevit jako dlouhodobý důsledek obezita dítěte, hypertenze, rozvinutí diabetu či vady srdce (Libby et al., 2007; Tappia and Gabriel, 2014). Děti narozené z těhotenství komplikovaných gestační hypertenzí, preeklampsií či fetální růstovou restrikcí tvoří cílovou skupinu, která by ze zavedení primární prevence kardiovaskulárních onemocnění mohla výrazněji profitovat. Tato primární péče sestává z dietetického stravování, zařazení pravidelné pohybové aktivity, odborného sledování jedince a případného ovlivnění zdravotního stavu farmakologicky (Lloyd-Jones et al., 2010).

MikroRNA jsou nekódujícím typem molekul RNA dlouhé přibližně 22 nukleotidů. MikroRNA mají regulační funkci v rostlinných i živočišných organizmech včetně člověka – významně ovlivňují translaci mnoha protein-kódujících RNA (Bartel, 2004). MikroRNA hrají důležitou roli při vzniku různých onemocnění, dysregulované hladiny mikroRNA nacházíme i u dětí narozených z těhotenství ovlivněných gestační hypertenzí, preeklampsií nebo fetální růstovou restrikcí, a to v různých tkáních: placentě a pupečnickové krvi (Hromadnikova et al., 2015; Hromadnikova et al., 2017).



Tato práce se věnuje výzkumu vztahu mezi přítomností těhotenských komplikací a postnatálními změnami v genové expresi mikroRNA v plné periferní žilní krvi dětí, konkrétně mikroRNA významných při výskytu kardiovaskulárních/cerebrovaskulárních onemocnění. Dále zkoumá rozdíly v expresním profilu mikroRNA v plné periferní žilní krvi dětí s ohledem na přítomnost patologického kardiologického nálezu odhaleném při klinickém vyšetření v době odběru vzorku krve pro vyšetření hladin mikroRNA.

## 2 Cíl práce

Cílem mé práce je určit expresní profil vybraných kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních mikroRNA v plné periferní žilní krvi dětských probandů ve věku 3–11 let, kteří se narodili z těhotenství komplikovaného gestační hypertenzí, preeklampsii nebo fetální růstovou restrikcí a kontrolní skupiny probandů dětí z těhotenství s fyziologickým průběhem.

Pro výzkum byly použity konkrétně miR-1-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-92a-3p, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-181a-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-342-3p, miR-499a-5p a miR-574-3p.

Dále je cílem statisticky porovnat genovou expresi mikroRNA mezi skupinami dětí rozdělenými dle průběhu těhotenství (fyziologické, s přítomností gestační hypertenze matky, preeklampsie matky, fetální růstové restrikce) a určit tak, zda jsou patologická těhotenství rizikem pro rozvoj kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění v průběhu života jedince.

Dalším cílem je statistické porovnání genové exprese mikroRNA mezi skupinou dětí s fyziologickým nálezem a skupinou dětí s patologickým nálezem dle aktuálního kardiologického vyšetření (sestavujícího z BMI, měření krevního tlaku a echokardiografického vyšetření /ECHO/), které bylo provedeno bezprostředně před odběrem vzorku krve. Toto porovnání je nejprve provedeno bez ohledu na aktuální nález kardiologického vyšetření a následně s ohledem na oba faktory současně: průběh těhotenství a zároveň přítomnost patologického kardiologického nálezu. Dle získaných výsledků se tento výzkum pokusí vytypovat mikroRNA spjaté s přítomností kardionálezu pro jejich potenciální využití v odhadování rizikových dětí v populaci a zařazení preventivních opatření do jejich života.

Tyto cíle jsou zvoleny na základě hypotézy získání statisticky signifikantních rozdílů mezi jednotlivými zvolenými skupinami.

### 3 MikroRNA

MikroRNA je krátký typ nekódující RNA endogenního původu o délce přibližně 22 nukleotidů. Jejich funkce je ovlivnění stability a translace mRNA (Kloosterman and Plasterk, 2006). Podílí se na řízení proliferace, apoptózy buněk (Brennecke et al., 2003), jejich diferenciaci (Chen et al., 2004), nalezneme je v rostlinných (Llave et al., 2002; Reinhart et al., 2002) i živočišných buňkách (Lee et al., 1993; Lagos-Quintana et al., 2002).

Poprvé byla mikroRNA objevena v roce 1993 u hlístice *C. elegans* – zjistilo se, že její gen *lin-4* nekóduje protein, ale jeho transkripcí vznikají krátké RNA, které se podílí na vývoji organismu v jeho larválním stadiu. Tyto krátké RNA mají délku 22 a 61 bazí, sekvence kódující tyto RNA je komplementární k nepřekládané oblasti u 3' konce genu *lin-14* a předpokládalo se tedy, že je exprese tohoto genu regulována pomocí zmíněných krátkých RNA. Množství proteinu vzniklého translací genu *lin-14* bylo redukováno, ačkoliv množství mRNA tohoto genu nebylo změněno (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Jako další byl objeven gen *let-7* opět u *C. elegans*, kódující stejnojmennou RNA o délce 22 nukleotidů. Tato RNA podněcuje přechod z pozdního larválního stadia do stadia dospělé (Reinhart et al., 2000). Tento gen byl později nalezen u člověka a u dalších dvanácti živočichů. Oba geny byly zařazeny do skupiny pojmenované small temporal RNAs, zkráceně stRNAs (Pasquinelli et al., 2000).

V roce 2001 již byly objeveny desítky těchto RNA u různých organismů (*C. elegans*, *C. briggsae*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Neurospora crassa*, *Danio rerio*, rod *Mus*, řád *Anura*) a začal se pro ně používat nový termín mikroRNA, zkráceně miRNA (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Jednotlivé mikroRNA jsou značeny zmíněnou zkratkou a pomlčkou s číslem. Čísla jsou přiřazována vzestupně dle objevu. Pro vlásenkové prekurzory – pre-mikroRNA, se využívá podobná zkratka, ovšem s malými písmeny, např. *mir-234* (Slabý and Svoboda, 2012). Stejně pre-mikroRNA, které vznikly přepisem z různých chromozomů jsou rozlišeny číselnou koncovkou, např. *mir-7-1* (z chromozomu 9), *mir-7-2* (z chromozomu 15) a *mir-7-3* (z chromozomu 19). Produktem je shodná miRNA-7. Velmi podobné miRNA, které se liší jedním či dvěma nukleotidy a mají shodnou funkci, jsou značeny stejným číslem a doplněné písmenem, např. *miR-200a*, *miR-200b* a *miR-200c* (Santulli, 2015). Pro rozlišení živočišného druhu se využívá počáteční třípísmenná zkratka, pro člověka *hsa* (*homo*

*sapiens*), např. hsa-miR-21. Jeden prekurzor (vlásenkového tvaru), může v některých případech tvořit 2 miRNA – každou z jednoho ramene, ty se pak odlišují dle konce prekurzoru, a to koncovkou -3p a -5p, např. hsa-miR-30a-5p. V případě, že se jedna z těchto miRNA tvoří v relativně menším množství, označuje se hvězdičkou, např. miR-21\* (Slabý and Svoboda, 2012).

Ačkoliv některé miRNA jsou kódovány v intronech jiných genů (Aravin et al., 2003), většina tvoří samostatné geny, které mohou být umístěny i relativně vzdáleně od genu mRNA, kterou ovlivňují (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Samostatné geny se mohou v genomu seskupovat do klastrů a přepisují se v podobě polycistronických primárních transkriptů (Yu, 2008). Geny v klastrech jsou si často funkčně příbuzné, ovšem funkčně podobné miRNA jsou umístěny i v odlehlých částech genomu (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001). miRNA geny jsou evolučně stálé, téměř všechny nalezneme u příbuzných organismů, např. u *C. elegans* a *C. briggsae* (Lim et al., 2003) nebo u člověka a myši (Lagos-Quintana et al., 2003), významné množství genů je i mezi evolučně vzdálenějšími organismy, např. více než jedna třetina společných genů byla nalezena u člověka a *C. elegans* (Lim et al., 2003), výše zmíněný gen *let-7* je přítomný u pláštěnců (Ascidiacea), měkkýšů (Mollusca), polostrunatců (Hemichordata), kroužkovic (Annelida), členovců (Arthropoda) i obratlovců (Vertebrata) (Pasquinelli et al., 2000).

Genová exprese miRNA probíhá v několika krocích, začíná transkripcí samostatného genu miRNA nebo transkripcí genu, jehož intronu je součástí (Filipowicz et al., 2008). Přepis provádí RNA polymeráza II, která tak vytvoří primární mikroRNA – pri-miRNA o délce stovek až tisíců bazí. Na jejím 3' konci se obvykle nachází poly(A) konec, na 5' konci čepička (cap) (Lee et al., 2004; Cai et al., 2004). Méně často provádí přepis RNA polymeráza III, konkrétně u klastru miRNA na chromozomu 19 (Borchert et al., 2006). pri-miRNA tvoří vlásenkové (hairpin) struktury, které jsou v oblasti kmene nedokonale párovány (Filipowicz et al., 2008). V případě klastrových genů vzniká pri-miRNA, ze které vzniká několik miRNA, např. pri-miR-23a~miR-27a~miR-24-2 (Lee et al., 2004).

Dvouvláknová vlásenková struktura pri-miRNA je rozpoznána proteinem DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8), zvaného též Pasha, který společně s ribonukleázou Drosha tvoří tzv. mikroprocesorový komplex. Enzym Drosha, řadící se mezi RNázy III, štěpí molekuly pri-miRNA a vzniká tak prekurzor miRNA zvaný pre-miRNA o délce přibližně 70 bazických párů. Vzniklá pre-miRNA má na svém 3' konci přesah dvou bazí

(Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003). Pro štěpení RNázou Drosha jsou klíčové jednovláknové části v bazi pri-miRNA, na rozdíl od smyčky v její apikální části, která pro rozpoznání molekuly není podstatná (Han et al., 2006). Specificky vznikají miRNA kódované v intronech, nazývané mirtrony, které pro vytvoření své pre-miRNA Droshu nepotřebují. Mirtrony byly nalezeny nejprve u bezobratlých (Okamura et al., 2007), později i u savců (Berezikov et al., 2007).

Pre-miRNA je pak přenášena z jádra do cytoplazmy Exportinem 5. Pro přenos Exportinem je nutná přítomnost kofaktoru Ran. Jedná se o GTPázu, která je aktivována vazbou molekuly GTP – po aktivaci vzniká komplex pre-miRNA – Exportin 5 – Ran s GTP, po průchodu jaderným pórem se GTP přemění na GDP a následně se uvolní pre-miRNA (Yi et al., 2003). Exportin 5 rozpoznává molekulu pre-miRNA díky jejímu přesahu na 3' konci (Gwizdek et al., 2004).

Další úprava probíhá tedy v cytoplazmě, a to enzymem Dicer (Lee et al., 2003). Dicer se stejně jako Drosha řadí mezi RNázy III, řídí maturaci miRNA (Ketting et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Dicer rozpozná molekulu pre-miRNA díky své afinitě k 5' fosfátu a přesahu na 3' konci a následně odštěpí smyčku na opačné straně molekuly (Bartel, 2004). Vznikne tak zralá molekula duplexu miRNA (Bernstein et al., 2001).

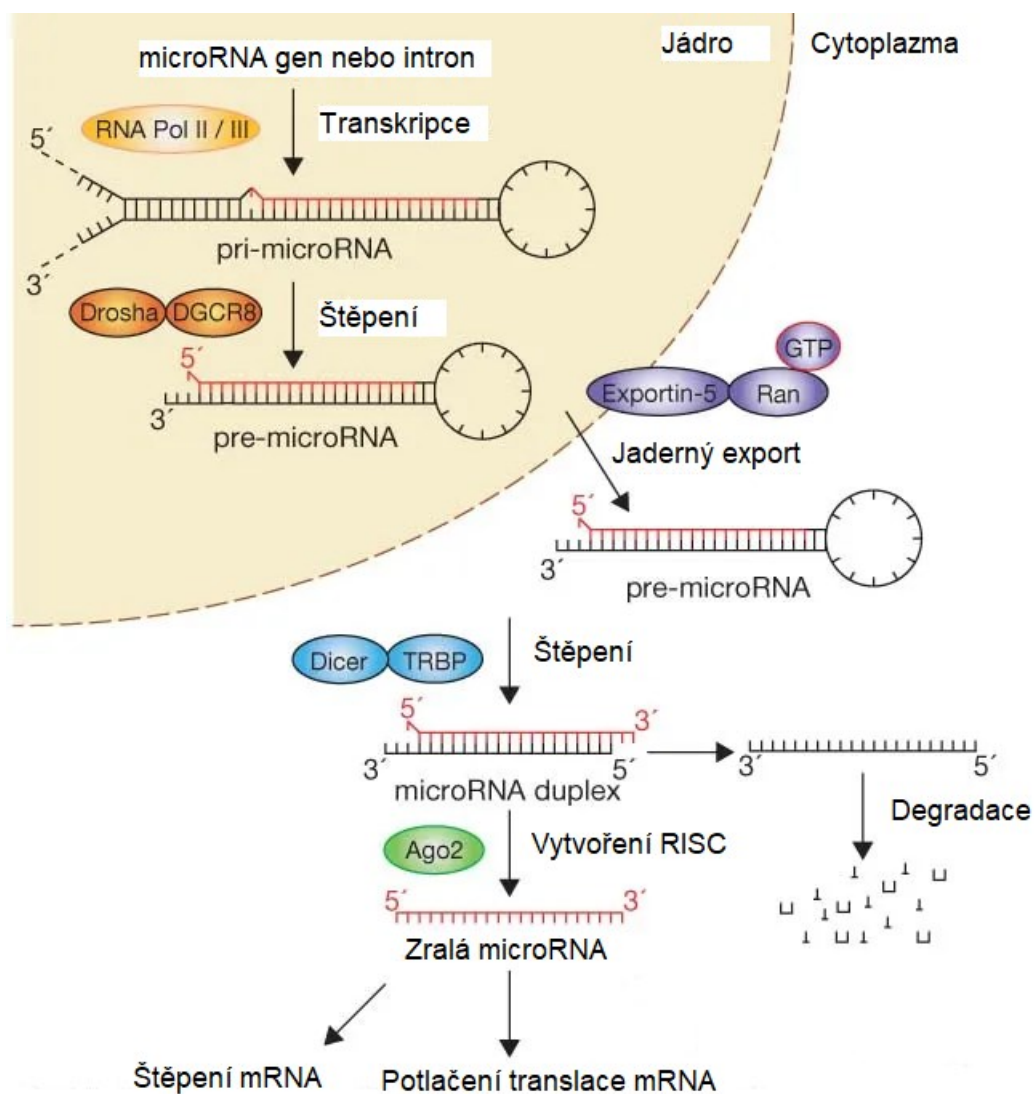
Duplex miRNA je navázán do multiproteinového komplexu miRISC (microRNA-induced silencing complex). RISC je multiproteinový komplex tvořený molekulami Dicer, Argonaut, PACT a TRBP (transactivating response RNA-binding protein) (Carthew and Sontheimer, 2009). Klíčovou úlohu mají proteiny rodiny Argonaut (AGO). U savců jsou to konkrétně 4 proteiny AGO1 – AGO4, aktivní při RNA interferenci je protein AGO2. Kromě zmíněných proteinů může miRISC obsahovat další složky působící jako regulační faktory nebo efektory pro inhibiční funkci miRISC (Filipowicz et al., 2008).

miRISC s navázaným duplexem miRNA je nazýván pre-RISC. Pro zprostředkování interference je duplex miRNA rozdělen na vedoucí vlákno (guide strand) a druhé, nefunkční vlákno (passenger strand), které je zničeno. Vzniká tak zralý RISC (Kawamata and Tomari, 2010). Výběr vlákna je umožněn díky rozdílu termodynamických stabilit prvních bazí: vedoucí vlákno má méně stabilní 5' konec (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003).

Vzniklý komplex RISC zprostředkovává proces zvaný RNA interference, (RNAi). miRISC je dle Watsonova – Crickova párování navázán na komplementární 3' UTR

(untranslated region) mRNA a reguluje tak expresi dané mRNA (Wakiyama et al., 2007; Pratt and MacRae, 2009). MiRNA nemusí být zcela komplementární k mRNA – úplná homologie vede k degradaci cílové mRNA, zatímco částečná potlačuje translaci cílové mRNA. Potlačení translace je u savců častější (Dangwal et al., 2012).

Popsaná biogeneze miRNA je schématicky znázorněna na obrázku níže:



Obrázek 1 Schéma biogeneze miRNA  
Převzato a upraveno dle Winter et al., 2009

MikroRNA se podílí na vývoji organismu a rozvoji některých onemocnění – včetně vad a nemocí kardiovaskulárního aparátu. Jejich výzkum tak má terapeutický potenciál, na počátku byly úspěšně zkoušeny chemicky vytvořené oligonukleotidy s názvem antagomir na myších, účinně a specificky tlumily činnost vybraných miRNA. Aplikace těchto molekul

do krve vedla k dlouhodobému snížení hladiny vybraných miRNA v jednotlivých orgánech včetně srdce (Krützfeldt et al., 2005). Později v roce 2015 již byly úspěšně provedeny preklinické studie (Bernardo et al., 2015). Dle Gary a Lainscaka (2019) je objeveno velké množství významných mikroRNA a klinické studie v oblasti kardiovaskulárních chorob se očekávají v blízké budoucnosti. Předmětem výzkumu je detailní popis funkce jednotlivých mikroRNA, stálost jejich hladiny, prozkoumání odlišné míry exprese u jednotlivých pohlaví a v různém věku jedinců.

Námi použité mikroRNA byly vybrány takové, jejichž hladina byla u kardiovaskulárních onemocnění dle rešerše dysregulována oproti hladině u zdravých jedinců. Konkrétně jsme vybrali miR-1-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-92a-3p, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-181a-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-342-3p, miR-499a-5p a miR-574-3p.

Sekvence genů kódující vybrané mikroRNA a jejich umístění v genomu člověka jsou shrnuty v Tabulce 1. Informace o jednotlivých genech pochází z databází miRBase (dostupné z <http://www.mirbase.org/>), RNAcentral (dostupné z <https://rnacentral.org/>) a GeneCards (dostupné z <https://www.genecards.org/>).

	Sekvence	Gen	Chromozom	Vlákno	Umístění
miR-1-3p	5' UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU 3'	MIR1-2	18q11.2	–	21 829 015 – 21 829 036
		MIR1-1	20q13.33	+	62 554 351 – 62 554 372
miR-16-5p	5' UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG 3'	MIR16-2	3q25.33	+	160 404 754 – 160 404 775
		MIR16-1	13q14.2	–	50 049 027 – 50 049 048
miR-17-5p	5' CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG 3'	MIR17	13q31.3	+	91 350 618 – 91 350 640
miR-20a-5p	5' UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG 3'	MIR20A	13q31.3	+	91 351 072 – 91 351 094
miR-20b-5p	5' CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG 3'	MIR20B	Xq26.2	–	134 169 850 – 134 169 872
miR-21-5p	5' UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA 3'	MIR21	17q23.1	+	59 841 273 – 59 841 294
miR-23a-3p	5' AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC 3'	MIR23A	19p13.12	–	13 836 595 – 13 836 615
miR-24-3p	5' UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG 3'	MIR24-1	9q22.32	+	95 086 064 – 95 086 085
		MIR24-2	19p13.12	–	13 836 289 – 13 836 310
miR-26a-5p	5' UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU 3'	MIR26A1	3p22.2	+	37 969 413 – 37 969 434
		MIR26A2	12q14.1	–	57 824 658 – 57 824 679
miR-29a-3p	5' UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA 3'	MIR29A	7q32.3	–	130 876 748 – 130 876 769
miR-92a-3p	5' UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU 3'	MIR92A1	13q31.3	+	91 351 361 – 91 351 382
		MIR92A2	Xq26.2	–	134 169 544 – 134 169 565
miR-100-5p	5' AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG 3'	MIR100	11q24.1	–	122 152 275 – 122 152 296



	Sekvence	Gen	Chromozom	Vlákno	Umístění
miR-103a-3p	5' AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA 3'	MIR103A1	5q34	–	168 560 904 – 168 560 926
		MIR103A2	20p13	+	3 917 541 – 3 917 563
miR-125b-5p	5' UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA 3'	MIR125B1	11q24.1	–	122 099 809 – 122 099 830
		MIR125B2	21q21.1	+	16 590 253 – 16 590 274
miR-126-3p	5' UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG 3'	MIR126	9q34.3	+	136 670 653 – 136 670 674
miR-130b-3p	5' CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU 3'	MIR130B	22q11.21	+	21 653 354 – 21 653 375
miR-133a-3p	5' UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG 3'	MIR133A1	18q11.2	–	21 825 712 – 21 825 733
		MIR133A2	20q13.33	+	62 564 970 – 62 564 991
miR-143-3p	5' UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC 3'	MIR143	5q32	+	149 428 978 – 149 428 998
miR-145-5p	5' GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU 3'	MIR145	5q32	+	149 430 661 – 149 430 683
miR-146a-5p	5' UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU 3'	MIR146A	5q33.3	+	160 485 372 – 160 485 393
miR-155-5p	5' UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU 3'	MIR155	21q21.3	+	25 573 983 – 25 574 006
miR-181a-5p	5' AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU 3'	MIR181A1	1q32.1	–	198 859 108 – 198 859 130
		MIR181A2	9q33.3	+	124 692 480 – 124 692 502
miR-195-5p	5' UAGCAGCACAGAAUAUUGGC 3'	MIR195	17p13.1	–	7 017 667 – 7 017 687
miR-199a-5p	5' CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC 3'	MIR199A2	1q24.3	–	172 144 592 – 172 144 614
		MIR199A2	19p13.2	–	10 817 469 – 10 817 491

	Sekvence	Gen	Chromozom	Vlákno	Umístění
miR-210-3p	5' CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA 3'	MIR210	11p15.5	–	568 112 – 568 133
miR-221-3p	5' AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC 3'	MIR221	Xp11.3	–	45 746 180 – 45 746 202
miR-342-3p	5' UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU 3'	MIR342	14q32.2	+	100 109 715 – 100 109 737
miR-499a-5p	5' UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU 3'	MIR499A	20q11.22	+	34 990 408 – 34 990 428
miR-574-3p	5' CACGCUCAUGCACACACCACA 3'	MIR574	4p14	+	38 868 092 – 38 868 113

*Tabulka 1 Sekvence a lokalizace v genomu použitých mikroRNA*

## 4 KOMPLIKACE V TĚHOTENSTVÍ

### 4.1 Gestační hypertenze

Za hypertenzi považujeme stav, kdy krevní tlak dosáhne hodnoty 140 mmHg systolického tlaku a více a/nebo 90 mmHg diastolického tlaku a více, a to alespoň při dvou za sebou provedených měřeních s odstupem minimálně 6 hodin. Gestační hypertenze je specifická zvýšenými naměřenými hodnotami od 20. gestačního týdne. Oproti tomu matky s chronickou hypertenzí dosahují zvýšených hodnot i před 20. týdnem těhotenství a před těhotenstvím (Sibai, 2003). Pokud je jednorázově naměřen diastolický tlak s hodnotou 110 mmHg a více, je pacientka také považována za hypertenzní (Vlk et al., 2015).

Jako závažná forma gestační hypertenze je hodnocen systolický krevní tlak s hodnotou 160 mmHg a více a/nebo diastolický 110 mmHg a více trvajících 6 hodin a déle (ACOG Committee on Obstetric Practice, 2002).

Hypertenzní poruchy včetně gestační hypertenze zvyšují riziko morbidit i mortality matky a plodu. Závažná forma může vést k cerebrální hemoragii, ruptuře jater, renální insuficienci matky, předčasnému porodu či abrupci placenty (předčasnému odloučení). Pro snížení rizika vzniku komplikací se doporučuje klidový režim doma, př. v nemocnici, sledování zdravotního stavu matky a plodu, u závažné formy gestační hypertenze zahájit léčbu antihypertenzními léky. Při rozvoji gestační hypertenze je nutné sledovat proteinurii pro případné včasné odhalení preeklampsie (Fabry et al., 2014).

### 4.2 Preeklampsie

Preeklampsie je komplikace vyskytující se u 3–5 % těhotných žen. Jedná se o hypertenzi o hodnotě systolického tlaku 140 mmHg a více a/nebo 90 mmHg a více u tlaku diastolického, která je provázena proteinurií 0,3 g/24 hodin a vyšší. Je diagnostikována, pokud se tyto symptomy objeví po 20. gestačním týdnem a po skončení těhotenství vymizí (von Dadelszen et al., 2009).

