

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie

**Katedra antropologie a genetiky člověka**



**Monika Štěrbová**

**Extracelulární microRNA a jejich role v patologiích zejména  
v oblasti gynekologie a porodnictví.**

Extracellular microRNAs and their role in pathologies especially in the field of  
gynecology and obstetrics.

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

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

Praha, 2012

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 30. 4. 2012

.....  
Monika Štěrbová

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce, Doc. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D., za vedení k samostatné práci a za cenné rady a připomínky. Také bych chtěla poděkovat svému manželovi, rodině a přátelům za podporu během studia a při psaní této práce.

## **Abstrakt**

mikroRNA (miRNA) jsou relativně nedávno objevené molekuly RNA, které slouží k regulaci genové exprese a přes procesy diferenciaci, proliferace a apoptózy ovlivňují komplexní biologické systémy, jako jsou embryogeneze, onkogeneze a imunita. V poslední době se začínají experimentálně využívat v diagnostice a predikci těhotenských komplikací a nádorového bujení. V neinvazivní diagnostice se využívají extracelulární miRNA molekuly – přítomné v cirkulaci pacienta. Molekuly RNA se do extracelulárních tekutin dostávají nejčastěji procesem apoptózy.

Pro mou práci jsem si vybrala čtyři choroby, pro které mají extracelulární miRNA diagnostický potenciál, preeklampsii, růstovou retardaci plodu, gestační diabetes mellitus a rakovinu prsu. U těchto chorob byla popsána aberantní exprese a rozdílné hladiny extracelulárních miRNA ve srovnání se zdravými kontrolami, ale klinické využití mikroRNA markerů v diagnostice a predikci onemocnění ještě vyžaduje další výzkum a optimalizaci.

### **Klíčová slova:**

extracelulární nukleové kyseliny, gestační diabetes mellitus, mikroRNA, PCR, preeklampsie, rakovina prsu, růstová retardace plodu

## **Abstract**

microRNAs (miRNAs) represent a relatively newly discovered group of RNA molecules and they serve to regulate gene expression. In spite of processes of differentiation, proliferation and apoptosis, miRNAs influence the whole biological systems, such as embryogenesis, oncogenesis, and immunity. There have been a number of experiments in recent years concerning diagnoses and predictions of complications during pregnancy, and tumour growth. Extracellular miRNA molecules participating in circulation of patients are used in the non-invasive diagnostics. RNA molecules usually get into the extracellular fluid during the apoptosis process.

I chose four diseases, which extracellular miRNA have diagnostic potential – preeclampsia, intrauterine growth retardation, gestational diabetes mellitus and breast cancer – for my work. An aberrant expression of different levels of various extracellular miRNAs has been reported in these diseases but the clinical use of microRNAs in the diagnosis and prediction of those still requires further research and optimization.

### **Keywords:**

breast cancer, extracellular nucleic acids, fetal growth retardation, gestational diabetes mellitus, microRNA, PCR, preeclampsia

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| Seznam zkratk .....  | 7  |
| Úvod .....   | 8  |
| 1 Extracelulární nukleové kyseliny .....                     | 9  |
| 1.1 Historie .....   | 9  |
| 1.2 Uvolňování nukleových kyselin .....                      | 9  |
| 1.3 Mechanismy odstraňování volných nukleových kyselin ..... | 11 |
| 1.4 Využití extracelulárních nukleových kyselin .....        | 11 |
| 2 mikroRNA .....   | 12 |
| 2.1 Objev mikroRNA .....                                     | 12 |
| 2.2 Biogeneze mikroRNA .....                                 | 12 |
| 2.3 S těhotenstvím asociované mikroRNA .....                 | 14 |
| 3 Onemocnění .....   | 14 |
| 3.1 Preeklampsie .....                                       | 14 |
| 3.2 Růstová retardace plodu .....                            | 18 |
| 3.3 Gestační diabetes mellitus (GDM) .....                   | 21 |
| 3.4 Rakovina prsu .....                                      | 24 |
| 4 Metodika .....   | 27 |
| 4.1 Odběr krve .....   | 27 |
| 4.2 Separace plasmy z nesrážlivé periferní krve .....        | 27 |
| 4.3 Izolace miRNA z plazmy .....                             | 27 |
| 4.4 Polymerázová řetězcová reakce .....                      | 27 |
| Závěr .....  | 30 |
| Reference: .....   | 31 |

## Seznam zkratek

|           |   |
|-----------|---|
| 3'UTR     | 3'-nepřekládaná oblast                                    |
| Ago       | protein argonautové rodiny                                |
| bp        | pár bází  |
| CS        | kouření cigaret   |
| DGCR8     | DiGeorgeova kritická oblast 8                             |
| DNA       | deoxyribonukleová kyselina                                |
| dsDNA     | dvouvláknová DNA  |
| EDTA      | kyselina ethylendiaminotetraoctová                        |
| GCT       | glukózový zkušební test                                   |
| GDM       | gestační diabetes mellitus                                |
| GTP       | guanosin-5'-trifosfát                                     |
| GW        | gestační týden  |
| Insig1    | insulinem indukovaný gen 1                                |
| IUGR      | intrauterinní růstová retardace                           |
| kB        | kilobáze  |
| kD        | kiloDalton  |
| Mabs      | monoklonální protilátka                                   |
| miRNA     | mikroRNA  |
| mRNA      | mediátorová ribonukleová kyselina                         |
| No CS     | nekouření cigaret   |
| nt        | nukleotid   |
| OGTT      | orální glukózový toleranční test                          |
| PCK2      | fosfoenolpyruvát karboxy kináza 2                         |
| PCR       | polymerázová řetězcová reakce                             |
| PE        | preeklampsie  |
| pg        | pikogram  |
| PP-13     | placentární protein 13                                    |
| pre-miRNA | prekurzor mikroRNA  |
| pri-miRNA | primární prekurzor mikroRNA                               |
| RISC      | RNA-indukovaný tlumící komplex                            |
| RNA       | ribonukleová kyselina                                     |
| RT        | reverzní transkripce                                      |
| SATB1     | speciální AT-bohaté sekvence vázající protein             |
| SREBP     | sterol regulační vazebný protein                          |
| ssDNA     | jednovláknová DNA   |
| TRBP      | HIV-1 trans aktivující odpověď (TAR) RNA-vázající protein |

## Úvod

Toto téma jsem si zvolila proto, že jsem se na jedné přednášce dozvěděla, že metody invazivní prenatalní diagnostiky způsobují spontánní aborty ve více než 0,5% případů, při kordocentéze<sup>1</sup> je riziko spontánního abortu dokonce 2-5%. Na přednášce jsem se také dozvěděla, že existují metody neinvazivní prenatalní diagnostiky, které aborty nevyvolávají. Tímto jsem se začala o tuto problematiku více zajímat a dospěla jsem k závěru, že toto je téma, které bych chtěla zpracovávat v mé práci a kterému bych se chtěla věnovat i později.

Extracelulární mikroRNA (miRNA) jsou krátké (18-25 nukleotidů dlouhé) molekuly RNA, které se vyskytují v tělních tekutinách (*Kawasaki, Taira, 2003; Mandel, Métais, 1948*). miRNA plní v organismu regulační funkce přes regulaci tranlace, čímž ovlivňují další pochody v organismu (*Kawasaki, Taira, 2003*). Při probíhající patologii se může měnit genová exprese miRNA. Sledování těchto změn v extracelulárních tekutinách je možné využít v diagnostice a predikci dané patologie (*Asaga et al, 2011; Heneghan et al, 2010; Hu et al, 2012; Mouillet et al, 2010; Wang et al, 2010; Wu et al, 2011; Wu et al, 2012; Zhao et al, 2011; Zhu et al, 2009*).

Cílem této práce je nastínit současné znalosti o struktuře a významu extracelulárních mikroRNA a jejich využití v diagnostice a predikci různých onemocnění, zejména v oblasti gynekologie a porodnictví.

Tato práce je členěna na čtyři hlavní kapitoly. V první kapitole s názvem Extracelulární nukleové kyseliny se budu věnovat extracelulárním nukleovým kyselinám obecně, dále způsobům, jak se dostávají do krevního řečiště, jak v krevním řečišti přetrvávají a jak jsou poté z krevního řečiště odstraňovány. Po využití extracelulárních nukleových kyselin přejdu na další kapitolu, mikroRNA. V této kapitole se krátce zmíním o historii objevu miRNA, poté se zaměřím na biogenezi miRNA a naznačím význam placentárně specifických miRNA detekovatelných v plazmě matky. Onemocnění je název třetí kapitoly, pro kterou jsem si vybrala čtyři příklady onemocnění, u kterých se sledují genové exprese a hladiny extracelulárních miRNA. U každého onemocnění zmíním jeho charakteristiku, současné metody, jak je toto onemocnění diagnostikováno, a možnosti využití extracelulárních miRNA pro neinvazivní diagnostiku a predikci onemocnění. V závěrečné kapitole Metodika se budu věnovat tomu, jakým způsobem lze získat miRNA ze vzorku periferní krve a jak je dále možné s miRNA pracovat.

Při psaní této práce jsem pracovala téměř výhradně s primární literaturou.

---

<sup>1</sup> přímý odběr fetální krve z pupečnicku



# 1 Extracelulární nukleové kyseliny

Pro extracelulární nukleové kyseliny existuje několik termínů, například CNAs, cirkulující nukleové kyseliny, cirDNA, exDNA/exRNA, volné nukleové kyseliny a další.

Extracelulární nukleové kyseliny jsou mimobuněčné nukleové kyseliny, které můžeme nalézt v plazmě a séru lidí (*Mandel, Métais, 1948*), u živočichů (*Schütz et al, 2005*) a u rostlin (*Stroun, Anker, 1971*). Jsou to volné DNA nebo RNA fragmenty o velikosti v rozmezí přibližně od 143 bp do více než 30 kB, což bylo prokázáno při několika elektronových mikroskopováních a sacharóza-gradient sedimentačních analýzách (*Giacona et al, 1998; Lo et al, 2010*). Koncentrace DNA v plasmě se u zdravých jedinců vyskytuje kolem hodnoty 21 ng/ml (*Cherepanova et al, 2008*).

Volné nukleové kyseliny byly zaznamenány kromě plasmy a séra také v mléce, moči, plodové vodě, lymfatických a peritoneálních tekutinách, v kostní dřeni, prostatické tekutině, žaludečních a žlučových šťávách, mozkomíšním moku, sputu a dokonce i ve stolici.

## 1.1 Historie

Griffith v roce 1928 jako první objevil transformace u bakterií. Při pokusech prokázal přenos patogenních vlastností od infekční bakterie, která byla tepelně zničena, na žijící nepatogenní kmen (*Griffith, 1928*). O několik let později Avery jednoznačně prokázal, že DNA je podstatou dědičnosti (*Avery et al, 1944*). V roce 1965 byly Gahanem a Chayenem detekovány cytoplasmatické deoxyribonukleové kyseliny (*Gahan, Chayen, 1965*). V roce 1977 Leon *et al* kvantifikovali zvýšenou hladinu plasmové a sérové DNA u pacientů s rakovinou (*Leon et al, 1977*). O dvacet let později Lo s kolegy prokázali přítomnost fetální DNA v plasmě a séru matky (*Lo et al, 1997*).

## 1.2 Uvolňování nukleových kyselin

### 1.2.1 Apoptóza

Jedním ze způsobů uvolňování nukleových kyselin do extracelulárního prostoru je apoptóza (programovaná buněčná smrt). Apoptóza je také významným zdrojem extracelulárních nukleových kyselin při probíhajícím nádorovém bujení (*Jahr et al, 2001*). Vzhledem k tomu, že u dospělého člověka hyne denně  $10^{11}$  buněk, množství uvolněné DNA by mělo být 0,6 g, ale některé chromatin degradační produkty jsou dále degradovány

a reutilizovány<sup>2</sup> (*Botezatu et al, 2000*). Extracelulární nukleové kyseliny můžeme nalézt v apoptotických tělíscích (*Franěk, Dolníková, 1991*). Apoptóza je také důležitým mechanismem při uvolňování fetálních nukleových kyselin do oběhu matky.

Nejvýznamnějším zdrojem extracelulárních fetálních nukleových kyselin pro účely neinvazivní prenatální diagnostiky jsou apoptotická tělíscika trofoblastu, která se dostávají do mateřské cirkulace (*Ng et al, 2003*). Za normálních fyziologických podmínek je v placentě udržován optimální počet fungujících buněk. Je udržována rovnováha mezi produkcí nových buněk a zánikem starých. Za odstraňování starých nebo poškozených buněk je zodpovědná apoptóza. Bylo zjištěno, že v placentě je výskyt apoptózy významně vyšší ve třetím trimestru než v prvním trimestru (*Shynlova et al, 2006; Smith et al, 1997*). Při apoptóze dochází ke zmenšování buňky, kondenzaci chromatinu a následně k fragmentaci buňky na apoptotická tělíscika. Dochází též k fragmentaci DNA. Cirkulující fetální nukleové kyseliny představují 1-2% celkového počtu cirkulujících nukleových kyselin. Cirkulující fetální DNA má velikost maximálně do 500 bp (*Chan et al, 2004; Li Y. et al, 2004*). V jedné studii se největší koncentrace fetální DNA vyskytovala v sekci o molekulové hmotnosti 100-300 bp, kde dosáhla hodnot 14,8 kopií/ml periferní krve matky. V sekci o molekulové hmotnosti 300-500 bp bylo detekováno menší množství fetální DNA a v sekcích o molekulové hmotnosti 500-700 bp, 700-900 bp a > 900 bp nebyla fetální DNA detekována (*Hromadníková et al, 2006*). Další studie zjistila, že fetální DNA je kratší než maternální DNA (*Fan et al, 2010*).

