

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Antropologie a genetika člověka



Bc. Iva Vintrová

Studium exprese placentárně specifických microRNA u pacientek se spontánním předčasným porodem a předčasným odtokem plodové vody (PPROM)

Study of placental specific microRNA expression in patients with spontaneous preterm birth and preterm prelabor rupture of membranes

Diplomová práce

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

Praha, 2016

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, 15. 8. 2016

Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí své diplomové práce prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. za cenné odborné rady a připomínky, ochotu a vstřícnost. Zároveň bych chtěla poděkovat svým kolegyním v laboratoři za pomoc a užitečné rady. Můj dík patří také doc. MUDr. Marianu Kacerovskému, Ph.D. za poskytnutí biologického materiálu z Fakultní nemocnice Hradec Králové. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým blízkým a kolegům v současné laboratoři za podporu během psaní práce. Tento výzkum vznikl za finanční podpory z grantu PRVOUK P32.

Abstrakt

MicroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA o délce 18 až 25 nukleotidů hrající stěžejní roli v posttranskripční regulaci genové exprese. Existují miRNA, jejichž exprese je omezena pouze na určitý typ tkáně, a choroby, které jsou charakteristické unikátním expresním profilem miRNA. Předpokládala jsem, že by spontánní předčasný porod (PTB) a předčasný odtok plodové vody (PPROM) mohl být charakterizován unikátním expresním profilem miRNA.

Sledovala jsem genovou expresi 15 placentárně specifických miRNA (miR-512-5p, miR-515-5p, miR-516b-5p, miR-517-5p, miR-518b, miR-518f-5p, miR-519a-5p, miR-519d-3p, miR-519e-5p, miR-520a-5p, miR-520h, miR-524-5p, miR-525-5p, miR-526a a miR-526b-5p) v placentární tkáni u pacientek s PTB, PPROM a u žen s fyziologickou graviditou a porodem v termínu (FG). PTB skupinu tvořilo 24 pacientek, PPROM skupinu 75 pacientek a FG skupinu 20 pacientek. Ke kvantifikaci genové exprese byla použita kvantitativní PCR v reálném čase. U PTB jsem v porovnání s kontrolami (FG) identifikovala 3 signifikantně upregulované miRNA (miR-516b-5p, miR-519d-3p a miR-524-5p) a 4 miRNA (miR-518b, miR-519a-5p, miR-520h a miR-526a) s trendem k upregulaci. U PPROM jsem identifikovala 3 miRNA (miR-519d-3p, miR-520h a miR-526b-5p) s trendem k downregulaci v porovnání s kontrolami. Zároveň bylo identifikováno 5 signifikantně upregulovaných miRNA (miR-516b-5p, miR-518b, miR-519d-3p, miR-520h a miR-526a) u PTB oproti PPROM. Trend k upregulaci u PTB byl pozorován u 2 miRNA (miR-519a-5p a miR-524-5p) ve srovnání s PPROM.

V rámci skupiny pacientek s PPROM neovlivňovala přítomnost histologické chorioamnionitidy ani přítomnost mikrobiální invaze amniální dutiny expresi žádné z testovaných miRNA. Ve skupině pacientek s PTB nebyla pozorována závislost mezi genovou expresí zkoumaných miRNA a gestačním stářím v době porodu. Naopak ve skupině PPROM pacientek byla identifikována slabá negativní korelace mezi genovou expresí u všech testovaných miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu.

Z výsledků práce vyplývá, že patogeneze PTB a PPROM je odlišná. PTB a PPROM se liší expresním profilem C19MC microRNA v placentární tkáni. Pro PTB je charakteristická upregulace a pro PPROM downregulace C19MC microRNA.

Klíčová slova: microRNA, spontánní předčasný porod, předčasný odtok plodové vody, PTB, PPRM

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs with a length of 18 to 25 nucleotides playing a pivotal role in post-transcriptional regulation of gene expression. There are miRNAs whose expression is limited to a certain tissue type and diseases which are characterized by a unique miRNA expression profile. I assumed spontaneous preterm birth (PTB) and preterm prelabor rupture of membranes (PPROM) would be characterized by a unique miRNA expression profile.

I observed the gene expression of 15 placental specific miRNAs (miR-512-5p, miR-515-5p, miR-516b-5p, miR-517-5p, miR-518b, miR-518f-5p, miR-519a-5p, miR-519d-3p, miR-519e-5p, miR-520a-5p, miR-520h, miR-524-5p, miR-525-5p, miR-526a and miR-526b-5p) in placental tissue of patients with PTB, PPRM and women with term in labor pregnancies (FG). PTB group consisted of 24 patients, PPRM group of 75 patients and FG group of 20 patients. Quantitative real-time PCR was used to quantify gene expression. In the group of PTB pregnancies I identified 3 significantly upregulated miRNAs (miR-516b-5p, miR-519d-3p and miR-524-5p) and 4 miRNAs (miR-518b, miR-519a-5p, miR-520h and miR-526a) with a trend to upregulation compared to controls (FG). In the group of PPRM pregnancies I identified 3 miRNAs (miR-519d-3p, miR-520h and miR-256b-5p) with a trend to downregulation compared to controls. 5 significantly upregulated miRNAs (miR-516b-5p, miR-518b, miR-519d-3p, miR-520h and miR-526a) were detected in PTB pregnancies compared to PPRM. The group of PTB pregnancies showed a trend to upregulation for 2 miRNAs (miR-519a-5p and miR-524-5p).

Within the group of patients with PPRM neither presence of histological chorioamnionitis or microbial invasion of the amniotic cavity affected expression of any of the tested miRNAs. In the group of patients with PTB there wasn't any correlation between gene expression of studied miRNAs and gestational age at delivery. Conversely, in the group of patients with PPRM a weak negative correlation between gene expression of all tested miRNAs and gestational age at delivery was observed.

According to results of the thesis there is a difference between a pathogenesis of PTB and PPRM. PTB and PPRM differ in an expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue. The upregulation of C19MC microRNAs is characteristic for PTB and downregulation of C19MC microRNAs for PPRM.

Key words: microRNA, spontaneous preterm birth, preterm prelabor rupture of membranes, PTB, PPRM

Obsah

Seznam zkratk	10
1. Úvod	12
2. MicroRNA	14
2.1. Historie	14
2.2. Kritéria pro identifikaci microRNA	14
2.3. Nomenklatura	15
2.4. Rozložení genů kódujících microRNA v genomu	16
2.5. Biogeneze	17
2.5.1 Transkripce.....	17
2.5.2. Maturace	17
2.6. Regulace genové exprese pomocí miRNA.....	19
2.7. Metody detekce a kvantifikace microRNA	20
2.7.1. Kvantitativní PCR v reálném čase.....	21
3. Předčasný porod	25
3.1. Klasifikace spontánního předčasného porodu a porodu s předčasným odtokem plodové vody	25
3.2. Patofyziologie vzniku spontánního předčasného porodu a porodu s předčasným odtokem plodové vody – společné znaky	25
3.2.1. Infekce	26
3.2.2. Zánětlivá odpověď bez přítomnosti mikroorganismů	26
3.3. Patofyziologie vzniku spontánního předčasného porodu a porodu s předčasným odtokem plodové vody – odlišné znaky.....	27
3.3.1. Snížený obsah kolagenu ve fetálních membránách u PPRM.....	27
3.3.2. Apoptóza u PPRM	27
3.3.3. Senescence plodových obalů u PPRM.....	28
3.4. Rizikové faktory vzniku spontánního předčasného porodu a porodu s předčasným odtokem plodové vody.....	29
3.5. Genetické predispozice pro rozvoj předčasného porodu.....	29
3.5.1. Gen <i>TNF</i>	29
3.5.2. Gen <i>IL1B</i>	30
3.5.3. Gen <i>IL6</i>	31

3.5.4. Gen <i>MMP1</i>	31
3.5.5. Gen <i>MMP9</i>	32
3.6. Diagnostika PPROM	32
3.7. Léčba PPROM	33
4. Úloha microRNA v těhotenství	35
4.1. Exprese microRNA v placentární tkáni	35
4.2. Exprese microRNA u PTB a PPROM	36
5. Cíle práce	38
6. Materiál	39
7. Metody	41
7.1. Prvotní zpracování materiálu	41
7.2. Izolace RNA obohacené o miRNA z placentární tkáně	41
7.3. MiRNA, jejichž exprese byla testována	42
7.4. Reverzní transkripce	43
7.5. Kvantitativní PCR v reálném čase	44
7.6. Relativní kvantifikace placentárně specifických microRNA	45
7.7. Statistická analýza	45
8. Výsledky	47
8.1. Porovnání exprese placentárně specifických miRNA: PTB vs. PPROM vs. FG	47
8.2. Porovnání genové exprese placentárně specifických miRNA ve skupině PPROM pacientek s ohledem na přítomnost a absenci MIAC	53
8.3. Porovnání genové exprese placentárně specifických miRNA ve skupině PPROM pacientek s ohledem na přítomnost a absenci HCA	54
8.4. Vztah mezi genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu u PPROM	55
8.5. Vztah mezi genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu u PTB	64
9. Diskuze	65
10. Závěr	69
11. Seznam použité literatury	70