Preeklampsie se dělí na mírnou a závažnou formu. Mírná preeklampsie nastává při systolickém tlaku o hodnotě 140–159 mmHg, diastolickém 90–109 mmHg a proteinurii dosahující hodnoty 0,3–5 g/24 hodin. Závažná forma preeklampsie dosahuje hodnot systolického tlaku 160 mmHg a více a/nebo diastolického 110 mmHg a více. Proteinurie je

od 5 g/24 hodin. Závažná preeklampsie může být doprovázena dalšími komplikacemi: oligurie (méně než 500 ml/24 hodin, poruchy vizu, CNS, otok plic, cyanóza, porucha funkce jater, bolest epigastria (kraniální část břicha ohraničená dolními žebry), trombocytopenie, fetální růstová restrikce (Wagner, 2004).

Dle doby nástupu dělíme preeklampsii na časnou a pozdní. Pokud preeklampsie propukne před 34. týdnem, označujeme ji jako časnou formu (early onset preeclampsia), při výskytu ve 34. týdnu a později jako pozdní (late onset preeclampsia) (von Dadelszen et al., 2009). Časná preeklampsie bývá způsobena poruchou fetoplacentární jednotky, může být přítomna dysfunkce placenty, růstová restrikce plodu, snížený objem placentární tkáně, abnormální nálezy průtoků v uterinních/umbilikálních tepnách (při dopplerovském vyšetření), závažná mateřská/neonatální morbidita a mortalita. Oproti tomu příčinou vzniku pozdní preeklampsie obvykle je chronické onemocnění matky, bývá přítomen normální objem placentární tkáně, plod roste fyziologicky, má fyziologickou porodní hmotnost, nález průtoků v tepnách je fyziologický, prognózy zdraví pro matku/dítě jsou pozitivní. Pozdní forma je častěji přítomna u obézních matek, u matek s diabetem, s kardiovaskulárním onemocněním, s vícečetným těhotenstvím. S pozdějším nástupem preeklampsie klesá pravděpodobnost rekurence v dalších těhotenstvích (Vlk et al., 2015).

Rizikové faktory pro vznik preeklampsie jsou: onemocnění postihující cévní systém (diabetes mellitus, chronická hypertenze, onemocnění cév, pojivové tkáně), antifosfolipidový syndrom (způsobující hyperkoagulační stavy), nefropatie, chromozomální abnormality plodu, gestační trofoblastická nemoc (nadměrný růst trofoblastu), fetální hydrops (edém plodu), vícečetné těhotenství, umělé oplodnění s darovaným oocytem/spermii, strukturální kongenitální (vrozené) vady plodu, infekce močového ústrojí matky, věk matky nižší než 20 let/vyšší než 35 let, preeklampsie v rodinné anamnéze (i otce)/v předchozím těhotenství, nuliparita, obezita, trombofilie, stres (Wagner, 2004; Dekker, 1999). Kouření snižuje riziko vzniku preeklampsie o 30–40 %, ovšem má negativní efekt na růst plodu, zvyšuje pravděpodobnost abrupce placenty. Předpokládá se, že pozitivní vliv je zprostředkován nikotinem (Conde-Agudelo and Belizan, 2000).

Preeklampsie způsobuje závažné fyziologické změny v organismu matky – dochází k vazospazmu, hemokoagulaci (zmenšení podílu tekuté složky v krvi), které omezují perfuzi (průtok krve) všech orgánů. U matky se objevuje nepřiměřená zánětlivá reakce a

aktivace endotelu, dochází tak ke koagulaci krve a vzniku mikrotrombů, čímž je perfuze orgánů dále zhoršena (Dekker and Sibai, 1998; Roberts and Cooper, 2001).

Projevy jsou u matek přítomny v různé míře, u některých probíhá preeklampsie asymptomaticky, u jiných se objevují poruchy vizu, silná bolest hlavy nebo bolest v kraniální části břicha (Wagner, 2004).

Preeklampsie se může vyvinout v eklampsii. Eklampsie je vážné onemocnění, při kterém se u matky objeví křeče a/nebo kóma, a to v průběhu těhotenství, př. po porodu bez jakýchkoliv patologických neurologických známek (Martin and Morris, 2019). Eklampsie se rozvine u 0,2–5 % porodů, v 70 % se objevuje až po porodu, opakování v dalším těhotenství je u 10–35 % žen (Hájek et al., 2004).

U ženy při eklampsii vzniká generalizovaný vazospasmus, dochází k hypoxii a edému mozku s patrnými morfologickými změnami, krvácením. Za prodromy (příznaky nadcházející nemoci) jsou považovány záškuby obličejových a očních svalů, stáčení bulbů, hlavy laterálně, poruchy vizu, silné bolesti hlavy, nauzea, zvracení, bolest v kraniální části břicha. Vlastní průběh eklampsie sestává z křečí, které přechází v bezvědomí, vzácně křeče absentují a žena přechází do kómatu. Je přítomna mióza a hyporeflexie. Jako komplikace se mohou dostavit selhání srdce, jater, ledvin, plicní edém, odchlípení sítnice, edém mozku, cerebrální krvácení, hypertonus dělohy, abrupce placenty, hypoxie plodu (Hájek et al., 2004).

V případě rozvoje eklampsie jsou ženě podávána farmaka tlumící křeče, zajišťuje se umělá ventilace a případně se řeší přidružené komplikace. Novorozenec obvykle vyžaduje intenzivní péči, bývá hypotrofický, často je nutná resuscitace ihned po porodu, je nutné udržovat tělesnou teplotu, korigovat metabolickou acidózu (Hájek et al., 2004).

Léčbou preeklampsie s vážným průběhem je v 38. gestačním týdnu a později vyvolání porodu, v dřívějším termínu se provádí po zvážení rizik pro matku a plod. Indikace k porodu jsou: závažná růstová restrikce plodu, oligohydramnion, neuspokojivé prospívání plodu, nízké množství krevních destiček u matky, progresivní zhoršení funkce jater/ledvin, podezření na abrupci placenty, perzistující bolesti hlavy/poruchy vizu/bolesti kraniální části břicha/nauzea/zvracení, eklampsie (Gifford et al., 2000).

Během těhotenství je u preeklamptických žen doporučeno průběžně sledovat krevní tlak a prospívání plodu a případně nasadit antihypertenzní léky (ACOG Committee on Obstetric

Practice, 2002). Při porodu je nutné průběžně sledovat krevní tlak matky a provést preventivní opatření vzniku záchvatu (podáním infuze síranu hořečnatého) (Witlin and Sibai, 1998; Magpie Trial Collaborative Group, 2002).

Krevní tlak matky je obvykle stabilizován do několika hodin po porodu, vyšší hodnoty ovšem mohou přetrvávat až 4 týdny (Ferrazzani et al., 1994). Pokud zvýšení krevního tlaku přetrvává 12 týdnů a déle, je ženě diagnostikována chronická hypertenze (Gifford et al., 2000).

### **4.3 Fetální růstová restrikce**

Fetální růstová restrikce (FGR) je opoždění růstu plodu doprovázené patologickými dopplerovskými průtoky. Nejčastěji odborná literatura uvádí růst jako opožděný při odhadované hmotnosti plodu menší než 10. percentil pro daný gestační věk v příslušné populaci. Pro opoždění růstu plodu bez patologických změn se používá anglický termín small for gestational age (SGA).

Růst plodu se dle Carrery et al. (1998) dělí na 4 fáze: do 16. týdne je rychlost růstu plodu do 10 g/týden, do 27. týdne 85 g/týden, následně plod dosahuje maxima růstu do 37. týdne, a to 200 g/týden, poté růst zpomaluje na 70 g/týden. Řízení růstu plodu je primárně genetické, dalším významným faktorem je prostředí plodu – děloha matky. Růst se dělí na 2 fáze: růstová křivka v první fázi má exponenciální průběh, později navazuje druhá fáze s lineárním průběhem – růst se tedy zpomalí, plod zraje (Carrera et al., 1998).

Růst plodu je ovlivněn mnoha faktory: genetická výbava jedince, dostupnost živin, kyslíku, výživa matky, přítomnost růstových faktorů (hormonů) matky, plodu a placenty (Gicquel and Le Bouc, 2006). V první polovině těhotenství odpovídá rychlosti růstu zejména genotyp plodu – je zde obecně zakódován růst buněčných linií i individuální rozdíly jako etnicita, pohlaví. Později, ve druhé polovině těhotenství, se uplatňují i negenetické vlivy: environmentální a hormonální (Love and Kinch, 1965). Hormony řídí růst i vývoj tkání, jejich diferenciaci, zohledňují podmínky plodu (Gicquel and Le Bouc, 2006).

Hormonální řízení ze strany matky je omezeno propustností placenty. Placentou prochází tyroxin a kortizol, ovlivňují množství glukózy a živin ve fetální krvi a tím je ovlivněn i růst plodu. Mateřský anabolismus je zvýšen relativním hyperinzulinizmem,

progesteronem a estrogény, uteroplacentární průtok je ovlivňován katecholaminy, angiotenzinem II, aldosteronem, prostaglandiny (Hájek, 2004; Speroff, 1973). Nízká hmotnost matky před těhotenstvím, nízký váhový přírůstek matky během těhotenství, (př. onemocnění toto způsobující), vícečetné těhotenství, hypertenze, preeklampsie, autoimunitní onemocnění, chronická onemocnění, infekce matky, užívání tabáku, alkoholu, kokainu, některých léků (antikonvulziva, antikoagulancia, antagonisté kyseliny listové) jsou rizikovými faktory pro fetální růstovou restrikcí. Naopak nekorigovaný diabetes mellitus a gestační diabetes mellitus vedou ke zvýšení glykemie matky, zvyšuje se sekrece inzulínu, která způsobuje celkový zvýšený růst plodu, jeho svalové hmoty, ukládání tuku, zvětšení orgánů. Další faktory pro zvýšení růstu jsou vyšší věk matky, její obezita (Mayer and Joseph, 2013).

Jako fetální faktory abnormálního hmotnostního vývoje plodu označujeme některé genetické syndromy, např. aneuploidie (Downův syndrom, Edwardsův syndrom, Patauův syndrom, Turnerův syndrom), genové delece, duplikace – tyto se považují za nositele zvýšeného rizika vzniku růstové restrikcce. Beckwith-Wiedemannův syndrom, u kterého se rozvíjí hyperinzulinemie naopak vede ke zvýšení růstu (Mayer and Joseph, 2013; Khoury et al., 1988). Plody s tělesnými malformacemi mají také zvýšené riziko vzniku fetální růstové restrikcce, např. vady srdce, gastroschisis – rozštěp břišní stěny (Wallenstein et al., 2012; Raynor and Richards, 1997).

Placentárními rizikovými faktory pro nižší hmotnost plodu jsou placenta praevia, velamentózní inzerce pupečníku, vasa praevia, abnormality dělohy ovlivňující skrusturu nebo funkci placenty, abnormální vaskulární spoje uvnitř placenty – u jednočetného i vícečetného těhotenství (Mayer and Joseph, 2013).

Pro růst plodu a placenty má zásadní význam inzulínový růstový faktor (IGF). Nedostatek IGF zpomaluje růst plodu, naopak nadměrná exprese růst plodu zvyšuje. Konkrétně v případě přítomnosti dostatečného množství živin IGF-I stimuluje růst plodu, produkce IGF-I je tedy citlivá na podvýživu. IGF-II hraje klíčovou roli v růstu placenty a přenosu živin (Gicquel and Le Bouc, 2006).

Odhad hmotnosti plodu se provádí ultrasonograficky, využívá se obvod hlavy, obvod břicha, př. i biparietální rozměr a délka femuru (Hájek, 2004; Hadlock et al., 1985). Při odhadované nízké hmotnosti je doporučováno doplnit vyšetření plodové vody,

dopplerovské průtoky v arteria umbilicalis a ultrazvukové vyšetření celého plodu pro zvýšené riziko strukturních abnormalit (Berkley et al., 2012).

Fetální růstovou restrikci dělíme dle nástupu restrikce na časnou – do 32. týdne a na pozdní – po 32. týdnů gestačního věku (Savchev et al., 2014). Pro účely této studie byla fetální růstová restrikce dále dělena podle přítomnosti oligohydramnia – snížené množství plodové vody (méně než 200 ml), př. anhydramnia – úplná absence plodové vody.



## 5 ONEMOCNĚNÍ KARDIOVASKULÁRNÍHO APARÁTU

Do vyšetření u dětí bylo v rámci naší studie zařazeno měření krevního tlaku, výpočet BMI a echokardiografické vyšetření (ultrazvukové vyšetření srdce).

Hypertenze u dětí je přítomna tehdy, pokud jejich systolický a/nebo diastolický krevní tlak dosahuje hodnot 95. percentilu a více pro dané pohlaví, věk a výšku. Těchto hodnot musí dosahovat průměr dvou nezávislých měření (druhého a třetího měření). Průměrné hodnoty v rozmezí 90.–95. percentilu jsou označeny jako prehypertenze.

Pro rozřazení hodnot tlaku se využívají tabulky vytvořené pro jednotlivá pohlaví a věk, zobrazující obvykle hodnoty 50., 90., 95. a 99. percentilu systolického a diastolického tlaku pro 5., 10., 25., 50., 75., 90., a 95. percentil výšky. (National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents, 2004).

Hypertenzi lze rozdělit na primární a sekundární. Primární hypertenzi nazýváme stav, kdy není přítomna zjevná příčina vzniku hypertenze, zatímco při sekundární je patrná nějaká hypertenzi vyvolávající příčina. Sekundární hypertenzi lze ovlivnit léčbou její příčiny (Vogt, 2001). V dětství je častěji zastoupena sekundární hypertenze, nejčastější příčinou je onemocnění ledvin (Luma and Spiotta, 2006). Mezi další příčiny řadíme: koarktaci aorty, Cushingův syndrom, hypertenzi vyvolanou léky a drogami (např. orální kontraceptiva, steroidy, amfetaminy, kokain, kofein ad.), hypertyreóza, zvýšená hladina mineralokortikoidů, obstrukční spánková apnoe, stenóza ledvinných arterií, feochromocytom (nádor nadleminy), revmatoidní onemocnění (Riley et al., 2018). U adolescentů je častější naopak primární hypertenze (Luma and Spiotta, 2006).

Rizikovými faktory pro vznik hypertenze jsou zvýšené BMI, abdominální obezita (velký obvod pasu), výskyt hypertenze v rodině (Falkner et al., 2006; Luma and Spiotta, 2006).

Hypertenzní děti by měly podstoupit léčbu pro snížení krevního tlaku a tím i pro snížení rizika rozvoje kardiovaskulárního onemocnění. Konzervativní léčba sestává ze zdravého životního stylu: dieta pro snížení hmotnosti u obézních dětí, vyvážené složení přijímané stravy (čerstvé ovoce, zelenina, dostatek vlákniny, omezení přijímaných tuků, sodíku), zařazení pravidelné fyzické aktivity (30–60 minut, 3x–5x týdně), vyřazení alkoholu, cigaret, zamezit vystavení stresu. Pro léčbu je žádoucí změna životního stylu v celé rodině dítěte (Flynn et al., 2017).

Pokud je konzervativní léčba neefektivní, přistupuje se k farmakologické léčbě. Účinné a dětmi dobře tolerované jsou inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu, blokátory receptorů pro angiotenzin, blokátory kalciového kanálu a thiazidová diuretika. U dětí se farmakologická léčba zahajuje minimální možnou dávkou a po 2–4 týdnech se postupně navyšuje do snížení krevního tlaku (Flynn et al., 2017).

Body mass index (BMI) je hodnota poměru hmotnosti jedince v kilogramech ku kvadrátu jeho výšky v metrech. Podle Centers for Disease Control and Prevention (2018) je interpretace vypočteného BMI u dětí obtížnější než u dospělých vzhledem k podstatným změnám v hmotnosti, výšce i zastoupení tuku v těle dítěte. BMI se tedy porovnává vůči dětem stejného pohlaví a věku, využívá se percentilových grafů. Hodnota BMI menší než 5. percentil pro dané pohlaví a věk je hodnocena jako podvýživa, hodnoty menší než 85. percentil jako optimální hmotnost dítěte, hodnoty do 95. percentilu jako nadváha a 95. percentil a vyšší jako obezita dítěte.

Obezita v dětství má negativní efekt na rozvoj hypertenze a vysoké hladiny cholesterolu, které jsou rizikovým faktorem pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. Freedmana et al. (2007) mezi tyto rizikové faktory řadí zvýšenou hladinu triglyceridů, inzulinu, LDL cholesterolu, sníženou hladinu HDL cholesterolu, zvýšený systolický, diastolický krevní tlak. U 70 % obézních dětí byl přítomen alespoň jeden rizikový faktor, 39 % mělo přítomny alespoň dva faktory. Dále obezita u dětí zvyšuje riziko vzniku snížené tolerance glukózy, inzulinovou rezistenci, diabetu II. typu (Whitlock et al., 2005), dechových obtíží (spánková apnoe, astma), potíže pohybového aparátu, vznik steatózy jater, žlučových kamenů, gastroezofageálního refluxu (Han et al., 2010; Sutherland, 2008; Taylor, 2006; Vos and McClain, 2008). Obezita ovlivňuje i psychické zdraví dítěte: mohou se objevovat deprese, problémy ve škole, nízké sebevědomí, sociální obtíže, emoční nestabilita (Morrison et al., 2015). Obézní děti mají předpoklady pro zachování, př. zhoršení obezity v dospělém věku a s tím spojené zdravotní potíže, jako např. onemocnění srdce, diabetes mellitus, některé typy nádorových onemocnění (Cunningham et al., 2014; Kelsey et al., 2014).

Echokardiografie je neinvazivní ultrazvuková diagnostická metoda vyšetřující srdce u pacientů se zjištěným nebo suspektním kardiovaskulárním onemocněním. Toto vyšetření poskytuje informaci o struktuře a funkci srdce, př. cév, bez prokázaných vedlejších účinků na lidské tělo. Vyšetření poskytuje okamžité, tedy aktuální výsledky, vyšetření je možné provést při fyzické zátěži. V tomto výzkumu bylo využíváno dopplerovské

echokardiografické vyšetření, které měří krevní průtok v srdci a cévách pomocí pohybu erytrocytů. Poskytuje informace o funkci kardiovaskulární soustavy – popisuje hemodynamiku srdce: systolický, diastolický tlak, rychlost a tlak krve, přítomnost, př. rozsah poškození chlopní a jeho závažnost, zkraty v srdci (Gottdiener et al., 2004).

## 6 MATERIÁL

Odběry vzorků byly realizovány v Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze, Podolí. Pro odběr vzorku byl nutný zákonným zástupcem podepsaný souhlas s účastí ve studii. Studie byla schválena Etickou komisí Ústavu pro péči o matku a dítě a Etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Analyzovaným materiálem byla periferní žilní krev v EDTA (kyselina ethylendiamin-tetraoctová) odebraná dětem ve věku 3–11 let, narozeným v letech 2007–2014. Děti byly rozdělené do skupin dle průběhu těhotenství: fyziologické gravidity, gravidity s přítomností gestační hypertenze (GH), preeklampsie (PE) a děti s fetální růstovou restrikcí (FGR). Celkový počet vyšetřených dětí byl 309 (Hromadnikova et al., 2019).

Jako skupina fyziologické gravidity byla označena jednočetná těhotenství bez lékařských, těhotenských a chirurgických komplikací, s délkou těhotenství alespoň 37 týdnů a s narozeným zdravým dítětem o minimální porodní hmotností 2 500 g. Počet vyšetřených dětí narozených z fyziologické gravidity byl 88.

Za těhotenství s GH byla považována ta, ve kterých byl po 20. týdnu těhotenství naměřen krevní tlak těhotné vyšší než 140 mmHg a/nebo 90 mmHg a zároveň nebyla přítomna proteinurie. Počet dětí narozených z těhotenství s GH byl 54.

Preeklampsie byla diagnostikována u matek s krevním tlakem přesahující 140 mmHg a/nebo 90 mmHg naměřeným dvakrát po sobě s alespoň 4 hodinovým rozestupem a zároveň s proteinurií přesahující 300 mg/24 h. Počet dětí narozených z těhotenství s preeklampsií byl 133. Tato skupina byla rozdělena na časnou preeklampsii (49 dětí), kde byla preeklampsie diagnostikována před 34. týdnem, a pozdní preeklampsie (84 dětí), kde se rozvinulo onemocnění ve 34. týdnu a později. Děti narozených z těhotenství komplikovaného mírnou preeklampsií bylo 27 a dětí narozených z těhotenství komplikovaného závažnou preeklampsií 106. Mezi těhotenství se závažnou preeklampsií byla zařazena ta, u kterých se vyskytl systolický krevní tlak vyšší než 160 mmHg nebo diastolický tlak vyšší než 110 mmHg, proteinurie vyšší než 5 g/24 h, nebo další symptomy jako nízké množství vyloučené moči (méně než 500 ml/24 h), známky plicního edému, př. cyanóza, patologie funkce jater, vážná bolest hlavy, poruchy vizu, bolest epigastria/pravého horního kvadrantu, trombocytopenie a/nebo vážná FGR. Většina těhotných žen (128) byla před rozvojem preeklampsie normotenzní, menší část těhotných žen (6) měla hypertenzi.

Do skupiny s fetální růstovou restrikcí byly zařazeny děti, které měly jako plody v těhotenství odhadovanou hmotnost plodu menší než 10. percentil v daném gestačním věku pro populaci ČR a zároveň měly patologické dopplerovské parametry (zvýšený index pulsatility v arteria umbilicalis nad 95. percentil, nebo snížený index pulsatility v arteria cerebri media pod 5. percentil, nebo známky centralizace – nízký cerebroplacentární poměr, pod 5. percentil). Celkový počet dětí s FGR v době těhotenství (34) se skládal z 13 dětí s diagnózou časně FGR (s nástupem FGR před 32. gestačním týdnem) a 21 dětí s diagnózou pozdní FGR (s nástupem ve 32. gestačním týdnu a později). U 20 dětí s FGR se prenatálně vyskytl oligohydramnion, př. anhydramnion.

Děti narozené z těhotenství, při kterých se vyskytly další komplikace, nebyly do studie zařazeny. Za další komplikace byly považovány předčasná ruptura plodových obalů, infekce in utero, strukturální anomálie plodu, chromozomální aberace plodu, úmrtí plodu a porod mrtvého dítěte.

Děti byly před odběrem krevního vzorku vyšetřeny a rozřazeny na zdravé a na děti s nálezem. Kardiovaskulární vyšetření obsahovalo měření krevního tlaku, posouzení BMI vzhledem k věku a echokardiografické vyšetření srdce. Děti s patologickým nálezem, př. děti již docházející do kardiologické poradny byly zařazeny do skupiny dětí s nálezem. Toto dělení je zcela nezávislé na průběhu těhotenství.

Měření krevního tlaku mělo standardizovaný postup: měření se provedlo třikrát na pravé paži dítěte s pětiminutovými přestávkami. Pro naši analýzu byl použit aritmetický průměr druhého a třetího měření. Měření bylo provedeno automatickým tlakoměrem Omron M6W, (Omron Healthcare Co., Kyoto, Japan) s manžetou Omron CS pro obvod paže 17–22 cm. Jako normální krevní tlak byly vyhodnoceny hodnoty menší než 90. percentil pro dané pohlaví, věk a hmotnost dítěte. Hodnoty od 90. percentilu výše a zároveň nižší než 95. percentil byly klasifikovány jako prehypertenze a hodnoty od 95. percentilu a výše byly zařazeny mezi hypertenzní. Do skupiny dětí s nálezem byly zařazeny hypertenzní i prehypertenzní děti. Pro určení hypertenze dítěte byla použita online kalkulačka Age-based Pediatric Blood Pressure Reference Charts (dostupná z: <https://www.bcm.edu/bodycomplab/Flashapps/BPVAgeChartpage.html>).

Pro výpočet BMI byly děti měřeny kalibrovaným stadiometrem s přesností 0,1 cm, hmotnost byla měřena na kalibrované elektronické osobní váze Radwag WPT 100/200 OW (Radwag, Česká republika) s přesností 0,05 kg. Pro vyhodnocení BMI byl použit online

nástroj BMI Percentile Calculator for Child and Teen), který kromě vlastního výpočtu BMI zařazuje dítě do kategorií podváha (BMI pod 5. percentilem), optimální hmotnost (do 85. percentilu), nadváha (do 95. percentilu) a obezita (95. percentil a výše) se zohledněním pohlaví a věku. (Nástroj je dostupný z <https://www.cdc.gov/healthyweight/bmi/calculator.html>.)

Echokardiografické vyšetření bylo prováděno na ultrazvukovém diagnostickém přístroji Philips HD15 (Philips Ultrasound, Bothell, WA, USA). Děti byly vyšetřovány v poloze vleže na zádech, byla provedena kompletní 2D echokardiografie. Dětem s patologickým nálezem byla doporučena péče kardiologa.