### 1.2.2 Nekróza

Dalším způsobem, jak se dostávají nukleové kyseliny z buněk, je nekróza. Při nekróze se uvolňují do krevního řečiště nukleové kyseliny s vysokou molekulovou hmotností (větší než 10 000 bp) (*Jahr et al, 2001*).

### 1.2.3 Aktivní sekrece

Aktivní sekrece je také jeden ze způsobů uvolňování extracelulárních nukleových kyselin (*Stroun et al, 2001*). Do aktivní sekrece je řazena sekrece exosomů. Exosomy jsou membránové vesikly o velikosti 50-110 nm (*Gallo et al, 2012*), které jsou sekretovány do extracelulárního prostoru většinou buněčných typů. Jako první byly objeveny exosomy uvolňované z nádorových buněk (*Taylor, Doellgast, 1979; Trams et al, 1981*). Později bylo prokázáno, že i jiné buňky, zahrnující retikulocyty (*Johnstone et al, 1987*), dendritické buňky (*Zitvogel et al, 1998*), B-buňky (*Raposo et al, 1996*), T-buňky (*Peters et al, 1991*), žírné buňky (*Raposo et al, 1997*), epitelální buňky (*van Niel et al, 2001*) a neurony (*Fauré et al,*

---

<sup>2</sup> opětovné využití

2006), mohou uvolňovat exosomy. Exosomy mohou obsahovat různé proteiny (*Pisitkun et al, 2004*) a miRNA (*Gallo et al, 2012; Michael et al, 2010*). Exosomy je možné detekovat v různých tělních tekutinách, například v krvi (*Gallo et al, 2012*), slinách (*Michael et al, 2010*), moči (*Pisitkun et al, 2004*), plodové vodě (*Keller et al, 2007*) a mateřském mléce (*Admyre et al, 2007*).

### **1.3 Mechanismy odstraňování volných nukleových kyselin**

Nukleové kyseliny uvolňované z buňky, které můžeme detekovat, jsou ve formě apoptotických tělísek nebo exosomů, ostatní jsou okamžitě degradovány všudypřítomnými exonukleázami, a proto jsou téměř nedetekovatelné v krvi.

Cirkulující DNA je rychle odstraněna z oběhu (*Tsumita, Iwanaga, 1963*). Nukleové kyseliny ve formě apoptotických tělísek jsou zachytávány retikulo-endoteliálním systémem (*Chused et al, 1972*). Mechanismy pro odstraňování cirkulující DNA z oběhu zahrnují plasmové nukleázy a jaterní a renální odklizení (clearanci) (*Kawabata et al, 1995*). Mechanismy vychytávání DNA eukaryotickými buňkami nejsou stále ještě pochopeny. Důležitou roli v odklizení dsDNA hrají jaterní makrofágy neboli Kupfferovy buňky (*Hisazumi et al, 2003*). Při jaterní likvidaci extracelulárních nukleových kyselin dochází k rychlejší eliminaci ssDNA než dsDNA (*Emlen, Mannik, 1984*). V případě renální clearance poslední údaje ukázaly přítomnost nádorově a fetálně odvozené DNA v moči pacientů s nádorovým onemocněním a u těhotných žen (*Botezatu et al, 2000*). Sekvence specifické pro muže mohou být nalezeny v moči žen, které podstoupily transfuzi krve od mužského dárce, stejně tak v moči žen, které nosí plod mužského pohlaví. K-ras mutace byly detekovány v moči pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva a karcinomem slinivky břišní (*Botezatu et al, 2000*). Tyto výsledky naznačují, že plasmatická DNA může projít glomerulární bariérou a je vylučována močí.

### **1.4 Využití extracelulárních nukleových kyselin**

Množství fragmentů extracelulárních nukleových kyselin a jejich velikost můžou být použity jako indikátory některých onemocnění. Výzkumy se zaměřily na extracelulární nukleové kyseliny a rakovinu, autoimunitní onemocnění, infekční onemocnění, na prenatální diagnostiku a další. O některých nemocech, u kterých se extracelulární nukleové kyseliny (konkrétně extracelulární mikroRNA) sledují, budu psát v samostatné kapitole.

Přítomnost cirkulujících nukleových kyselin u zdravých jedinců a významné změny jejich koncentrace a distribuce v krvi nemocných jedinců naznačují, že extracelulární nukleové kyseliny mohou hrát důležité role v homeostázi mnohobuněčných organismů.

## 2 mikroRNA

mikroRNA (miRNA) jsou nekódující jednořetězcové RNA o délce 18-25 nukleotidů. miRNA jsou regulátory genové exprese vyskytující se v rostlinných i živočišných buňkách (Kawasaki, Taira 2003). Databáze miRBase obsahuje 21 643 maturovaných miRNA (verze 18, listopad 2011).

### 2.1 Objev mikroRNA

Victor Ambros se svými kolegy objevil miRNA v roce 1993 při studiu vývoje mutantních nematod *Caenorhabditis elegans*. Popsali gen *lin-4*, který je nezbytný pro časovou kontrolu různých postembryonálních vývojových událostí. Tento gen nekóduje protein, ale 22 nukleotidů dlouhou RNA, která je schopná interagovat s mRNA genu *lin-14* a reprimovat její translaci (Lee R. et al, 1993). miRNA byly objeveny později kvůli své délce, předpokládalo se, že to jsou pouze degradační produkty jiných RNA.

Sekvence miRNA jsou napříč organismy vysoce konzervované. Například byla detekována *let-7* RNA (dlouhá přibližně 21 nukleotidů) ve vzorcích celé řady živočišných druhů včetně obratlovců, hemichordat, měkkýšů a členovců, ale nebyla přítomna ve vzorcích RNA ze *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* nebo *Arabidopsis* (Pasquinelli et al, 2000).

miRNA mají důležité regulační funkce v procesech diferenciaci, proliferaci a apoptózy, a tím ovlivňují komplexní biologické systémy, jako jsou embryogeneze, onkogeneze a imunita.

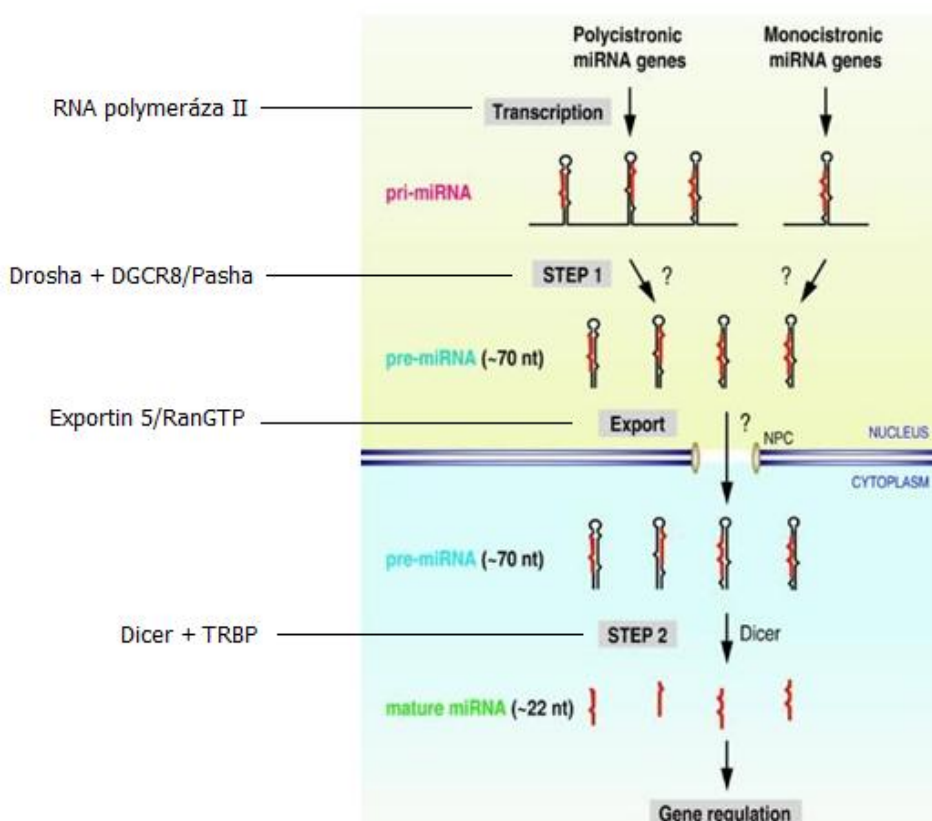
### 2.2 Biogeneze mikroRNA

Geny pro savčí miRNA se mohou vyskytovat v intronech protein-kódujících genů nebo v dlouhých nekódujících RNA transkriptech, některé miRNA se překrývají s exony nekódujících RNA, v některých případech se nacházejí v buď intronech, nebo exonech v závislosti na alternativním sestřihu hostitelského přepisu (nazývají se „smíšené“ miRNA). miRNA se mohou být klasifikovány jako exonové miRNA (odvozené z exonů) a intronové miRNA (odvozené z intronů) (Rodriguez et al, 2004).

Při northern blot analýze mohou být detekovány RNA přibližně 70 nukleotidů (nt) dlouhé stejně jako 22 nt dlouhé. Bylo zjištěno, že tyto 70 nt dlouhé RNA jsou prekurzory 22 nt dlouhých miRNA (Grishok et al, 2001; Lee R. et al, 1993; Pasquinelli et al, 2000). Tímto se dostáváme k biogenezi miRNA. miRNA geny jsou transkribovány RNA polymerázou II generující primární transkript. Primární prekurzory miRNA (pri-miRNA) jsou delší než 70 nt dlouhé pre-miRNA. pri-miRNA mohou být polycistronní (např. miR-23~27~24-2)

a monocystronní (např. miR-30a). Výsledkem prvního kroku procesu (STEP 1) vykonaného jadernou RNasou III Drosha v komplexu s DGCR8/Pasha je pre-miRNA dlouhá přibližně 70 nt, která je rozpoznána a exportována z jádra komplexem Exportin5/RanGTP. Po exportu se cytoplasmatická RNasa III Dicer a protein TRBP podílí na druhém kroku procesu (STEP 2), který produkuje maturované miRNA. Jeden řetězec miRNA je degradován, na druhý je navázán RISC, miRNA se tak stává zralou. Finální produkt může fungovat v různých regulačních drahách, jako je kontrola translace některých mRNA (Bohnsack et al, 2004; Denli et al, 2004; Filippov et al, 2000; Gregory et al, 2005; Han et al, 2004; Chendrimada et al, 2005; Lee Y. et al, 2002: Fig. 7; Lee Y. et al, 2003; Lee Y. et al, 2004; Yeom et al, 2006; Yi et al, 2003;), viz Figure 1.

**Figure 1**



*Lee Y., Jeon K., Lee J-T., Kim S., Kim V. N. (2002), MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization, EMBO J, 21(17): 4663–4670*

Charakteristické RNA umlčovací efektorové komplexy obsahují alespoň jeden protein z agronautové rodiny (Hammond et al, 2001; Hutvagner, Zamore, 2002; Tabara et al, 1999). Pokud se na RISC naváže Ago2 protein z agronautové rodiny, nikoliv Ago1, Ago3, nebo Ago4, dochází ke štěpení cílové mRNA (Meister et al, 2004).

Interakce s cílovou mRNA je umožněna na základě komplementárního párování bází mezi zralou miRNA a 3'UTR (3'-untranslated region) mRNA (*Lee L. et al, 1993; Wightman et al, 1993*).

### **2.3 S těhotenstvím asociované mikroRNA**

Některé studie prokázaly, že některé miRNA exprimované v placentách žen (miR-141, miR-149, miR-299-5p, miR-135b, miR-517a) je možné detekovat během těhotenství v mateřské plasmě, a že jejich koncentrace po porodu klesají (*Chim et al, 2008, Luo et al, 2009*). Plasmatická koncentrace miR-141 rostla s postupujícím těhotenstvím až do třetího trimestru (*Chim et al, 2008*). Z databáze miRNAMap bylo zjištěno, že placentárně specifická z těchto miRNA je pouze miR-517a (též miR-517\*) a že ostatní mikroRNA jsou exprimovány v celé řadě tkání, a tak nejsou vhodné pro sledování průběhu těhotenství (*Hromadníková et al, 2010*). Další miRNA, které můžeme nalézt v mateřské cirkulaci, budu zmiňovat u jednotlivých onemocnění, u kterých se tyto miRNA sledují.

## **3 Onemocnění**

V této kapitole se budu věnovat nemocem, u kterých se zkoumají genová exprese a extracelulární hladiny mikroRNA.

### **3.1 Preeklampsie**

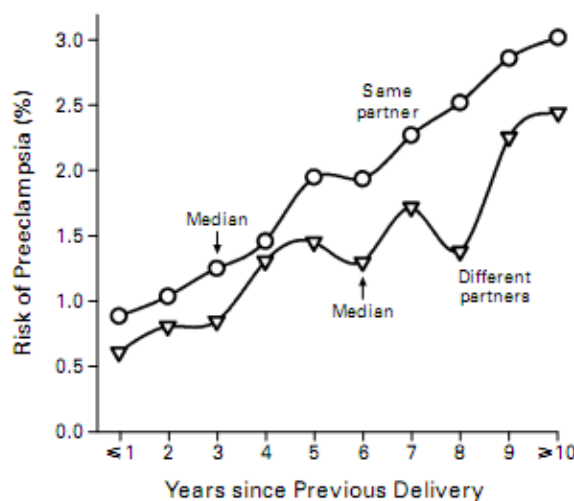
První zmínku o tomto onemocnění jsem našla z roku 1914. V článku se popisuje případ jedné prvorodičky, u níž byly pozorovány tyto příznaky: zvracení, průjem, rozostřené vidění, žloutenka, otok, zrychlený pulz. Moč této ženy obsahovala krev a vysoké množství albuminů. Po císařském řezu došlo k mimořádně rychlému zlepšení zdravotního stavu pacientky, druhý den odezněla žloutenka a otok a ustalo zvracení. V moči bylo nalezeno mnohem menší množství albuminů a žádná krev. Zrak byl do značné míry obnoven. Z textu dále vyplývá, že preeklampií trpí převážně prvorodičky a starší rodičky (*Bonney, 1914*).