Seznam zkratk

3'UTR	nepřekládaná oblast na 3'konci mRNA
40S	malá ribozomální podjednotka (40 Svedbergů)
60S	velká ribozomální podjednotka (60 Svedbergů)
AFP	α -fetoprotein
Ago2	protein Argonaut 2
APC	antigen prezentující buňka
ARE	AU-bohaté elementy
Bcl-2	mRNA a protein lymfomů B buněk 2
C14MC	genový klastr na chromozomu 14
C19MC	genový klastr na chromozomu 19
Caf1	faktor 1 asociovaný s Ccr4
CASP2	enzym kaspáza 2
Ccp1	cytochrom c peroxidáza 1
Ccr4	chemokinový receptor s C-C motivem 4
cDNA	komplementární DNA
Ct	Číslo cyklu, ve kterém hodnota fluorescenčního signálu překročí stanovenou prahovou hodnotu.
DAMP	molekulární vzory spojené s nebezpečím
DAO	enzym diaminooxidáza
Dcp1, 2	protein 1, 2 odstraňující metylguanositovou čepičku mRNA (decapping mRNA 1, 2)
DGCR8	protein chromozomální (kritické) oblasti 8 DiGeorgova syndromu
ECM	extracelulární matrix
eIF4	iniciační faktor 4
EXP5	protein Exportin-5
F2-IsoP	isoprostan třídy F2
fFN	fetální fibronectin
FG	fyziologická gravidita s porodem v termínu
HCA	histologická chorioamnionitida
IAI	intraamniální zánět
IG-DMR	mezigenová odlišně metylovaná oblast (intergenic-derived differentially methylated region)
IGFBP-1	vazebný protein 1 k inzulinu-podobnému růstovému faktoru (insulin-like growth factor binding protein-1)
IL-1 β , -6, -8	interleukin-1 β , -6, -8
IL1RA	antagonista receptoru IL-1
<i>IL1RN</i>	gen pro antagonistu receptoru IL-1
<i>IL1RN*2</i>	alela 2 v genu pro antagonistu receptoru IL-1

ISH	hybridizace <i>in situ</i>
LNA	uzamčené nukleové kyseliny (locked nucleic acid)
m7G čepička	7-metylguanosinová čepička
MGB sonda	sonda vázající se do malého žlábků
MIAC	mikrobiální invaze amniální dutiny
miRNA	microRNA
MMP-1,-2,-9	matrixová metaloproteináza-1,-2,-9
MT1-MMP	matrixová metaloproteináza membránového typu 1
NPV	negativní prediktivní hodnota
PACT	aktivátor proteinu interferonem-indukované protein kinázy (protein activator of the interferon-induced protein kinase)
Pan2,3	polyA nukleáza 2
PAP polymeráza	polymeráza prodlužující polyA konec
PLA2G4B	fosfolipáza A2 skupiny IVB
polyA konec	polyadenylovaný konec
PPROM	předčasný odtok plodové vody (preterm prelabor rupture of membranes)
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
pre-miRNA	prekurzorová microRNA
pri-miRNA	primární microRNA transkript
PRR	receptory rozpoznávající vzory
PTB	spontánní předčasný porod
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězcová reakce v reálném čase
Ran-GTP	forma jaderného proteinu příbuzného s Ras (Ras-related nuclear protein) s navázaným GTP
RIIID	doména ribonukleáz typu III
RISC	umlčující komplex indukovaný RNA
RNA Pol II, III	enzym RNA polymeráza II, III
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
siRNA	malé interferující RNA
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
TLR	receptor podobný genu Toll
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
TPROM	předčasný odtok plodové vody v termínu
TRBP	(trans-activation response RNA-binding protein)
Xrn1	5'-3' exoribonukleáza 1
β -hCG	β podjednotka lidského choriového gonadotropinu

1. Úvod

Porod před stanovenou fyziologickou hranicí zahrnující spontánní předčasný porod a předčasný odtok plodové vody je jednou z nejčastějších těhotenských komplikací. Takovýto typ porodu je příčinou 5 % (v rozvinutých zemích) až 18 % (v rozvojových zemích) novorozenecké úmrtnosti (Blencowe *et al.*, 2012). Kromě neonatální úmrtnosti zanechává porod před termínem na novorozencích trvalé následky související s nedostatečným vývinem orgánů. Předčasně narozené děti mívají plicní vady (Hibbard *et al.*, 2010), vady sluchu a zraku, opožděný psychomotorický vývoj, poruchy učení a zvýšený výskyt dětské mozkové obrny (Mwaniki *et al.*, 2012).

MicroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující jednořetězcové molekuly o délce 18 až 25 nukleotidů se zásadní rolí v posttranskripční regulaci. Vazbou na cílovou mRNA jsou schopny inhibovat translaci nebo cílovou mRNA degradovat (Mathonnet *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2006). Tuto funkci miRNA uplatňují v mnoha biologických procesech a regulačních drahách. Účastní se např. buněčné diferenciaci (Huang *et al.*, 2010a), apoptózy (Welch *et al.*, 2007), senescence (Menghini *et al.*, 2009) a regulace proliferace buňky (Brennecke *et al.*, 2003).

Bylo prokázáno, že miRNA hrají roli ve fyziologickém i patologickém průběhu gravidity (Morales Prieto, Markert, 2011). U těhotenských komplikací asociovaných s poruchami ve funkci placenty byly v minulosti popsány miRNA se signifikantně odlišnou expresí v placentární tkáni v porovnání s fyziologickými graviditami, kdy porod proběhl v termínu. Lze tedy předpokládat, že rozdílně exprimované miRNA zřejmě hrají roli v patogenezi těchto komplikací. Těhotenskými komplikacemi vyznačujícími se změnami v expresi miRNA v placentární tkáni byla např. preeklampsie (Enquobahrie *et al.*, 2011) či intrauterinní růstová retardace (Hromadnikova *et al.*, 2015a).

Ve studii Yu Liang a kolegů byla identifikována rozsáhlá skupina microRNA, jejichž exprese je omezena téměř výhradně na placentární tkáň, přičemž tyto miRNA jsou ze značné části kódovány v klastrech na chromozomech č. 14 a 19 (Bortolin-Cavaillé *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2007; Seitz *et al.*, 2004). Studium exprese těchto miRNA v placentě u spontánního předčasného porodu a předčasného odtoku plodové vody by mohlo přinést nové objevy přispívající k pochopení patofyziologie těchto těhotenských komplikací.

Ve své práci jsem porovnávala expresi 15 placentárně specifických miRNA exprimovaných v genovém klastru na chromozomu č. 19 (C19MC) ve vzorcích placentární

tkáně u pacientek se spontánním předčasným porodem, pacientek s předčasným odtokem plodové vody a u žen s fyziologickým průběhem gravidity a porodem v termínu. Tato pilotní studie měla za úkol zjistit, zda některé testované miRNA hrají roli v patogenezi vzniku zmíněných těhotenských komplikací. V době začátku tohoto výzkumu nebyly publikovány žádné studie detekující expresi C19MC microRNA u pacientek se spontánním předčasným porodem a u pacientek s předčasným odtokem plodové vody.

2. MicroRNA

2.1. Historie

Poprvé byla microRNA objevena u *Caenorhabditis elegans* v roce 1993. Tehdy Lee a kolegové popsali, že gen *lin-4*, který je zodpovědný za kontrolu správného načasování larválního vývoje *C. elegans*, nekóduje vznik proteinu, ale produkuje dva malé transkripty. Jeden z nich dosahuje délky 22 nukleotidů a druhý délky 61 nukleotidů. Obě tyto *lin-4* RNA jsou komplementární k repetitivní sekvenci v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) mRNA genu *lin-14*. Pro přechod *C. elegans* z prvního larválního stádia (L1) do druhého (L2) musí dojít v rámci řady regulačních drah k poklesu hladiny proteinu LIN-14. To je zajištěno navázáním dvou zmíněných *lin-4* RNA do 3'UTR mRNA *lin-14* a dochází tak k represi její translace. RNA *lin-4* tímto způsobem negativně reguluje hladinu proteinu LIN-14 (Lee *et al.*, 1993).

V roce 2000 byla popsána druhá molekula RNA tohoto typu, a to *let-7* u *C. elegans*, dosahující délky 21 nukleotidů. Tato RNA funguje stejným způsobem jako *lin-4*. *Let-7* nasedá do 3'UTR mRNA genů *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* a *daf-12* a tím brání translaci příslušných mRNA. Gen *let-7* je u *C. elegans* nezbytný pro přeměnu z larválního stádia do dospělce (Reinhart *et al.*, 2000).