Dle nálezu byla rozdělena skupina dětí z fyziologických gravidit na 50 bez nálezu a 38 s nálezem. Děti narozených z těhotenství s gestační hypertenzí bylo 23 bez nálezu a 31 s nálezem, s preeklampsií bylo 70 bez nálezu a 63 s nálezem, s fetální růstovou restrikcí bylo 12 bez nálezu a 22 s nálezem. Podrobnější dělení do podskupin je znázorněno v Tabulce 1 níže:

<b>Fyziologické gravidity</b>	88		
bez nálezu	50		
s nálezem	38		
<b>Gestační hypertenze</b>	54		
bez nálezu	23		
s nálezem	31		
<b>Preeklampsie</b>	133		
bez nálezu	70	časná PE	23
		pozdní PE	47
s nálezem	63	časná PE	26
		pozdní PE	37
bez nálezu	70	mírná PE	11
		závažná PE	59
s nálezem	63	mírná PE	16
		závažná PE	47
<b>Fetální růstová restrikce</b>	33		
bez nálezu	12	časná FGR	6
		pozdní FGR	6
s nálezem	22	časná FGR	7
		pozdní FGR	15
bez nálezu	12	bez oligohydramnia/anhydramnia	2
		s oligohydramniem/anhydramniem	8
		nezjištěno	2
s nálezem	22	bez oligohydramnia/anhydramnia	10
		s oligohydramniem/anhydramniem	12

Tabulka 2 Rozdělení dětí do skupin

Zákonní zástupci všech probandů poskytli písemný informovaný souhlas se zpracováním dat. Studie byla schválena Etickou komisí Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze (grant č. AZV 16-27761A, schváleno 28. května 2015) a Etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (grant č. AZV 16-27761A, schváleno 27. března 2014).

## 7 METODY

### 7.1 Zpracování biologického materiálu

Odebraný vzorek periferní žilní krve s EDTA byl ihned po přijetí do laboratoře zpracován. Zpracování vzorků bylo uskutečněno v boxech s laminárním prouděním po ozáření UV světlem. Vzorky byly zaevidovány do laboratoře společně s informovaným souhlasem zákonného zástupce a byly označeny přiděleným kódem. Pro zpracování byla použita sada QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo, č. 52304). Do zkumavky bylo přeneseno 200  $\mu$ l periferní žilní krve a bylo přidáno 1 000  $\mu$ l EL pufru (erythrocyte lysis buffer). Tato směs byla inkubována 10 minut na ledu pro zvýšení účinnosti lýzy erytrocytů a následně byla směs stočena v centrifuze s relativní odstředivou silou  $400 \times g$  po dobu 10 minut při 4 °C. Stočením se ve zkumavce vytvořila peletka z krevních buněk (kromě erytrocytů) a supernatant obsahující lyzované erytrocyty s pufrem. Supernatant byl ze zkumavek odstraněn a k peletě byl znovu doplněn EL pufr s objemem 400  $\mu$ l. Směs byla po vortexování znovu odstředěna se stejnými parametry, supernatant odstraněn. Výsledná peleta byla rozpuštěna směsí RLT pufru (RNeasy Lysis Buffer, 346,5  $\mu$ l) a  $\beta$ -merkaptoethanolu (3,5  $\mu$ l). Takto připravené vzorky byly zamrazeny na  $-80$  °C.

### 7.2 Izolace miRNA

Pro izolaci RNA se vzorky nejprve rozmrazovaly 4 minuty při teplotě 37 °C a následně byly zpracovány pomocí sady mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, USA, č. AM1560). Poté bylo ke vzorkům přidáno 600  $\mu$ l Lysis/Binding Buffer, zvortexováno a přidáno 95  $\mu$ l homogenizačního roztoku miRNA Homogenate Additive, (objem odpovídající 1/10 celkového obsahu zkumavky). Po promíchání byla zkumavka inkubována 10 minut na ledu. Následně byl do zkumavky přidán 1  $\mu$ l 0,1 nM miRNA *C. elegans* s funkcí vnitřní kontroly. Dále byl přidán Acid-Phenol-Chloroform o objemu 950  $\mu$ l a vzniklá směs byla důkladně vortexována po dobu minimálně 30 s. Centrifugací při  $10\,000 \times g$  po dobu 5 minut se oddělila vodná fáze od organické. Vodní fáze v horní části zkumavky obsahující RNA byla přenesena do nové zkumavky a naředěna 100% ethanolem o objemu odpovídajícím 1/3 objemu získané vodní fáze. Po promíchání byla směs aplikována na kolonku, zkumavka s kolonkou byla odstředěna při  $10\,000 \times g$  po dobu 15 s. Kolonka



zachytila dlouhé molekuly RNA a případné nečistoty ve vzorku. Takto vzniklý filtrát byl přenesen do nové zkumavky, naředěn 100% ethanolem o objemu 2/3 filtrátu a po promíchání znovu aplikován na kolonku a odstředěn při stejných podmínkách. Kolonka zachytila krátké molekuly RNA, které jsou později analyzovány. K promytí kolonky byly aplikovány roztoky miRNA Wash Solution 1 a následně 2x miRNA Wash Solution 2/3. Po promytí byla kolonka odstředěna při  $14\,500 \times g$  po dobu 1 minuty pro odstranění reziduální tekutiny. Takto připravená kolonka byla promyta 100  $\mu\text{l}$  roztoku Elution Solution s teplotou  $95\text{ }^\circ\text{C}$ , při  $14\,500 \times g$  po dobu 30 s. Pro eliminaci možné přítomnosti molekul DNA bylo k získaným uvolněným krátkým molekulám RNA přidáno 5  $\mu\text{l}$  pufru a 5  $\mu\text{l}$  DNázy (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Vzorek byl 10 minut inkubován při teplotě  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Pro zastavení činnosti DNázy při následující reverzní transkripci bylo ke vzorku přidáno 5  $\mu\text{l}$  EDTA a vzorek byl inkubován 10 minut při  $65\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 7.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce do cDNA (complementary DNA) probíhala ve shodný den. Kromě studovaných vzorků byla provedena reverzní transkripce i referenčního vzorku, který byl vytvořen z náhodně vybrané placenty z těhotenství s fyziologickým průběhem. Tento vzorek byl naředěn na 3 ng/ $\mu\text{l}$ . Pro reakci byly použity TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Branchburg, USA) a TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Branchburg, USA). Použité MicroRNA Assay byly primery tzv. vlásenkového typu, (stem-loop primery), jednalo se o sekvence vybraných kardiovaskulárních miRNA, 2 vybraných stabilních endogenních kontrol RNU58A, RNU38B a syntetickou cel-miR-39. Celkový objem zkumavky pro reverzní transkripci tvořil 7  $\mu\text{l}$ , z čehož 3,22  $\mu\text{l}$  byl Mater Mix pro reverzní transkripci, 1,4  $\mu\text{l}$  primer a 2,38  $\mu\text{l}$  vzorek. Detailní složení je popsáno v tabulce níže:

Master Mix	
100mM dNTPs	0,07 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase, 50 U/µl	0,49 µl
10x Reverse Transcription Buffer	0,7 µl
RNase Inhibitor, 20 U/µl	0,07 µl
Beznukleázová voda	1,89 µl
	3,22 µl
RT primer	1,4 µl
Vzorek	2,38 µl
Celkový objem	7 µl

*Tabulka 3 Složení směsi pro reverzní transkripci*

Reverzní transkripce probíhala na přístroji 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA). Teplotní profil byl následující:

30 minut	16 °C	Navázání primeru
30 minut	42 °C	Aktivace reverzní transkriptázy
5 minut	85 °C	Inaktivace reverzní transkriptázy
10 minut	4 °C	Stabilizace cDNA

*Tabulka 4 Teplotní profil reverzní transkripce*

Přepsané vzorky byly zamrazeny při teplotě  $-20\text{ °C}$ . Tento výrobcem doporučený postup je dostupný z:

[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4364031\\_TaqSmallRNA\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4364031_TaqSmallRNA_UG.pdf)

## 7.4 Kvantitativní PCR v reálném čase

Kvantitativní PCR v reálném čase byla prováděna druhý den po reverzní transkripci. Nejprve byla připravena směs PCR Master Mixu (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, no: 4318157), primerů a sond (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems) a beznukleázové vody. Tato směs byla zvortexována a stočena při  $5\,000 \times g$  po dobu jedné minuty, následovala pauza 3 minuty a tento postup se opakovával 2x. Připravená směs byla aplikována do stripů společně s rozmrazeným a stočeným vzorkem cDNA z předchozí reakce. Objemy reakční směsi pro zpracování jednoho vzorku jsou popsány v tabulce níže:

TaqMan Universal PCR Master Mix	7,5 µl
TaqMan MicroRNA Assay	3,75 µl
Beznukleázová voda	0,75 µl
	12 µl
Vzorek	3 µl
Celkový objem	15 µl

Tabulka 5 Složení směsi pro PCR

Kromě připravené cDNA extrahovaných vzorků a referenčního vzorku byl přítomna negativní kontrola (NTC, non template control) pro odhalení případné kontaminace. NTC byla pro každou Assay tvořena nahrazením 3 µl vzorku za 3 µl beznukleázové vody. Dále byly stripy 3x stočeny s pauzou 3 minuty a následně byla provedena vlastní kvantitativní PCR. Teplotní profil kvantitativní PCR je popsán v tabulce níže.

2 minuty	50 °C	Aktivace uracyl-N-glykosylázy	
10 minut	95 °C	Aktivace DNA polymerázy	
15 sekund	95 °C	Denaturace	opakování 50x
60 sekund	60 °C	Annealing, elongace	

Tabulka 6 Teplotní profil kvantitativní PCR v reálném čase

Postup pro reverzní transkripci a kvantitativní PCR byl zvolen dle doporučení výrobce, manuál je dostupný z:

[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4364031\\_TaqSmallRNA\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4364031_TaqSmallRNA_UG.pdf)

## 7.5 Relativní kvantifikace

Získané výsledky z kvantifikující PCR byly zpracovány relativní kvantifikací komparativní delta Ct metodou. Vzorec pro výpočet zahrnuje Ct endogenních kontrol RNU58A a RNU38B a vypočítává relativní množství pomocí Ct referenčního vzorku (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{\text{vzorek}} - G_{\text{vzorek}} (Ct_{\text{RNU58A}}, Ct_{\text{RNU38B}})] - [Ct_{\text{reference}} - G_{\text{reference}} (Ct_{\text{RNU58A}}, Ct_{\text{RNU38B}})]$$

Použité dvě endogenní kontroly se přepočítávají na výše zmíněné G, které je počítáno jako geometrický průměr hodnot endogenních kontrol (Vandesompele et al., 2002):

$$G (Ct_{\text{RNU58A}}, Ct_{\text{RNU38B}}) = \sqrt{Ct_{\text{RNU58A}} \times Ct_{\text{RNU38B}}}$$

Výsledek byl upraven na  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  za účelem snadnějšího zpracování vypočtených dat (Livak and Schmittgen, 2001).

## **7.6 Statistické zpracování**

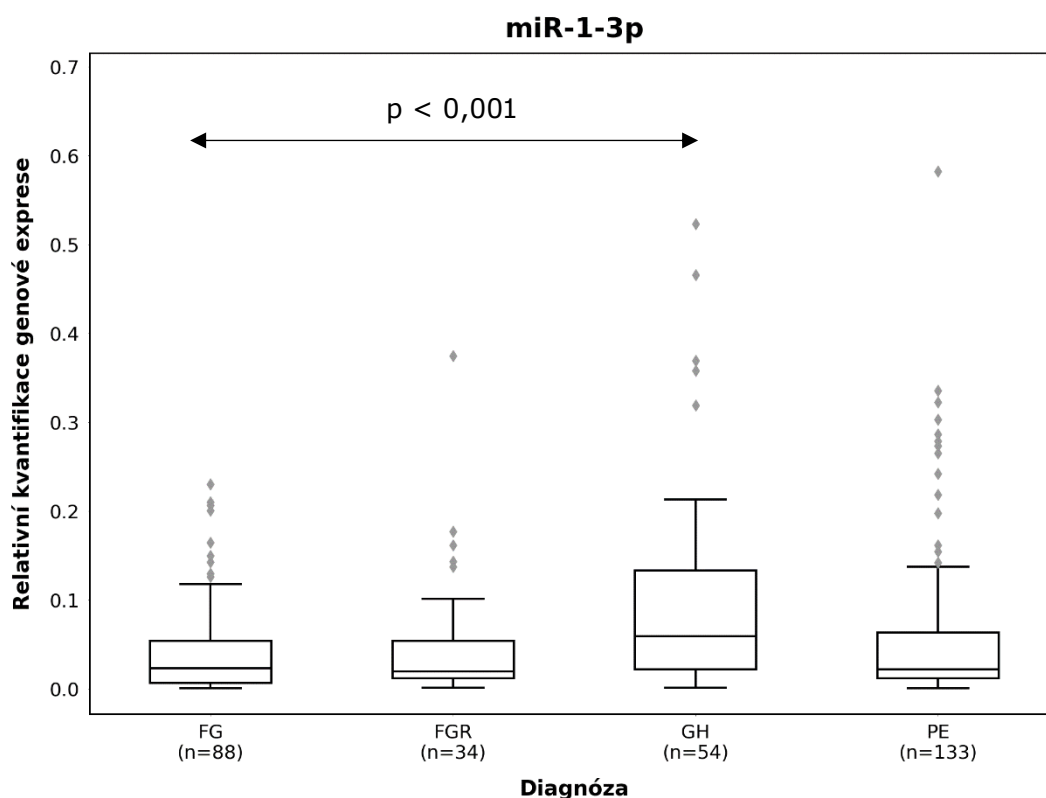
Získaná data relativní kvantifikace byla statisticky zpracována v softwaru STATISTICA application, TIBCO Software Inc., verze 13.5.0.17. Nejprve byl proveden Shapiro-Wilkův test normality dat. Protože data neměla normální rozdělení, pro následující zpracování byl zvolen Kruskal-Wallisův test v případě více porovnávaných skupin a Mann-Whitneyův test pro vzájemné porovnání dvou skupin. Jako signifikantní byla označena data s p hodnotou menší než 0,05 a následně byla data zanesena do krabicových grafů naprogramovaných jazykem Python.

## 8 VÝSLEDKY

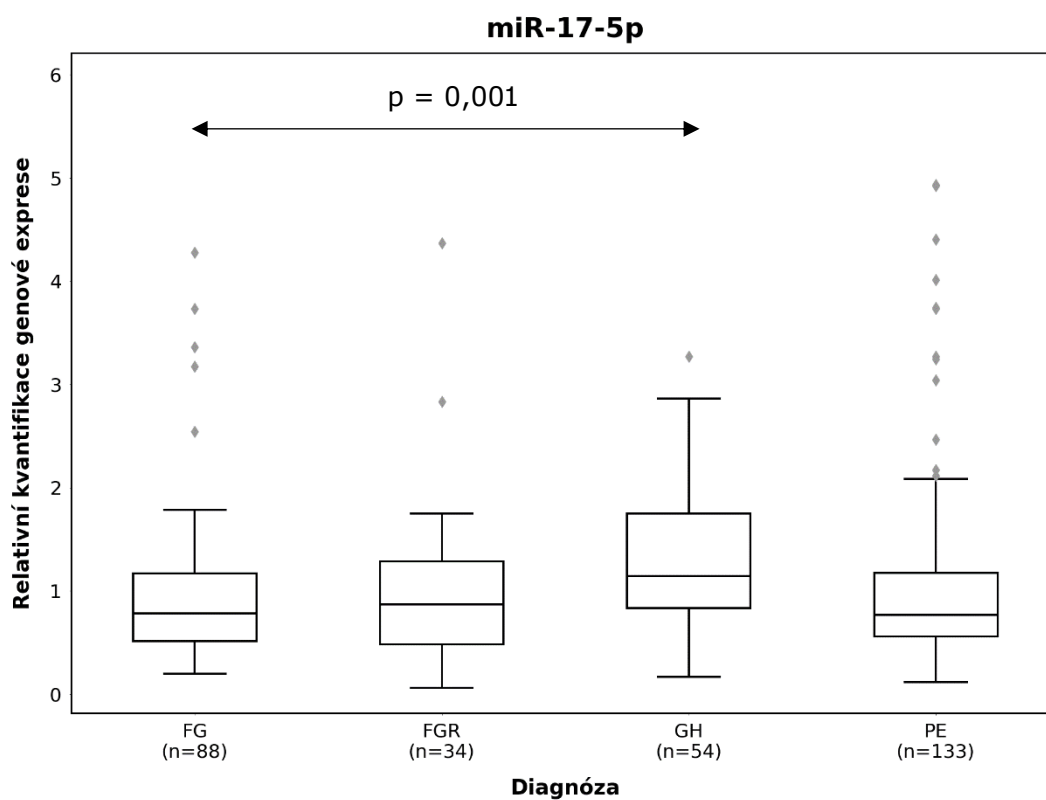
Byla provedena analýza dat dětí ve věku 3–11 let. Signifikantní výsledky byly zpracovány pomocí krabicových grafů a jsou předloženy níže. Vypočtená p hodnota je zaokrouhlena na 3 desetinná místa a je vyznačena v grafu mezi danými dvěma skupinami. Část výsledků této studie byla publikována v časopise International Journal of Molecular Sciences (Hromadnikova et al., 2019).

### 8.1 Porovnání skupin dětí dle průběhu těhotenství

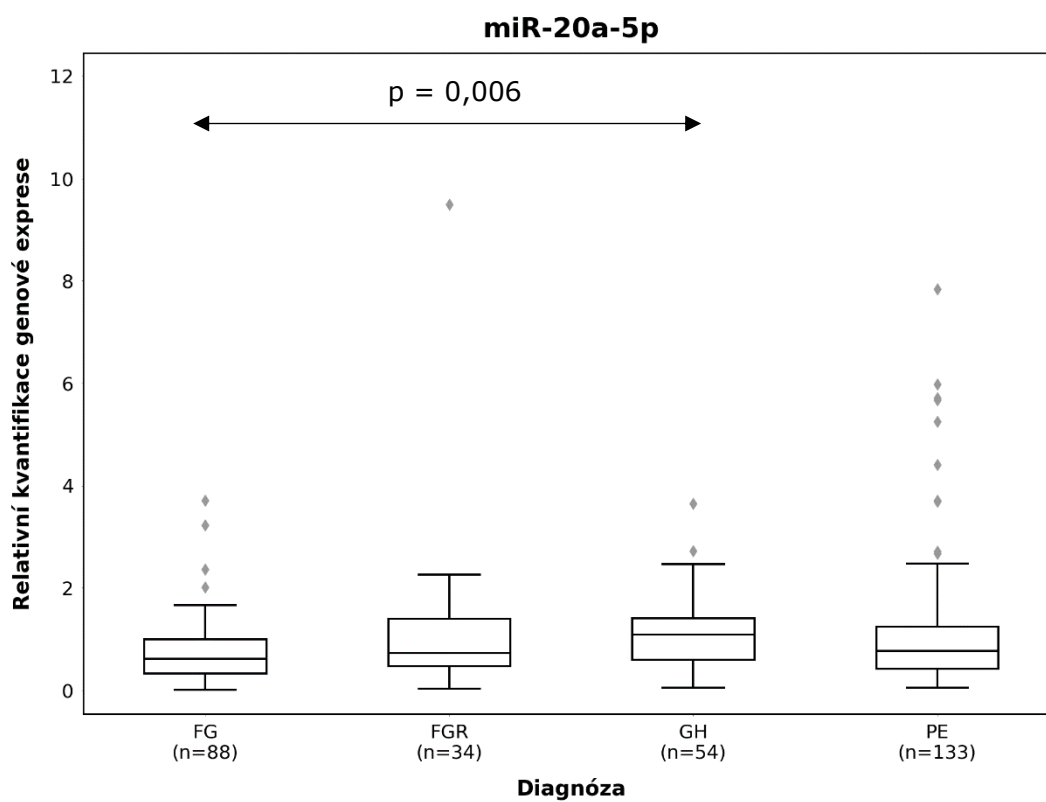
Při porovnání skupin dětí dle průběhu těhotenství byly pomocí Kruskal-Wallisova testu porovnány skupiny FG, FGR, GH a PE bez ohledu na přítomnost nálezu při vyšetření dětí. Signifikantní výsledky byly zjištěny porovnáním FG a GH, a to přítomnost up-regulace u skupiny FG oproti skupině GH u miR-1-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-181a-5p a miR-499-5p.



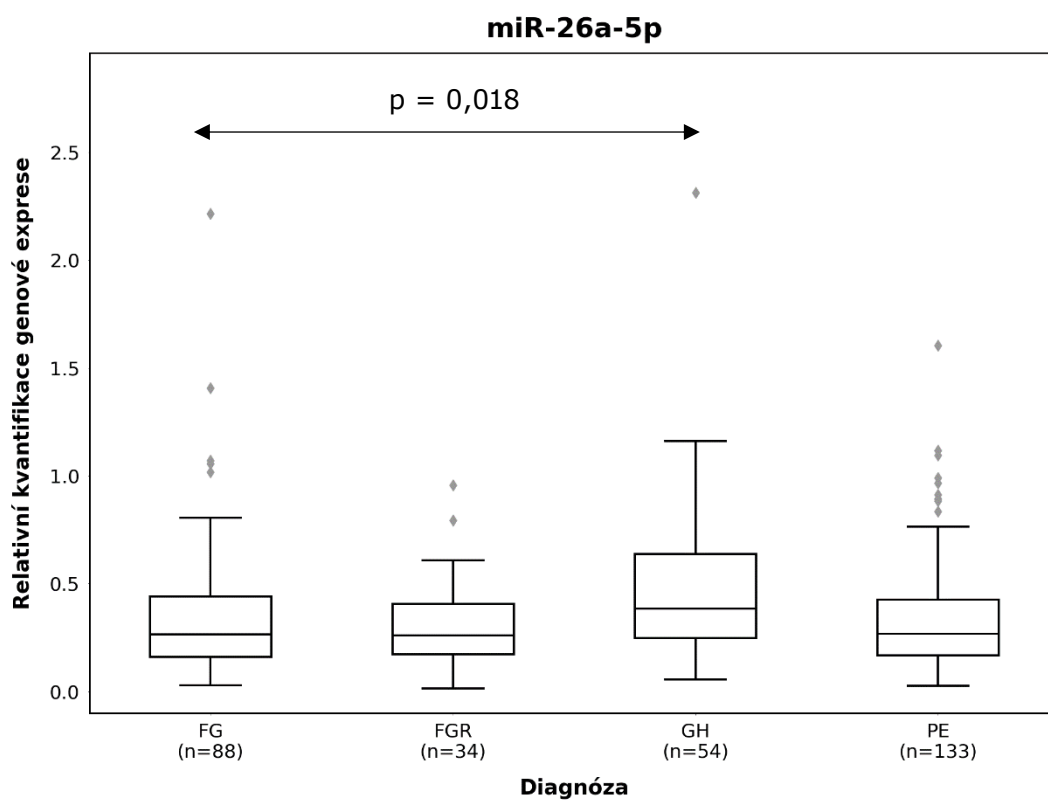
Graf 1 Up-regulace miR-1-3p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG



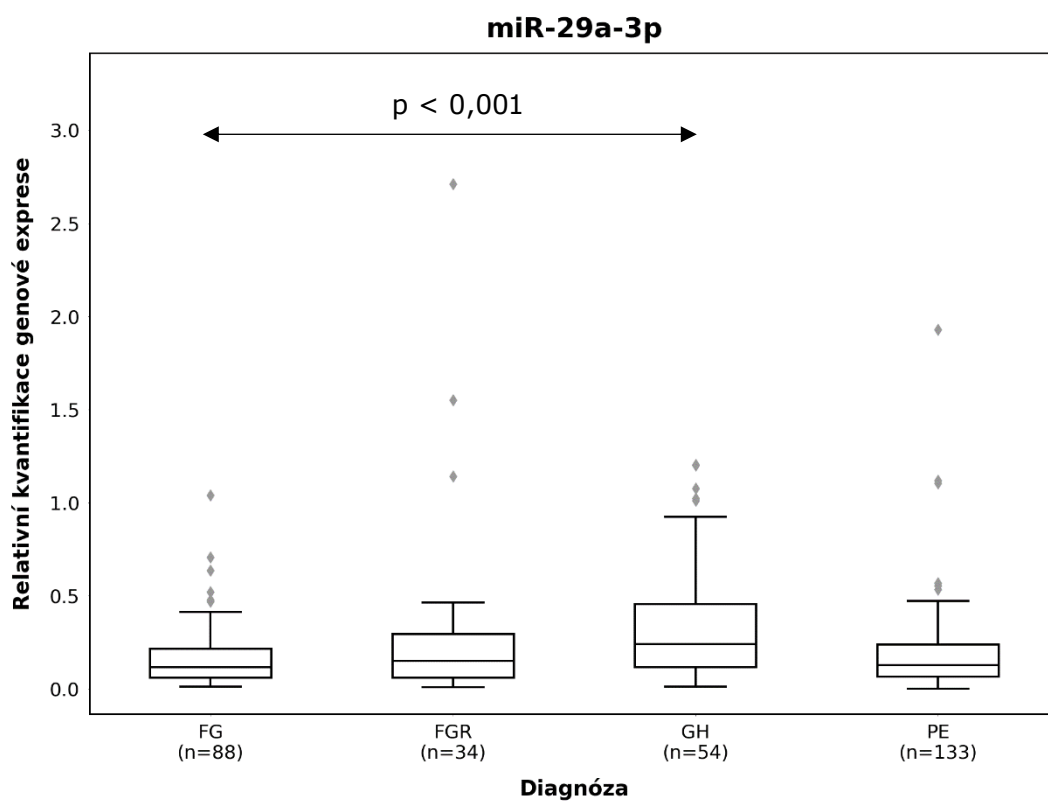
Graf 2 Up-regulace miR-17-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG



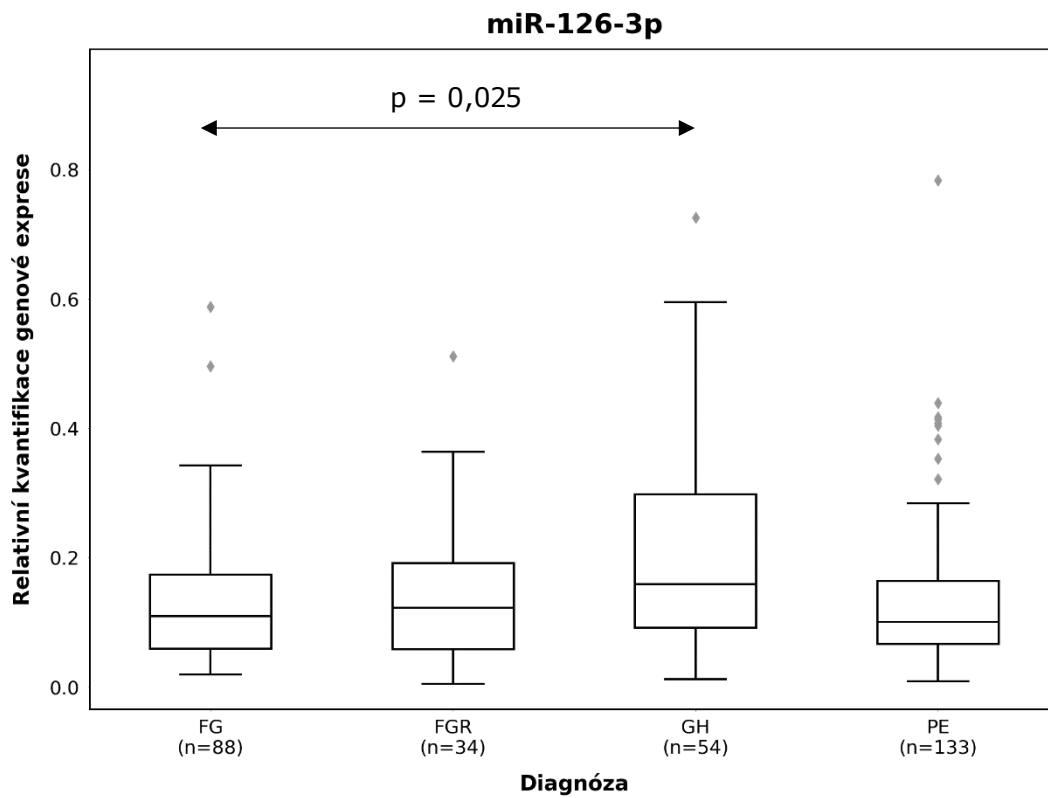
Graf 3 Up-regulace miR-20a-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG



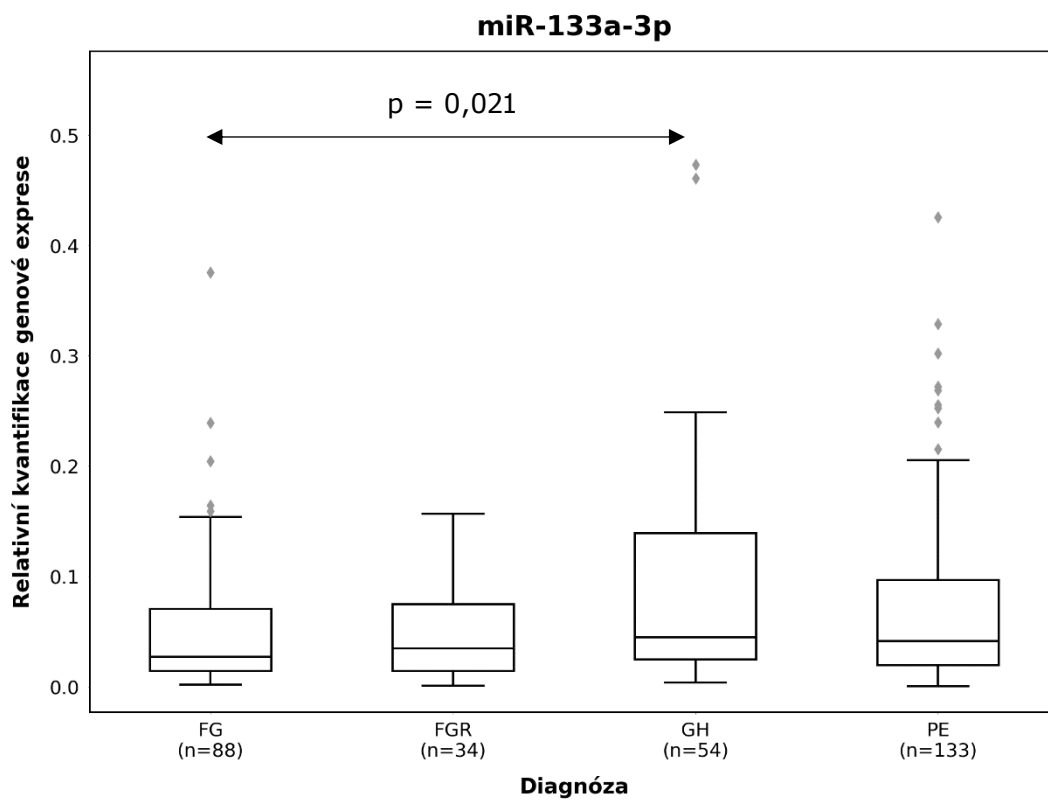
*Graf 4 Up-regulace miR-26a-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG*



*Graf 5 Up-regulace miR-29a-3p u skupiny GH ve srovnání se skupinou s FG*

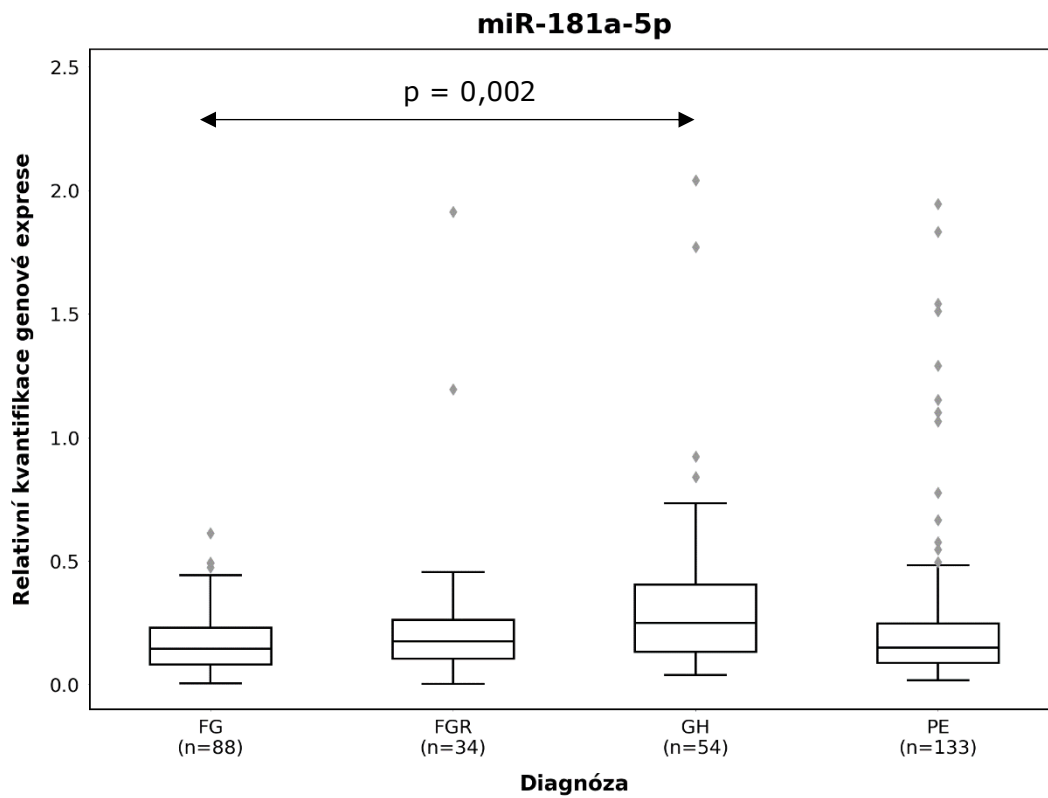


*Graf 6 Up-regulace miR-126-3p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG*

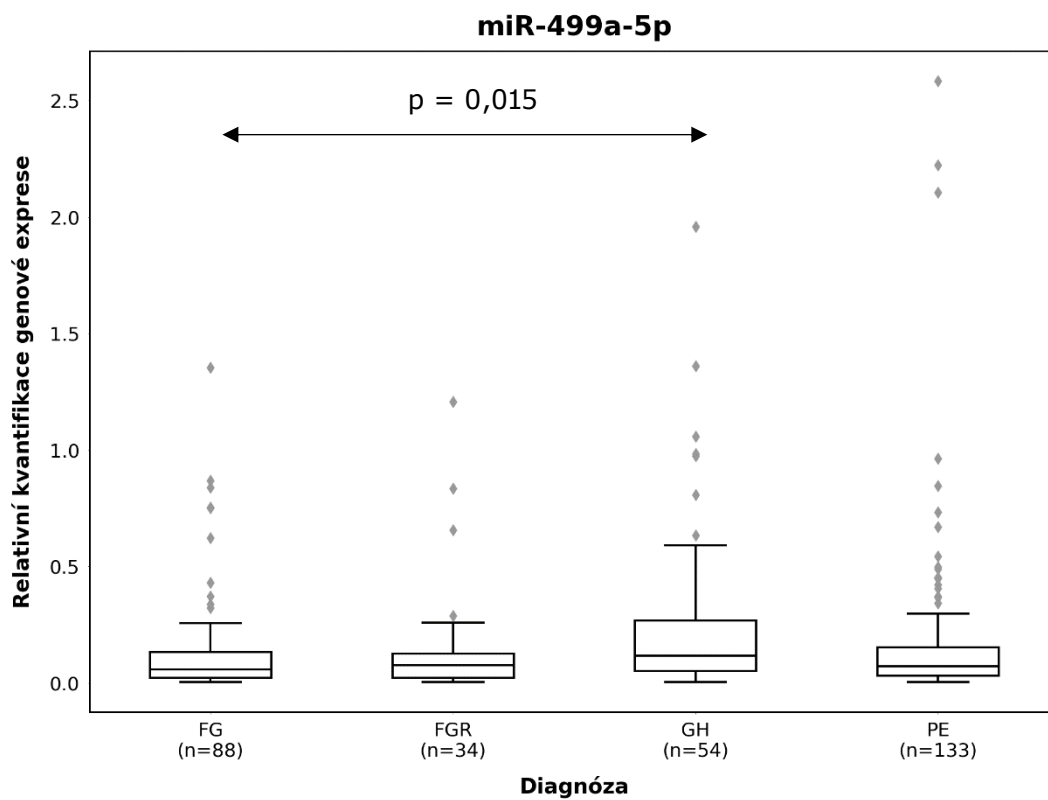


*Graf 7 Up-regulace miR-133a-3p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG*





*Graf 8 Up-regulace miR-181a-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG*



*Graf 9 Up-regulace miR-499a-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG*

## 8.2 Porovnání skupin dětí dle přítomnosti nálezu

Naměřené hodnoty mikroRNA dětí rozdělených do dvou skupin podle přítomnosti nálezu při kardiologickém vyšetření byly porovnány Mann-Whitneyovým testem. Děti byly dle vyšetření rozděleny na: děti bez nálezu (z FG, s GH, s PE a s FGR; n = 155) a děti s nálezem (z FG, s GH, s PE a s FGR; n = 154). Mezi těmito dvěma skupinami nebyly nalezeny signifikantní rozdíly u žádné z testovaných mikroRNA, viz tabulka níže:

MikroRNA	p-hodnota	MikroRNA	p-hodnota
miR-1-3p	0,222	miR-130b-3p	0,689
miR-16-5p	0,322	miR-133-3p	0,384
miR-17-5p	0,424	miR-143-3p	0,263
miR-20a-5p	0,215	miR-145-5p	0,764
miR-20b-5p	0,818	miR-146a-5p	0,298
miR-21-5p	0,107	miR-155-5p	0,271
miR-23a-3p	0,379	miR-181a-5p	0,582
miR-24-3p	0,379	miR-195-5p	0,764
miR-26a-5p	0,857	miR-199a-5p	0,153
miR-29a-3p	0,384	miR-210-3p	0,667
miR-92-3p	0,582	miR-221-3p	0,944
miR-100-5p	0,575	miR-342-3p	0,478
miR-103-3p	0,082	miR-499a-5p	0,522
miR-125b-5p	0,920	miR-574-3p	0,660
miR-126-3p	0,308		

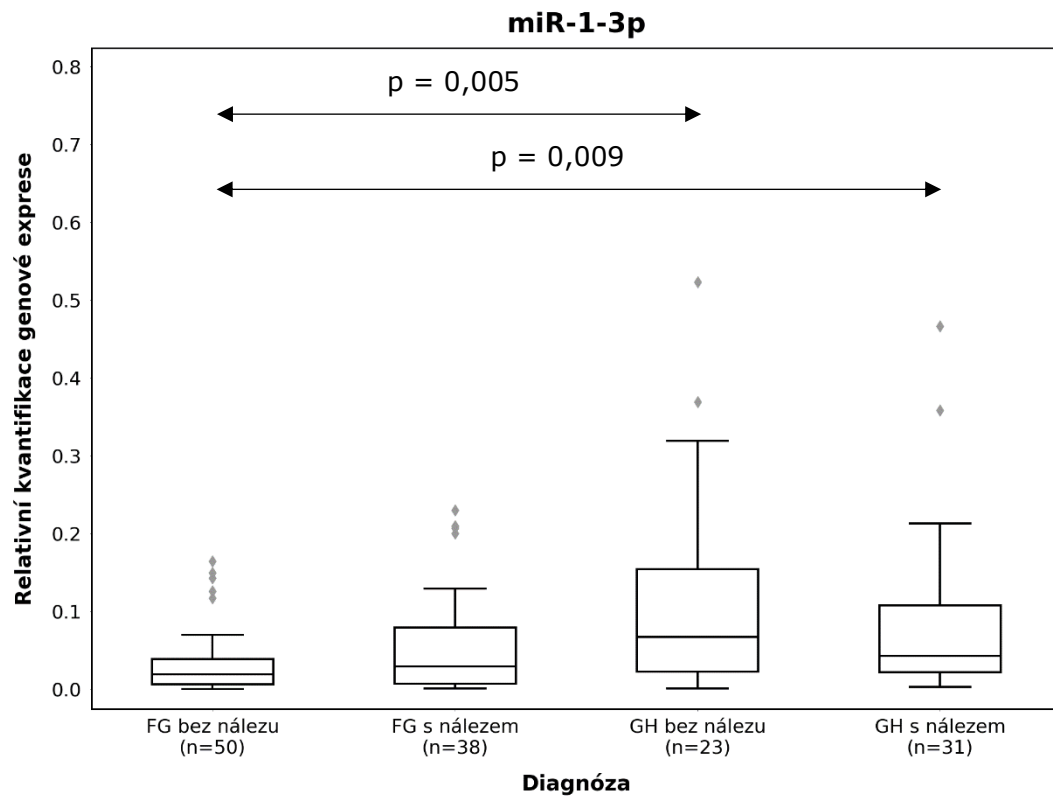
Tabulka 7 Porovnání skupiny dětí bez nálezu a dětí s nálezem: p-hodnoty jednotlivých mikroRNA

## 8.3 Porovnání skupin dětí dle průběhu těhotenství a přítomnosti nálezu

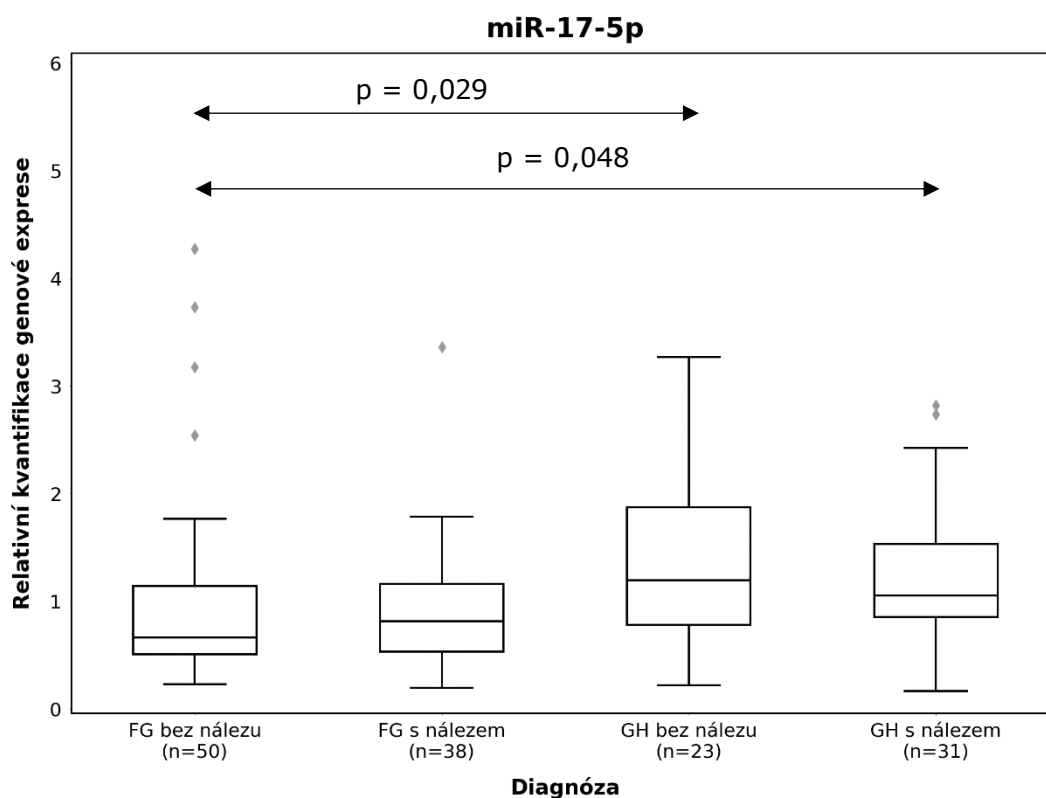
V dalším statistickém zpracování dat se skupiny dětí rozdělily do základních skupin dle průběhu těhotenství a zároveň podle přítomnosti nálezu. Jednotlivá patologická těhotenství byla porovnávána zvlášť oproti fyziologické graviditě s nálezem a bez nálezu.

Porovnáním FG a GH s ohledem na nález byly nalezeny signifikantní výsledky mezi skupinou FG bez nálezu a skupinou GH bez nálezu u miR-1-3p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-26a-5p a miR-133-3p. Dále byl nalezen rozdíl mezi skupinou FG bez nálezu a GH s nálezem u miR-1-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-29a-3p a miR-181a-5p. Mezi FG s nálezem a GH bez nálezu byl patrný rozdíl u miR-26a-5p, miR-29a-3p a miR-199a-5p.

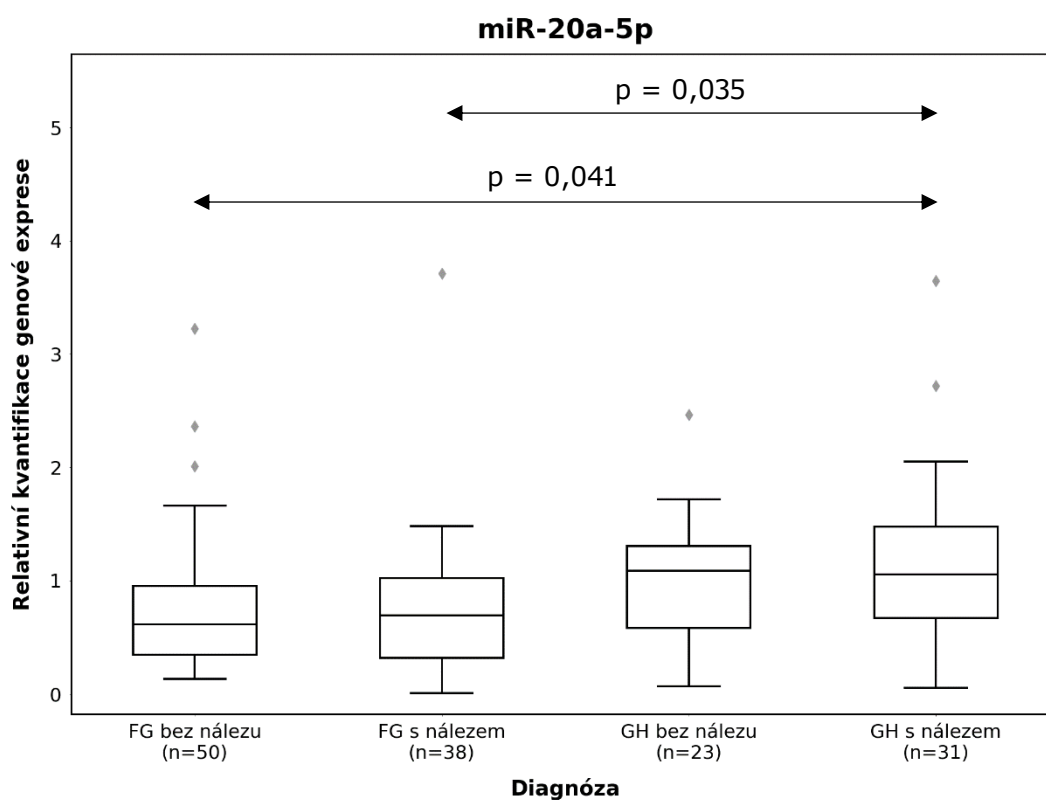
Mezi FG s nálezem a GH s nálezem byly naměřeny odlišné hladiny u miR-20a-5p, miR-29a-3p a miR-181a-5p.