Preeklampsie je známým těhotenským syndromem, který je charakterizován hypertenzí, proteinurií a případně edémy po 20. týdnu gravidity. Je to porucha, která postihuje minimálně 5% všech těhotenství z celého světa a patří mezi hlavní příčiny mateřské a perinatální morbidity a mortality (*Driul et al, 2004*). Příčinou preeklampsie je nedostatečná invaze trofoblastu do děložních spirálních artérií a jejich remodelace, proto je průsvit cév v myometriu úzký. V důsledku toho dochází ke snížení uteroplacentární perfuze (*Abe et al, 2008; Peng et al, 2008; Zhou et al, 1993*). Příčinou preeklampsie je tedy přítomnost

patologicky fungující placenty, protože jedinou léčbou je porod placenty, po kterém symptomy rychle ustupují. Bylo zjištěno, že preeklampsie je asociována se změnami exprese placentárně specifických mikroRNA (Pineles et al, 2007).

Retrospektivní analýza souboru porodů v letech 1967-1998 podle centrálního registru v Norsku ukázala, že preeklampsie vznikla u 3,9% prvních těhotenství, v 1,7% při druhém těhotenství a v 1,8% při třetím těhotenství, pokud měla žena téhož partnera (Skjaerven et al, 2002). Riziko ve druhém a třetím těhotenství bylo přímo úměrné časovému intervalu, který uběhl mezi nimi, viz Figure 2. Pokud žena porodila další dítě až po 10 letech od předchozího těhotenství, bylo riziko rozvoje preeklampsie stejné jako u nullipar<sup>3</sup> (Skjaerven et al, 2002). Pokud žena změnila partnera, bylo riziko preeklampsie zvýšeno, i když opět rozhodoval interval mezi oběma posledními těhotenstvími (Skjaerven et al, 2002). Statistické zpracování poukazuje na to, že protektivní účinek předchozího těhotenství na snížení rizika vzniku preeklampsie je přechodný. Změna partnera nehraje při srovnatelných intervalech mezi těhotenstvími pravděpodobně roli (Skjaerven et al, 2002).

**Figure 2**



Skjaerven R., Wilcox A. J., Lie R. T. (2002), *The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia*, *New Engl.J.Med.*, 1: 35

Riziko preeklampsie během druhého těhotenství. Podle intervalu od prvního těhotenství se stejným nebo jiným partnerem, pro ženy bez historie preeklampsie. Je indikován průměrný počet let od předchozího těhotenství pro každou skupinu žen.

<sup>3</sup> žena, která dosud nerodila

Pravděpodobnost vzniku preeklampsie je častější u žen, jejichž matky měly preeklampsii (Arngrimsson et al, 1990; Cincotta, Brennecke, 1998; Mogren et al, 1999; Sutherland et al, 1981). Pravděpodobnost vzniku preeklampsie je také častější u žen, které mají partnera, jehož matka měla preeklampsii. Z toho vyplývá, že genotyp plodu přispívá k celkovému riziku vzniku preeklampsie (Esplin et al, 2001).

Mezi možné predispoziční faktory patří výrazná hyperkoagulace (Lindoff et al, 1997), genetický polymorfismus ovládající hemokoagulaci, vazba na gen angiotenzinogenu (Ward et al, 1993) a hypertenze v těhotenství. U žen, které mají před 20. týdnem těhotenství systolický krevní tlak vyšší než 130 mm Hg, vznikne preeklampsie častěji. I u těhotných žen, které měly hypertenzi před těhotenstvím, je pravděpodobnější vznik preeklampsie. Zvýšené riziko je také u žen, které měly preeklampsii v předchozím těhotenství. Dalším predispozičním faktorem je obezita. Dvojčata také navyšují riziko vzniku onemocnění (Odegard et al, 2000). Těhotné kuřačky mají nižší riziko vzniku preeklampsie (Marcoux et al, 1989). Diabetes mellitus je také rizikovým faktorem vzniku preeklampsie. Dalším předpokladem pro vznik preeklampsie je nedostatek některých významných látek, například nedostatek kalcia, zinku, vitamínu C a E a n-3 esenciálních mastných kyselin (Pipkin, 2001 – review).

### 3.1.1 Diagnostika preeklampsie

Placentární protein 13 (PP-13) je prvotrimestrálním markerem pro pozdější výskyt preeklampsie a intrauterinní růstové retardace (IUGR). PP-13 patří do rodiny galektinů (Visegrady et al, 2001), je to 32kD velký homodimer s disulfidickými můstky spojujícími obě podjednotky dohromady (Bohn et al, 1983). PP-13 je lokalizován na chromozomu 19. Purifikací PP-13, naklonováním a expresí jeho cDNA v *Escherichia coli* byly vytvořeny specifické protilátky. To vedlo k vytvoření čistých (PP-13-B) a rekombinantních (PP-13-R) proteinů interagujících s monoklonálními protilátkami (MAbs) pro detekci těhotenských komplikací. Abnormální hladina PP-13 koreluje s preeklampií a intrauterinní růstovou retardací (IUGR). Při normálním těhotenství je v séru těhotných žen hladina PP-13 vyšší ve třetím trimestru než v prvním trimestru. Průměrná hladina PP-13 v séru těhotných žen se pomalu zvyšuje ze 150 pg/ml v gestačním týdnu (GW) 6-10, přes 170 pg/ml v GW 11-14, až na 300 pg/ml ve třetím trimestru (GW 34-38). Hladiny PP-13 zjištěné v plodové vodě jsou přibližně dvakrát tak vyšší než ve vzorku mateřského séra. Při patologickém těhotenství byly v prvním trimestru zjištěny nižší hladiny PP-13 v séru oproti normálnímu těhotenství, viz Tabulka 1 a Figure 3. Rozdíly jsou významné pro časný vývoj preeklampsie před GW 34. Ve



druhém trimestru jsou hladiny PP-13 naopak vyšší než u normálního těhotenství (*Burger et al, 2004; Nicolaidis et al, 2006*).

**Tabulka 1**

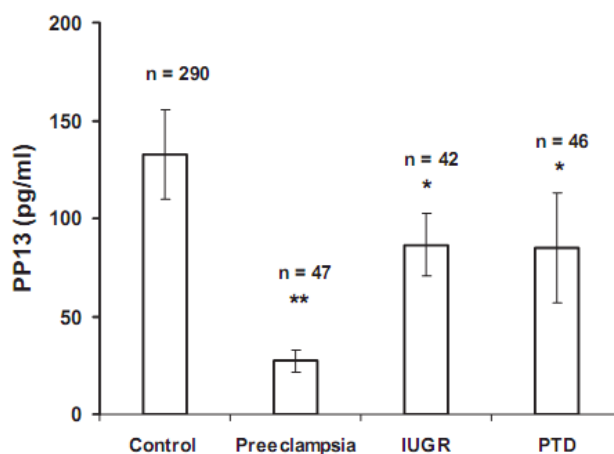
|              | 2nd Trimester     |     |       | 1st Trimester        |     |       |
|--------------|-------------------|-----|-------|----------------------|-----|-------|
|              | Mean $\pm$ SD     | n   | p     | Mean $\pm$ SD        | n   | p     |
| Normal       | 207.4 $\pm$ 194.4 | 514 |       | 171.21 $\pm$ 1151.09 | 350 |       |
| Any disorder | 248.9 $\pm$ 199.8 | 127 | 0.005 | 144.27 $\pm$ 157.07  | 38  | 0.01  |
| PE           | 234.2 $\pm$ 173.8 | 69  | 0.054 | 116.32 $\pm$ 128.62  | 15  | 0.03  |
| IUGR         | 257.5 $\pm$ 213.4 | 69  | 0.025 | 143.97 $\pm$ 170.92  | 26  | 0.05  |
| PTD          | 262.1 $\pm$ 224.5 | 52  | 0.021 |                      |     |       |
| Early PE     | 212.6 $\pm$ 136.5 | 24  | 0.07  | 29.49 $\pm$ 44.84    | 5   | 0.005 |

*Burger O. et al (2004), Placental protein 13 (PP-13): Effect on Cultured Trophoblasts, and Its Detection in Human Body Fluids in Normal and Pathological Pregnancies, Placenta, 25: 618*

Hladina PP-13 stanovena v séru těhotných žen pomocí two-MABs sandwich ELISA na odebraných vzorcích v GW 11-14 (1. trimestr) a GW 21-23 (2. trimestr) u případů a kontrol. Případy a kontroly byly shodné ve věku, BMI, paritě a těhotenství. Hodnoty byly naměřeny na kódovaných vzorcích, statistika byla provedena až po dekódování.

Detekce rizikových pacientek v prvním trimestru má umožnit dispenzarizaci<sup>4</sup> pacientek v prenálních centrech, kde je jim nabídnuta specializovaná léčba (časté monitorování krevního tlaku, monitorování těhotenství, zvýšená péče lékaře, atd.). Ženy, které jsou označeny za vysoce rizikové, mohou užívat nízké dávky aspirinu (kyseliny acetylsalicylové, blokátoru tromboxanu) (*Sibai et al, 1993*).

**Figure 3**



*Chafetz et al (2007) First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction, American Journal of Obstetrics & Gynecology, 197: 35.e5*

Medián (95% meze spolehlivosti) výsledky hladiny PP-13 v těhotenství.

Jedna hvězdička označuje pravděpodobnostní hodnotu menší než 0.005 ve srovnání s kontrolními jedinci; dvě hvězdičky označují pravděpodobnostní hodnotu menší než 0.001 ve srovnání s kontrolními jedinci. PTD = předčasný porod.

<sup>4</sup> aktivní sledování či dohled nad osobou, která má určitý rizikový faktor

Další význam pro diagnostiku a predikci preeklampsie by mohly mít placentárně specifické mikroRNA přítomné v mateřské cirkulaci (*Hromadníková et al, 2010; Kotlabová et al, 2011*). Při srovnání exprese mikroRNA v placentách žen postižených preeklampsii s kontrolní skupinou byla pozorována rozdílná exprese u 34 miRNA, z nichž u preeklampsie mělo 11 zvýšenou expresi (up-regulované) a 23 sníženou expresi (down-regulované) (*Zhu et al, 2009*). Podle databáze miRNAMap bylo ověřeno, že z 11 up-regulovaných miRNA u preeklampsie, jsou pouze 3 nalezené miRNA placentárně specifické (miR-517\*, miR-518b, miR-519e) (*Hromadníková et al, 2010*). Geny pro tyto tři miRNA jsou lokalizovány na chromozomu 19. Další studie potvrdila zvýšenou expresi dvou miRNA (miR-182 a miR-210) v placentách žen postižených preeklampsii ze 157 studovaných miRNA, z nichž ani jedna není placentárně specifická (*Pineles et al, 2007*). Do jiné studie byly zahrnuty miR-135b, miR-517a, miR-518b a dále všechny mikroRNA, které byly podle databáze miRNAMap placentárně specifické (*Hromadníková et al, 2010*). Ze souboru testovaných mikroRNA byly vyřazeny mikroRNA, které nebyly detekovány v mateřské cirkulaci v průběhu těhotenství, a také mikroRNA, které byly detekovány v krvi zdravých žen bez známek těhotenství (například miR-519e, která je zmíněna výše). Na základě studií bylo vybráno 7 mikroRNA (miR-516-5p, miR-517\*, miR-518b, miR-520a\*, miR-520h, miR-525, miR-526a) pro další sledování přítomnosti placentárně specifických mikroRNA v mateřské cirkulaci v průběhu gravidity a pro diferenciaci mezi fyziologickým a patologickým průběhem gravidity ve stejném gestačním stádiu (*Hromadníková et al, 2010; Kotlabová et al, 2011; Hromadníková et al, 2012*).

### **3.2 Růstová retardace plodu**

Nitroděložní prostředí nemá vliv pouze na správný růst a vývoj plodu, ale také na riziko vzniku onemocnění v pozdějším životě. Omezený růst plodu lze biologicky charakterizovat jako selhání plodu ve splnění jeho růstového potenciálu, tedy je pod 5. nebo 10. percentilem normálního rozptylu pro příslušný týden těhotenství. Růstová retardace plodu představuje jednu z hlavních příčin perinatální morbidity a mortality (*Lubchenco et al, 1963*). Intrauterinní růstová retardace v rozmezí porodní váhy 501-1500 g je spojena se zvýšeným rizikem smrti novorozence, nekrotizující enterokolitidy a syndromu dechové tísně (*Bernstein et al, 2000*).

Příčiny růstové retardace mohou být mateřské, například závažnější choroby matky jako hypertenze a další (*Srinivas et al, 2009*), dále pak nízký příjem energie (poruchy výživy – mentální anorexie, bulimie) (*Lagiou et al, 2004*), kouření (*Dejmek et al, 2002*) a další, příčiny

růstové retardace mohou být i placentární, například špatná placentace, porucha tvorby placenty, preeklampsie (*Teasdale, 1984*). Růstová retardace je také spojena s vrozenými vývojovými vadami (*Chen et al, 1974; Khoury et al, 1988*).