Necelý rok od objevu *let-7* RNA ohlásily tři laboratoře v součtu přes 100 genů pro krátké RNA s potenciálně regulační rolí u různých druhů organismů. Mariana Lagos-Quintana a spolupracovníci se souhlasem členů dalších dvou laboratoří prezentujících nově objevené geny pro RNA pojmenovat tyto krátké RNA s regulační úlohou miRNA (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee, Ambros, 2001).

2.2. Kritéria pro identifikaci microRNA

Aby nedocházelo k nesprávnému označování siRNA nebo částí jiných RNA pojmem microRNA, publikovali Ambros a kolegové kritéria, jimiž jsou microRNA jasně identifikovány (Ambros *et al.*, 2003).

Kritéria pro genovou expresi:

1. Je detekován přibližně 22 nukleotidů dlouhý RNA transkript hybridizací k RNA definované velikosti, zpravidla Northern blotem.

2. Je identifikována přibližně 22 nukleotidů dlouhá sekvence v cDNA knihovně. Tyto sekvence musí být zcela komplementární ke genomickým sekvencím organismu, ze kterého byly získány.

Kritéria pro biogenezi:

3. Je predikována sekundární struktura prekurzoru, která obsahuje uvnitř jednoho raménka vlásenky přibližně 22 nukleotidů dlouhou sekvenci miRNA a spolu s druhým raménkem vlásenky dosahuje délky minimálně 16 bp. Vlásenka prekurzoru tvoří sekundární strukturu s nejnižší možnou volnou energií a neměla by obsahovat velké vnitřní smyčky ani výdutě. U živočichů jsou miRNA prekurzory obvykle dlouhé okolo 60 až 80 nukleotidů, zatímco u rostlin jsou variabilnější a mohou obsahovat až několik stovek nukleotidů.
4. Sekvence miRNA a jejího prekurzoru jsou fylogeneticky konzervovány. Je-li konzervovaná strukturou vlásenka, měla by vyhovovat stejným požadavkům párování jako v bodě 3, ale nemusí být sekundární strukturou s nejnižší volnou energií.
5. U organismů se sníženou funkcí enzymu Dicer je detekováno hromadění zvýšeného množství prekurzoru miRNA, jehož přeměnu Dicer katalyzuje.

V ideálním případě je za dostatečný důkaz identifikace miRNA považováno splnění kritérií 1, 4 a 5. Ačkoli při nedostatku dat lze za dostačující považovat i kombinaci kritérií 1 a 4. V každém případě je nutno splnit jedno z kritérií pro genovou expresi a jedno z kritérií pro biogenezi (Ambros *et al.*, 2003).

2.3. Nomenklatura

Pojmenování microRNA se řídí několika následujícími pravidly, z nichž se vymykají *lin-4* a *let-7*. U nich zůstává zachován historicky originální název a všechny jejich homology jsou pojmenovávány podle něj. Označení microRNA je složeno ze dvou částí. Předponu tvoří třípísmenná zkratka miR, nebo mir. MiR nesou ve svém názvu maturované miRNA, zatímco některé geny pro microRNA a primární transkripty jsou označovány jako mir. Přípona je tvořena jedinečným číslem, z něhož lze usuzovat, kdy byla microRNA objevena. Vyšší čísla jsou přidělována později objeveným miRNA. Pro potřebu upřesnění druhu u homologních miRNA se před miR/mir píše tří- až čtyřpísmenná

předpona. Tvoří ji zkratka druhu organismu, u něhož se miRNA vyskytuje. Např. u člověka je touto předponou hsa podle *Homo sapiens* (Ambros *et al.*, 2003; Griffiths-Jones *et al.*, 2006; Griffiths-Jones, 2004).

Geny kódující miRNA jsou psány standardně kurzívou. U živočichů nesou stejný název jako jimi kódovaná microRNA pouze s tím rozdílem, že mají v názvu v předponě mir malé r (např. *mir-16*). Gen pro rostlinnou miRNA je tvořen všemi velkými písmeny a před identifikačním číslem je vynechána pomlčka (např. *MIR156*) (Griffiths-Jones, 2004).

V případě, že se u více druhů organismů vyskytnou microRNA identické sekvence, ponесou až na předponu specifikující druhovou příslušnost stejný název. Zároveň pokud jsou objeveny téměř totožné ortology, lze je pojmenovat stejným identifikačním číslem (např. miR-1 u *Drosophily* se liší jedním nukleotidem od miR-1 u člověka). Pokud se některé miRNA liší pouze v jednom či dvou nukleotidech, je za unikátní číslo přidáváno ještě jedno malé písmeno (např. hsa-miR-520b a hsa-miR-520h). Když je stejná miRNA kódována z více genových lokusů, je to rozlišeno připojením pomlčky a čísla za jejím názvem (např. miR-24-1 a miR-24-2) (Ambros *et al.*, 2003; Griffiths-Jones *et al.*, 2006; Lagos-Quintana *et al.*, 2001).

Z jednoho miRNA prekurzoru mohou vznikat 2 microRNA, z každého raménka vlásenky jedna. Dokud není zjištěno, ze kterého raménka dochází k převažující expresi miRNA, jsou označovány příponou -3p pro 3' raménko a 5p pro 5' raménko. Dříve byly označovány příponou -s pro 5' raménko a -as pro 3' raménko. Označení -s a -as vychází z pojmenování ramének sense a antisense. Když je objeveno, ze kterého raménka dochází k predominantní expresi, není jeho produkt graficky nijak specificky označován, protože pro odlišení slouží označení minoritně exprimovaného produktu hvězdičkou. Např. miR-56 vzniká ve větší míře než miR-56* (Griffiths-Jones, 2004).

2.4. Rozložení genů kódujících microRNA v genomu

Geny pro microRNA tvoří jednu z nejbohatších genových rodin a jsou hojně zastoupeny v rostlinné i živočišné říši, mezi protisty i viry. Sekvence microRNA jsou umístěny na různých místech v genomu (Ha, Kim, 2014). MiRNA geny byly identifikovány v intronech protein-kódujících genů a v intronech i exonech dlouhých nekódujících RNA transkriptů (Rodriguez *et al.*, 2004).

Geny pro miRNA se mohou vyskytovat v genomu samostatně nebo ve shlucích (klastrech). Samostatně ležící geny jsou přepisovány do monocistronních primárních transkriptů, zatímco geny v klastrech jsou zpravidla přepisovány společně a tvoří polycistronní nascentní transkripty (Lee *et al.*, 2002).

2.5. Biogeneze

Biogeneze microRNA je zahájena transkripcí, po níž následuje několikakrokový proces maturace nejprve v jádře a následně v cytoplazmě.

2.5.1 Transkripce

Geny pro microRNA jsou přepisovány zejména RNA polymerázou II (RNA Pol II) a minoritně RNA polymerázou III (RNA Pol III). RNA Pol II zajišťuje přepis primárního microRNA transkriptu (pri-miRNA) obsahující promotor, 7-metylguanosinovou čepičku (m7G) a 3' polyA konec (Lee *et al.*, 2004). Pri-miRNA je dlouhá okolo 80 nukleotidů a je součástí vlásenkové struktury. RNA Pol III přepisuje některé virové miRNA (Pfeffer *et al.*, 2005).