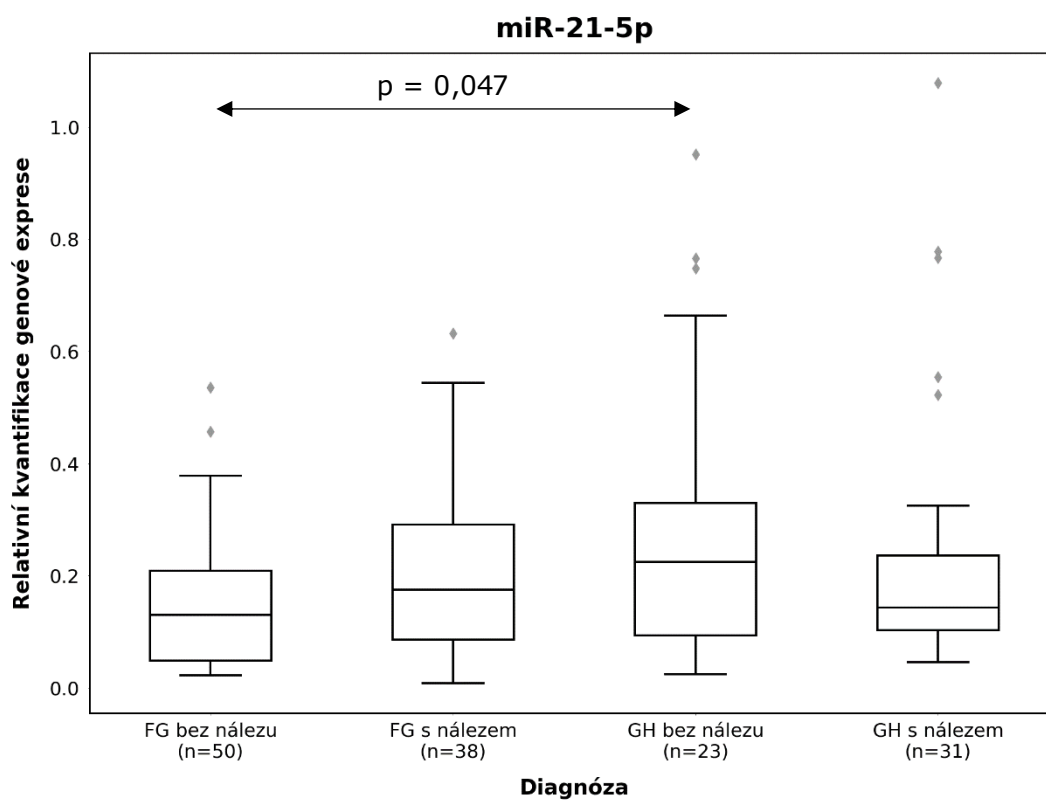
Graf 10 Up-regulace miR-1-3p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG bez nálezu; up-regulace miR-1-3p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu



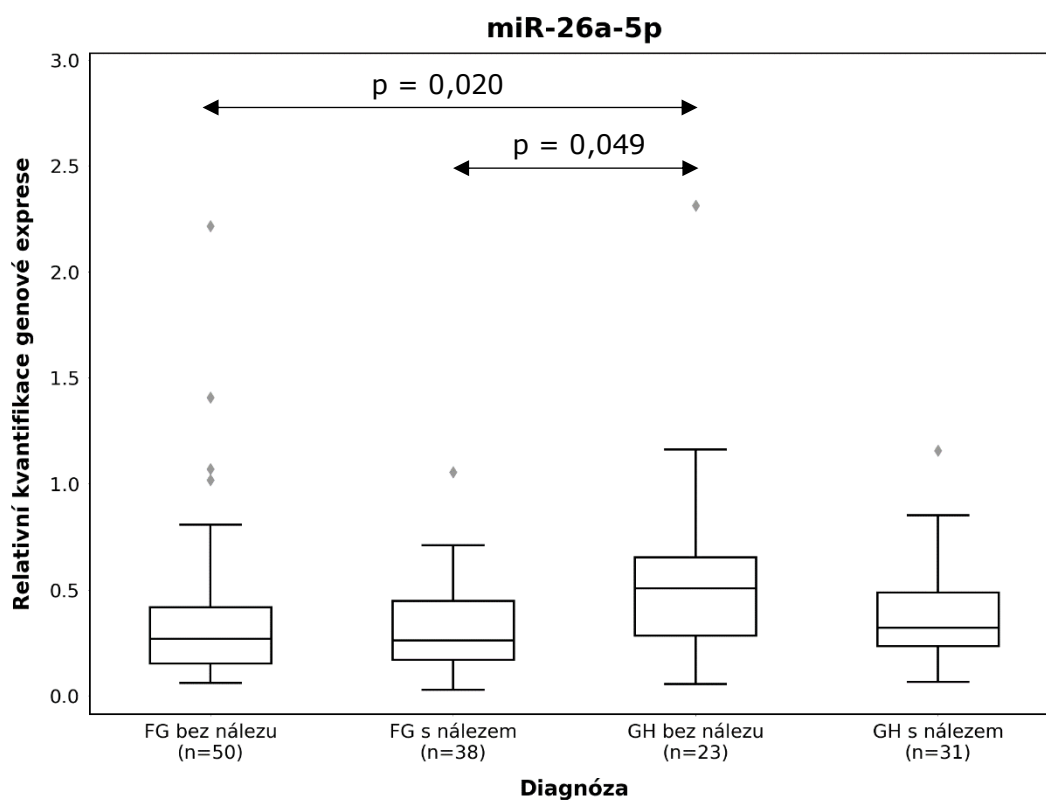
Graf 11 Up-regulace miR-17-5p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG bez nálezu; up-regulace miR-17-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu



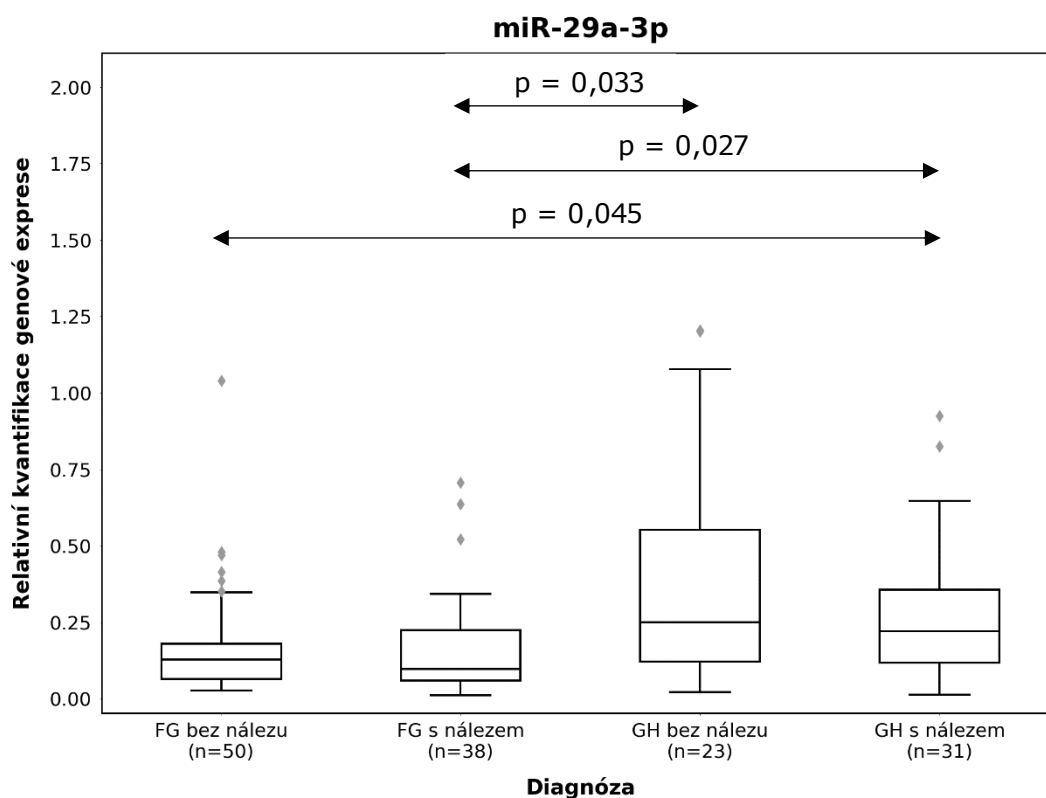
Graf 12 Up-regulace miR-20a-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu; up-regulace miR20a-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG s nálezem



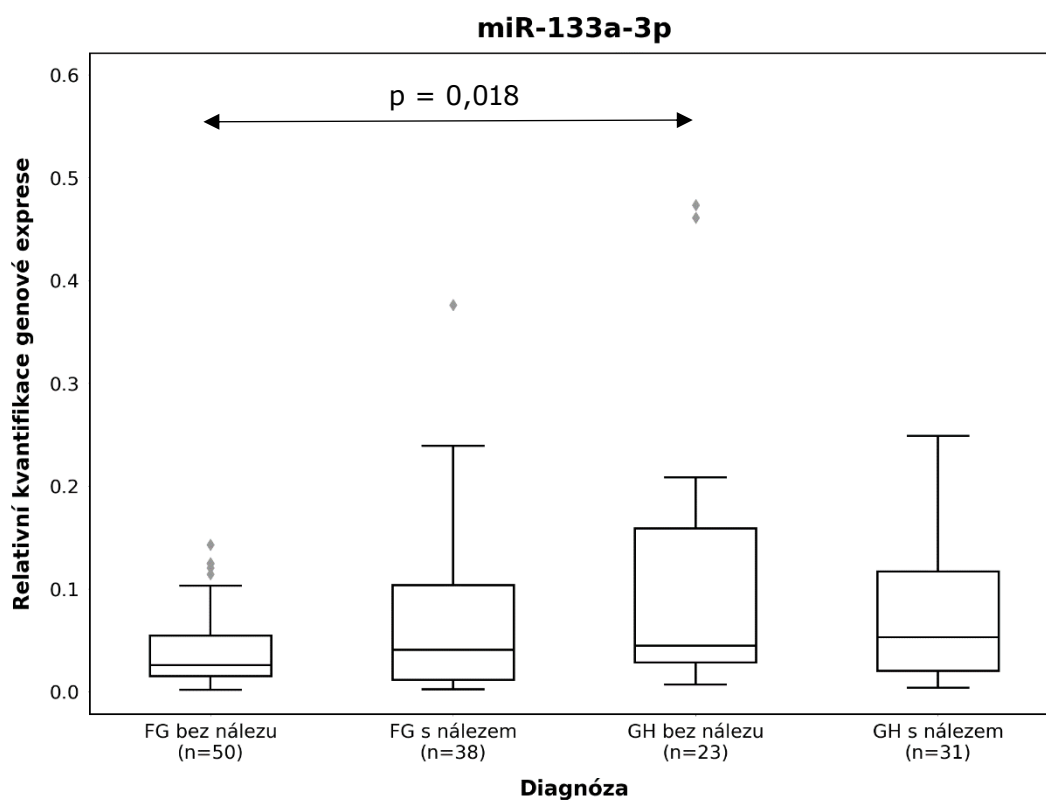
Graf 13 Up-regulace miR-21-5p u skupiny GH bez nálezů ve srovnání se skupinou FG bez nálezů



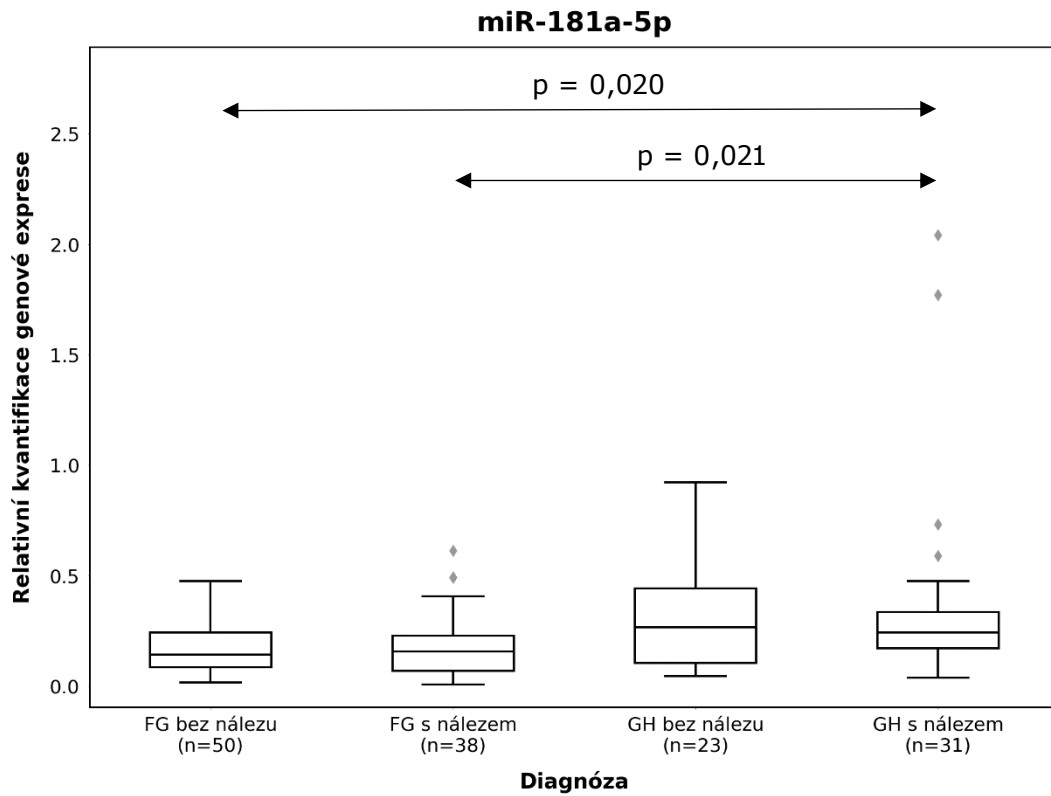
Graf 14 Up-regulace miR-26a-5p u skupiny GH bez nálezů ve srovnání se skupinou FG bez nálezů; up-regulace miR-26a-5p u skupiny GH bez nálezů ve srovnání se skupinou FG s nálezem



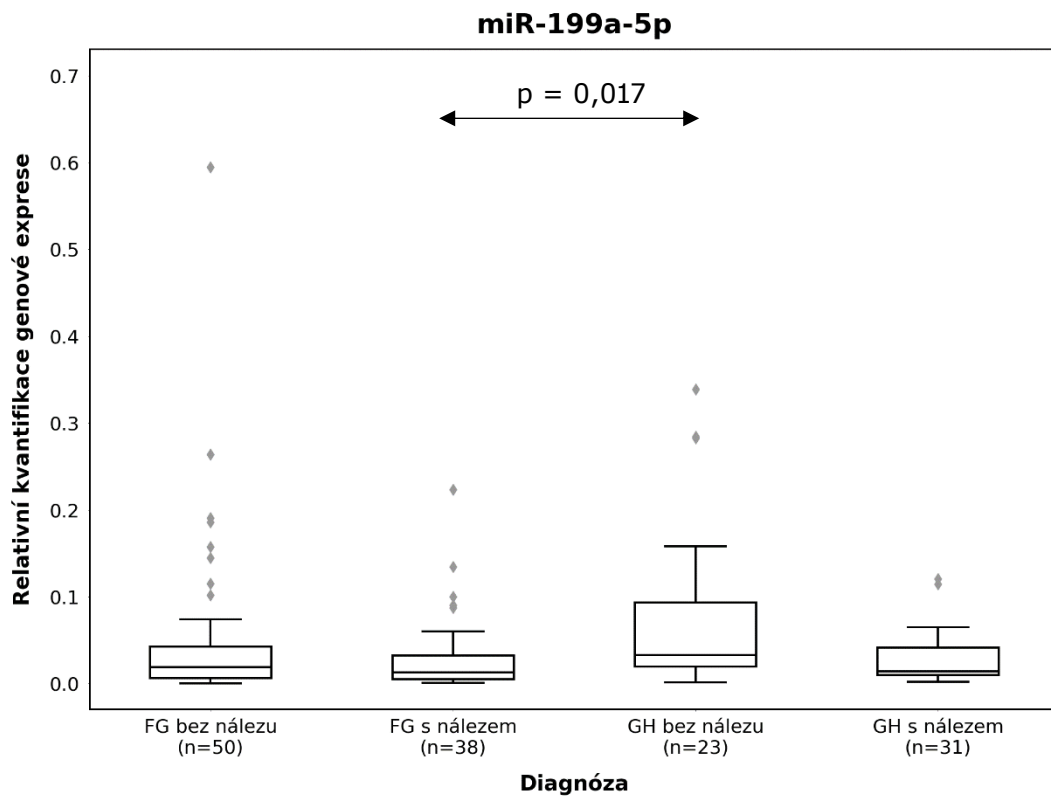
Graf 15 Up-regulace miR-29a-3p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu, up-regulace miR-29a-3p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG s nálezem, up-regulace miR-29a-3p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG s nálezem



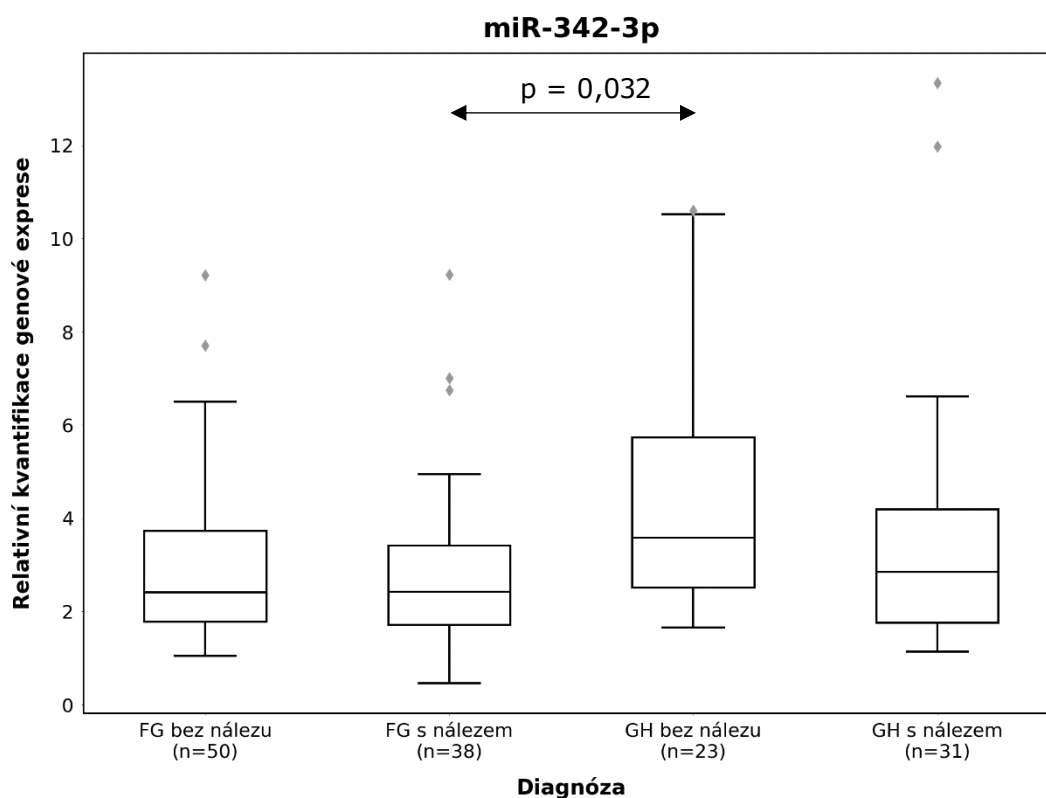
Graf 16 Up-regulace miR-133a-3p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG bez nálezu



Graf 17 Up-regulace miR-181a-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu, up-regulace miR-181a-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG s nálezem



Graf 18 Up-regulace miR-199a-5p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG s nálezem

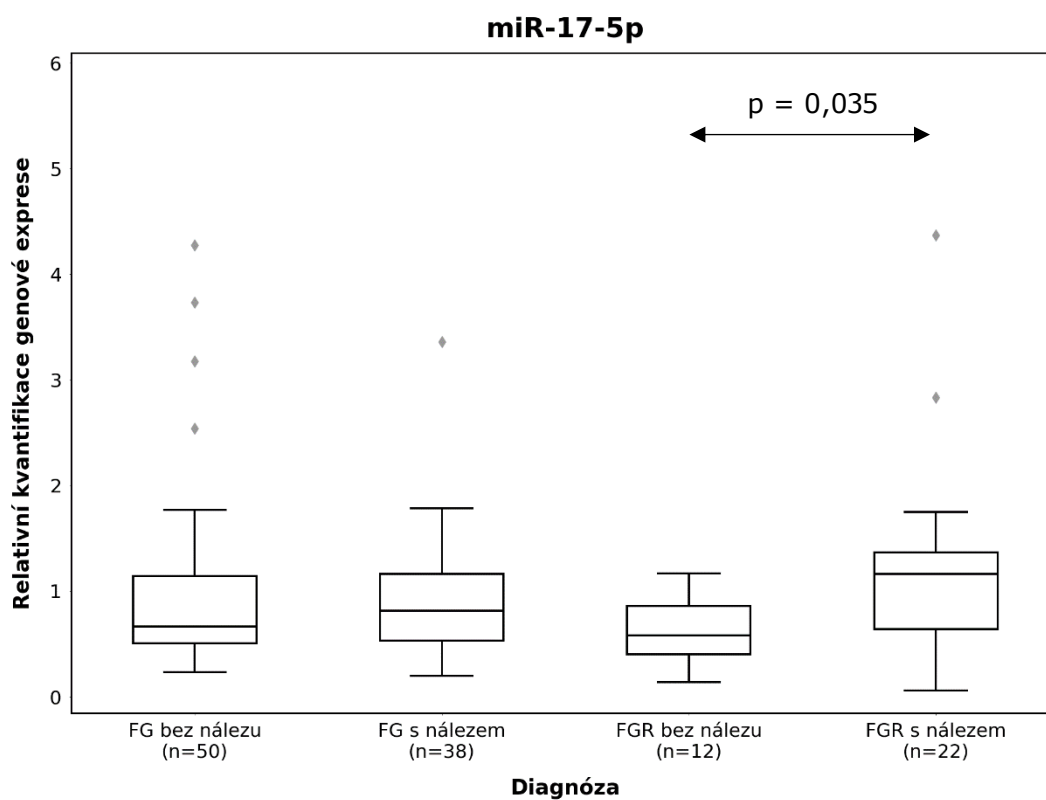


*Graf 19 Up-regulace miR-342-3p u skupiny GH bez nálezů ve srovnání se skupinou FG s nálezem*

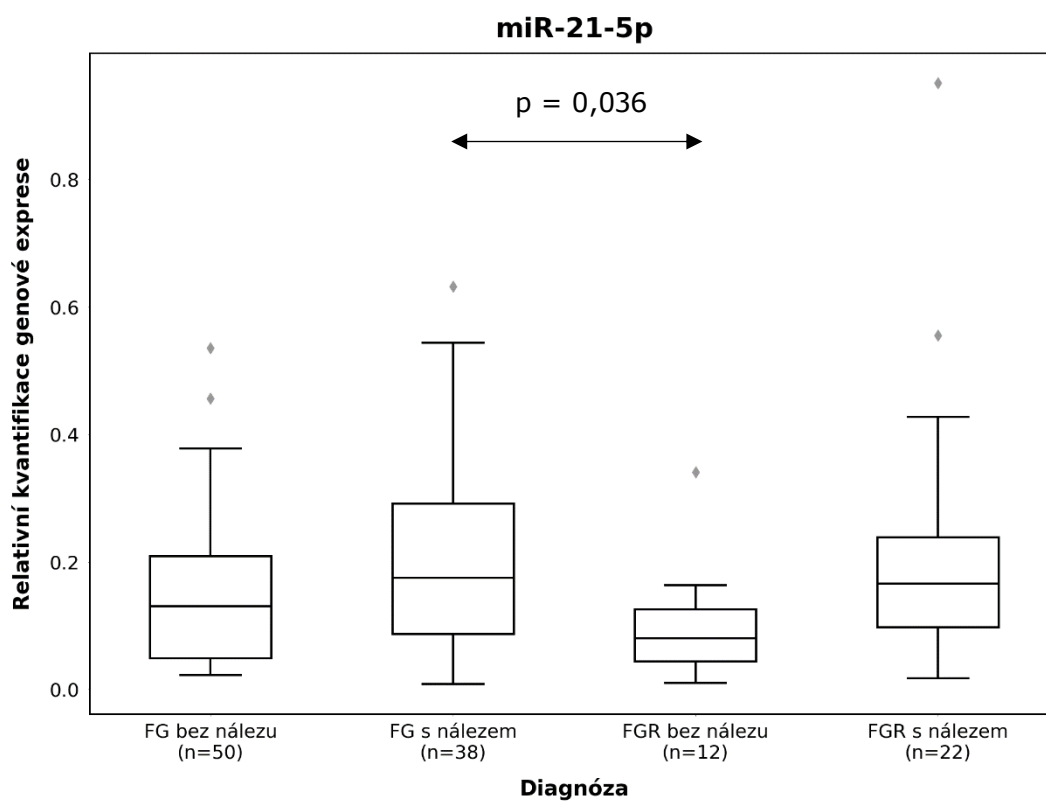
Při porovnávání FG a PE s ohledem na nález nebyly nalezeny žádné signifikantní výsledky.

Při porovnání FG a FGR byla nalezena down-regulace u miR-21-5p u skupiny FGR bez nálezů oproti skupině FG s nálezem. Dále byla přítomna up-regulace miR-17-5p a miR-126-3p u skupiny FGR s nálezem oproti skupině FGR bez nálezů.