Ve své studii publikované v roce 2011 se *Maccani et al* zaměřili na 6 kandidátních miRNA, u kterých již dříve bylo zjištěno, že se exprimují v placentě a vážou se na cílové geny, které jsou důležité v regulaci klíčových buněčných procesů – miR-16 (*Maccani et al, 2010*), miR-21 (*Maccani et al, 2010*), miR-93 (*Mouillet et al, 2010*), miR-135b (*Chim et al, 2008*), miR-146a (*Maccani et al, 2010*), miR-182 (*Pineles et al, 2007*). *Maccani et al* analyzovali expresi těchto kandidátních genů na 107 vzorcích lidských placent. Z analýzy vyplývá, že dvě ze zkoumaných miRNA souvisí s růstem plodu. Snížená exprese miR-16 a miR-21 významně souvisí s růstovou retardací plodu (*Maccani et al, 2011*). miR-21 je též asociována s řadou nádorových onemocnění, kde je naopak více exprimována (*Asangani et al, 2008; Chan et al, 2005; Iorio et al, 2005; Iorio et al, 2007; Meng et al, 2006; Meng et al, 2007; Roldo et al, 2006*). Dále bylo prokázáno, že i miR-16 se v řadě linií nádorových buněk podílí na indukcii apoptózy a regulaci buněčného cyklu (*Calin et al, 2008; Cimmino et al, 2005; Chen et al, 2008; Linsley et al, 2007*). V různých buněčných typech má miR-16 rozdílné funkce (*Kaddar et al, 2009*).

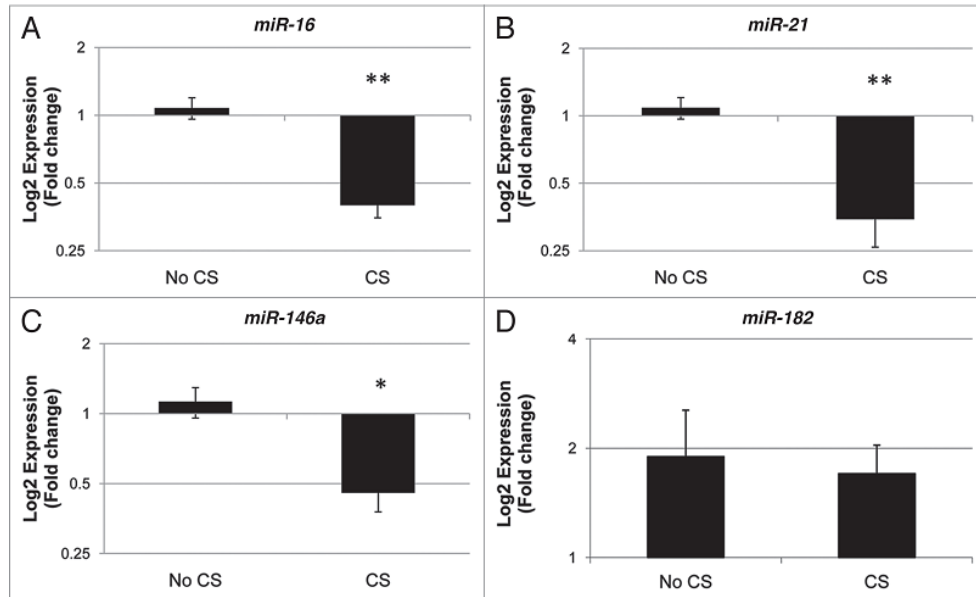
S růstovou retardací plodu souvisí kouření matek během těhotenství (*Dejmek et al, 2002; Esposito et al, 2008*). Expozice tabákovému kouři v průběhu těhotenství („pasivní kouření“) může být téměř stejně škodlivá, jako primární expozice při aktivním kouření matek (*Dejmek et al, 2002*). Vystavení jedovatým látkám *in utero*, například těm, které byly nalezeny v cigaretovém kouři, je spojeno se zvýšenou placentární disfunkcí a se snížením placentární funkce. Je to způsobeno tím, že i nízké dávky expozice tabákovému kouři během těhotenství způsobují významnou deregulaci transkripce v placentárních a fetálních buňkách (*Votavova et al, 2012*). Pokud matky kouří cigarety během těhotenství, dochází k down-regulaci miR-16, miR-21 a miR-146a v placentě. V této studii byla také zkoumána miR-182, u které ale down-regulace nebyla prokázána (*Maccani et al, 2010*), viz Figure 4.

*Maccani* s kolegy navrhli, že cílovými sekvencemi miR-21 jsou geny PLAG1 (Pleomorphic adenoma gene 1) a SATB1 (Special AT-rich sequence-binding protein 1). Oba tyto geny jsou transkripčními faktory podílejícími se na tkáňově specifické kontrole buněčného cyklu a buněčné proliferace. Down-regulace miR-21 způsobená pasivním kouřením může vést k nadprodukcii PLAG1 a SATB1 bílkovin (*Maccani et al, 2010*). Toto bych zmínila pouze na okraj jako příklad, jelikož signalizační dráhy vedoucí k regulaci

buněčného cyklu a proliferace jsou velmi komplexní a zde není prostor pro jejich podrobný popis.

Shrnutí na závěr: potlačením exprese těchto miRNA (miR-16, miR-21 a miR-146a) dochází k up-regulaci některých jejich cílových sekvencí, což může mít vliv na regulaci buněčného cyklu, imunomodulaci, růst a vývoj placenty. Změny placenty mohou mít další vliv na vývoj plodu.

**Figure 4**



Maccani et al (2010), Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21 and miR-146a in the placenta. *Epigenetics*, 57: 584

Pokud matka kouří cigarety během těhotenství, dochází k downregulaci miR-16, miR-21 a miR-146a. Byla použita kvantitativní RT-PCR analýza ke zkoumání exprese zralých forem miR-16 (A), miR-21 (B), miR-146a (C) a miR-182 (D) ve vzorcích primární placentární tkáně u plodů, jejichž matka kouřila cigarety (CS) během těhotenství (n=8), a u plodů, jejichž matka během těhotenství nekouřila (No CS, n=17). \*označuje  $p < 0.01$ , \*\*označuje  $p < 0.0001$  determinováno t-testem.

### 3.2.1 Diagnostika růstové retardace plodu

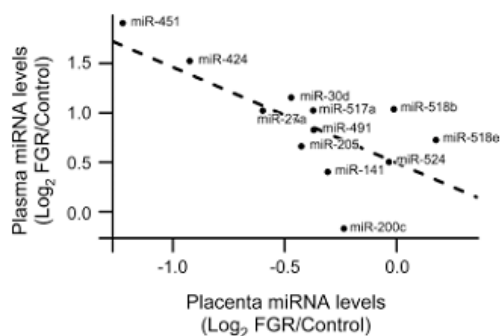
V předchozí části jsem se věnovala expresi miRNA v placentě, jejím změnám a roli v růstové retardaci plodu. V tomto oddíle bych se chtěla věnovat možnosti diagnostikovat růstovou retardaci plodu podle úrovně miRNA v plasmě těhotných žen.

Mouillet *et al* se ve své práci zaměřili na sledování relativních hladin cirkulujících miRNA pocházejících z placentárních buněk trofoblastu a souvisejících s hypoxií plodu. Nepodařilo se jim prokázat významné rozdíly v relativních hladinách individuálních miRNA, ale pokud miRNA považovali za skupinu, zjistili, že úrovně relativních hladin všech zkoumaných druhů miRNA byly zvýšeny v plasmě žen s těhotenstvím komplikovaným růstovou retardací plodu v porovnání s normálním těhotenstvím. Dále také zjistili, že celkové relativní hladiny miRNA

v placentě byly nižší než v těhotenství bez komplikací (*Mouillet et al, 2010*). To potvrzuje studie i Maccaniho *et al* (*Maccani et al, 2010*).

Existuje vztah mezi nárůstem miRNA v plazmě a poklesem miRNA v placentě žen s těhotenstvím komplikovaným růstovou retardací plodu (*Mouillet et al, 2010*), viz Figure 5.

**Figure 5**



*Mouillet et al (2010), The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction, Placenta, 31(9): 781-784*

Relativní změna úrovní miRNA ve vzorcích plazmy vynesena proti vzorkům placenty v těhotenství komplikovaném růstovou retardací plodu

### 3.3 Gestační diabetes mellitus (GDM)

Gestační diabetes mellitus (GDM) je definován jako jakýkoli stupeň glukózové intolerance s nástupem, nebo prvním rozpoznáním během těhotenství (*Reynolds, Hunt, 1981 - review*). Toto onemocnění postihuje přibližně 7% všech těhotenství. Prevalence se může pohybovat v rozmezí 1-14% všech těhotenství v závislosti na studované populaci a použitých diagnostických testech (*American Diabetes Association, 2004*). Přítomnost hyperglykémie může být spojena se zvýšeným rizikem nitroděložní smrti plodu během posledních 4-8 týdnů těhotenství. Přestože nekomplikovaný GDM s méně závažnou hyperglykémií není spojen se zvýšenou perinatální úmrtností, GDM bez ohledu na závažnost zvyšuje riziko vzniku makrosomie<sup>5</sup> plodu (*Boulet et al, 2003*). GDM je spojen se zvýšenou frekvencí hypertenzního onemocnění u matky a nutností císařského řezu (*HAPO Study Cooperative Research Group et al, 2008; Jang, 1997; Johns et al, 2006;*). Ženy s GDM mají zvýšené riziko diabetu po těhotenství (*Konarzewska, Wójcikowski, 2004*). Děti žen s GDM mají zvýšené riziko obezity, nesnášenlivosti glukózy a vzniku diabetu v pozdní adolescenci.

Hodnocení rizika vzniku GDM by mělo být provedeno při první prenatalní návštěvě. Věk nižší než 25 let, normální hmotnost před otěhotněním, příslušnost k etnické skupině s nízkou

<sup>5</sup> zvětšení celého těla, či jednotlivých orgánů plodu

prevalencí GDM, žádná známka diabetu u nejbližších příbuzných a žádná historie abnormální glukózové tolerance patří mezi nízko-rizikové faktory. Naopak mezi rizikové faktory GDM se řadí obezita, osobní historie GDM, glykosurie<sup>6</sup> a silná rodinná anamnéza diabetu. U všech žen se v těhotenství (ve 24.-28. týdnu) provádí test glukózové tolerance (*American Diabetes Association, 2004*).

### 3.3.1 Diagnostika GDM

Plasmatická hladina glukózy nalačno  $> 126$  ml/dl (7,0 mmol/l) nebo příležitostná hladina glukózy v plazmě  $> 200$  ml/dl (11,1 mmol/l) splňují práh pro stanovení diagnózy diabetu. Pokud není zjištěn tento stupeň hyperglykémie, tak se provádí hodnocení GDM u žen s průměrnými nebo vysoce-rizikovými vlastnostmi jedním ze dvou přístupů (*American Diabetes Association, 2004*).

Jedno-krokový přístup je diagnostický orální glukózový toleranční test (OGTT) bez předchozího plasmového nebo sérového screeningu glukózy. Tento test může být nákladově efektivní u vysoce rizikových pacientů nebo populace (*American Diabetes Association, 2004*).

Druhý přístup je dvou-krokový. Nejprve se provádí screening pomocí měření koncentrace glukózy v plazmě nebo séru jednu hodinu po orálním podání 50 g glukózy (glucose challenge test, GCT), dále se provede diagnostický OGTT u žen, které překročily prahovou hodnotu v GCT (*American Diabetes Association, 2004*).

GDM je obvykle diagnostikováno na konci druhého trimestru nebo na počátku třetího trimestru. Screening na bázi séra na GDM se obvykle začíná mezi 24.-28. týdnem těhotenství, nicméně užívaný dvou-krokový přístup nemůže být dokončen před 32. týdnem těhotenství (*American Diabetes Association, 2004*). Detekce žen s vyšším rizikem GDM na počátku těhotenství je požadovaným cílem, protože zásahy, jako je stravování, léčba a cvičení, by mohly být aplikovány dříve, což by mělo pozitivní vliv na matku i dítě.

mikroRNA jsou nutné pro vývoj pankreatu a regulaci glukózou stimulované sekrece inzulinu (*Lynn et al, 2007; Plaisance et al, 2006; Poy et al, 2004*). Bylo zjištěno, že miRNA jsou zapojeny do patogeneze diabetu, a že řada miRNA se jinak exprimuje v  $\beta$ -buňkách slinivky břišní (*Ouaamari et al, 2008*), játrech (*Zhao et al, 2009*), tukové tkáni (*Zhao et al, 2009*) a v kosterních svalech (*Huang et al, 2009*) zvířecích modelů 1. nebo 2. typu diabetu. Po objevení miRNA v lidském séru, se *Zhao et al* začali zabývat myšlenkou, že by sérové

---

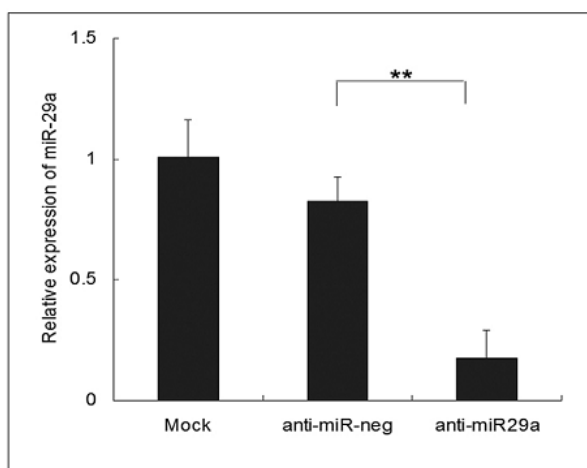
<sup>6</sup> přítomnost cukru (glukózy) v moči

miRNA mohly sloužit jako kandidátní biomarkery pro relativně brzkou predikci GDM v těhotenství.

V jejich studii měly případy a kontroly dobrou shodu ve věku, BMI, gestačním týdnem a graviditě. Byly objeveny tři mikroRNA (miR-132, miR-29a a miR-222), které měly signifikantně odlišnou expresi u žen s GDM ve srovnání s kontrolami (Zhao *et al*, 2011).