2.5.2. Maturace

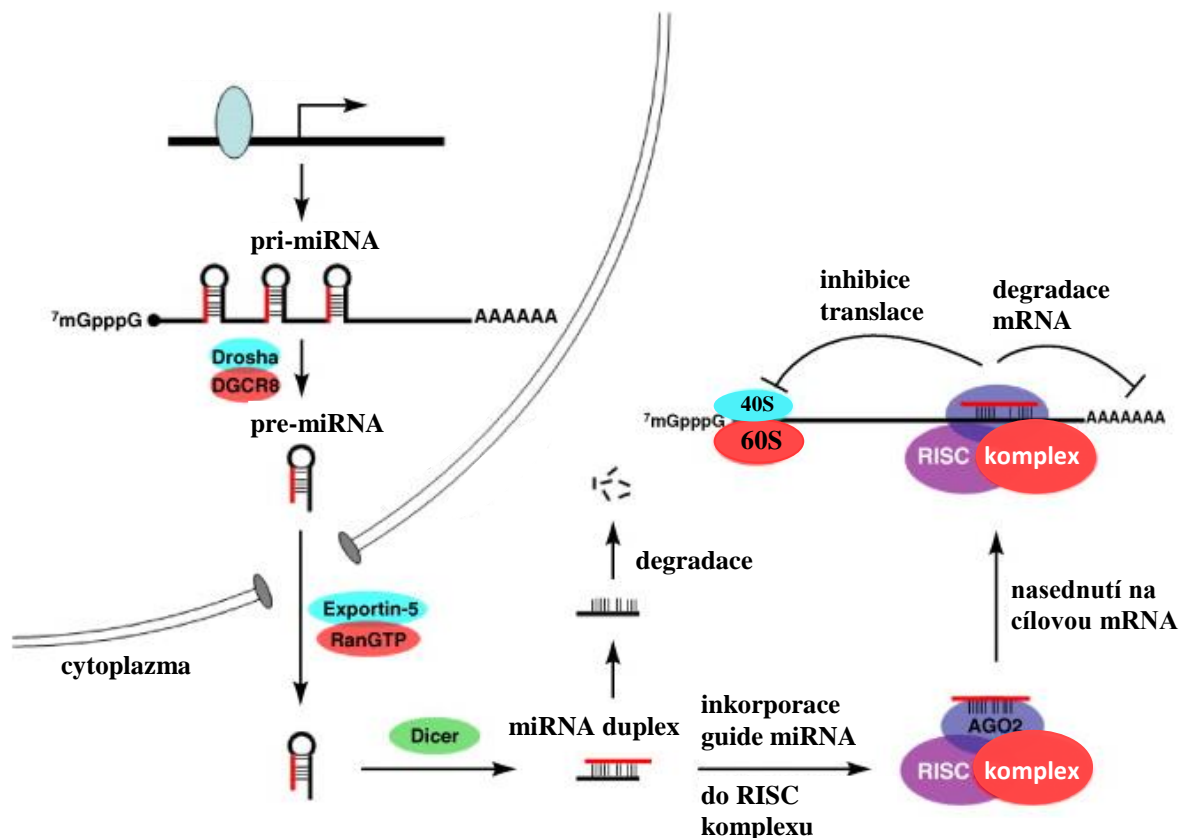
Maturaci zahajuje v jádře endonukleáza Drosha štěpením pri-miRNA v blízkosti vlásenky a uvolněním přibližně 70 nukleotidů dlouhého meziprojektu nazývaného pre-miRNA (Yoontae Lee *et al.*, 2003). Drosha tvoří spolu s kofaktorem DGCR8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8) komplex Mikroprocesor (Kwon *et al.*, 2016).

Drosha je jaderný protein a patří do rodiny ribonukleáz typu III. Na C-konci proteinu má dvě domény ribonukleázového typu III (RIIID) a každá RIIID doména obsahuje vazebné místo pro jednu molekulu DGCR8 (Kwon *et al.*, 2016). DGCR8 obsahuje 2 vazebné domény pro dsRNA (dsRBD), které jsou důležité pro rozpoznávání a vazbu pri-miRNA, protože Drosha interaguje s RNA substrátem pouze přechodně během katalytického procesu (Yeom *et al.*, 2006). Dvě RIIID domény enzymu Drosha vytvoří dimer a vznikne tím jedno místo, kde je pri-miRNA upravovaná na pre-miRNA. Jedna podjednotka (RIIIDa) štěpí 3' konec a druhá podjednotka (RIIIDb) 5' konec vlásenky RNA. Výsledkem tohoto štěpení je 5' fosfát a přesah dlouhý 2 nukleotidy na 3' konci. Dvounukleotidový přesah slouží k interakci s proteiny, jež se účastní dalších kroků maturace (Han *et al.*, 2004).

Po štěpení enzymem Drosha musí být pre-miRNA transportována do cytoplazmy. Aby mohla projít přes jadernou membránu, vytvoří transportní komplex s receptorem Exportin-5 (EXP5) a s GTP-vazebným proteinem Ran-GTP, jež umožní její transmembránový přechod (Lund *et al.*, 2004).

V cytoplazmě je pre-miRNA štěpena endonukleázou Dicer, jejíž činností vzniká miRNA duplex o délce přibližně 22 nukleotidů (Bernstein *et al.*, 2001). S Dicerem jsou asociovány dsRNA vazebné proteiny TRBP (trans-activation response RNA-binding protein) a PACT (protein activator of the interferon-induced protein kinase) (Lee *et al.*, 2013). Dicer je endonukleáza náležící stejně jako Drosha do rodiny ribonukleáz typu III. C-koncové domény Diceru (RHIIDa a RHIIDb) spolu vytváří intramolekulární dimer, který slouží jako katalytické místo. N-koncová dsRBD doména rozpoznává a váže preferenčně pre-miRNA s dvounukleotidovým přesahem na 3' konci a fosfátem na 5' konci vytvořenými Droshou (Zhang *et al.*, 2004). Místa, která Dicer rozpoznává a štěpí, jsou vzdálena přibližně 22 nukleotidů od 3' konce dsRNA, což je nazýváno tzv. "pravidlem počítání od 3' konce" (Vermeulen *et al.*, 2005). U lidských miRNA bylo popsáno také "pravidlo počítání od 5' konce". U tohoto pravidla vyžaduje Dicer fosfátovou skupinu na 5' konci a vlákno štěpí ve vzdálenosti 22 nukleotidů od 5' konce pre-miRNA (Park *et al.*, 2011).

Finálním krokem biogeneze je inkorporace jednoho vlákna miRNA duplexu reprezentujícího maturovanou miRNA do ribonukleázového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), jenž plní roli efektoru při umlčování genů pomocí microRNA. RISC komplex je tvořen proteiny Dicer a Argonaut 2 (Ago2) a doplňují je pomocné proteiny TRPB, PACT a další (Lee *et al.*, 2013). Stěžejní roli hraje Ago2, který umožňuje rozpoznat a štěpit cílovou mRNA, k níž je maturovaná miRNA komplementární a jejíž expresi má regulovat. Jedno vlákno z miRNA duplexu nazývané "guide" zůstává součástí RISC komplexu a druhé vlákno označované jako "passenger" je degradováno (Ha, Kim, 2014). Určení toho, zda bude vlákno "guide" nebo "passenger", není náhodné, ale závisí na stabilitě obou konců RNA duplexu. Obvykle je vlákno s méně stabilním 5' koncem určeno jako "guide" (Schwarz *et al.*, 2003). Proces biogeneze miRNA je znázorněn na obrázku č. 1.



Obr. 1: Schematické znázornění microRNA biogeneze

Geny kódující miRNA jsou přepisovány do pri-miRNA RNA polymerázou II. Z pri-miRNA je následně vyštěpena pre-miRNA endonukleázou Drosha spolu s kofaktorem DGCR8. Pre-miRNA je exportována z jádra do cytoplazmy pomocí komplexu Exportin-5-Ran-GTP. V cytoplazmě je miRNA meziprodukt upravován endonukleázou Dicer a vzniká miRNA duplex. “Passenger“ vlákno z miRNA duplexu je degradováno a “guide“ vlákno nasedá na RISC komplex. RISC komplex reguluje genovou expresi inhibicí translace RNA nebo degradací cílové mRNA komplementární pomocí vazby miRNA ke 3'UTR cílové mRNA. (Upraveno dle Huang *et al.*, 2010)

2.6. Regulace genové exprese pomocí miRNA

Maturovaná microRNA může regulovat genovou expresi na post-transkripční úrovni dvěma způsoby. Prvním je inhibice translace cílových genů a druhým je degradace cílové mRNA. V obou případech je však důležitým krokem vazba maturované miRNA, jež je součástí RISC komplexu, k cílové sekvenci mRNA. Vazba je zprostředkována pomocí komplementárního párování tzv. “seed” sekvence na 5' konci miRNA ke 3'UTR cílové mRNA. Tato oblast se obvykle nachází na pozici 2. – 8. nukleotidu miRNA (Lewis *et al.*, 2003). V závislosti na míře komplementarity k cílové mRNA nastává jeden či druhý způsob výše zmíněné regulace (Hutvagner, Zamore, 2002).

K represi translace dochází na různých úrovních tohoto procesu. Na úrovni iniciace je zabráněno translaci vazbou proteinu Ago2 jako součásti RISC komplexu na m7G čepičku cílové mRNA, a proto nemůže být m7G čepička přístupná iniciačnímu faktoru

eIF4, který je nezbytný pro iniciaci (Kiriakidou *et al.*, 2007). Jiným způsobem represe iniciační fáze translace je zabránění připojení velké ribozomální podjednotky (60S) k malé (40S) podjednotce, bez čehož nemůže být translace zahájena (Wang *et al.*, 2008). Na úrovni elongace je vznikající polypeptidový řetězec vytvořen nedokončený, protože ribozomy předčasně disociují od mRNA a elongace bez nich nemůže pokračovat (Petersen *et al.*, 2006).

Pokud má být mRNA degradována, dochází nejprve k interakci RISC komplexu s deadenylačními komplexy Pan2-Pan3 a Ccr4-Caf1, které mají za úkol odstranit polyA konec na 3' konci mRNA. Následuje odstranění m7G čepičky komplexem Dcp1-Dcp2 a rozštěpení mRNA 5'-3' exonukleázovou aktivitou enzymu Xrn1 (Chen *et al.*, 2009; Rehwinkel *et al.*, 2005).