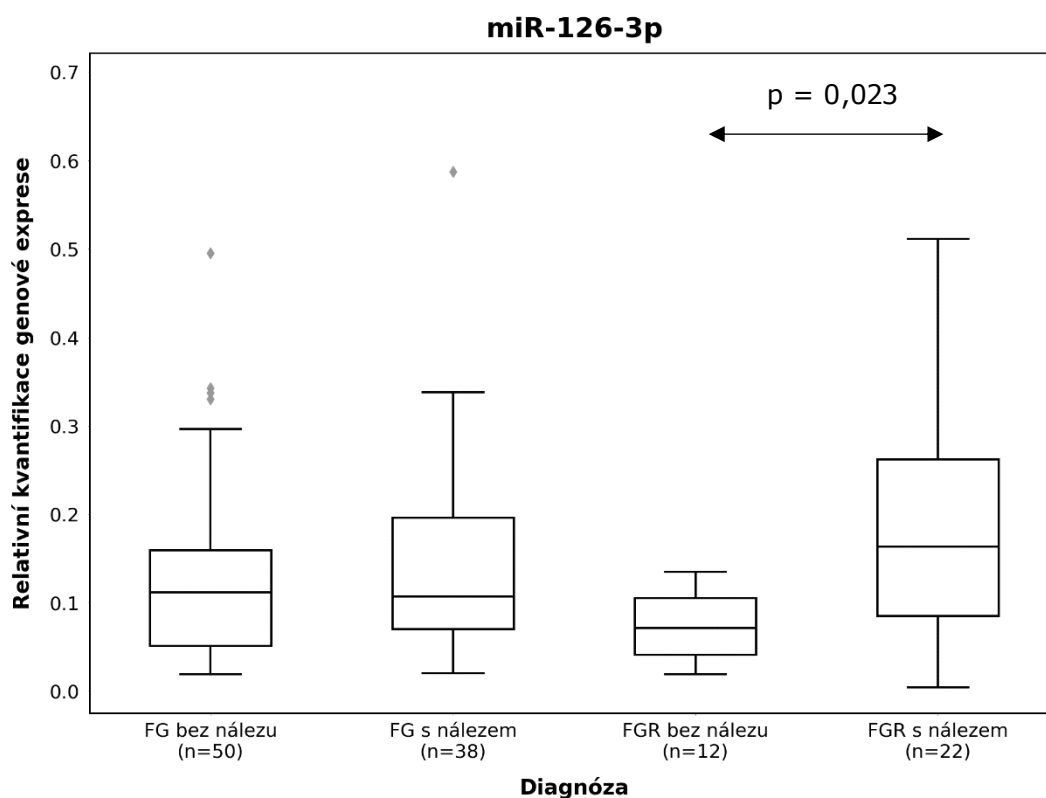




Graf 20: Up-regulace miR-17-5p u skupiny FGR s nálezem ve srovnání se skupinou FGR bez nálezu



Graf 21 Down-regulace miR-21-5p u skupiny FGR bez nálezu ve srovnání se skupinou FG s nálezem



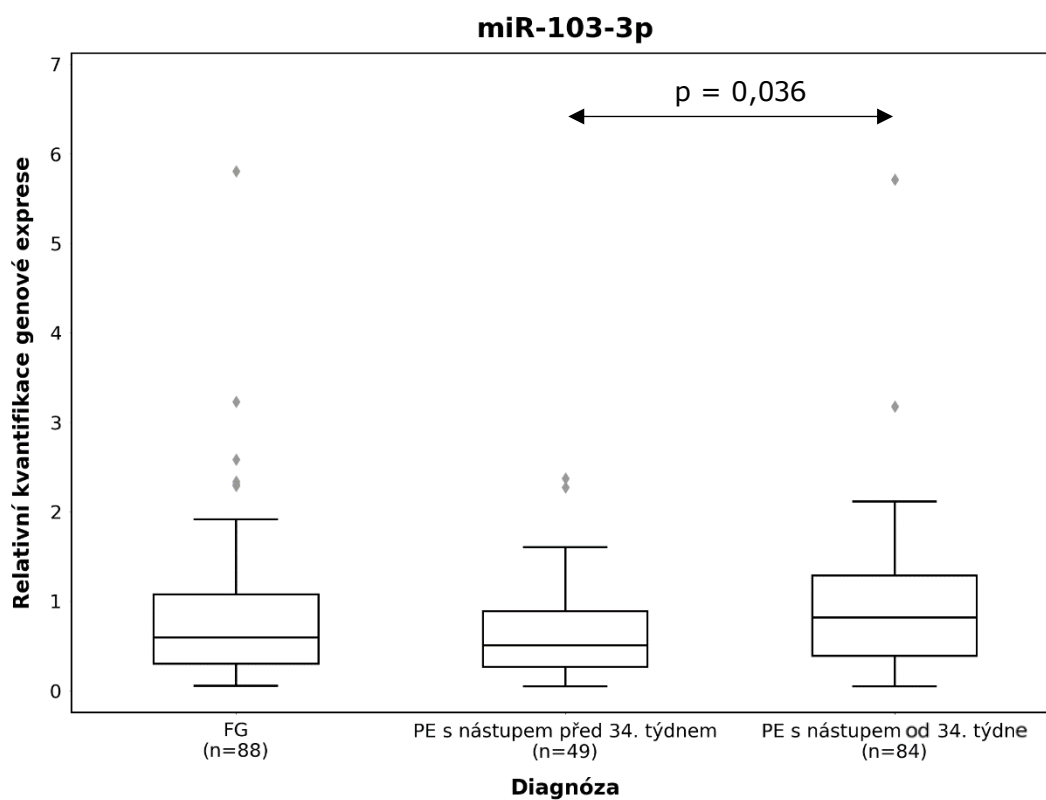
Graf 22 Up-regulace miR-126-3p u skupiny FGR s nálezem ve srovnání se skupinou FGR bez nálezu

## 8.4 Porovnání podskupin dětí z těhotenství s preeklampsii

Děti narozené z těhotenství s preeklampsii byly rozděleny na ty, které se narodily z těhotenství s mírným a se závažným průběhem preeklampsie a porovnány s dětmi z fyziologických gravidit bez ohledu na přítomnost nálezu při vyšetření. V tomto rozdělení nebyly nalezeny žádné signifikantní výsledky.

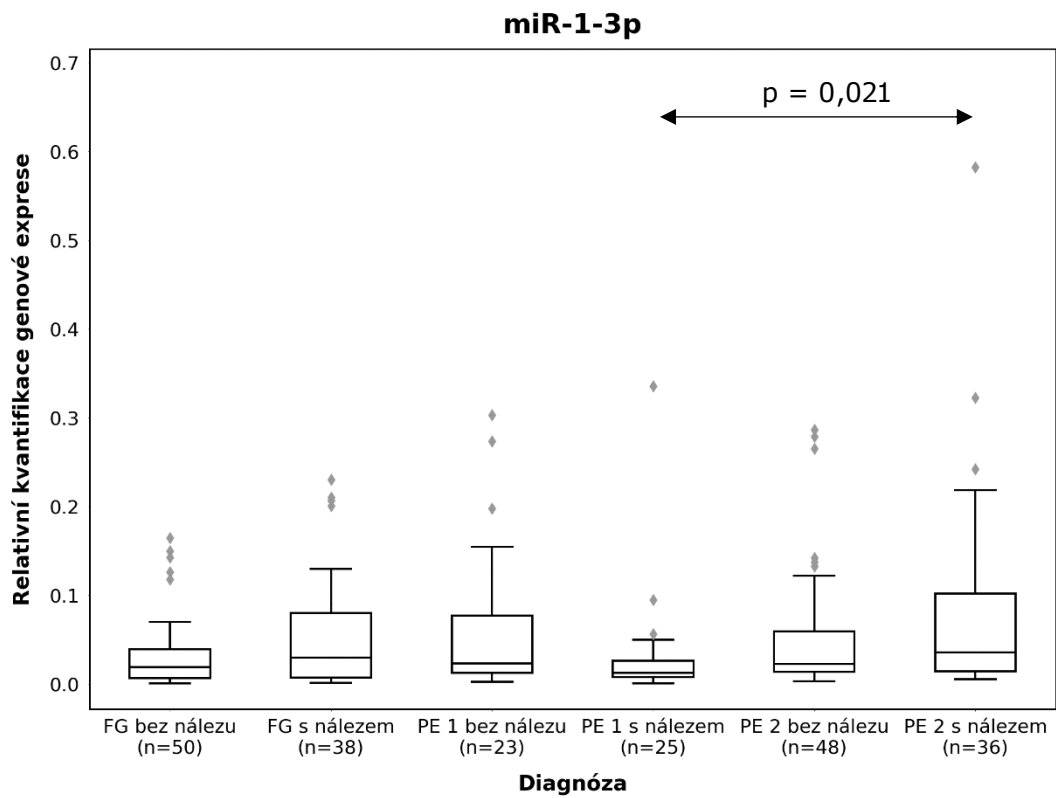
Porovnání podskupin mírné a závažné PE s FG s ohledem na nález bylo také bez signifikantních výsledků.

Další rozdělení dětí narozených z těhotenství s preeklampsii bylo dle data nástupu onemocnění (preeklampsie): na skupiny s nástupem před 34. gestačním týdnem a s nástupem ve 34. týdnu a později. V tomto případě byl přítomen jeden signifikantní výsledek u miR-103-3p mezi skupinou PE s nástupem před 34. týdnem a PE s nástupem ve 34. týdnu a později.



*Graf 23 Up-regulace miR-103-3p u skupiny PE s nástupem od 34. týdne ve srovnání se skupinou PE s nástupem před 34. týdnem*

Porovnáním podskupin dětí narozených z těhotenství s nástupem PE před 34. týdnem, s nástupem PE po 34. týdnu s podskupinami dětí narozených z fyziologických těhotenství s ohledem na nález byl nalezen jediný signifikantní výsledek u miR-1-3p mezi skupinami dětí s nálezem s nástupem PE před 34. týdnem a s nástupem PE ve 34. týdnu a později.



Graf 24 Up-regulace miR-1-3p u skupiny PE s nástupem po 34. týdnu s nálezem ve srovnání se skupinou PE s nástupem před 34. týdnem s nálezem  
 PE 1 – nástup PE před 34. týdnem, PE 2 – nástup PE ve 34. týdnu a později

## 9 DISKUZE

Z dětí ve věku mezi 3 a 11 lety byly vybrány ty, jejichž matky měly fyziologický průběh těhotenství a ty, u jejichž matek se v průběhu těhotenství vyskytla gestační hypertenze a/nebo preeklampsie a/nebo trpěly fetální růstovou restrikcí. V případě výskytu preeklampsie u matky byly děti podrobněji rozřazeny do podskupin dle gestačního stáří v době nástupu preeklampsie na časnou (před 34. gestačním týdnem) a pozdní formu (ve 34. gestačním týdnu a později), dle klinického průběhu na mírnou a závažnou formu.

Tyto děti byly pozvány a vyšetřeny: byl jim změřen a vyhodnocen krevní tlak, BMI a bylo jim provedeno kardiologické vyšetření zobrazovací metodou dopplerovské ultrasonografie (ecgokardiografické vyšetření srdce). Kardiologické ultrazvukové vyšetření vyhodnotilo anatomickou strukturu a funkci srdce, př. diagnostikovalo patologické jevy. Dle vyšetření byly všechny děti rozděleny do dvou skupin: děti bez nálezu a s nálezem. Děti, které již docházely do kardiologické poradny, byly zařazeny do skupiny dětí s nálezem.

Všem vyšetřeným dětem byl vyhodnocen expresní profil mikroRNA z plné periferní žilní krve. Vybráno bylo 29 mikroRNA, které jsou asociované s kardiovaskulárními nebo cerebrovaskulárními onemocněními. Získaná data byla nejprve porovnávána mezi základními skupinami, př. podskupinami, vytvořenými dle průběhu těhotenství, následně byly skupiny, př. podskupiny, dětí z fyziologických gravidit porovnány s dětmi z patologických dle přítomnosti vyšetřovaného nálezu (Hromadnikova et al., 2019).

Poměr dětí s přítomností nálezu ku celkovému počtu dětí byl 50,0 %. Při rozdělení na jednotlivé skupiny byly patrné rozdíly v zastoupení dětí s nálezem: u FG 43,2 %, u GH 57,4 %, u PE 47,4 % a u FGR 66,7 %. Vyšší zastoupení patologických nálezů je u GH a FGR, obecně jsou tedy děti z těchto těhotenství rizikovější skupinou pro rozvoj patologie kardiovaskulárního aparátu.

U časného nástupu PE je zastoupení patologického nálezu 53,1 %; u pozdní PE 44,0 %; u mírné PE 59,3 % a u závažné PE 44,3 %. Pozdější nástup PE má očekávatelně menší riziko vzniku patologického nálezu, dokonce srovnatelné s FG, naopak brzký nástup PE riziko zvětšuje. Překvapivě závažná forma PE s sebou nese menší zastoupení patologického nálezu u dětí než mírná forma, a to dokonce srovnatelné s FG. U časně FGR bylo 53,8 % dětí s nálezem, 71,4 % u pozdních FGR; 83,3 % u FGR bez oligohydramnia/anhydramnia a

60,0 % u FGR s oligohydraniem/anhydramniem. Překvapivě až pozdní rozvoj FGR tedy výrazně zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulární patologie oproti FG, vyšší riziko je i neočekávaně u dětí s oligohydraniem/anhydramniem. Tyto výsledky, zjm. u FGR jsou zatíženy chybou z důvodu nízkého počtu probandů.

Při porovnání hladin mikroRNA mezi dvěma skupinami: dětí s nálezem (z FG, s GH, s PE a s FGR) a dětí bez nálezu (z FG, s GH, s PE a s FGR) – tedy bez ohledu na průběh těhotenství, nebyly přítomny žádné statisticky významné rozdíly.

U dětí narozených z patologických těhotenství byly nalezeny rozdíly v expresi oproti FG, a to konkrétně mezi FG a GH byl signifikantní rozdíl u 9 z 29 miRNA: miR-1-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-181a-5p a miR-499a-5p. Vždy se jednalo o up-regulaci u GH oproti FG. Rozdílná exprese mikroRNA mezi skupinami FG – PE a FG – FGR nebyla zjištěna.

Při zohlednění přítomnosti nálezu byla mezi základními skupinami nalezena odlišná míra exprese různých miRNA mezi skupinami FG a GH. Odlišnosti mezi FG bez nálezu a GH bez nálezu a zároveň i GH s nálezem byly signifikantní u miR-1-3p a miR-17-5p. Rozdíl mezi FG bez nálezu a GH bez nálezu byl dále přítomen u miR-21-5p, miR-26a-5p a miR-133-3p; rozdíl mezi FG bez nálezu a GH s nálezem dále u miR-20a-5p, miR-29a-3p a miR-181a-5p. Mezi FG s nálezem a GH bez nálezu byla různá míra exprese u miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-199a-5p a miR-342-3p. Mezi FG s nálezem a GH s nálezem byly naměřeny odlišné hladiny u miR-20a-5p, miR-29a-3p a miR-181a-5p. Celkově se tedy dysregulace 6 miRNA opakovala mezi více skupinami, 4 miRNA se objevily výhradně mezi 2 skupinami:

	GH bez nálezu x FG bez nálezu	GH s nálezem x FG bez nálezu	GH bez nálezu x FG s nálezem	GH s nálezem x FG s nálezem
miR-1-3p	up-regulace	up-regulace	–	–
miR-17-5p	up-regulace	up-regulace	–	–
miR-20a-5p	–	up-regulace	–	up-regulace
miR-21-5p	up-regulace	–	–	–
miR-26a-5p	up-regulace	–	up-regulace	–
miR-29a-3p	–	up-regulace	up-regulace	up-regulace
miR-133a-3p	up-regulace	–	–	–
miR-181a-5p	–	up-regulace	–	up-regulace
miR-199-5p	–	–	up-regulace	–
miR-342-3p	–	–	up-regulace	–

Tabulka 8 Rozdílná míra exprese mezi skupinami FG a GH s ohledem na nález

Zohlednění nálezů při porovnání skupin FG a PE nepřineslo žádné významné rozdíly.

Mezi FG a FGR byla při zohlednění klinického vyšetření nalezena down-regulace u miR-21-5p u skupiny FGR bez nálezů oproti skupině FG s nálezem. Dále byly přítomny up-regulace miR-17-5p a miR-126-3p u skupiny FGR s nálezem oproti skupině FGR bez nálezů.

Expresí zkoumaných mikroRNA byla srovnatelná mezi skupinami FG bez nálezů a FG s nálezem.

Při dělení PE na podskupiny bez zohlednění klinického vyšetření dětí byl přítomen pouze jeden signifikantní výsledek u miR-103-3p mezi skupinou časné PE a pozdní PE. Při zohlednění klinického vyšetření byl nalezen významný výsledek u miR-1-3p mezi skupinami PE s nálezem s časným a pozdním nástupem.

Tato studie přinesla odlišné výsledky od studie expresního profilu mikroRNA v pupečnickové krvi, kde byla nalezena down-regulace miR-195-5p u těhotenství s GH, u dětí narozených z GH gravidity byla patrna ve věku 3–11 let up-regulace jiných mikroRNA. Dále byly v pupečnickové krvi nalezeny nižší hladiny miR-195-5p, miR-199a-5p a miR-221-3p u závažné formy PE a naopak vyšší hladina miR-92a-3p u mírné formy PE. U dětí s FGR byla nalezena nižší hladina miR-221-3p a miR-143-3p (Hromadníková et al.,

2017). Žádný ze zmíněných výsledků se při porovnání daných skupin neshoduje s výsledky této studie.

U studie expresního profilu mikroRNA placenty byl nalezen obdobný výsledek u miR-499a-5p, která se vyskytovala ve vyšší hladině u dětí narozených nejen z těhotenství s GH jako v této studii, ale i u dětí narozených z těhotenství s PE či FGR. Dále byla ve studii placenty pozorována zvýšená hladina miR-1-3p u PE ve 34. gestačním týdnu a pozdějším oproti fyziologickým graviditám – v této studii byl patrný rozdíl mezi dětmi s PE s nálezem s časným nástupem oproti pozdnímu nástupu, oproti fyziologickým graviditám se však statisticky signifikantní rozdíl nevyskytl. Výlučně ve studii placenty byla přítomna nižší hladina miR-26a-5p, miR-103a-3p a miR-145-5p u PE a FGR vyžadující ukončení těhotenství před 34. týdnem. Další down-regulace, př. tendence k down-regulaci, se vyskytla pouze u FGR vyžadující ukončení těhotenství před 34. týdnem u miR-16-5p, miR-100-5p, miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-143-3p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-221-3p, miR-342-3p a miR-574-3p (Hromadnikova et al., 2015).

MiR-1-3p byla ve zmíněných studiích up-regulována v placentě i pupečnickové krvi u PE a FGR s patologickým indexem pulzality v arteria umbilicalis, u plodů s centralizací oběhu, př. u pozdně se vyskytujících PE – jako příčinu předpokládají autoři rozvoj hypoxie a nedostatečnost krevního oběhu plodu plodu v pokročilém stadiu těhotenství (Hromadnikova et al., 2015; Hromadnikova et al., 2017). To by mohla být příčina i vyšších hodnot exprese miR-1-3p u dětí narozených z těhotenství s GH oproti fyziologické graviditě a u dětí narozených z těhotenství s PE s pozdním nástupem a nálezem oproti PE s časným nástupem a nálezem.

Up-regulace u dvou mikroRNA (miR-1-3p a miR-499-5p) v placentě z komplikovaných těhotenství je přítomna rovněž i v krvi dětí ve věku 3–11 let, které se narodily z těhotenství s GH a/nebo PE (Hromadnikova et al., 2015). Epigenetické změny vzniklé při těhotenství se tedy mohou přenášet i do vyššího věku dítěte a ovlivnit tak jeho vývoj, případné dysregulace námi zkoumaných mikroRNA mohou iniciovat rozvoj kardiovaskulárních/cerebrovaskulárních onemocnění (Hromadnikova et al., 2019).

Onemocnění související s kardiovaskulárním aparátem jako obezita, diabetes nebo onemocnění srdce mají komplexní původ v genetických i environmentálních faktorech. Tato fakta můžeme doplnit o průběh těhotenství: dysregulované hladiny mikroRNA mohou být způsobeny jiným množstvím/poměrem některých exprimujících buněčných populací,



např. endotelových kmenových buněk či imunitních buněk, jejichž abnormální počet je způsoben těhotenskými komplikacemi.

Z porovnání expresních profilů ostatních dysregulovaných mikroRNA placenty/pupečnickové krve ve zmíněných studiích a expresních profilů mikroRNA periferní krve odebrané postnatálně ve vyšším věku dítěte v této studii je zřejmé, že působením různých faktorů se epigenetický profil jedince mění.

Zvýšené hladiny extracelulární miR-1-3p jsou přítomny při akutním infarktu myokardu, a to již v časných stádiích, kdy je přítomna ischemie, hypoxie, otok, počíná nekróza tkáně, obdobně jako hladiny Troponinu T, který se vyskytuje při poškození srdce (Li et al., 2013a; D'Alessandra et al., 2010). Vyšší hladiny byly dále nalezeny při zranění srdce během a po jeho operaci (Zhou et al., 2013), u jedinců s ischemickou chorobou srdeční a bylo prokázáno, že zároveň tyto hladiny i u zdravých jedinců zvyšují arytmogenezi (Yang et al., 2007).

V této studii bylo nalezeno zvýšené množství miR-1-3p u dětí narozených z těhotenství s GH oproti dětem z FG – obecně tedy mohou mít děti s GH vyšší riziko vzniku zmíněných onemocnění: ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu, poruch srdečního rytmu, a je tedy vhodné do jejich života zařadit preventivní opatření, př. zpřesnit odhad rizika stanovením hladiny miR-1-3p. Při zpracování výsledků s ohledem na patologický nálezu byla signifikantně vyšší hladina miR-1-3p u dětí s GH s nálezem oproti FG bez nálezu (a zároveň u dětí narozených z těhotenství s GH bez nálezu oproti dětem z FG bez nálezu). Z tohoto hlediska je tedy vhodné dětem narozeným z těhotenství s GH zařadit preventivní program a sledování zdravotního stavu odborníkem. Vyšetření hladiny miR-1-3p by bylo přínosné obecně z hlediska vyšetření dispozic ke zvýšenému kardiovaskulárnímu riziku.

Dále byla přítomna vyšší hladina miR-1-3p u dětí narozených z těhotenství s PE s pozdním nástupem s nálezem oproti dětem s PE s časným nástupem s nálezem. Děti s pozdějším nástupem PE a již přítomným nálezem jsou díky zvýšené hladině miR-1-3p také mnohem rizikovější skupinou pro vznik kardiovaskulárních onemocnění a zařazení preventivního programu by pro ně mohlo být přínosné.

Klaster miR17-92, jehož součástí je gen pro miR-17-5p, je klíčový pro vývoj srdce a hladké svaloviny. Při diferenciaci kardiomyocytů je exprese tohoto klastru snížena. Delece toho klastru vede k defektům komorového septa neslučitelným se životem, zvýšená exprese vede k dilataci síně a snížení funkce srdce, zvyšuje arytmií, kardiomyocyty vznikají ve

větším počtu a s větší velikostí (Danielson et al., 2013). Zvýšené exprese genů tohoto klastru dále vede ke sníženému množství kostního morfogenetického proteinu typu II (BMP2), což způsobuje rozvoj plicní hypertenze (Brock et al., 2009). Up-regulace u kryš podporuje apoptózu kardiomyocytů oxidačním stresem při zraněních srdce vyvolaných ischemií nebo reperfuzí (Du et al., 2014). Up-regulace je přítomna u difuzní myokardiální fibrózy u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (Fang et al., 2015) a při akutní ischemické centrální mozkové příhodě (Wu et al., 2015). Naopak down-regulace byla přítomna při ischemické chorobě srdeční (Fichtlscherer et al., 2010).

V této studii byla pozorována up-regulace miR-17-5p u dětí narozených z těhotenství s GH oproti FG – obecně tedy mají děti s GH vyšší riziko vzniku výše zmíněných onemocnění: plicní hypertenze, dilatace síně a snížení funkce srdce, arytmie, difuzní myokardiální fibróza, akutní ischemická centrální mozková příhoda. Je tedy vhodné zařadit preventivní opatření do života těchto dětí, př. zpřesnit odhad pro tato rizika stanovením hladiny miR-17-5p v plné periferní žilní krvi. Při analýze výsledků s ohledem na patologický nález byla nalezena signifikantně vyšší hladina miR-17-5p u dětí narozených z těhotenství s GH s nálezem oproti dětem z FG bez nálezu (a zároveň u dětí narozených z těhotenství s GH bez nálezu oproti dětem z FG bez nálezu). Z tohoto hlediska je tedy vhodné dětem narozeným z těhotenství s GH zařadit preventivní program a sledovat zdravotní stav odborníkem, vyšetření hladiny miR-17-5p by bylo rovněž přínosné z hlediska nalezení dispozic ke zvýšenému kardiovaskulárnímu riziku. Později se může rovněž objevit nález u dětí, které jsou doposud bez nálezu.