Insulinem indukovaný gen 1 (Insig1) byl prokázán jako cílový gen pro miR-29a. Krapivner *et al* prezentovali, že Insig1 hraje roli v homeostázi glukózy a že akce Insig1 souvisí se sterol regulačními vazebnými proteiny (SREBP). Insig1 je blokátorem proteolytické aktivace SREBPs, které ovlivňují geny regulující cholesterol a metabolismus mastných kyselin a nejspíš i geny podílející se na homeostázi glukózy, protože cílovým genem SREBPs je fosfenoalpyruvat karboxy kináza 2 (PCK2). Tím dochází ke zprostředkované regulaci PCK2, což je klíčový enzym v glykolýze a glukoneogenezi (Krapivner *et al*, 2007). Dále byl zkoumán vztah mezi expresí Insig1 a expresí miR-29a a následně změna exprese PCK2 (He *et al*, 2007). Zhao *et al* provedli pokus v HepG2 buňkách (buněčná linie lidského karcinomu jater) a zjistili, že exprese miR-29a významně poklesla, pokud byly tyto buňky transfektovány<sup>7</sup> anti-miR-29a (miRNA inhibitor sekvenčně specifický a chemicky upravený pro přesné zacílení a vyřazení individuální miRNA molekuly, též označovaný jako hsa-mir-29a (Gene-pharma)) ve srovnání s buňkami, které byly transfektovány anti-miR-neg, viz Figure 6. To mělo vliv na expresi Insig1 proteinu v HepG2 buněčné linii, došlo ke zvýšení exprese Insig1, když byla miR-29a down-regulována. Buňky s down-regulovanou miR-29a měly také významně zvýšenou expresi mRNA pro PCK2 (Zhao *et al*, 2011), viz Figure 7.

**Figure 6**

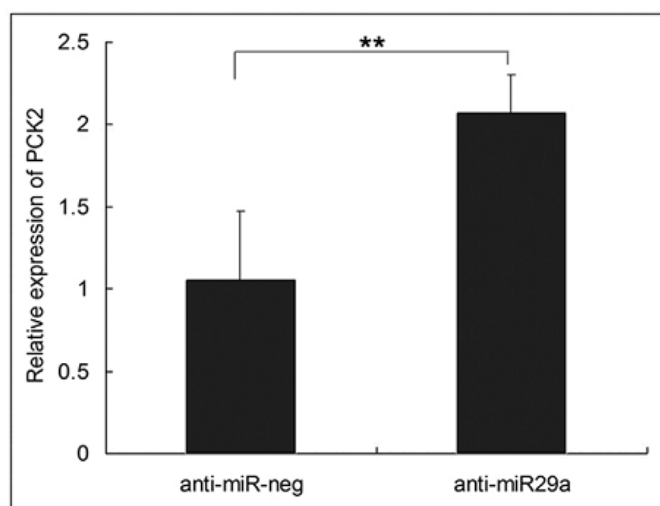


Zhao *et al* (2011), *Early Second-Trimester Serum MiRNA Profiling Predicts Gestational Diabetes Mellitus*, *PloS ONE*, 6: e23925

Expresí miR-29a v HepG2 buňkách transfektovaných 100 nM anti-miR-29a, anti-miR-neg nebo mock (falešný) k určení efektivnosti anti-miR-29a

<sup>7</sup> infikování hostitelské buňky nukleovou kyselinou bez proteinového obalu

**Figure 7**



*Zhao et al (2011), Early Second-Trimester Serum MiRNA Profiling Predicts Gestational Diabetes Mellitus, PLoS ONE, 6: e23925*

Expres PCK2 v HepG2 buňkách transfekovaných 100 nM anti-miR-29a, anti-miR-neg k determinaci miR-29a regulace exprese PCK2

Expres miR-29a v séru poklesla ještě před zvýšením sérové glukózy (*Zhao et al, 2011*).

↓ miR-29a → ↑ Insig1 → ↓ aktivace SREBP → ↑ PCK2 → ↑ glukózy v séru ⇒ GDM

Závěrem bych chtěla říct, že miR-29a je tedy negativním regulátorem množství glukózy v séru.

Biologické funkce miR-222 a miR-132 v GDM nejsou dosud jasné (*Zhao et al, 2011*).

Pokud to shrnu, bylo ukázáno, že exprese miRNA (miR-29a, miR-222, miR-132) byly rozdílně vyjádřeny u žen s GDM a kontrol. Klinické použití těchto mikroRNA v predikci GDM ještě vyžaduje další výzkum a optimalizaci.

### **3.4 Rakovina prsu**

Rakovina prsu je nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu u žen po celém světě. Příčiny onemocnění jsou jak genetické, tak enviromentální. Celosvětově se odhaduje, že každý rok je diagnostikována rakovina prsu více než jednomu milionu žen a více než 410 tisíc zemře na tuto nemoc (*Coughlin, Ekwueme, 2009 – review*). Lepší diagnostické přístupy jsou nezbytně nutné pro včasné odhalení případů rakoviny prsu, tím by se výrazně zvýšila míra přežití pacientek.

#### **3.4.1 Diagnostika rakoviny prsu**

V současné době mezi diagnostické nástroje patří mammograf, nicméně tento přístroj má své limitace, včetně používání ionizujícího záření a míry falešné positivity v rozmezí 8-10% (*Taplin et al, 2008*).



Výzkum se zaměřil na hledání citlivého, specifického a co nejméně invazivního biomarkeru, který by bylo možné použít k detekci časných nádorových změn a tím usnadnit detekci rakoviny prsu v raném stádiu. Bylo by dobré, kdyby se tento marker dal také využít ke sledování odpovědi pacientek na léčbu. Heneghan *et al* se ve své studii jako první zaměřili na cirkulující miRNA u pacientek s rakovinou prsu a zjistili, že genové exprese miR-195 a let-7a jsou signifikantně vyšší v krvi pacientek s rakovinou prsu v porovnání se zdravými kontrolami, viz Tabulka 2 a Figure 8. Z grafu také vyplývá, že dva týdny po resekci tumoru došlo ke snížení genové exprese miR-195 a let-7a na úroveň, která se vyskytuje u zdravých kontrol. Pacientky s rakovinou prsu od kontrol bylo možné odlišit s vysokou specifitou a senzitivitou. Tato studie je také první, která pro detekci a kvantifikaci miRNA upřednostnila plnoperiferní krev před plasmou nebo sérem, vzorky krve pacientů a kontrolních osob byly srovnatelné v úrovních bílých krvinek, hemoglobinu, hematokritu. V této studii dále zaznamenali značný nárůst genové exprese miR-195 u metastatizující rakoviny prsu v porovnání s raným stádiem rakoviny (Heneghan *et al*, 2010).

V navazující studii Heneghan *et al* zjistili, že zvýšená genová exprese miR-195 je specifická pro rakovinu prsu a lze tak rozlišit rakovinu prsu od dalších druhů rakovin a od kontrol se senzitivitou 88% a specifitou 91% (Heneghan *et al*, 2010).

Jiná skupina publikovala, že miR-21, miR-106, miR-155 měly v séru u pacientek s rakovinou prsu zvýšenou relativní expresi v porovnání se zdravými kontrolami a miR-126, miR-199a, miR-335 měly sníženou expresi v séru u pacientek s rakovinou prsu ve srovnání s kontrolami. V téže studii bylo také prokázáno, že relativní exprese miRNA je úzce spjata s klinickopatologickými rysy rakoviny prsu, jako je histologický stupeň nádoru a exprese receptorů pohlavních hormonů, viz Figure 9 (Wang *et al*, 2010).

**Tabulka 2**

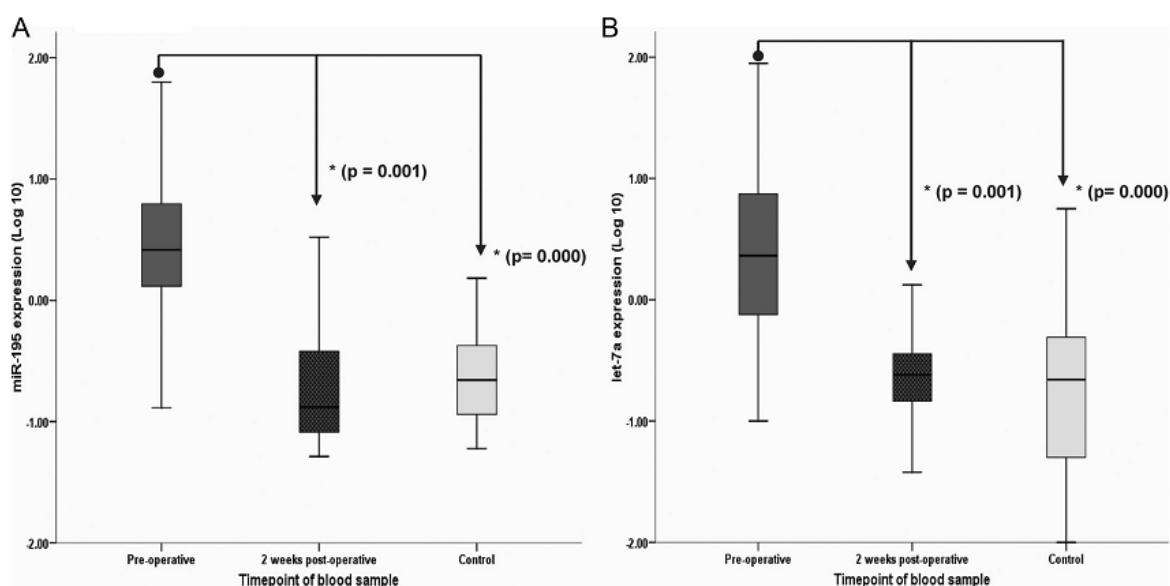
**TABLE 3.** Mean RQ Expression Levels (SD) of Target miRNAs in Blood From Breast Cancer Patients Compared With Blood From Healthy Controls

| Target miRNA   | Breast Cancer Blood Samples (n = 83) | Control Blood Samples (n = 44) | Mean Fold Change in miRNA Expression in Breast Cancer Blood Compared to Controls | P      |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------|--|--------|
| <i>miR-10b</i> | 1.05 (3.03)                          | 0.83 (0.83)                    | 1.27   | 0.449  |
| <i>miR-21</i>  | 3.52 (10.30)                         | 2.69 (7.47)                    | 1.31   | 0.606  |
| <i>miR-145</i> | 3.58 (7.29)                          | 1.65 (4.14)                    | 2.17   | 0.062  |
| <i>miR-155</i> | 2.92 (6.23)                          | 1.77 (4.48)                    | 1.65   | 0.280  |
| <i>miR-195</i> | 6.91 (12.17)                         | 0.36 (0.43)                    | 19.25  | <0.001 |
| <i>let-7a</i>  | 5.05 (24.33)                         | 0.45 (0.9)                     | 11.20  | <0.001 |

Heneghan *et al* (2010), *Circulating microRNAs as Novel Minimally Invasive Biomarkers for Breast Cancer, Annals of Surgery*, 251: 501

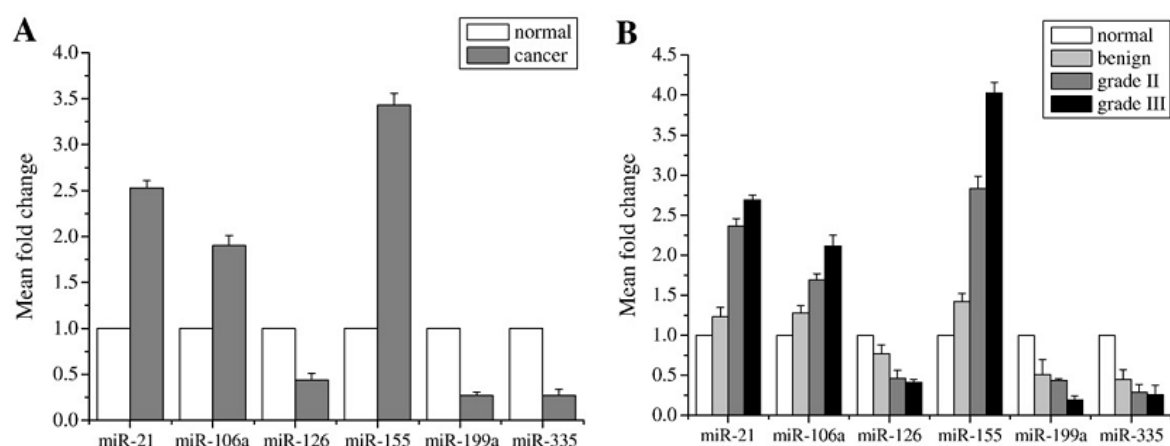
Průměrné RQ úrovně exprese (SD) cílových miRNA v krvi od pacientek s rakovinou prsu ve srovnání s krví od zdravých kontrol

**Figure 8**



Heneghan et al (2010), *Circulating microRNAs as Novel Minimally Invasive Biomarkers for Breast Cancer, Annals of Surgery, 251: 502*  
 Úroveň exprese miR-195 (A) a let-7a (B) v preoperativních (n=83) a postoperativních (n=29) vzorcích krve pacientek s rakovinou prsu a kontrol (n=44). Dva týdny po operaci bylo pozorováno signifikantní snížení průměrné exprese miR-195 a let-7a, dosažené hladiny exprese byly srovnatelné s kontrolními subjekty.

**Figure 9**



Wang et al. (2010), *Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor, Gynecologic Oncology, 119: 590*

Korelace biopatologických rysů invazivního karcinomu prsu s relativní úrovní exprese šesti vybraných miRNA v séru. (A) Srovnání exprese miRNA v séru pacientek s rakovinou prsu a zdravých kontrol. (B) Porovnání exprese miRNA v séru žen, které měly různý stupeň rakoviny prsu.