Kromě miRNA výhradně inhibujících translaci byla popsána lidská miR-369-3, která osciluje mezi represí a aktivací v závislosti na fázi buněčného cyklu. V proliferujících buňkách reprimuje translaci, zatímco v G0 fázi podmiňuje aktivaci. Pokud se za těchto okolností miR-369-3 váže k AU-bohatým elementům (ARE) mRNA TNF- α (tumor necrosis factor- α), je to považováno za aktivační signál k mobilizaci členů RISC komplexu za účelem snížení resp. zvýšení translace (Vasudevan *et al.*, 2007).

2.7. Metody detekce a kvantifikace microRNA

K detekci miRNA se využívá několika metod jako je sekvenování, Northern blot, *in situ* hybridizace (ISH), microarray a kvantitativní PCR v reálném čase.

Sekvenování nové generace je vysokokapacitní technika s vysokou citlivostí a lze pomocí něho rozlišit heterogenní konce, délky a míru exprese (Guo *et al.*, 2011).

Northern blot je používán k detekci hladin miRNA. Nevýhodou této metody je nízká senzitivita a neschopnost analýzy mnoha vzorků najednou. Použití speciálních LNA sond (locked nucleic acid), v nichž je každý třetí nukleotid nahrazen LNA, její senzitivitu pro detekci miRNA zvyšuje. LNA oligonukleotidy jsou třídou bicyklických RNA analogů s mnohonásobně vyšší afinitou k cílové RNA či DNA (Koshkin, Wengel, 1998; Schmittgen *et al.*, 2004).

In situ hybridizace umožňuje vizualizovat expresi a lokalizaci molekul v buňce, tkáni či embryu pomocí hybridizace DNA či RNA sond k cílové sekvenci. Hlavní výhodou této metody je místně-časové stanovení exprese, což může být u miRNA důležitým vodítkem k určení biologické úlohy či patologie příslušných nemocí. ISH poskytuje také

semikvantitativní analýzu exprese miRNA. Senzitivitu této metody zvyšuje stejně jako u Northern blotu použití LNA sond (de Planell-Saguer, Rodicio, 2013).

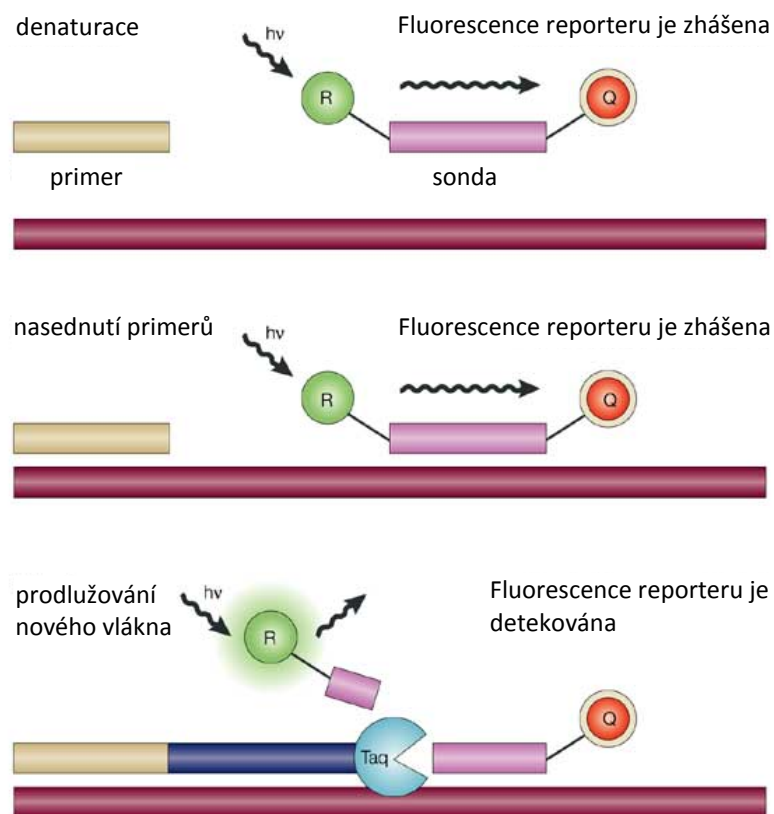
Metoda microarray je schopná stanovit míru exprese velkého množství současně analyzovaných microRNA bez nutnosti jejich reverzní transkripce do komplementární DNA. Principem této metody je hybridizace fluorescenčně značených miRNA k oligonukleotidovým sondám, které jsou pevně vázány kovalentní vazbou k přesně definovaným, ohraničeným částem arraye (čipu). Dle intenzity fluorescenčního signálu na příslušné pozici lze detekovat míru exprese dané miRNA. Kvůli své nižší senzitivitě je potřeba takto získané výsledky potvrdit senzitivnější metodou, např. qRT-PCR (Li, Ruan, 2009). Vzhledem k tomu, že jsem pomocí qRT-PCR prakticky detekovala microRNA ve své práci, věnuji této metodě větší prostor než ostatním.

2.7.1. Kvantitativní PCR v reálném čase

Kvantitativní PCR v reálném čase je modifikací klasické PCR (polymerázové řetězcové reakce), která je nyní jednou z nejvyužívanějších metod molekulární biologie. Principem PCR je namnožení specifického úseku DNA. Toho lze docílit cyklickým střídáním tří dílčích částí reakce. V první fázi dochází vlivem vysoké teploty k denuraci dvou vláken DNA. Obvykle k denuraci dochází při teplotě okolo 95 °C. Ve druhé fázi hybridizují k jednovláknové DNA primery (přímý a zpětný), které vymezují oblast, jež má být amplifikována. Během třetí fáze dochází činností DNA polymerázy k samotné syntéze nového vlákna DNA. Mnohonásobné opakování takového cyklu má za následek exponenciální nárůst počáteční DNA (Mullis *et al.*, 1986). Při reakci se zpravidla používá termostabilní Taq polymeráza izolovaná z organismu *Thermus aquaticus*, která vydrží teplotu až 95 °C, a proto si zachovává schopnost amplifikace i po několik desítek cyklů (Saiki *et al.*, 1988).

U metody kvantitativní PCR v reálném čase lze množství přibývajícího PCR produktu sledovat v podobě fluorescenčního signálu tzv. v reálném čase, myšleno od začátku až do konce PCR reakce. Na rozdíl od konvenční PCR, u níž lze produkt detekovat až po skončení samotné reakce a kvantifikovat jej např. pomocí elektroforézy (Heid *et al.*, 1996). Pokud jsou pomocí kvantitativní PCR analyzovány miRNA či jiné RNA, je nutno tyto nukleové kyseliny nejprve reverzně přepsat do komplementární DNA (cDNA), která slouží jako výchozí produkt qRT-PCR (Gibson *et al.*, 1996).

Amplifikovanou DNA lze detekovat specificky nebo nespecificky. Ke specifické detekci se využívají speciální fluorescenční sondy, např. tzv. TaqMan sondy. Taková sonda je značena dvěma druhy fluorescenčních barev. Na 5' konci je navázán reportér a na 3' konci zhášec (quencher). V této podobě sonda hybridizuje k cílové DNA ve stejné fázi jako primery. Dokud je sonda neporušená, je zhášec v dostatečné blízkosti k reportéru a fluorescence reportérem emitovaná je zhášečem absorbovaná. Ve fázi prodlužování DNA řetězce štěpí DNA polymeráza svou 5'-3' exonukleázovou aktivitou navázanou sondu a reportér se dostává daleko od zhášeče. V tomto okamžiku dojde k emisi fluorescence, která je zaznamenána detektorem v čase, kdy k ní došlo. Na konci reakce je výsledkem amplifikační křivka zobrazující nárůst fluorescence v čase. Číslo cyklu, ve kterém amplifikační křivka překročí stanovený práh, je popisováno jako Ct (cycle treshold) (Heid *et al.*, 1996). Nespecificky lze detekovat celkovou DNA značenou pomocí fluorescenční barvy vážící se do DNA. Nespecifická barva je např. SYBR Green (Lind *et al.*, 2006). Princip fungování TaqMan sondy je znázorněn na obrázku č. 2.