Vyšetření hladiny miR-17-5p v plné periferní žilní krvi u dětí narozených z těhotenství s FGR by bylo také přínosné vzhledem k up-regulaci u dětí narozených z těhotenství s FGR s nálezem oproti dětem bez nálezu – zpřesnilo by odhad dětí, které by těžily z preventivních opatření a z odborného sledování. Rovněž děti narozené z těhotenství s FGR, které mají zvýšenou expresi miR-17-5p a jsou doposud bez nálezu, mohou profitovat z preventivních režimových opatření, neboť se u nich nález může objevit později.

Zvýšená exprese genu pro miR-20a-5p se (společně s miR-17-5p) podílí na snížení množství BMP2 vedoucí k plicní hypertenzi (Brock et al., 2009). V časném těhotenství je zvýšena hladina u matky v případě výskytu gestačního diabetu mellitu (Zhu et al., 2015). V této studii byla nalezena zvýšená hladina miR-20a-5p u dětí narozených z těhotenství s GH oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem – obecně tedy mají

děti narozené z těhotenství s GH vyšší riziko vzniku plicní hypertenze a je tedy vhodné zařadit preventivní opatření do jejich života, př. zpřesnit odhad pro tato rizika stanovením hladiny miR-20a-5p v plné periferní žilní krvi. Dále jsme našli zvýšenou hladinu miR-20a-5p u dětí narozených z těhotenství s GH s nálezem oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem bez nálezu a zároveň i oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem s nálezem – zvýšená hladina miR-20a-5p je tedy spjatá jak s výskytem těhotenské komplikace (gestační hypertenze), tak s nálezem (vysokým BMI, krevním tlakem či patologiemi srdce) a z tohoto hlediska stanovení hladiny miR-20a-5p v plné periferní žilní krvi má klinický přínos.

Up-regulace miR-21-5p je přítomna u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, kteří trpí difuzní myokardiální fibrózou (Fang et al., 2015). Exprese miR-21 je vyšší ve fibroblastech srdce než v kardiomyocytech, vyšší hladina je přítomna ve fibroblastech selhávajícího srdce, způsobuje hypertrofii srdce a intersticiální fibrózu. Inhibice miR-21 vedla ke zmírnění srdeční fibrózy a ke zmenšení srdce (Thum et al., 2008; Dong et al., 2014). V plazmě byla nalezena nižší hladina miR-21 u probandu s diabetem mellitem (Zampetaki et al., 2010). Vyšší hladinu miR-21-5p jsme našli u dětí narozených z těhotenství s GH bez nálezu oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem bez nálezu – skupina dětí s GH bez nálezu má tak zvýšené riziko hypertrofie srdce a intersticiální fibrózy. Vyšší hladina miR-21-5p byla přítomna i u skupiny dětí narozených z těhotenství s fyziologickým průběhem s nálezem oproti skupině dětí narozených z těhotenství s FGR bez nálezu – zde by tedy vyšší hladina miR-21-5p mohla být následkem již přítomného patologického nálezu.

MiR-26a-5p reguluje autofagii v srdečních fibroblastech: nadměrná exprese vede ke snížení tvorby autofagosomových membrán, a tím ke snížení autofagie ve fibroblastech. Autofagie díky odstraňování poškozených proteinů plní ochrannou funkci srdce – zabraňuje srdeční hypertrofii a selhání srdce (Zheng et al., 2018). Při pokusu na myších, kde byla provedena transversální konstrikce aorty vedoucí k uměle vytvořené hypertrofii srdce, vznikla po 14 dnech od provedení zákroku down-regulace miR-26a (Sayed et al., 2007) – mohlo by se tedy jednat o reakci na hypertrofii srdce. U pacientů s akutním infarktem myokardu byla přítomna také nižší hladina, která se tedy naopak pojí s patologickým stavem (Hsu et al., 2014).

Naše data odhalila zvýšenou hladinu miR-26a-5p u dětí narozených z těhotenství s GH oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem – obecně tedy mají děti narozené z těhotenství s GH vyšší pravděpodobnost snížení ochranného procesu autofagie a může se u nich rozvinout hypertrofie a selhání srdce. Je tedy vhodné zařadit preventivní opatření do jejich života, př. zpřesnit odhad pro tato rizika stanovením hladiny miR-26-5p v plné periferní žilní krvi. Dále měly v našem výzkumu vyšší hladinu miR-26-5p děti narozené z těhotenství s GH bez nálezu oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem bez nálezu i s nálezem – mohlo by se tedy jednat o kompenzační mechanismus dítěte jako je reakce na zvýšené riziko rozvoje kardiovaskulárního onemocnění na základě přítomnosti GH v těhotenství matky.

Up-regulace miR-29a-3p je přítomna u difuzní myokardiální fibrózy u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (Fang et al., 2015). Zvýšení exprese zástupců rodiny miR-29 vede ke ztrátě extracelulární matrix aorty, díky které vznikají aneurysmata (Boon et al., 2011). miR-29 reguluje srdeční fibrózu, vyšší exprese snižuje tvorbu kolagenu ve fibroblastech (van Rooij et al., 2008). Při pokusu na myších, kde byla provedena transverzální konstrikce aorty vedoucí k uměle vytvořené hypertrofii srdce, vznikla po 14 dnech od provedení zákroku down-regulace miR-26a (Sayed et al., 2007).

V naší studii byla zjištěna signifikantně vyšší hladina miR-29a-3p u dětí narozených z těhotenství s GH oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem – obecně tedy mají děti s GH vyšší riziko vzniku myokardiální fibrózy, aneurysmat a je tedy vhodné zařadit preventivní opatření do jejich života, př. zpřesnit odhad pro tato rizika stanovením hladiny miR-29a-3p v plné periferní žilní krvi. Děti narozené z těhotenství s GH s nálezem i bez nálezu mají vyšší hladinu než děti z FG s nálezem, zároveň má vyšší hladinu i skupina dětí narozených z těhotenství s GH s nálezem oproti dětem z FG bez nálezu. Předpokládá se tedy zvýšení hladiny miR-29a-3p vlivem patologie těhotenství nehledě na stávající nález.

miR-103-3p je exprimována ve vyšší míře v zónách srdce, kde je přítomna ischemie, vyšší hladiny v plazmě se vyskytují u jedinců s vysokým krevním tlakem nebo akutním infarktem myokardu (Huang et al., 2016). Potlačení miR-103-3p vedlo k redukci nekrózy a infarktu myokardu (Wang et al., 2015). Nadměrná exprese miR-103 je přítomna u obézních myší a inhibice této mikroRNA vede ke zlepšení glukózové homeostázy a senzitivity k inzulínu (Trajkovski et al., 2011).

Tato studie našla vyšší hladinu miR-103-3p u dětí narozených z těhotenství s PE s pozdním nástupem oproti dětem narozeným z těhotenství s PE s časným nástupem. U dětí narozených z těhotenství s pozdějším nástupem PE je tedy překvapivě vyšší riziko vzniku zvýšeného krevního tlaku, ischemie srdce, akutního infarktu myokardu, obezity a snížené senzitivity k inzulínu oproti dětem narozeným z těhotenství s PE s časným nástupem. Pro tuto skupinu dětí je tedy žádoucí zařazení preventivního programu.

MiR-126-3p tvořená endotelem cév řídí angiogenezi – má proangiogenní účinek. Cílená delece miR-126 u myši způsobila krvácení a částečnou embryonální letalitu v důsledku ztráty vaskulární integrity a defektů v proliferaci, migraci a angiogenezi endoteliálních buněk (Wang et al., 2008). Snížení hladiny miR-126-3p podporuje vznik vaskulárního zánětu (Harris et al., 2008) a diabetu mellitu 2. typu – v tomto případě byly snížené hladiny miR-126-3p přítomny již před projevem onemocnění (Zampetaki et al., 2010; Olivieri et al., 2015). Dále byla nižší hladina miR-126-3p zjištěna u pacientů s akutním infarktem myokardu (Hsu et al., 2014). miR-126 má zásadní roli v redukcii tvorby neointimy cév a snížení proliferace cévní hladké svaloviny zprostředkované endoteliálními mikropartikulami, vysokou expresí miR-126 disponují koronární cévy při ischemické chorobě srdeční (Jansen et al., 2017).

V této studii se vyskytla up-regulace miR-126a-3p u dětí narozených z těhotenství s GH oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem – obecně tedy mají děti narozené z těhotenství s GH vyšší riziko vzniku poškození cévní stěny a s tím související ischemické choroby srdeční. Je proto vhodné dětem narozeným z těhotenství s GH v těhotenství zařadit preventivní opatření do jejich života, př. zpřesnit odhad pro tato rizika stanovením hladiny miR-126-3p v plné periferní žilní krvi. Dále tato studie prokázala zvýšené hladiny miR-126-3p u skupiny dětí narozených z těhotenství s FGR s nálezem oproti skupině dětí narozených z těhotenství s FGR bez nálezu – tato mikroRNA se může tedy podílet na vzniku patologického nálezu u dětí narozených z těhotenství s FGR. Umělé snížení její hladiny u rizikových dětí by mohlo zabránit rozvoji klinických patologií kardiovaskulárního aparátu.

Zvýšené hladiny extracelulární miR-133a-3p (společně s miR-1-3p a miR-499a-5p) jsou přítomny při akutním infarktu myokardu, a to již v časných stádiích, kdy je přítomna ischemie, hypoxie, otok, počíná nekróza tkáně, obdobně jako hladiny Troponinu T, který se vyskytuje při poškození srdce (Li et al., 2013a; D'Alessandra et al., 2010). Zvýšená hladina

miR-133a-3p byla přítomna u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (Fichtlscherer et al., 2010). Up-regulace miR-133a-3p je přítomna u difuzní myokardiální fibrózy u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (Fang et al., 2015). Snížená hladina miR-133 se vyskytuje u jedinců s hypertrofií kardiomyocytů, naopak nadměrná exprese miR-133 potlačuje vznik srdeční hypertrofie (Carè et al., 2007).

Podle tohoto výzkumu je hladina miR-133a-3p zvýšena u dětí narozených z těhotenství s GH oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem – obecně tedy mají děti narozené z těhotenství s GH vyšší riziko vzniku ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu, fibrózy a je tedy vhodné zařadit preventivní opatření do jejich života, př. zpřesnit odhad pro tato rizika stanovením hladiny miR-133a-3p v plné periferní žilní krvi. Vyšší hladinu miR-133a-3p jsme našli u dětí narozených z těhotenství s GH bez nálezu oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem bez nálezu – vyšší exprese miR-133a-3p se může podílet na udržení fyziologického nálezu, obdobně jako působí protektivně před vznikem srdeční hypertrofie.

miR-181a-5p byla ve vyšší hladině přítomna u jedinců s defektem komorového septa (Li et al., 2013b), s ischemickou cévní mozkovou příhodou, s přechodnou ischemií mozku a s akutním infarktem myokardu (Wu et al., 2017; Zhu et al., 2016). Rodina miR-181 má protizánětlivý účinek –inhibuje tedy chronický i akutní kardiovaskulární zánět, jako např. aterosklerózu, diabetes mellitus 2. typu a obezitu (Sun et al., 2014). Naopak nižší hladiny miR-181a-5p jsou přítomny při hypertrofii srdce, jehož kardiomyocyty mají zmenšenou velikost (van Rooij et al., 2006).

Naše data odhalila zvýšenou hladinu miR-181a-5p u dětí narozených z těhotenství s GH oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem – obecně tedy mají děti narozené z těhotenství s GH vyšší riziko vzniku ischemické choroby srdeční, př. přechodné ischemie mozku, akutního infarktu myokardu a je tedy vhodné zařadit preventivní opatření do jejich života, př. zpřesnit odhad pro tato rizika stanovením hladiny miR-181a-5p v plné periferní žilní krvi. Dále byla vyšší hladina miR-181a-5p přítomna u dětí narozených z těhotenství s GH s nálezem oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem bez nálezu i s nálezem – na námi vyšetřovaný patologický nálezu tedy hladina miR-181a-5p neměla vliv, ale měla na ni vliv těhotenská komplikace matky (GH).

Zvýšená exprese miR-199a-5p se objevuje při hypertrofii a selhání srdce, jehož kardiomyocyty mají významné morfologické změny (van Rooij et al., 2006). Dále byla

vyšší hladina miR-199a-5p přítomna 7–14 dní po zákroku na myších, kdy byla provedena transverzální konstriktce aorty vedoucí k uměle vytvořené hypertrofii srdce (Sayed et al., 2007). V tomto výzkumu měly up-regulaci děti narozené z těhotenství s GH bez nálezu oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem s nálezem, na postnatální aberantní expresní profil miR-199a-5p má tedy vliv těhotenstvá komplikace matky (GH).

Nadměrná exprese miR-342-3p vede k diferenciaci adipocytů z lidských mezenchymálních kmenových buněk a naopak down-regulace miR-342-3p adipogenezi blokuje (Wang et al., 2015). Nižší hladiny miR-342-3p v plazmě jsou přítomny při dysfunkci endotelu, které je časným rizikovým faktorem pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění (Khalyfa et al., 2016). U jedinců s diabetem mellitem 1. typu, 2. typu i gestačního typu je zvýšená hladina miR-342-3p přítomna v mononukleárních buňkách periferní krve (Collares et al., 2013). Down-regulace miR-342 se vyskytuje u jedinců s ischemickou chorobou srdeční (Weber et al., 2011) a při selhání srdce (Ellis et al., 2013). V této studii byla nalezena vyšší hladina miR-342-3p u dětí narozených z těhotenství s GH bez nálezu oproti skupině dětí narozených z těhotenství s fyziologickým průběhem s nálezem – neprokázali jsme tedy přímou souvislost mezi zvýšenou expresí miR-342-3p a výskytem kardiovaskulární patologie u dětí, ale vztah mezi zvýšenou postnatální expresí miR-342-3p a předchozím výskytem těhotenské komplikace u matky (GH).

Zvýšené hladiny extracelulární miR-499a-5p (společně s miR-1-3p a miR-133a-3p) jsou přítomny při akutním infarktu myokardu, a to již v časných stadiích, kdy je přítomna ischemie, hypoxie, otok, počíná nekróza tkáně, obdobně jako hladiny Troponinu T, který se vyskytuje při poškození srdce (Li et al., 2013a; Adachi et al., 2010). Dále je vyšší hladina miR-499a-5p přítomna při akutní virové myokarditidě a při akutním selhání srdce (Corsten et al., 2010). Při našem výzkumu byla hladina miR-499a-5p up-regulována u dětí narozených z těhotenství s GH oproti dětem narozeným z těhotenství s fyziologickým průběhem – obecně tedy mají děti narozené z těhotenství s GH vyšší riziko vzniku výše zmíněných onemocnění: akutního infarktu myokardu, akutního selhání srdce, a je tedy vhodné zařadit preventivní opatření do jejich života, př. zpřesnit odhad pro tato rizika stanovením hladiny miR-499a-5p v plné periferní žilní krvi.

Potenciálním rizikovým/ochranným vlastnostem konkrétních mikroRNA z této studie je nutné ještě věnovat podrobnější výzkum pro potvrzení a objasnění mechanismu účinku a využití skríninku mikroRNA v rámci prevence kardiovaskulárních onemocnění. Výsledky

této studie mohou být zkreslené zejm. u dětí narozených z těhotenství s FGR, z důvodu menšího množství dětí zařazených do studie.



## 10 ZÁVĚR

V rámci této studie byl zhodnocen postnatální expresní profil 29 kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních mikroRNA v plné periferní žilní krvi u dětí ve věku 3–11 let, rozdělených do skupin podle průběhu těhotenství matky a postnatálního kardiologického nálezu při vyšetření lékařem.

Tato práce odhalila mikroRNA, které jsou dysregulovány mezi různými skupinami dětí, které se narodily z patologického průběhu těhotenství: v případě dětí narozených z těhotenství s GH se jedná o dysregulaci miR-1-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-181a-5p, miR-199a-5p, miR-342-3p a miR-499a-5p; v případě dětí narozených z těhotenství s PE se jedná o dysregulaci miR-1-3p a miR-103-3p; v případě dětí narozených z těhotenství s FGR se jedná o dysregulaci miR-17-5p, miR-21-5p a miR-126-3p.

Potvrdila se nám tak hypotéza statisticky signifikantních rozdílů mezi jednotlivými skupinami. Získané výsledky mají potenciální využití pro vytypování rizikových skupin dětí narozených z patologické gravidity se sklonem ke kardiovaskulárním nebo cerebrovaskulárním onemocněním a dále pro zavedení skríninku za účelem odhadnutí rizika vzniku kardiovaskulárního onemocnění na základě abnormální exprese mikroRNA specifické pro patologický nálezný v tomto výzkumu. Pro rizikové skupiny dětí by bylo přínosné zavedení preventivních opatření v podobě úpravy životního stylu a pravidelných kontrol odborným lékařem.

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BMI	body mass index
BMP2	kostní morfogenetický protein typu II (bone morphogenetic protein receptor type II)
CNS	centrální nervová soustava
FG	fyziologická gravidita
FGR	fetální růstová retardace (fetal growth restriction)
GH	gestační hypertenze
LDL	low-density lipoprotein
miRNA	mikroRNA
PE	preeklampsie

## 12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ACOG Committee on Obstetric Practice. 2002. Practice bulletin #33: diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstetrics & Gynecology* [Internet] 99:159-167. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0029784401017471>

Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. 2010. Plasma MicroRNA 499 as a Biomarker of Acute Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry* [Internet] 56:1183-1185. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/56/7/1183/5622365>

Alsnes IV, Vatten LJ, Fraser A, Bjørngaard JH, Rich-Edwards J, Romundstad PR, Åsvold BO. 2017. Hypertension in Pregnancy and Offspring Cardiovascular Risk in Young Adulthood. *Hypertension* [Internet] 69:591-598. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08414>

Anon. 2018. About Child & Teen BMI. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Available from: [https://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens\\_bmi/about\\_childrens\\_bmi.html](https://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens_bmi/about_childrens_bmi.html)

Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T. 2003. The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Developmental Cell* [Internet] 5:337-350. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580703002284>

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* [Internet] 116:281-297. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404000455>

Berezikov E, Chung W-J, Willis J, Cuppen E, Lai EC. 2007. Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell* [Internet] 28:328-336. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276507006697>

Berkley E, Chauhan SP, Abuhamad A. 2012. Doppler assessment of the fetus with intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [Internet] 206:300-308. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937812000518>

Bernardo BC, Ooi JYY, Lin RCY, McMullen JR. 2015. MiRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart. *Future Medicinal Chemistry* [Internet] 7:1771-1792. Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.15.107>

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* [Internet] 409:363-366. Available from: <http://www.nature.com/articles/35053110>

Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. 2009. MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of Ischemic Tissues in Mice. *Science* [Internet] 324:1710-1713. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1174381>

Boon RA, Seeger T, Heydt S, Fischer A, Hergenreider E, Horrevoets AJG, Vinciguerra M, Rosenthal N, Sciacca S, Pilato M, van Heijningen P, Essers J, Brandes RP, Zeiher AM, Dimmeler S. 2011. MicroRNA-29 in Aortic Dilatation: Implications for Aneurysm Formation. *Circulation Research* [Internet] 109:1115-1119. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.111.255737>

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* volume [Internet] 13:1097-1101. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb1167>

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2003. Bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* [Internet] 113:25-36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403002319>

Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Fischler M, Ulrich S, Speich R, Huber LC. 2009. Interleukin-6 Modulates the Expression of the Bone Morphogenic Protein Receptor Type II Through a Novel STAT3–microRNA Cluster 17/92 Pathway. *Circulation Research* [Internet] 104:1184-1191. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.109.197491>

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* [Internet] 10:1957-1966. Available from: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.7135204>

Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang M-L, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MVG, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW, Ellingsen Ø, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. 2007. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Medicine* [Internet] 13:613-618. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1582>

Carrera JM, Devesa R, Serra B. 1998. Fetal growth characteristics. In: *Textbook of perinatal medicine: a comprehensive guide to modern clinical perinatology*. New York: Parthenon Pub. Group. p 1129-1139.

Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* [Internet] 136:642-655. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740900083X>

Collares CVA, Evangelista AF, Xavier DJ, Rassi DM, Arns T, Foss-Freitas MC, Foss MC, Puthier D, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Donadi EA. 2013. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC Research Notes* [Internet] 6. Available from: <http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-6-491>

Conde-Agudelo A, Belizan JM. 2000. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* [Internet] 107:75-83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0528.2000.tb11582.x>

Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. 2010. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics* [Internet] 3:499-506. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCGENETICS.110.957415>

Cunningham SA, Kramer MR, Narayan KMV. 2014. Incidence of Childhood Obesity in the United States. *New England Journal of Medicine* [Internet] 370:403-411. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoal309753>

D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggiolini S, Marenzi G, Pompilio G, Capogrossi MC. 2010. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal* [Internet] 31:2765-2773. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehq167>

Dangwal S, Bang C, Thum T. 2012. Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research. *Cardiovascular Research* [Internet] 93:545-554. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvr297>

Danielson LS, Park DS, Rotllan N, Chamorro-Jorganes A, Guijarro MV, Fernandez-Hernando C, Fishman GI, Phoon CKL, Hernando E. 2013. Cardiovascular dysregulation of miR-17-92 causes a lethal hypertrophic cardiomyopathy and arrhythmogenesis. *The FASEB Journal* [Internet] 27:1460-1467. Available from: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.12-221994>

Davis EF, Lazdam M, Lewandowski AJ, Worton SA, Kelly B, Kenworthy Y, Adwani S, Wilkinson AR, McCormick K, Sargent I, Redman C, Leeson P. 2012. Cardiovascular Risk Factors in Children and Young Adults Born to Preeclamptic Pregnancies: A Systematic Review. *Pediatrics* [Internet] 129:e1552-e1561. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2011-3093>

Dekker GA, Sibai BM. 1998. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [Internet] 179:1359-1375. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937898701607>

Dekker GA. 1999. Risk Factors for Preeclampsia. *Clinical Obstetrics and Gynecology* [Internet] 42:422. Available from: [https://journals.lww.com/clinicalobgyn/Fulltext/1999/09000/Risk\\_Factors\\_for\\_Preeclampsia.2.aspx#](https://journals.lww.com/clinicalobgyn/Fulltext/1999/09000/Risk_Factors_for_Preeclampsia.2.aspx#)

Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, Lynch JM, Hullinger TG, Seto AG, van Rooij E. 2013. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *European Journal of Heart Failure* [Internet] 15:650-659. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1093/eurjhf/hft018>

Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, Hofmann W-K, Zeiher AM, Dimmeler S. 2010. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* [Internet] 115:4944-4950. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/115/23/4944/27835/Members-of-the-microRNA1792-cluster-exhibit-a>

Dong S, Ma W, Hao B, Hu F, Yan L L, Yan X, Wang Y, Chen Z, Wang Z. 2014. MicroRNA-21 promotes cardiac fibrosis and development of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction by up-regulating Bcl-2. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet] 7:565-574. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551276>

Du W, Pan Z, Chen X, Wang L, Zhang Y, Li S, Liang H, Xu C, Zhang Y, Wu Y, Shan H, Lu Y. 2014. By Targeting Stat3 microRNA-17-5p Promotes Cardiomyocyte Apoptosis in Response to Ischemia Followed by Reperfusion. *Cellular Physiology and Biochemistry* [Internet] 34:955-965. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/366312>

Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. 2013. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *European Journal of Heart Failure* [Internet] 15:1138-1147. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1093/eurjhf/hft078>

Fabry IG, Richart T, Cheng X, Van Bortel LM, Staessen JA. 2014. Diagnosis and treatment of hypertensive disorders during pregnancy. *Acta Clinica Belgica* [Internet] 65:229-236. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/acb.2010.050>

Falkner B, Gidding SS, Ramirez-Garnica G, Wiltrout SA, West D, Rappaport EB. 2006. The relationship of body mass index and blood pressure in primary care pediatric patients. *The Journal of Pediatrics* [Internet] 148:195-200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347605010024>

Fang L, Ellims AH, Moore X-I, White DA, Taylor AJ, Chin-Dusting J, Dart AM. 2015. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Translational Medicine* [Internet] 13. Available from: <http://www.translational-medicine.com/content/13/1/314>

Ferrazzani S, De Carolis S, Pomini F, Testa AC. 1994. The duration of hypertension in the puerperium of preeclamptic women: Relationship with renal impairment and week of

delivery. American Journal of Obstetrics and Gynecology [Internet] 171:506-512. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002937894902909>

Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. 2010. Circulating MicroRNAs in Patients With Coronary Artery Disease. Circulation Research [Internet] 107:677-684. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.109.215566>

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nature Reviews Genetics [Internet] 9:102-114. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrg2290>

Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM, Blowey D, Carroll AE, Daniels SR, de Ferranti SD, Dionne JM, Falkner B, Flinn SK, Gidding SS, Goodwin C, Leu MG, Powers ME, Rea C, Samuels J, Simasek M, Thaker VV, Urbina EM. 2017. Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. Pediatrics [Internet] 140:e20171904. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/lookup/doi/10.1542/peds.2017-1904>

Fraser A, Nelson SM, Macdonald-Wallis C, Sattar N, Lawlor DA. 2013. Hypertensive Disorders of Pregnancy and Cardiometabolic Health in Adolescent Offspring. Hypertension [Internet] 62:614-620. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01513>

Freedman DS, Mei Z, Srinivasan SR, Berenson GS, Dietz WH. 2007. Cardiovascular Risk Factors and Excess Adiposity Among Overweight Children and Adolescents: The Bogalusa Heart Study. The Journal of Pediatrics [Internet] 150:12-17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347606008171>

Gara E, Lainscak M. 2019. Genes, Cells, and MiRNAs. International Cardiovascular Forum Journal [Internet] 18:19-22. Available from: <http://icfjournal.org/index.php/icfj/article/view/617>

Gicquel C, Le Bouc Y. 2006. Hormonal Regulation of Fetal Growth. Hormone Research in Paediatrics [Internet] 65:28-33. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/91503>



Gifford RW, August PA, Cunningham G, Green LA, Lindheimer MD, McNellis D, Roberts JM, Sibai BM, Taler SJ. 2000. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [Internet] 183:1-22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937800408203>

Gottdiener JS, Bednarz J, Devereux R, Gardin J, Klein A, Manning WJ, Morehead A, Kitzman D, Oh J, Quinones M, Schiller NB, Stein JH, Weissman NJ. 2004. American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials: A report from the american society of echocardiography's guidelines and standards committee and the task force on echocardiography in clinical trials. *Journal of the American Society of Echocardiography* [Internet] 17:1086-1119. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0894731704006753>

Gregory RI, Yan K-ping, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* [Internet] 432:235-240. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature03120>

Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Evers S, Macara IG, Dargemont C. 2004. Minihelix-containing RNAs Mediate Exportin-5-dependent Nuclear Export of the Double-stranded RNA-binding Protein ILF3. *Journal of Biological Chemistry* [Internet] 279:884-891. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M306808200>

Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. 1985. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [Internet] 151. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002937885902984>

Hájek Z. 2004. Intrauterinní růstová retardace plodu (IUGR). In: Rizikové a patologické těhotenství. Praha: Grada. p 69-79

Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, Kim VN. 2006. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* [Internet] 125:887-901. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406005162>

Han JC, Lawlor DA, Kimm SYS. 2010. Childhood obesity. *The Lancet* [Internet] 375:1737-1748. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610601717>

Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet] 105:1516-1521. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707493105>

Hromadnikova I, Kotlabova K, Dvorakova L, Krofta L. 2019. Postnatal Expression Profile of microRNAs Associated with Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases in Children at the Age of 3 to 11 Years in Relation to Previous Occurrence of Pregnancy-Related Complications. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet] 20. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/3/654>

Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, Krofta L, Jeyaseelan K. 2015. Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Associated microRNAs Are Dysregulated in Placental Tissues Affected with Gestational Hypertension, Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *PLOS ONE* [Internet] 10. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0138383>

Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, Vedmetzkaya Y, Krofta L. 2017. 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* [Internet] 249:402-409. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527317326864>

Hsu A, Chen S-J, Chang Y-S, Chen H-C, Chu P-H. 2014. Systemic Approach to Identify Serum microRNAs as Potential Biomarkers for Acute Myocardial Infarction. *BioMed Research International* [Internet]:1-13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/418628/>

Huang L, Li L, Chen X, Zhang H, Shi Z. 2016. MiR-103a targeting Piezo1 is involved in acute myocardial infarction through regulating endothelium function. *Cardiology Journal* [Internet] 23:556-562. Available from: [https://journals.viamedica.pl/cardiology\\_journal/article/view/45269](https://journals.viamedica.pl/cardiology_journal/article/view/45269)

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint É, Tuschl T, Zamore PD. 2001. A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science* [Internet] 293:834-838. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1062961>

Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LOF, Sandhu D, Fernández-Hernando C, Suárez Y. 2011. MicroRNA-16 and MicroRNA-424 Regulate Cell-Autonomous Angiogenic Functions in Endothelial Cells via Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 and Fibroblast Growth Factor Receptor-1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [Internet] 31:2595-2606. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.111.236521>

Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. 2004. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science* [Internet] 303:83-86. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1091903>

Jansen F, Stumpf T, Proebsting S, Franklin BS, Wenzel D, Pfeifer P, Flender A, Schmitz T, Yang X, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. 2017. Intercellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [Internet] 104:43-52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282816304473>

Kapur G, Ahmed M, Pan C, Mitsnefes M, Chiang M, Mattoo TK. 2010. Secondary Hypertension in Overweight and Stage 1 Hypertensive Children: A Midwest Pediatric Nephrology Consortium Report. *The Journal of Clinical Hypertension* [Internet] 12:34-39. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-7176.2009.00195.x>

Kawamata T, Tomari Y. 2010. Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences* [Internet] 35:368-376. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000410000630>

Kelsey MM, Zaepfel A, Bjornstad P, Nadeau KJ. 2014. Age-Related Consequences of Childhood Obesity. *Gerontology* [Internet] 60:222-228. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/356023>

Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Dev* [Internet] 15:2654-2659. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.927801>

Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Bhattacharjee R, Khalyfa AA, Gozal D. 2016. Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of Endothelial Dysfunction in Obese

Children. Chest [Internet] 149:786-800. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369215001324>

Khoury MJ, Erickson JD, Cordero JF, McCarthy BJ. 1988. Congenital Malformations and Intrauterine Growth Retardation: A Population Study. Pediatrics [Internet] 82:83-90. Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/82/1/83.long>

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. 2003. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. Cell [Internet] 115:209-216. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403008018>

Kloosterman WP, Plasterk RHA. 2006. The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. Developmental Cell [Internet] 11:441-450. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580706004023>

Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. Nature [Internet] 438:685-689. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature04303>

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. Science [Internet] 294:853-858. Available from:  
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1064921>

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. 2003. New microRNAs from mouse and human. RNA [Internet] 9:175-179. Available from:  
<http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.2146903>

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. 2002. Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. Current Biology [Internet] 12:735-739. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982202008096>

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. 2001. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. Science [Internet] 294:858-862. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1065062>

Lee RC, Ambros V. 2001. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. Science [Internet] 294:862-864. Available from:  
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1065329>

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* [Internet] 75:843-854. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749390529Y>

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* [Internet] 425:415-419. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature01957>

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* [Internet] 23:4051-4060. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600385>

Li J, Cao Y, Ma X-jing, Wang H-jun, Zhang J, Luo X, Chen W, Wu Y, Meng Y, Zhang J, Yuan Y, Ma D, Huang G-ying. 2013b. Roles of miR-1-1 and miR-181c in ventricular septal defects. *International Journal of Cardiology* [Internet] 168:1441-1446. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527312016774>

Li S-H, Chen L, Pang X-M, Su S-Y, Zhou X, Chen C-Y, Huang L-G, Li J-P, Liu J-L. 2017. Decreased miR-146a expression in acute ischemic stroke directly targets the *Fbx110* mRNA and is involved in modulating apoptosis. *Neurochemistry International* [Internet] 107:156-167. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018616304363>

Li YQ, Zhang MF, Wen HY, Hu CL, Liu R, Wei HY, Ai CM, Wang G, Liao XX, Li X. 2013a. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clinics* [Internet] 68:75-80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552456/?report=classic>

Libby G, Murphy DJ, McEwan NF, Greene SA, Forsyth JS, Chien PW, Morris AD. 2007. Pre-eclampsia and the later development of type 2 diabetes in mothers and their children: an intergenerational study from the Walker cohort. *Diabetologia* [Internet] 50:523-530. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-006-0558-z>

Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB. 2003. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development* [Internet] 17:991-1008. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1074403>

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* [Internet] 25:402-408. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>

Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC. 2002. Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *The Plant Cell* [Internet] 14:1605-1619. Available from: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.003210>

Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D, Mozaffarian D, Appel LJ, Van Horn L, Greenlund K, Daniels S, Nichol G, Tomaselli GF, Arnett DK, Fonarow GC, Ho PM, Lauer MS, Masoudi FA, Robertson RM, Roger V, Schwamm LH, Sorlie P, Yancy CW, Rosamond WD. 2010. Defining and Setting National Goals for Cardiovascular Health Promotion and Disease Reduction. *Circulation* [Internet] 121:586-613. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192703>

Love EJ, Kinch RAH. 1965. Factors influencing the birth weight in normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [Internet] 91:342-349. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002937865902486>

Luma GB, Spiotta RT. 2006. Hypertension in Children and Adolescents. *American Family Physician* [Internet] 73:1558-1568. Available from: <https://www.aafp.org/afp/2006/0501/p1558.html>

Magpie Trial Collaborative Group. 2002. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* [Internet] 359:1877-1890. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673602087780>

Martin JN, Morris RF. 2019. Preeclampsia-Spectrum Hypertensive Disorders of Pregnancy: Gestational Hypertension, Preeclampsia, Eclampsia, Chronic Hypertension, and HELLP Syndrome. In: Sex differences in cardiovascular physiology and pathophysiology. Academic Press. p 121-136. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128131978000087>

Mayer C, Joseph KS. 2013. Fetal growth: a review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. [Internet] 41:136-145. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.11204>

Morrison KM, Shin S, Tarnopolsky M, Taylor VH. 2015. Association of depression & health related quality of life with body composition in children and youth with obesity.

Journal of Affective Disorders [Internet] 172:18-23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165032714005680>

National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. 2004. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. Pediatrics [Internet] 114:555-576. Available from: [https://pediatrics.aappublications.org/content/114/Supplement\\_2/555](https://pediatrics.aappublications.org/content/114/Supplement_2/555)

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM. 2007. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in Drosophila. Cell [Internet] 130:89-100. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407007957>

Olivieri F, Spazzafumo L, Bonafè M, Recchioni R, Prattichizzo F, Marcheselli F, Micolucci L, Mensà E, Giuliani A, Santini G, Gobbi M, Lazzarini R, Boemi M, Testa R, Antonicelli R, Procopio AD, Bonfigli AR. 2015. MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications. Oncotarget [Internet] 6:35372-35382. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/6164>

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature [Internet] 408:86-89. Available from: <http://www.nature.com/articles/35040556>

Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G. 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. Blood [Internet] 108:3068-3071. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/108/9/3068/22583/MicroRNAs-modulate-the-angiogenic-properties-of>

Pratt AJ, MacRae IJ. 2009. The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. Journal of Biological Chemistry [Internet] 284:17897-17901. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R900012200>

Raitoharju E, Lyytikäinen L-P, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T, Kähönen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Lehtimäki T. 2011. MiR-21, miR-210, miR-

34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* [Internet] 219:211-217. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915011006411>

Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin J-P, Fischer M-C, Jost B, Dembele D, Gourdon G, Nicole A, Duboc D, Wahbi K, Day JW, Fujimura H, Takahashi MP, Auboeuf D, Dreumont N, Furling D, Charlet-Berguerand N. 2011. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. [Internet] 18:840-845. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb.2067>

Raynor BD, Richards D. 1997. Growth retardation in fetuses with gastroschisis. *Journal of Ultrasound in Medicine* [Internet] 16:13-16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.7863/jum.1997.16.1.13>

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* [Internet] 403:901-906. Available from: <http://www.nature.com/articles/35002607>

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes & Development* [Internet] 16:1616-1626. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1004402>

Reuter A, Sckell A, Brandenburg L-O, Burchardt M, Kramer A, Stope MB. 2018. Overexpression of MicroRNA-1 in Prostate Cancer Cells Modulates the Blood Vessel System of an In Vivo Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane Model. *In Vivo* [Internet] 33:41-46. Available from: <http://iv.iijournals.org/lookup/doi/10.21873/invivo.11436>

Riley M, Hernandez AK, Kuznia AL. 2018. High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Am Fam Physician* [Internet] 98:486-494. Available from: <https://www.aafp.org/afp/2018/1015/p486.html>

Roberts JM, Cooper DW. 2001. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *The Lancet* [Internet] 357:53-56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600035777>

Rodosthenous RS, Burris HH, Sanders AP, Just AC, Dereix AE, Svensson K, Solano M, Téllez-Rojo MM, Wright RO, Baccarelli AA. 2017. Second trimester extracellular microRNAs in maternal blood and fetal growth: An exploratory study. *Epigenetics*



[Internet] 12:804-810. Available from:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15592294.2017.1358345>

Santulli G. 2015. MicroRNA: Basic Science: From Molecular Biology to Clinical Practice. Switzerland: Springer International Publishing. Available from:  
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-22380-3.pdf>

Sarvari SI, Rodriguez-Lopez M, Nuñez-Garcia M, Sitges M, Sepulveda-Martinez A, Camara O, Butakoff C, Gratacos E, Bijmens B, Crispi F. 2017. Persistence of Cardiac Remodeling in Preadolescents With Fetal Growth Restriction. *Circulation: Cardiovascular Imaging* [Internet] 10:e005270. Available from:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCIMAGING.116.005270>

Savchev S, Figueras F, Sanz-Cortes M, Cruz-Lemini M, Triunfo S, Botet F, Gratacos E. 2014. Evaluation of an Optimal Gestational Age Cut-Off for the Definition of Early- and Late-Onset Fetal Growth Restriction. *Fetal Diagnosis and Therapy* [Internet] 36:99-105. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/355525>

Sayed D, Hong C, Chen I-Y, Lypowy J, Abdellatif M. 2007. MicroRNAs Play an Essential Role in the Development of Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research* [Internet] 100:416-424. Available from:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000257913.42552.23>

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. 2003. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* [Internet] 115:199-208. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403007591>

Sibai B. 2003. Diagnosis and Management of Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology* [Internet] 102:181-192. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0029784403004757>

Slabý O, Svoboda M. 2012. MikroRNA: historie, definice, biogeneze a funkce. In: *MikroRNA v onkologii*. Praha: Galén. p 1-126.

Speroff L. 1973. An essay: Prostaglandins and toxemia of pregnancy. *Prostaglandins* [Internet] 3:721-728. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009069807390107X>

Staley JR, Bradley J, Silverwood RJ, Howe LD, Tilling K, Lawlor DA, Macdonald-Wallis C. 2015. Associations of Blood Pressure in Pregnancy With Offspring Blood Pressure Trajectories During Childhood and Adolescence: Findings From a Prospective Study. *Journal of the American Heart Association* [Internet] 4. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.114.001422>

Sun X, Sit A, Feinberg MW. 2014. Role of miR-181 family in regulating vascular inflammation and immunity. *Trends in Cardiovascular Medicine* [Internet] 24:105-112. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050173813001254>

Sutherland ER. 2008. *Immunology and Allergy Clinics of North America* [Internet] 28:589-602. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889856108000374>

Tappia PS, Gabriel CA. 2014. Role of nutrition in the development of the fetal cardiovascular system. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* [Internet] 4:211-225. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14779072.4.2.211>

Taylor ED. 2006. Orthopedic Complications of Overweight in Children and Adolescents. *PEDIATRICS* [Internet] 117:2167-2174. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2005-1832>

Tenhola S, Rahiala E, Martikainen A, Halonen P, Voutilainen R. 2003. Blood Pressure, Serum Lipids, Fasting Insulin, and Adrenal Hormones in 12-Year-Old Children Born with Maternal Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet] 88:1217-1222. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/88/3/1217/2845329>

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* [Internet] 456:980-984. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature07511>

Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M. 2011. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* [Internet] 474:649-653. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10112>

van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet] 103:18255-18260. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0608791103>

van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. 2008. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet] 105:13027-13032. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0805038105>

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* [Internet] 3. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>

Vlk R, Procházka M, Měchurová A, Šimetka O, Janků P. 2015. *Preeklampsie*. Praha: Maxdorf.

Vogt BA. 2001. Hypertension in children and adolescents: definition, pathophysiology, risk factors, and long-term sequelae. *Current Therapeutic Research* [Internet] 62:283-297. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011393X01800138>

von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. 2009. Subclassification of Preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* [Internet] 22:143-148. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/PRG-120021060>

Vos MB, McClain CJ. 2008. Nutrition and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Current Gastroenterology Reports* [Internet] 10:308–315. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-008-0061-4>

Wagner LK. 2004. Diagnosis and management of preeclampsia. *Am Fam Physician* [Internet] 70:2317-2324. Available from: <https://www.aafp.org/afp/2004/1215/p2317.html>

Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. 2007. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes* [Internet] 21:1857-1862. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1566707>

Wallenstein MB, Harper LM, Odibo AO, Roehl KA, Longman RE, Macones GA, Cahill AG. 2012. Fetal congenital heart disease and intrauterine growth restriction: a retrospective cohort study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* [Internet] 25:662-665. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2011.597900>

Wang D, Li T, Cui H, Zhang Y. 2016. Analysis of the Indicating Value of Cardiac Troponin I, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-18, Mir-1 and Mir-146b for Viral Myocarditis among Children. *Cellular Physiology and Biochemistry* [Internet] 40:1325-1333. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/453185>

Wang J-X, Zhang X-J, Li Q, Wang K, Wang Y, Jiao J-Q, Feng C, Teng S, Zhou L-Y, Gong Y, Zhou Z-X, Liu J, Wang J-L, Li P-feng. 2015. MicroRNA-103/107 Regulate Programmed Necrosis and Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Through Targeting FADD. *Circulation Research* [Internet] 117:352-363. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.305781>

Wang L, Xu L, Xu M, Liu G, Xing J, Sun C, Ding H. 2015. Obesity-Associated MiR-342-3p Promotes Adipogenesis of Mesenchymal Stem Cells by Suppressing CtBP2 and Releasing C/EBP $\alpha$  from CtBP2 Binding. *Cellular Physiology and Biochemistry* [Internet] 35:2285-2298. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/374032>

Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2008. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Developmental Cell* [Internet] 15:261-271. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580708002815>

Wang X, Ha T, Liu L, Zou J, Zhang X, Kalbfleisch J, Gao X, Williams D, Li C. 2013. Increased expression of microRNA-146a decreases myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research* [Internet] 97:432-442. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvs356>

Wang Y-S, Wang H-YJ, Liao Y-C, Tsai P-C, Chen K-C, Cheng H-Y, Lin R-T, Juo S-HH. 2012. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovascular Research* [Internet] 95:517-526. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvs223>

Weber M, Baker MB, Patel RS, Quyyumi AA, Bao G, Searles CD. 2011. MicroRNA Expression Profile in CAD Patients and the Impact of ACEI/ARB. *Cardiology Research*

and Practice [Internet] 2011:1-5. Available from:  
<http://www.hindawi.com/journals/crp/2011/532915/>

Whitlock EP, Williams SB, Gold R, Smith PR, Shipman SA. 2005. Screening and Interventions for Childhood Overweight: A Summary of Evidence for the US Preventive Services Task Force. PEDIATRICS [Internet] 116:e125-e144. Available from:  
<http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2005-0242>

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell [Internet] 75:855-862. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867493905304>

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature Cell Biology [Internet] 11:228-234. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb0309-228>

Witlin AG, Sibai BM. 1998. Magnesium sulfate therapy in preeclampsia and eclampsia. Obstetrics & Gynecology [Internet] 92:883-889. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0029784498002774>

Wu J, Du K, Lu X. 2015. Elevated expressions of serum miR-15a, miR-16, and miR-17-5p are associated with acute ischemic stroke. Int J Clin Exp Med [Internet] 8:21071-21079. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885038>

Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2009. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. Genes & Dev. [Internet] 23:2166-2178. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1842409>

Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. 2007. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. Nature Medicine [Internet] 13:486-491. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1569>

Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, Sun Z, Shen WF. 2011. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. FEBS Letters [Internet] 585:854-860. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2011.02.009>

Yi R, Qin Y, Macara Y, Cullen IG, BR. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Dev* [Internet] 17:3011-3016. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1158803>

Yu Z. 2008. Non-coding RNAs in Gene Regulation. In: *Epigenetics*. 1st ed. Norfolk: Caister Academic Press. p 171-182.

Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. 2010. Plasma MicroRNA Profiling Reveals Loss of Endothelial MiR-126 and Other MicroRNAs in Type 2 Diabetes. *Circulation Research* [Internet] 107:810-817. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.110.2263577>

Zhao Y, Samal E, Srivastava D. 2005. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* [Internet] 436. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature03817>

Zheng L, Lin S, Lv C. 2018. MiR-26a-5p regulates cardiac fibroblasts collagen expression by targeting ULK1. *Scientific Reports* [Internet] 8:2104. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-20561-4>

Zhou X, Mao A, Wang X, Duan X, Yao Y, Zhang C, Qin G. 2013. Urine and Serum MicroRNA-1 as Novel Biomarkers for Myocardial Injury in Open-Heart Surgeries with Cardiopulmonary Bypass. *PLoS ONE* [Internet] 8. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0062245>

Zhu J, Yao K, Wang Q, Guo J, Shi H, Ma L, Liu H, Gao W, Zou Y, Ge J. 2016. Circulating miR-181a as a Potential Novel Biomarker for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Cellular Physiology and Biochemistry* [Internet] 40:1591-1602. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/453209>

Zhu Y, Tian F, Li H, Zhou Y, Lu J, Ge Q. 2015. Profiling maternal plasma microRNA expression in early pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. [Internet] 130:49-53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.ijgo.2015.01.010>

## 13 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma biogeneze miRNA Převzato a upraveno dle Winter et al., 2009 .....	14
--	----

## 14 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Sekvence a lokalizace v genomu použitých mikroRNA .....	18
Tabulka 2 Rozdělení dětí do skupin .....	31
Tabulka 3 Složení směsi pro reverzní transkripci .....	34
Tabulka 4 Teplotní profil reverzní transkripce .....	34
Tabulka 5 Složení směsi pro PCR .....	35
Tabulka 6 Teplotní profil kvantitativní PCR v reálném čase .....	35
Tabulka 7 Rozdílná míra exprese mezi skupinami FG a GH s ohledem na nález .....	55

## 15 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Up-regulace miR-1-3p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG .....	37
Graf 2 Up-regulace miR-17-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG .....	38
Graf 3 Up-regulace miR-20a-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG .....	38
Graf 4 Up-regulace miR-26a-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG .....	39
Graf 5 Up-regulace miR-29a-3p u skupiny GH ve srovnání se skupinou s FG .....	39
Graf 6 Up-regulace miR-126-3p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG .....	40
Graf 7 Up-regulace miR-133a-3p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG .....	40
Graf 8 Up-regulace miR-181a-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG .....	41
Graf 9 Up-regulace miR-499a-5p u skupiny GH ve srovnání se skupinou FG .....	41
Graf 10 Up-regulace miR-1-3p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG bez nálezu; up-regulace miR-1-3p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu .....	43
Graf 11 Up-regulace miR-17-5p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG bez nálezu; up-regulace miR-17-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu .....	44

Graf 12 Up-regulace miR-20a-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu; up-regulace miR20a-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG s nálezem .....	44
Graf 13 Up-regulace miR-21-5p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG bez nálezu .....	45
Graf 14 Up-regulace miR-26a-5p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG bez nálezu; up-regulace miR-26a-5p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG s nálezem .....	45
Graf 15 Up-regulace miR-29a-3p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu, up-regulace miR-29a-3p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG s nálezem, up-regulace miR-29a-3p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG s nálezem .....	46
Graf 16 Up-regulace miR-133a-3p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG bez nálezu .....	46
Graf 17 Up-regulace miR-181a-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG bez nálezu, up-regulace miR-181a-5p u skupiny GH s nálezem ve srovnání se skupinou FG s nálezem .....	47
Graf 18 Up-regulace miR-199a-5p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG s nálezem .....	47
Graf 19 Up-regulace miR-342-3p u skupiny GH bez nálezu ve srovnání se skupinou FG s nálezem .....	48
Graf 20: Up-regulace miR-17-5p u skupiny FGR s nálezem ve srovnání se skupinou FGR bez nálezu .....	49
Graf 21 Down-regulace miR-21-5p u skupiny FGR bez nálezu ve srovnání se skupinou FG s nálezem .....	49
Graf 22 Up-regulace miR-126-3p u skupiny FGR s nálezem ve srovnání se skupinou FGR bez nálezu .....	50
Graf 23 Up-regulace miR-103-3p u skupiny PE s nástupem od 34. týdne ve srovnání se skupinou PE s nástupem před 34. týdnem .....	51
Graf 24 Up-regulace miR-1-3p u skupiny PE s nástupem po 34. týdnu s nálezem ve srovnání se skupinou PE s nástupem před 34. týdnem s nálezem PE 1 – nástup PE před 34. týdnem, PE 2 – nástup PE ve 34. týdnu a později .....	52