Byly provedeny další studie, které byly zaměřeny na různé miRNA. Zde bych vzhledem k omezenému rozsahu práce uvedla pouze závěry, ke kterým se výzkumné skupiny dopracovaly. Byly zaznamenány odlišné koncentrace miR-16, miR-21, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-25, miR-103, miR-29a, miR-222, miR-324-3p v séru pacientek s rakovinou prsu ve srovnání se zdravými kontrolami (Asaga et al, 2011; Hu et al, 2012; Wu et al, 2011; Wu et al, 2012).

## **4 Metodika**

### **4.1 Odběr krve**

Pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky jsou odebírány vzorky periferní krve matky (10-12 ml) do zkumavek obsahujících EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová). Tímto dochází k vyvazování vápníku a krev se tak stává nesrážlivou (*Hromadníková et al, 2006; Chim et al, 2008*).

### **4.2 Separace plasmy z nesrážlivé periferní krve**

Pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky se používá plasma i sérum. Zde budu demonstrovat separaci plasmy z nesrážlivé periferní krve matky, která se získává odběrem krve do zkumavek EDTA. Separace plasmy se provádí centrifugací vzorků mateřské krve, krev se centrifuguje dvakrát (*Chim et al, 2008*). Nejlepších výsledků je dosahováno při menší odstředivé síle (přibližně 1 200-1 600g), jelikož při použití větší odstředivé síly klesá celkové množství nukleových kyselin, včetně fetálních.

### **4.3 Izolace miRNA z plazmy**

Nejprve se extrahuje celková RNA pomocí Trizol LS. miRNA izolační kit slouží k obohacení krátkých miRNA z celkové RNA. DNA kontaminace se odstraní pomocí DNasa I (*Chim et al, 2008*).

### **4.4 Polymerázová řetězcová reakce**

#### **4.4.1 Historie:**

miRNA profilace je důležitým nástrojem pro identifikaci rozdílné exprese miRNA v normálních a patofyziologických procesech.

Používaly se tři techniky k detekci a kvantifikaci miRNA, klonování, hybridizace se selektivními sondami a polymerázová řetězcová reakce (PCR).

Klonovací strategie identifikovala v počátcích velké množství miRNA a ukázala, že se miRNA vyskytují u mnoha druhů, jak rostlinných, tak živočišných (*Lagos-Quintana et al, 2001*). Klonovací metoda však není vhodná pro rozsáhlé detekce stovek miRNA, z tohoto hlediska je časově náročná a nepraktická. Byly používány i další metody, které se ale ukázaly pro amplifikaci miRNA nevhodné. Tímto se dostáváme k PCR. Techniky založené na PCR jsou schopné detekovat malý počet kopií jednotlivých miRNA s vysokou citlivostí a specifičností.

#### **4.4.2 Reverzně-transkripční polymerázová řetězcová reakce**

Reverzně-transkripční polymerázová řetězcová reakce (RT-PCR) je kombinací reversní transkripcie a PCR. Může profilovat expresi miRNA pouze na nanogramech celkové RNA

nebo dokonce na jedné buňce (*Chen C. et al, 2005; Tang et al, 2006*). RT-PCR je metoda, která nejprve přepíše miRNA do cDNA (komplementární) a poté tuto cDNA amplifikuje pomocí PCR. K přepisu miRNA do cDNA jsou použity reverzní transkriptázy (RNA dependentní DNA polymerázy). V současné době kvantitativní RT-PCR užívající array metodu (qPCR-array) mohou kombinovat vysokou specifitu RT-PCR s možností profilovat velké množství miRNA v jednom experimentu (*Mestdagh et al, 2008*).

V pokusu, který provedl *Chim et al*, byla použita ke kvantifikaci miRNA kvantitativní RT-PCR analýza v reálném čase. Použili TaqMan MicroRNA Assay, u kterého byla prokázána vysoká specifita k určité miRNA, ale ne pro její delší prekurzory nebo jiné vysoce homologní miRNA, které se v sekvenci liší v jediném nukleotidu. *Chen et al* navrhli nové schéma RT-PCR v reálném čase pro kvantifikaci miRNA, viz Figure 10. Zahrnuje dva kroky: reverzní transkripci a PCR v reálném čase (viz kapitola 4.4.3 PCR v reálném čase). V prvním kroku je vlásenkový RT primer hybridizován k miRNA molekule a pak je reverzně transkribován s MultiScribe reverzní transkriptázou. Dále je produkt reverzní transkripce kvantifikován pomocí TaqMan PCR v reálném čase (*Chen C. et al, 2005; Chim et al, 2008*).

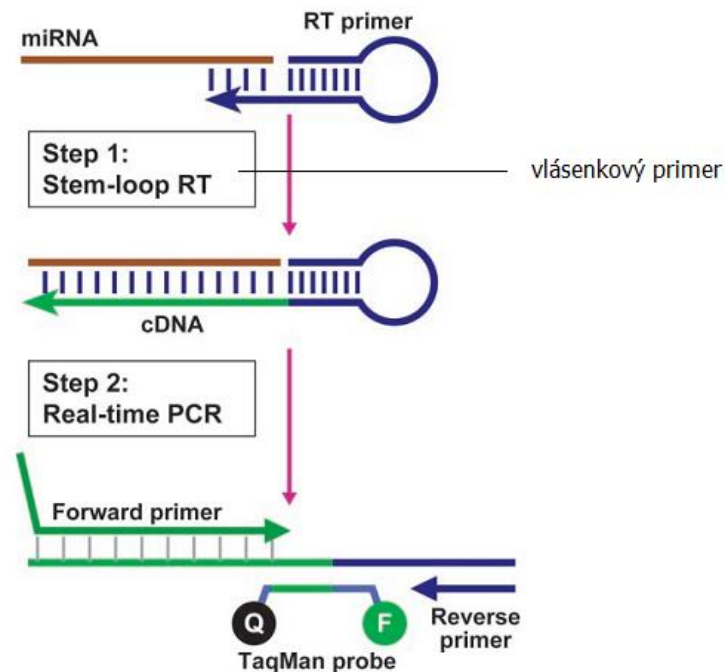
#### **4.4.3 PCR v reálném čase**

Název PCR v reálném čase plně odpovídá, jelikož tato metoda umožňuje sledovat kvantifikaci cDNA (cDNA komplementární k dané miRNA vznikla v procesu reverzní transkripce) monitorováním fluorescence emitované v průběhu polymerázové řetězcové reakce (indikátoru amplifikace požadované cDNA) v každém cyklu. Pro záznam amplifikace se využívají detekční sondy. Sondy se vážou specificky nebo nespecificky na amplifikovanou cDNA.

Nespecifické sondy mají větší riziko falešně pozitivních signálů při tvorbě nespecifických vazeb, proto se při zjišťování hladin cDNA v prenatální diagnostice nevyžívají. V předchozím oddílu jsem zmiňovala TaqMan sondy. TaqMan sondy patří mezi sondy tvořící specifickou vazbu s cílovou sekvencí. Testování pomocí TaqMan je založeno na 5' nukleázové aktivitě Taq polymerázy, která rozštěpí a nahradí oligonukleotidovou sondu hybridizovanou s cílovou molekulou cDNA (*Holland et al, 1991*). TaqMan sonda obsahuje na svém 5' konci fluorescenční barvu, která je označována jako „reportér“, a na svém 3' konci fluorescenční barvu označovanou jako „quencher“ (zhášec). Pokud není sonda rozštěpena, quencher inhibuje fluorescenční signál reportéru. Po rozštěpení sondy se reportér odštěpí od zhášec, nedochází tak k redukci fluorescence reportéru a fluorescence je umožněna (*Heid et al, 1996; Lee L. G. et al, 1993*), viz Figure 11.

Pro absolutní kvantifikaci hladin nukleových kyselin, případně miRNA, je nutné vytvořit standardní křivku DNA o známé koncentraci. Pro relativní kvantifikaci se nejčastěji využívá komparativní Ct metody (Livak, Schmittgen, 2001).

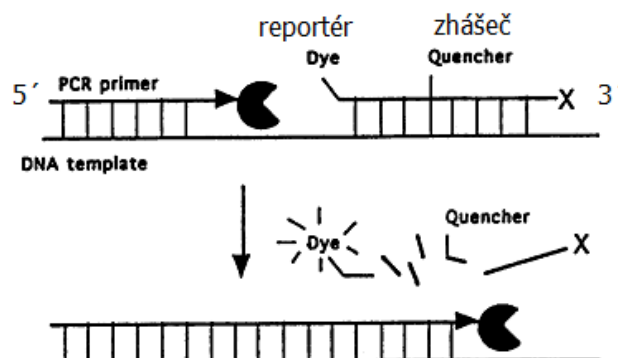
**Figure 10**



Chen C et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 33: e179

Schématický popis TaqMan miRNA assay. TaqMan založená na kvantifikaci miRNA v reálném čase obsahuje dva kroky, reverzní transkripci a PCR v reálném čase. Vlásokový RT primer se váže na 3' konec miRNA molekuly a je reverzně transkribován pomocí reverzní transkriptázy. Pak je RT produkt kvantifikován konvenční TaqMan PCR, která zahrnuje miRNA specifický přímý primer, reverzní primer a barevně značené TaqMan sondy. Teplota tání se mění v závislosti na složení sekvence miRNA molekuly.

**Figure 11**



Lee L.G. et al (1993), Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Res.*, 21: 3761-3766

Použití fluorescenčních sond během PCR

## Závěr

Po objevení extracelulárních mikroRNA se začalo přemýšlet nad jejich využitím v diagnostice a predikci těhotenských komplikací a nádorového bujení. S postupem času se hledají mikroRNA specifické pro určité tkáně, aby byly patologie s nimi spojené diagnostikovány co nejpřesněji.

Pro diferenciaci mezi fyziologickým a patologickým průběhem gravidity bylo vybráno 7 mikroRNA (miR-516-5p, miR-517\*, miR-518b, miR-520a\*, miR-520h, miR-525, miR-526a), které by v dalších studiích mohly prokázat význam v diagnostice a predikci jedné z nejzávažnějších těhotenských komplikací, preeklampsii.

Ve výzkumu zabývajícím se těhotenstvím komplikovaným růstovou retardací se dosud nepodařilo prokázat významné rozdíly v relativních hladinách individuálních miRNA obsažených v plazmě. Když se výzkum zaměřil na miRNA jako na skupinu, bylo zjištěno, že úroveň relativních hladin všech zkoumaných druhů miRNA byly zvýšeny v plazmě žen s těhotenstvím komplikovaným růstovou retardací plodu v porovnání s normálním těhotenstvím.

Ženy s gestačním diabetem měly v séru rozdílně vyjádřené exprese miRNA (miR-29a, miR-222, miR-132) v porovnání se zdravými kontrolami.

Genové exprese miR-195 a let-7a byly prokázány signifikantně vyšší v plné krvi pacientek s rakovinou prsu v porovnání se zdravými kontrolami. Dále bylo zjištěno, že zvýšení exprese miR-195 v plnoperiferní krvi je specifické pro rakovinu prsu. Toto zjištění by v budoucnu po dalším výzkumu umožnilo rozlišit rakovinu prsu od dalších druhů rakovin a od zdravých jedinců. Jiná skupina publikovala, že miR-21, miR-106, miR-155 měly v séru u pacientek s rakovinou prsu zvýšenou relativní expresi v porovnání se zdravými kontrolami a miR-126, miR-199a, miR-335 měly sníženou expresi v séru pacientek s rakovinou prsu ve srovnání s kontrolami. V téže studii bylo také prokázáno, že exprese miRNA je úzce spjata s klinickopatologickými rysy rakoviny prsu, jako je histologický stupeň nádoru a exprese receptorů pohlavních hormonů.

Ve spojení s nejrůznějšími patologiemi bylo zkoumáno velké množství extracelulárních mikroRNA, ale klinické použití mikroRNA v diagnostice a predikci onemocnění ještě vyžaduje další výzkum a optimalizaci.

V budoucnu, po rozpoznání konkrétních funkcí jednotlivých mikroRNA, by se daly zjištěné poznatky využít k zabránění rozvoje onemocnění pomocí genové terapie, například pomocí zásahů do regulace transkripce.