Obr. 2: Schematické znázornění fungování TaqMan hydrolyzační sondy během kvantitativní PCR. Činností 5'-3' exonukleázové aktivity termostabilní DNA polymerázy je štěpena sonda během prodlužování amplifikujícího se vlákna, což způsobí oddělení a oddálení reportérového fluoroforu od zhášeče. V případě působení externího světelného zdroje ($h\nu$) je emitovaná fluorescence během každého PCR cyklu úměrná množství vznikajícího produktu. (Upraveno dle Koch, 2004)

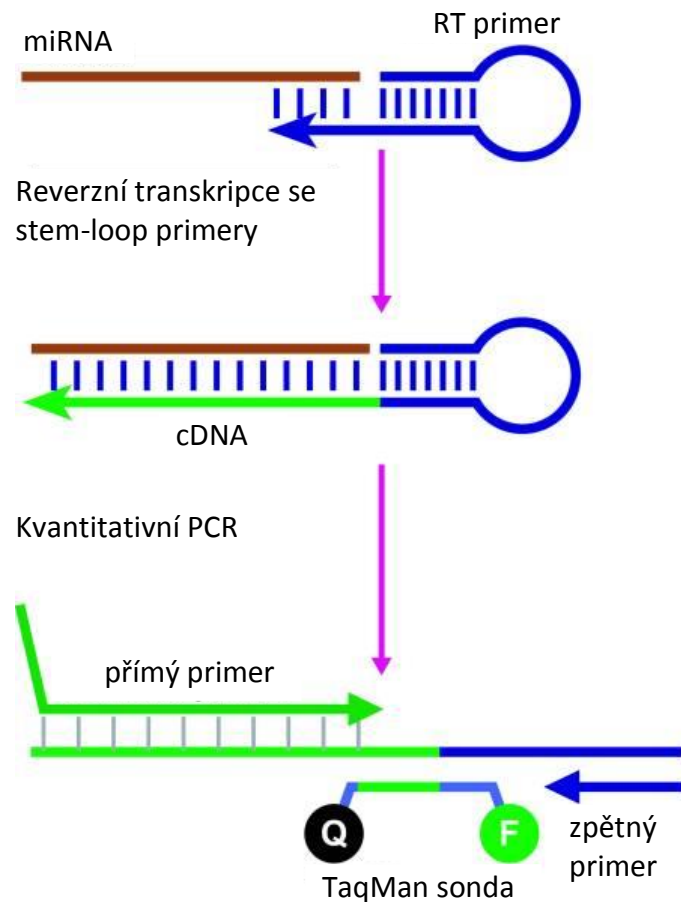
Kvantitativní PCR v reálném čase nabízí dva způsoby kvantifikace – absolutní a relativní. U absolutní kvantifikace je spolu se vzorkem neznámé koncentrace amplifikováno několik vzorků známé koncentrace, z nichž je sestavena standardní křivka. Z křivky lze následně odečíst koncentraci neznámého vzorku (Dhanasekaran *et al.*, 2010). Pomocí relativní kvantifikace lze určit relativní množství exprimovaného genu vůči housekeepingovému nebo jinému genu vyznačujícím se stálou expresí ve všech testovaných vzorcích (Heid *et al.*, 1996).

Při použití speciálních primerů pro detekci miRNA je kvantitativní PCR vysoce senzitivní a specifická metoda, a to i pro nízké hladiny miRNA. Zároveň je to vysokokapacitní metoda umožňující analýzu mnoha vzorků najednou (Schmittgen *et al.*, 2004). Pokud má být zachována vysoká senzitivita této metody, používání standardních primerů není pro detekci miRNA vhodné z několika důvodů. MiRNA jsou příliš krátké molekuly pro používání konvenčních primerů (maturované miRNA dosahují přibližně stejné délky jako standardní primery). Sekvence miRNA jsou velmi podobné a nevhodně zvolené primery by mohly hybridizovat k jiným obdobným miRNA. Standardní primery by mohly nasedat nejen na maturované miRNA, ale i na jejich prekurzory či části jiných RNA, pokud by byly ve vzorku přítomné. Tato úskalí při detekci miRNA eliminuje používání alternativních druhů reverzně transkriptázových primerů, z nichž jsou nejčastější následující dva druhy (Schmittgen *et al.*, 2008).

Prvním druhem jsou tzv. stem-loop primery (primery s vlásenkou). Tyto reverzně-transkriptázové (RT) primery jsou tvořeny krátkou jednovláknovou částí komplementární k miRNA, na ni navazující dvouvláknovou částí a smyčkou, která je tvořena univerzální vazebnou sekvencí. Nejprve dojde k hybridizaci jednovláknové části primeru ke 3' konci miRNA a reverzní transkriptázou je vznikající vlákno prodlužováno a miRNA je přepsána do cDNA. V této fázi je zachována struktura vlásenky primeru. Následně dojde pomocí kvantitativní PCR k amplifikaci cDNA a její detekci. V první fázi kvantitativní PCR denaturuje dvouvláknová část RT primeru, o něžž je cDNA prodloužena, a primer linearizuje. K takovéto cDNA molekule hybridizuje specifický přímý primer, univerzální reverzní primer a hydrolyzační TaqMan sonda, díky níž je možné amplifikaci sledovat (Chen *et al.*, 2005). Na obrázku č. 3 je schematicky znázorněno fungování stem-loop primeru.

Jiným druhem alternativních primerů jsou lineární oligo(dT) primery. Pro fungování těchto primerů musí nejprve poly(A) polymeráza (PAP) prodloužit 3' konec

maturované miRNA o několik adenosinů a vytvořit poly(A) konec. Následně proběhne reverzní transkripce s těmito primery, které obsahují na 3' konci oligo(dT) a na 5' konci univerzální sekvenci pro vazbu PCR primerů. Během reverzní transkripce se oligo(dT) sekvence primeru naváže na poly(A) konec miRNA a dochází od něho k prodlužování nového řetězce a k vytvoření cDNA. Při následné kvantitativní PCR hybridizují k prodlouženým cDNA vláknům univerzální zpětný primer a specifický přímý primer (Shi, Chiang, 2005).



Obr. 3: Schematické znázornění fungování stem-loop primeru během kvantitativní PCR.

V prvním kroku se naváže RT stem-loop primer ke 3' konci maturované miRNA molekuly a ta je pomocí reverzní transkriptázy přepsána do cDNA. Následně je cDNA kvantifikována pomocí kvantitativní PCR s využitím TaqMan sond. K cDNA hybridizují specifický přímý primer, univerzální zpětný primer a fluorescenčně značená TaqMan sonda. Princip fungování TaqMan sondy je popsán na obrázku č. 2. (Upraveno dle Chen *et al.*, 2005)

3. Předčasný porod

Předčasný porod je definovaný jako jakýkoliv porod před dokončeným 37. týdnem těhotenství. Je jednou z nejčastějších příčin úmrtnosti novorozenců a jeho podíl na všech porodech je 5 – 18 % (Blencowe *et al.*, 2012). Následky předčasně narozených dětí souvisí s nedostatečným vývinem orgánů před jejich narozením. Patří mezi ně poruchy učení a kognitivních procesů, opožděný psychomotorický vývoj, zvýšený výskyt dětské mozkové obrny, vady sluchu, zraku (Mwaniki *et al.*, 2012) a vady plic (Hibbard *et al.*, 2010). Z klinického hlediska lze předčasný porod rozdělit do následujících tří skupin (Goldenberg *et al.*, 2008):

1. Indikace císařského řezu nebo vyvolání porodu vlivem komplikací na straně matky nebo plodu je příčinou 30 – 35 % předčasných porodů.
2. Spontánní předčasný porod tvoří 40 – 45 % všech předčasných porodů.
3. Předčasný odtok plodové vody se vyskytuje u 25 – 30 % předčasných porodů.

3.1. Klasifikace spontánního předčasného porodu a porodu s předčasným odtokem plodové vody

Spontánní předčasný porod (PTB = spontaneous preterm birth) je definován nástupem pravidelných kontrakcí před dokončeným 37. týdnem těhotenství (Goldenberg *et al.*, 2008).

Předčasný odtok plodové vody je definován jako ruptura plodových obalů s odtokem plodové vody více než hodinu před nástupem kontrakcí. V anglické literatuře je označován jako PROM (prelabor rupture of membranes). PROM se dle doby ruptury plodových obalů dělí do dvou skupin: TPROM a PPRM. TPROM (term prelabor rupture of membranes) nastává po dokončeném 37. gestačním týdnu a k PPRM (preterm prelabor rupture of membranes) dochází před 37. týdnem těhotenství. PPRM se vyskytuje přibližně u 3 % porodů (Mercer, 2003).

3.2. Patofyziologie vzniku spontánního předčasného porodu a porodu s předčasným odtokem plodové vody – společné znaky

Etiologie PTB a PPRM je multifaktoriální a může k nim dojít za přítomnosti jednoho či několika patofyziologických jevů. Existuje několik hypotéz popisujících možné příčiny těchto těhotenských komplikací.

3.2.1. Infekce

Infekce doprovází značnou část případů PTB a PPRM. Nejčastějšími typy infekcí u těchto těhotenských komplikací jsou mikrobiální invaze amniální dutiny (MIAC = microbial infection of the amniotic cavity) a intraamniální zánět (IAI = intraamniotic inflammation) vedoucí k histologické chorioamnionitidě (HCA = histologic chorioamnionitis), což je zánět fetálních membrán (amnionu a chorionu). Infekce vyvolává produkci a sekreci zánětlivých cytokinů, které indukují produkci prostaglandinů vedoucí k dozrávání děložního čípku a kontrakcím u PTB. U PPRM zánětlivé markery vyvolávají další níže popsané procesy vedoucí k ruptuře plodových obalů (Fortunato, Menon, 2001). MIAC je podmíněn přítomností genitálních mycoplasmat (*Ureaplasma spp.* a *Mycoplasma hominis*) a/nebo přítomností *Chlamydia trachomatis* (Musilova *et al.*, 2015).

3.2.2. Zánětlivá odpověď bez přítomnosti mikroorganismů

Kromě infekčních agens může být zánět vyvolán tzv. sterilně, tzn. bez detekovaných mikroorganismů. Výskyt intraamniálního zánětu bez přítomných mikroorganismů byl popsán u PTB i u PPRM, avšak v rozdílném procentuálním zastoupení. Zatímco u PPRM pacientek byl sterilní zánět i mikroby indukovaný zánět zastoupen stejně, a to přibližně u 30 % testovaných žen, u PTB byl mikrobiální zánět zastoupen pouze v 11 %, avšak sterilní zánět byl zastoupením srovnatelný s PPRM pacientkami. Obě těhotenské komplikace se lišily v síle vyvolané imunitní reakce jednotlivými typy zánětů. U PTB dokázal mikroby vyvolaný zánět indukovat silnější imunitní reakci než sterilní zánět, zatímco u PPRM nebyl rozdíl v síle imunitní odpovědi mezi oběma typy zánětů statisticky signifikantní (Romero *et al.*, 2014, 2015).

Romero a kolegové popsali možný mechanismus vzniku sterilního zánětu u PTB pacientek. Při zánětu vyvolaném např. buněčným stresem či nekrotickými buňkami dochází k produkci tzv. DAMPs (danger associated molecular patterns = molekulární vzory spojené s nebezpečím). DAMPs jsou rozpoznávány PRR receptory (PRR = pattern recognition receptor) jako např. TLR (toll-like receptor)-2, -4 a -9 na povrchu antigen prezentujících buněk (APC), což vede k sekreci stresových signálů nazývaných alarminy. Alarminy mohou indukovat zánět stimulací produkce zánětlivých cytokinů jako IL-6, IL-1 β , IL-8 či TNF- α (Bianchi, 2007; Romero *et al.*, 2014). Mechanismus zodpovědný za indukci sterilního IAI u PPRM zatím není znám (Romero *et al.*, 2015).

3.3. Patofyziologie vzniku spontánního předčasného porodu a porodu s předčasným odtokem plodové vody – odlišné znaky

Jestliže u PTB i PPRM dochází k produkci zánětlivých markerů vedoucích k předčasnému porodu, pravděpodobně existuje nějaký další faktor, který je přítomen u PPRM, ale nikoliv u PTB, a pokud ano, tak pouze v minimální míře (Fortunato, Menon, 2001). V následující studii byla zkoumána schopnost zánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α vyvolat imunitní reakci v plodových obalech. Dle jejích výsledků hraje TNF- α nejdůležitější roli v patogenezi vzniku PPRM, protože indukuje proces apoptózy, expresi matrixových metaloproteináz (MMP) vedoucích k degradaci extracelulární matrix plodových obalů a aktivaci kaspáz. Tyto děje, podrobněji popsane dále, jsou spojovány s patofyziologií vzniku PPRM (Fortunato *et al.*, 2002). V navazující studii byla zjištěna u IL-1 β nižší a u IL-6 minimální schopnost vyvolat apoptózu a expresi matrixových metaloproteináz v plodových obalech (Fortunato, Menon, 2003).

Z těchto objevů lze soudit, že některé z analyzovaných cytokinů mohou být rozhodujícím faktorem v tom, zda dojde k iniciaci jedné či druhé cytokinové dráhy vedoucí ke vzniku PTB či PPRM. To může být také ovlivněno hormony nebo dalšími exogenními faktory jako např. infekcí. (Fortunato *et al.*, 2002).

3.3.1. Snížený obsah kolagenu ve fetálních membránách u PPRM

Snížení obsahu kolagenu v plodových obalech vede ke snížení pružnosti fetálních membrán a snazší ruptuře. Matrixové metaloproteinázy jsou enzymy schopné degradovat extracelulární matrix, v tomto případě ECM plodových obalů. Při porovnávání obsahu MMP v plodových obalech u PTB a PPRM byl výskyt MMP-9, MMP-2 a MT1-MMP (aktivátor MMP-2) u skupiny PPRM pacientek signifikantně vyšší. Významně vyšší výskyt MMP-2 a MMP-9 byl následně potvrzen i v plodové vodě (Fortunato, Menon, 2001). V jiné studii byl potvrzen signifikantně vyšší výskyt matrixové metaloproteinázy 8 v plodové vodě PPRM pacientek oproti PTB pacientkám (Maymon *et al.*, 2000a). Tyto objevy ukazují na matrixové metaloproteinázy jako na možné efekторы vzniku ruptury plodových obalů.

3.3.2. Apoptóza u PPRM

Apoptóza fetálních membrán je dobře popsána jako faktor asociovaný s PPRM (Canzoneri *et al.*, 2013), u kterého k ní dochází ve větší míře než u PTB (Fortunato *et al.*,

2000). To potvrzuje studie detekující transkripty genů s pro- nebo anti-apoptotickou funkcí v plodových obalech. U PPRM byla detekovaná 10x vyšší exprese mRNA p53 (proapoptotická funkce) oproti PTB. U PTB byla 3,5x nižší exprese mRNA Bax (proapoptotická funkce) než u PPRM. mRNA Bcl-2 s antiapoptotickou funkcí se u PTB vyskytovala 100x více než u PPRM, což naznačuje predominantní efekt u PTB (Fortunato, Menon, 2001).

U buněk fetálních membrán může zřejmě dojít k přechodnému zastavení buněčného cyklu, a pokud se podmínky obklopující buňku nezlepší, může to potencionálně vést k apoptóze nebo senescenci (Serrano *et al.*, 1997; Zindy *et al.*, 1998). Osud buňky, ať už žít nebo podstoupit buněčnou smrt apoptózou nebo senescencí, pravděpodobně závisí na rizikových faktorech.

3.3.3. Senescence plodových obalů u PPRM

Pravděpodobnou hypotézou vysvětlující vznik PPRM je senescence plodových obalů. Na stárnutí buňky se podílí především oxidativní stres. Jedním z biomarkerů asociovaných s oxidativním stresem je eikosanoid a metabolit kyseliny arachidonové F2-isoprostan (F2-IsoP) (Menon *et al.*, 2011). Tato látka byla detekovaná v plodové vodě PPRM pacientek ve vyšší koncentraci než u PTB pacientek, což naznačuje vyšší míru oxidativního stresu u pacientek s předčasným odtokem plodové vody (Menon *et al.*, 2014). Stejný závěr u PPRM pacientek podporuje rovněž studie popisující kratší délku telomer fetálních leukocytů u pacientek s rupturou plodových obalů v porovnání s PTB pacientkami odpovídajícího gestačního stáří (Menon *et al.*, 2012). Délka telomer fetálních leukocytů u pacientek s PPRM s gestačním stářím nižším než 34 týdnů těhotenství byla srovnatelná s délkou telomer pacientek s fyziologickým porodem v termínu. Tento výsledek ukazuje na zrychlený proces stárnutí u PPRM. Stejný fakt naznačuje rozdílná morfologie buněk plodových obalů. Buňky u PPRM byly oproti buňkám u PTB zploštělé a zvětšené, což odpovídá charakteristice senescentních buněk (Menon *et al.*, 2014).

Vlivem rizikových faktorů dochází ke hromadění reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a aktivaci předčasného stárnutí fetálních membrán u PPRM. Senescence je mj. charakteristická nevratným zastavením buněčného cyklu. Ale na rozdíl od apoptózy tyto buňky přetrvávají v prostředí tkáně a změní svoji funkci tak, že indukují produkci zánětlivých markerů (Coppé *et al.*, 2010; Menon *et al.*, 2014). Zánětlivé znaky tvoří základ

PPROM a redukuje pružnost plodových obalů, což vede k jejich ruptuře (Moore *et al.*, 2010).

3.4. Rizikové faktory vzniku spontánního předčasného porodu a porodu s předčasným odtokem plodové vody

Rizikové faktory související s PTB a PPRROM jsou opakované potraty, uterinní a cervikální anomálie, umělé oplodnění, vícečetné těhotenství, zdravotní komplikace matky, vaginální krvácení během těhotenství, abnormální placentace, urogenitální infekce, nízký socioekonomický status, kouření a nízký BMI index v době početí. Další faktory asociované s předčasným porodem jsou věk matky, parita, dědičnost či užívání drog (Menon, 2008). Největším rizikem pro předčasný nástup porodu je předčasně narozené dítě v předchozí graviditě (Mercer *et al.*, 1999).

3.5. Genetické predispozice pro rozvoj předčasného porodu

Při zkoumání možných kandidátních genů zodpovědných za PTB či PPRROM bylo objeveno několik genů, u nichž jsou převážně jednonukleotidové polymorfismy (SNP) asociované s nástupem porodu před termínem. Lze tedy předpokládat, že by případná regulace těchto genů pomocí miRNA vedla také k předčasnému porodu. Jedná se především o geny kódující proteiny, které hrají roli při zánětu nebo v imunitní odpovědi během těhotenství či při porodu.