## Reference:

- Abe E., Matsubara K., Oka K., Kusanagi Y., Ito M. (2008), Cytokine Regulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression on Trophoblasts in Preeclampsia, *Gynecol Obstet Invest.*, 66: 27-33
- Admyre C., Johansson S. M., Qazi K. R., Filen J. J., Lahesmaa R., Norman M., Neve E. P. A., Scheynius A., Gabrielsson S. (2007), Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk, *J Immunol*, 179: 1969-1978
- American Diabetes Association (2004), Gestational Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 27: 588-590
- Arngrimsson R., Bjornsson S., Geirsson R. T., Bjornsson H., Walker J. J., Snaedal G. (1990), Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population, *Br J Obstet Gynaecol*, 97: 762-769
- Asaga S., Kuo Ch., Nguyen T., Terpenning M., Giuliano A. E., Hoon D. S. B. (2011), Direct Serum Assay for MicroRNA-21 Concentrations in Early and Advanced Breast Cancer, *Clinical Chemistry*, 57 (1): 84-91
- Asangani I. A., Rasheed S. A. K., Nikolova D. A., Leupold H., Colburn N. H., Post S., Allgayer H. (2008), MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer, *Oncogene*, 27: 2128-2136
- Avery O. T., MacLeod C. M., McCarty M. (1944), Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types., *J Exp Med*, 79:137-158
- Bernstein I. M., Horbar J. D., Badger G. J., Ohlsson A., Golan A. (2000), Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network, *Am J Obstet Gynecol.*, 182: 198-206
- Bohnsack M. T., Czaplinski K., Görlich D. (2004), Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs, *RNA*, 10: 185-191
- Bohn H., Krause W., Winckler W. (1983), Purification and characterization of two new soluble placental tissue proteins (PP-13 and PP17), *Oncodev Biol Med*, 4: 343-350
- Bonney V. (1914), A Case of " Pre-eclampsia" at the Twenty-fourth Week; Acute Toxemia; Cesarean Section, *Proc R Soc Med.*, 7: 118-121
- Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G., Shelepov V., Alechina R., Molyaka Y., Anan'ev V., Bazin I., Garin A., Narimanov M., Knysh V., Melkonyan H., Umansky S., Lichtenstein A. (2000), Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism, *Clin. Chem.*, 46: 1078-1084
- Boulet S. L., Alexander G. R., Salihu H. M., Pass M. (2003), Macrosomic births in the United States: Determinants, outcomes, and proposed grades of risk *Am J Obstet Gynecol*, 188: 1372-1378
- Burger O., Pick E., Zwickel J., Klayman M., Meiri H., Slotky R., Mandel S., Rabinovitch L., Paltieli Y., Admon A., Gonen R. (2004), Placental protein 13 (PP-13): Effect on Cultured Trophoblasts, and Its Detection in Human Body Fluids in Normal and Pathological Pregnancies, *Placenta*, 25: 608-622
- Calin G. A., Cimmino A., Fabbri M., Ferracin M., Wojcik S. E., Shimizu M., Taccioli C., Zanesi N., Garzon R., Aqeilan R. I., Alder H., Volinia S., Rassenti L., Liu X., Liu Ch.-g., Kipps T. J., Negrini M.,

- Croce C. M. (2008), MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105: 5166-5171
- Cimmino A., Calin G. A., Fabbri M., Iorio M. V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S. E., Aqeilan R. I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu Ch.-g., Kipps T. J., Negrini M., Croce C. M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102: 13944-13949
- Cincotta R. B., Brennecke S. P. (1998), Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas, *Int J Gynaecol Obstet*, 60: 23-27
- Coughlin S. S., Ekwueme D. U. (2009), Breast cancer as a global health concern, *Cancer Epidemiol.*, 33(5): 315-318.
- Dejmek J., Solanský I., Podrazilová K., Šrám R. J. (2002) The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth, *Environmental Health Perspectives*, 110: 601-606
- Denli A. M., Tops B. B., Plasterk R. H., Ketting R. F., Hannon G. J. (2004), Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex, *Nature*, 432: 231-235
- Driul L., Damante G., D'Elia A., Springolo F., Ianni A., Di Leonardo C., Angelini M., Marchesoni D. (2004), Screening for pre-eclampsia in a low-risk population at 24 weeks: uterine artery Doppler flow velocimetry and genetic variants of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase, *Minerva Ginecol*, 56: 385-90
- Esplin M. S., Fausett M. B., Fraser A., Kerber R., Mineau G., Carrillo J., Varner M. W. (2001), Paternal and Maternal Components of the Predisposition to Preeclampsia, *N Engl J Med*, 344: 867-872
- Emlen W., Mannik M. (1984), Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA, *Clin. exp. Immunol.*, 56: 185-192
- Esplin M. S., Fausett M. B., Fraser A., Kerber R., Mineau G., Carrillo J., Varner M. W. (2001), Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia, *N Engl J Med*, 344: 867-872
- Esposito E. R., Horn K. H., Greene R. M., Pisano M. M. (2008) An animal model of cigarette smoke-induced in utero growth retardation, *Toxicology*, 246: 193-202
- Fan H. Ch., Blumenfeld Y. J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S. R. (2010), Analysis of the Size Distributions of Fetal and Maternal Cell-Free DNA by Paired-End Sequencing, *Clinical Chemistry*, 56: 1279-1286
- Fauré J., Lachenal G., Court M., Hirrlinger J., Chatellard-Causse C., Blot B., Grange J., Schoehn G., Goldberg Y., Boyer V., Kirchhoff F., Raposo G., Garin J., Sadoul R. (2006), Exosomes are released by cultured cortical neurones, *Mol. Cell. Neurosci.*, 31: 642-648
- Filippov V., Solovyev V., Filippova M., Gill S. S. (2000), A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes, *Gene*, 245: 213-221
- Franěk F., Dolníková J. (1991), Nucleosomes occurring in protein-free hybridoma cell culture: evidence for programmed cell death, *FEBS Lett.* 284: 285-287
- Gahan P. B., Chayen J. (1965), Cytoplasmic deoxyribonucleic acid., *Int Rev Cytol*, 18:223-248
- Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G. G. (2012), The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes, *PLoS ONE*, 7(3): e30679



- Gregory R. I., Chendrimada T. P., Cooch N., Shiekhattar R. (2005), Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing, *Cell*, 123: 631-640
- Giacona M. B., Ruben G. C., Iczkowski K. A., Roos T. B., Porter D. M., Sorenson G. D. (1998), Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls, *Pancreas*, 17: 89-97
- Griffith F. (1928), The significance of Pneumococcal types. *J Hyg* 27: 113–159
- Grishok A, Pasquinelli A. E., Conte D., Li N., Parrish S., Ha I., Baillie D. L., Fire A., Ruvkun G., Mello C.C (2001), Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing, *Cell*, 106: 23-34
- Hammond S. M., Boettcher S., Caudy A. A., Kobayashi R., Hannon G. J. (2001), Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi, *Science*, 293: 1146-1150
- Han J., Lee Y., Yeom K-H., Kim Y-K., Jin H., Kim V. N. (2004), The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing, *Genes Dev*, 18: 3016-3027
- HAPO Study Cooperative Research Group, Metzger B. E., Lowe L. P., Dyer A. R., Trimble E. R., Chaovarindr U., Coustan D. R., Hadden D. R., McCance D. R., Hod M., McIntyre H. D., Oats J. J., Persson B., Rogers M. S., Sacks D. A. (2008), Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes, *N Engl J Med.*, 358 (19): 1991-2002
- He A., Zhu L., Gupta N., Chang Y., Fang F. (2007), Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes, *Mol Endocrinol*, 21: 2785-2794
- Heid Ch. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. (1996), Real Time Quantitative PCR, *Genome Res.*, 6: 986-994
- Heneghan H. M., Miller N., Kelly R., Newell J., Kerin M. J. (2010), Systemic miRNA-195 Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease, *The Oncologist*, 15: 673-682
- Heneghan H. M., Miller N., Lowery A. J., Sweeney K. J., Newell J., Kerin M. J. (2010), Circulating microRNAs as Novel Minimally Invasive Biomarkers for Breast Cancer, *Annals of Surgery*, 251: 499-505
- Hisazumi J., Kobayashi N., Nishikawa M., Takakura Y. (2004), Significant role of liver sinusoidal endothelial cells in hepatic uptake and degradation of naked plasmid DNA after intravenous injection, *Pharm Res*, 21: 1223-1228
- Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H. (1991), Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7276-7280
- Hromadníková I., Kotlabová K. (2010), Placentárně specifické mikroRNA přítomné v mateřské cirkulaci a jejich potenciální význam pro diagnostiku a predikci těhotenských komplikací souvisejících s placentární insuficiencí, *Actual. Gyn.*, 2: 3-4

- Hromadnikova I., Kotlabova K., Doucha J., Dlouha K., Krofta L. (2012), Absolute and Relative Quantification of Placenta-Specific MicroRNAs in Maternal Circulation with Placental Insufficiency-Related Complications, *J Mol Diagn.*, 14(2): 160-167
- Hromadníková I, Kotlabová K, Jirásek JE, Doucha J. (2010), Detekce placentárně specifických mikroRNA v mateřské cirkulaci, *Čes.Gynek.*, 75(3): 257-261
- Hromadníková I., Žejšková L., Doucha J., Wagenknecht D. (2006), Neinvazivní prenatalní diagnostika z periferní krve matky je prováděna na fragmentové extracelulární fetální DNA o velikosti < 500 bp, *Trans. Hemat. dnes*, 2: 95-99
- Hu Z., Dong J., Wang L.-E., Ma H., Liu J., Zhao Y., Tang J., Chen X., Dai J., Wei Q., Zhang Ch., Shen H. (2012), Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls, *Carcinogenesis*, vol.0 no.0 pp.1-7, 2012
- Huang B., Qin W., Zhao B., Shi Y., Yao C., Li J., Xiao H., Jin Y. (2009), MicroRNA expression profiling in diabetic GK rat model, *Acta Biochim Biophys Sin*, 41:472-477
- Hutvagner G., Zamore P. D. (2002), A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex, *Science*, 297: 2056-2060
- Chan J. A., Krichevsky A. M., Kosik K. S. (2005), MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells, *Cancer Res*, 65: 6029-6033
- Chan K. C. A., Zhang J., Hui A. B. Y., Wong N., Lau T. K., Leung T. N., Lo K.-W., Huang D. W. S., Lo Y. M. D. (2004), Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma, *Clin Chem* 50: 88-92
- Chen A. T., Falek A., Lester W. (1974), Chromosome aberrations in full-term low birth weight neonates, *Humangenetik*, 21(1): 13-6
- Chen C., Ridzon D. A., Broomer A. J., Zhou Z., Lee D. H., Nguyen J. T., Barbisin M., Xu N. L., Mahuvakar V. R., Andersen M. R., Lao K. Q., Livak K. J., Guegler K. J. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 33: e179.
- Chen R. W., Bemis L. T., Amato C. M., Myint H., Tran H., Birks D. K., Eckhardt S. G., Robinson W. A. (2008), Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma, *Blood*, 112: 822-829
- Chendrimada T. P, Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. (2005), TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing, *Nature*, 436: 470-474
- Cherepanova A. V., Tamkovich S. N., Bryzgunova O. E., Vlassov V. V., Laktionova P. P. (2008), Deoxyribonuclease Activity and Circulating DNA Concentration in Blood Plasma of Patients with Prostate Tumors, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1137: 218-221
- Chim S. S. C., Shing T. K. F., Hung E. C. W., Leung T.-y., Lau T.-k., Chiu R. W. K., Lo I. M. D. (2008), Detection and characterization of placenta microRNAs in maternal plasma, *ClinChem*, 54(3): 482-490
- Chused . M., Steinberg A. D., Talal N. (1972), The clearance and localization of nucleic acids by New Zeland and normal mice, *Clin. exp. Immunol.*, 12: 465-476

- Iorio M. V., Ferracin M., Liu C.-G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Ménard S., Palazzo J. P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G. A., Querzoli P., Negrini M., Croce M. C. (2005), MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer, *Cancer Res*, 65: 7065-7070
- Iorio M. V., Visone R., Di Leva G., Donati V., Petrocca F., Casalini P., Taccioli C., Volinia S., Liu C.-G., Alder H., Calin G. A., Ménard S., Croce C. M. (2007), MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 67: 8699-8707
- Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F. O., Hesch R. D., Knippers R. (2001), DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells, *Cancer Res.*, 15: 1659-1665
- Jang H. C., Cho N. H., Yong-Ki M., In K. H. (1997), Increased macrosomia and perinatal morbidity independent of maternal obesity and advanced age in Korean women with GDM, *Diabetes Care*, 20: 1582-1588
- Johns K., Olynik C., Mase R., Kreisman S., Tildesley H. (2006), Gestational diabetes mellitus outcome in 394 patients, *J Obstet Gynaecol Can*, 28: 122-127
- Johnstone R. M., Adam M., Hammond J. R., Orr L., Turbide C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.*, 262: 9412-9420
- Kaddar T., Rouault J. P., Chien W. W., Chebel A., Gadoux M., Salles G., Ffrench M., Magaud J. P. (2009) Two new miR-16 targets: caprin-1 and HMGA1, proteins implicated in cell proliferation, *Biol Cell.*, 101: 511-524
- Kawabata K., Takakura Y., Hashida M. (1995), The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake, *Pharm. Res.*, 12: 825-830
- Kawasaki H., Taira K. (2003), Functional analysis of microRNAs during the retinoic acid- induced neuronal differentiation of human NT2 cells, *Oxford University Press*, 3: 243-244
- Keller S., Rupp C., Stoeck A., Runz S., Fogel M., Lugert S., Hager H.-D., Abdel-Bakky M. S., Gutwein P., Altevogt P. (2007), CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid, *Kidney International*, 72: 1095-1102
- Khoury M. J., Erickson J. D., Cordero J. F., McCarthy B. J. (1988), Congenital Malformations and Intrauterine Growth Raterdation: A Population Study, *Pediatrics*, 82: 83-90
- Konarzewska J., Wójcikowski C. (2004), [Risk of diabetes mellitus after pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus (GDM)], *Ginekol Pol.*, 75(10): 754-759
- Kotlabová K., Doucha J., Hromadníková I. (2011) Placental-specific microRNA in maternal circulation – identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential, *Journal of Reproductive Immunology*, 89: 185-191
- Krapivner S., Chernogubova E., Ericsson M., Ahlbeck-Glader C., Hamsten A., van't Hooft F. M. (2007), Human evidence for the involvement of insulin-induced gene 1 in the regulation of plasma glucose concentration, *Diabetologia*, 50: 94-102
- Lagiou P., Tamimi R. M., Mucci L. A., Adami H.-O., Hsieh C.-C., Trichopoulos D. (2004), Diet during pregnancy in relation to maternal weight gain and birth size, *European Journal of Clinical Nutrition*, 58: 231-237

- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853-858
- Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. (1993), Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Res.*, 21: 3761-3766
- Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. (1993), The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 75: 843-854
- Lee Y., Jeon K., Lee J-T., Kim S., Kim V. N. (2002), MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization, *EMBO J*, 21(17): 4663–4670
- Lee Y., Ahn Ch., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark O., Kim S., Kim V. N. (2003), The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, 425: 415-419
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. (2004), MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *EMBO J.*, 23: 4051-4060
- Leon S. A., Shapiro B., Sklaroff D. M., Yaros M. J. (1977), Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy, *Cancer Res*, 37: 646-650
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. (2004), Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphism., *Clin Chem*, 50: 1002-1011
- Lindoff C., Ingermarsson I., Martinsson G., Segelmark M., Thysell H., Astedt B. (1997), Preeclampsia is associated with a reduced response to activated protein C, *Am J Obstet Gynecol*, 176: 457-460
- Linsley P. S., Schelter J., Burchard J., Kibukawa M., Martin M. M., Bartz S. R., Johnson J. M., Cummins J. M., Raymond Ch. K., Dai H., Chau N., Cleary M., Jackson A. L., Carleton M., Lim L. (2007), Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression, *Mol Cell Biol.*, 27: 2240-2252
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001), Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method, *Methods*, 25: 402-408
- Lo Y. M. D., Corbetta N., Chamberlain P. F., Rai V., Sargent I. L., Redman C. W. G., Wainscoat J. S. (1997), Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum, *Lancet*, 350: 485-487
- Lo Y. M. D., Chan K. C. A., Sun H., Chen E. Z., Jiang P., Lun F. M. F., Zheng Y. V., Leung T. Y., Lau T. K., Cantor Ch. R., Chiu R. W. K (2010), Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and Mutational Profile of the Fetus, *Sci. Transl. Med.*, 2: 61-91
- Lubchenco L. O., Hansman C., Boyd E. (1963), Intrauterine growth as estimated from live born birth-weight data at 24–42 weeks of gestation, *Pediatrics*, 32: 793
- Luo S. S., Ishibashi O., Ishikawa G., Ishikawa T., Katayama A., Mishima T., i Takizawa T., Shigihara T., Goto T., Izumi A., Ohkuchi A., Matsubara S., Takeshita T., Takizawa T. (2009), Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNA into maternal circulation via exosomes, *Biol Reprod.*, 81(4):717-29
- Lynn F. C., Skewes-Cox P., Kosaka Y., McManus M. T., Harfe B. D., German M. S. (2007), MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes*, 56: 2938-2945

- Maccani M. A., Avissar-Whiting M., Banister C. E., McGonnigal B., Padbury J. F., Marsit C. J. (2010), Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21 and miR-146a in the placenta. *Epigenetics*, 57: 583-589
- Maccani M. A., Padbury J. F., Marsit C. J. (2011), miR-16 and miR-21 Expression in the Placenta Is Associated with Fetal Growth. *Plos One*, 6(6): e21210
- Mandel P., Métais P. (1948), Les Acides Nucleic Du Plasma Sanguin Chez L'Homme, *C R Acad Sci Paris*, 142: 241-243
- Marcoux S., Brisson J., Fabia J. (1989), The effect of cigarette smoking on the risk of preeclampsia and gestational hypertension. *Am J Epidemiol*, 130: 950-957
- Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. (2004), Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs, *Molecular Cell*, 15: 185-197
- Meng F., Henson R., Lang M., Wehbe H., Maheshwari S., Mendell J. T., Jiang J., Schmittgen T. D., Patel T. (2006), Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines, *Gastroenterology*, 130:2113e29
- Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Ghoshal K., Jacob S. T., Patel T. (2007), MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer, *Gastroenterology*, 133: 647-658
- Mestdagh P., Feys T., Bernard N., Guenther S., Chen C., Speleman F., Vandesompele J. (2008), High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA, *Nucleic Acids Res*, 36(21): e143
- Michael A., Bajracharya S. D., Yuen P. S. T., Zhou H., Star R. A., Illei G. G., Alevizos I. (2010), Exosomes from Human Saliva as a Source of microRNA Biomarkers, *Oral Dis.*, 16 (1): 34-38
- Mogren I., Hogberg U., Winkvist A., Stenlund H. (1999), Familial occurrence of preeclampsia, *Epidemiology*, 10: 518-522
- Mouillet J. F., Chu T., Nelson D. M., Mishima T., Sadovsky Y. (2010), MiR-205 silences MED1 in hypoxic primary human trophoblasts, *FASEB J.*, 24: 2030-2039
- Mouillet J. F., Chu T., Hubel C. A., Nelson D. M., Parks W. T., Sadovsky Y. (2010), The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction, *Placenta*, 31(9): 781-784
- Ng E. K., Tsui N. B., Lau T. K., Leung T. N., Chiu R. W. K, Panesar N. S., Lit L. C. W, Chan K.-W., Lo Y. M. D. (2003), mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100: 4748-53
- Nicolaidis K. H., Bindra R., Turan O. M., Chefetz I., Sammar M., Meiri H., Tal J., Cuckle H. S. (2006), A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 27: 13-17
- Odegard R. A., Vatten L. J., Nilsen S. T., Salvesen K. A., Austgulen R. (2000), Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *BJOG*, 107: 1410-1416

- Ouaamari A. E., Baroukh N., Martens G. A., Lebrun P., Pipeleers D., van Obberghen E. (2008), miR-375 Targets 3'-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 and Regulates Glucose-Induced Biological Responses in Pancreatic  $\beta$ -Cells, *Diabetes*, 57: 2708-2717
- Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F., Martindale M.Q., Kuroda M.I., Maller B., Hayward D.C., Ball E.E., Degan B., Muller 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*, 408: 86-89
- Peng M, Yu L, Ding YL, Zhou CJ. (2008) Trophoblast cells invading the placenta bed and change of spiral arteries and microvessels in pre-eclampsia, *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, 33(2): 121-129
- Peters P. J., Borst J., Oorschot V., Fukuda M., Krahenbuhl O., Tschopp J., Slot J. W., Geuze H. J. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes, *J. Exp. Med.*, 173: 1099-1109
- Pineles B.L., Romero R., Montenegro D., Tarca A.-L., Han Y. M., Kim Y. M., Draghici S., Espinoza J., Kusanovic J. P., Mittal P., Hassan S. S., Kim Ch. J. (2007), Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol*, 196: 261.e1-266.e6
- Pipkin B. E. (2001), Risk factors for preeclampsia, *New Engl.J.Med*, 12 : 925-926
- Pisitkun T., Shen R.-F., Knepper M. A. (2004), Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine, *PNAS*, 101: 13368-13373
- Plaisance V., Abderrahmani A., Perret-Menoud V., Jacquemin P., Lemaigre F., Regazzi R. (2006), MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells, *J Biol Chem* 281: 26932-26942
- Poy M. N., Eliasson L., Krutzfeldt J., Kuwajima S., Ma X., MacDonald P. E., Pfeffer S., Tuschl T., Rajewsky N., Rorsman P., Stoffel M. (2004), A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion, *Nature* 432: 226-230
- Raposo G., Nijman H. W., Stoorvogel W., Leijendekker R., Hardingfl C. V., Melief C. J. M., Geuze H. J. (1996), B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles, *J. Exp. Med*, 183: 1161-1172
- Raposo G., Tenza D., Mecheri S., Peronet R., Bonnerot C., Desaymard C. (1997), Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell*, 8: 2631-2645
- Reynolds C., Hunt J. (1981), Diabetes update, *Can Fam Physician.*, 27: 1255-1261
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L., Bradley A. (2004), Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units, *Genome Res*, 14: 1902-1910
- Roldo C., Missiaglia E., Hagan J. P., Falconi M., Capelli P., Bersani S., Calin G. A., Volinia S., Liu C. G., Scarpa A., Croce C. M. (2006), MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*, 24:4677-4684
- Sibai B. N., Caritis S. N., Thom E., Klebanoff M., McNellis D., Rocco L., Paul R. H., Romero R., Witter F., Rosen M., Depp R. and the National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal – fetal Medicine Units (1993), Prevention of preeclampsia with low-dose aspirin in health. Nulliparous pregnant women, *N Engl J Med*, 329: 1213-1218

Shynlova O., Oldenhof A., Dorogin A., Xu Q., Mu J., Nashman N., Lye S. J. (2006), Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation, *Biol Reprod*, 74(5): 839-849

Schütz E., Urnovitz H. B., Iakoubov L., Schulz-Schaeffer W., Wemheuer W., Brenig B. (2005), Bov-tA Short Interspersed Nucleotide Element Sequences in Circulating Nucleic Acids from Sera of Cattle with Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and Sera of Cattle Exposed to BSE, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12: 814-820

Skjaerven R., Wilcox A. J., Lie R. T. (2002), The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia, *New Engl.J.Med.*, 1: 33-38

Smith S. C., Baker P. N., Symonds E. M (1997), Placental apoptosis in normal human pregnancy, *Am J Obstet Gynecol.*,177: 57-65

Srinivas S. K., Edlow A. G., Neff P. M., Sammel M. D., Andrela C. M., Elovitz M. A. (2009), Rethinking IUGR in preeclampsia: dependent or independent of maternal hypertension?, *Journal of Perinatology*, 29: 680-684

Stroun M., Anker P. (1971), Bacterial nucleic acid synthesis in plants following bacterial contact, *Mol Gen Genet.*, 113: 92-98

Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Mulcahy H. E., Anker P. (2001), Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells?, *Annals New York Academy of Sciences*, 945: 258-264

Sutherland A., Cooper D. W., Howie P. W., Liston W. A., MacGillivray I. (1981), The incidence of severe pre-eclampsia amongst mothers and mothers-in-law of pre-eclamptics and controls, *Br J Obstet Gynaecol*, 88: 785-791

Tabara H., Sarkissian M., Kelly W. G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., Mello C. C. (1999), The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*, *Cell*, 99: 123-132

Tang F., Hajkova P., Barton S. C., Lao K., Surani M. A. (2006), MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells, *Nucleic Acids Res*, 34(2): e9

Taplin S., Abraham L., Barlow W. E., Fenton J. J., Berns E. A., Carney P. A., Cutter G. R., Sickles E. A., D'Orsi C., Elmore J. G. (2008), Mammography facility characteristics associated with interpretive accuracy of screening mammography, *J Natl Cancer Inst.*, 100: 876-887

Taylor D. D., Doellgast G.J. (1979), Quantitation of eroxidise-antibody binding to membrane fragments using column chromatography. *Anal Biochem*, 98: 53-59

Teasdale F. (1984), Idiopathic intrauterine growth retardation: histo-morphometry of the human placenta, *Placenta*, 5: 83-92

Trams E. G., Lauter C. J., Salem N. Jr, Heine U. (1981), Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 645: 63-70

Tsumita T., Iwanaga M. (1963), Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice, *Nature (Lond.)*, 198: 1088-1089

van Niel G., Raposo G., Candalh C., Boussac M., Hershberg R., Cerf-Bensussan N., Heyman M. (2001), Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles, *Gastroenterology*, 121: 337-349

Visegrady B., Than N. G., Kiler F., Sumegi B., Than G. N., Bohn H. (2001), Homology modeling and molecular dynamics studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13), *Protein Eng*, 14: 875-880

Votavova H., Dostalova Merkerova M., Krejcik Z., Fejglova K., Vasikova A., Pastorkova A., Tabashidze N., Topinka J., Balascak I., Sram R. J., Brdicka R. (2012) Deregulation of Gene Expression Induced by Environmental Tobacco Smoke Exposure in Pregnancy, *Nicotine a Tobacco Research Advance Access* published February 21, 2012

Wang F., Zheng Z., Guo J., Ding X. (2010), Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor, *Gynecologic Oncology*, 119: 586-593

Ward K., Hata A., Jeunemaitre X., Helin C., Nelson L., Namikawa C., Farrington P. F., Ogasawara M., Suzumori K., Tomoda S., et al. (1993), A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia, *Nat Genet*, 4: 59-61

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*, 75: 855-862

Wu Q., Lu Z., Li H., Lu J., Guo L., Ge Q. (2011), Next-Generation Sequencing of MicroRNAs for Breast Cancer Detection, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 597145, 7 pages, doi:10.1155/2011/597145

Wu Q., Wang Ch., Lu Z., Guo L., Ge Q. (2012), Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection, *Clin Chim Acta*, doi: 10.1016/j.cca.2012.02.016

Yeom K-H., Lee Y., Han J., Suh M. R., Kim V. N. (2006), Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing, *Nucleic Acids Research*, 34 (16): 4622-4629

Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R. (2003), Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes Development*, 17: 3011-3016

Zhao E., Keller M. P., Rabaglia M. E., Oler A. T., Stapleton D. S., Schueler K. L., Neto E. C., Moon J. Y., Wang P., Wang I.-M., Lum P. Y., Ivanovska ., Cleary M., Greenawalt D., Tsang J., Choi Y. J., Kleinhanz R., Shang J., Zhou Y.-P., Howard A. D., Zhang B. B., Kendzioriski C., Thornberry N. A., Yandell B. S., Schadt E. E., Attie A. D. (2009), Obesity and genetics regulate microRNAs in islets, liver, and adipose of diabetic mice, *Mamm Genome*, 20: 476-485

Zhao C., Dong J., Jiang T., Shi Z., Yu B., Zhu Y., Chen D., Xu J., Huo R., Dai J., Xia Y., Pan S., Hu Z., Sha J. (2011), Early Second-Trimester Serum MiRNA Profiling Predicts Gestational Diabetes Mellitus. *PLoS ONE* 6(8): e23925

Zhou Y., Damsky C. H., Chiu K., Roberts J. M., Fisher S. J. (1993), Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts, *J Clin Invest.*, 91: 950-960

Zhu X. M., Han T., Sargent I. L., Yin G.-w., Yao Y.-q. (2009), Differential expression profile of microRNAs in human placenta from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies, *AmJ Obstet Gynecol*, 200: 661.e1-661.e7

Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S. (1998), Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes, *Nature Med.*, 4: 594-600