3.5.1. Gen *TNF*

Gen *TNF* kóduje protein TNF- α , který hraje roli v remodelaci cervixu a fetálních membrán a indukuje produkci matrixových metaloproteináz degradujících ECM (So *et al.*, 1992). Monzón-Bordonaba a kolegové popsali, že TNF- α se účastní rozdílným způsobem fyziologického těhotenství s porodem v termínu a gravidity končící předčasnou rupturou plodových obalů. Za normálních podmínek TNF- α indukuje diferenciaci trofoblastu, implantaci, vývoj placenty a růst plodových obalů. Při deregulaci sekrece TNF- α může dojít k inhibici endokrinní funkce, aktivaci proteáz a degradaci ECM. Tyto děje mohou v rané fázi těhotenství vyústit v jeho spontánní zánik a v pozdější fázi gravidity může dojít k předčasné ruptuře plodových obalů či PTB (Monzón-Bordonaba *et al.*, 2002).

V souvislosti se zánětlivou odpovědí byl studován polymorfismus v *TNF* genu na pozici 308 (oblast promotoru genu *TNF*), a to konkrétně alela *TNF(-308A)*. U jedinců

s alespoň jednou alelou *TNF(-308A)* dochází k mírné nadprodukci $TNF-\alpha$ a intenzivnější zánětlivé aktivitě (Gonzalez *et al.*, 2003). Nejprve byla studována souvislost předčasného porodu (nerozlišeno PTB a PPRM) s výskytem *TNF(-308A)*. Závislost však nebyla potvrzena (Dizon-Townson *et al.*, 1997). Následně se Roberts a kolegové zabývali souvislostí mezi výskytem *TNF(-308A)* a vznikem PTB a PPRM. Dle jejich výsledků existuje vztah mezi výskytem alely -308A a vznikem PPRM, ale spojitost výskytu této alely se vznikem PTB prokázána nebyla (Roberts *et al.*, 1999). V jiné studii byl potvrzen vztah mezi výskytem předčasného porodu a přítomností *TNF(-308A)* alely (Moore *et al.*, 2004). Autoři studie však v rámci předčasného porodu nerozlišovali mezi PTB a PPRM. Z prezentovaných výsledků lze předpokládat jistou spojitost mezi výskytem alely -308A *TNF* genu a vznikem předčasného porodu. Rozhodně však nelze potvrdit souvislost této alely s PTB či PPRM. Odlišné výsledky mohou být způsobeny jak rozdílným zastoupením PTB či PPRM v rámci předčasného porodu, tak odlišným složením testované populace (genetické i rasové).

3.5.2. Gen *IL1B*

Gen *IL1B* kóduje protein IL-1 β , který je dalším prozánětlivým cytokinem hrajícím roli v těhotenství. U primátů IL-1 β prostupuje amniální dutinou a indukuje produkci prozánětlivých cytokinů, prostaglandinů a zvyšuje děložní činnost (Sadowsky *et al.*, 2003). IL-1 β soutěží s IL1RA (antagonista receptoru IL-1 kódován genem *IL1RN*) o vazbu na IL-1 receptor a IL1RA tak může zabránit zánětu indukovanému IL-1 β vedoucí k porodu (Arend, 1991; Witkin *et al.*, 1994). Jedinci s variantou genu *IL1RN* – alela 2 IL-1RA (*IL1RN*2*) mají signifikantně vyšší hladinu IL-1RA v plazmě oproti kontrolám, které *IL1RN*2* nemají (Hurme, Santtila, 1998).

Vliv výskytu *IL1RN*2* na vznik PTB byl studován v polské populaci a autoři dospěli k závěru, že nositelky *IL1RN*2* jsou asociovány s vyšším rizikem vzniku spontánního předčasného porodu (Kalinka, Bitner, 2009). Tyto výsledky jsou překvapivé, protože byla popsána souvislost této alelické varianty s vyšší hladinou IL-1RA, u něž se předpokládá, že suprimuje zánět vyvolaný IL-1 β . Stejní autoři zkoumali v další studii souvislost výskytu *IL1RN*2* se vznikem PPRM a konstatovali, že výskyt *IL1RN*2* nepredisponuje jejich nositele k rozvoji PPRM (Kalinka, Bitner, 2009). V další studii zjišťovali Genç a kolegové vliv výskytu *IL1RN*2* na vznik PTB a PPRM v různorodé populaci USA. Při analýze celé populace nebyl zjištěn vliv výskytu *IL1RN*2* na žádný ze

zkoumaných druhů předčasného porodu. Při analýze dílčích populací byla zjištěna souvislost výskytu *IL1RN*2* na vznik PTB i PPRM u hispánské populace (Genç *et al.*, 2002). Vliv *IL1RN*2* na PPRM byl zkoumán také u vícečetných těhotenství a byla potvrzena souvislost s výskytem *IL1RN*2* a vznikem PPRM (Kalish *et al.*, 2003). Vlivem různorodého složení studované populace jsou proto i tyto výsledky nekonzistentní.

3.5.3. Gen *IL6*

Protein IL-6 kódovaný genem *IL6* je prozánětlivý cytokin aktivující akutní fázi imunitní odpovědi, stimuluje T lymfocyty, indukuje konečnou diferenciaci B lymfocytů a indukuje produkci C-reaktivního proteinu (Papanicolaou *et al.*, 1998). Zvýšená hladina IL-6 byla popsána v několika studiích u PTB i u PPRM (Goepfert *et al.*, 2001; Rizzo *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 1990).

Polymorfismus v promotoru genu *IL6*, konkrétně alela *IL6(-174C)* byla zkoumána v souvislosti se vznikem PTB. Nejprve byla popsána souvislost výskytu *IL6(-174C)* alely se sníženou hladinou IL-6 v plazmě (Hoffmann *et al.*, 2002) a následně autoři jiné studie prezentovali signifikantně nižší frekvenci obou kopií *IL6(-174C)* u žen s PTB (Simhan *et al.*, 2003). Ve studii Simhana a kolegů existují disproporce v testovaných parametrech mezi jednotlivými rasami.

3.5.4. Gen *MMP1*

Gen *MMP1* kóduje stejnojmenný protein, který se účastní ruptury plodových obalů pomocí matrixových metaloproteináz degradujících kolagen. Nejprve *MMP1* katabolizuje fibrilární kolagen, který je následně degradován želatinázami *MMP2* a *MMP9* (Crider *et al.*, 2005).

K nárůstu koncentrace *MMP1* s gestačním stářím dochází jak u PPRM, u něž byla prokázána asociace s *MMP1*, tak u fyziologického porodu v termínu (Maymon *et al.*, 2000b). U *MMP1* byl zkoumán polymorfismus v jeho promotoru na pozici -1607, a to alela *2G*, u níž je na zmíněné pozici inzertován guanin. Porovnáván byl výskyt této alely u PPRM a u FG v buňkách amnionu u afroamerické populace. Autoři této studie pozorovali signifikantně vyšší výskyt *2G* alely u PPRM než u kontrol. Vyvozují tedy, že alela *2G* má silnější promotorovou aktivitu v amniálních buňkách a představuje při vlivu stejných rizikových faktorů větší riziko vzniku PPRM (Fujimoto *et al.*, 2002).

3.5.5. Gen *MMP9*

MMP9 kóduje stejnojmenný protein, jenž se účastní degradace bazální membrány a ostatních součástí ECM. K nárůstu jeho koncentrace dochází v době porodu (McLaren *et al.*, 2000). Při hledání možného polymorfismu predisponujícího ke vzniku PPRM zkoumali Ferrand a kolegové promotor *MMP9*. Jejich předpoklad, že délka CA repetitivní sekvence na pozici -1562 tohoto genu je predisponující pro vznik PPRM se nepotvrdila. Autoři však zjistili, že 14 opakování CA repetice se pojí se signifikantně vyšším rizikem PPRM než 20 opakování CA repetice a vede ke zvýšené expresi *MMP9* (Ferrand *et al.*, 2002).

3.6. Diagnostika PPRM

Vzhledem k tomu, že při malém úniku amniální tekutiny není vždy jasné, zda se jedná o plodovou vodu či jiné tělní tekutiny, bylo vyvinuto několik diagnostických testů, které jsou schopny začínající PPRM zachytit. Mezi orientační testy patří test stanovující vaginální pH, např. pomocí pH indikátoru nitrazinu, a tzv. ferning test (fern = kapradina). Měření pH jako indikátoru PPRM vychází z faktu, že pH plodové vody je vyšší než standardní vaginální pH, a pokud již došlo k ruptuře plodových obalů, lze takto přítomnost plodové vody detekovat (Abdelazim, Makhlof, 2011; Ernest *et al.*, 1989). Při ferning testu se využívá schopnosti plodové vody krystalizovat a pod mikroskopem lze pozorovat krystaly připomínající tvar kapradiny (Abdelazim, Makhlof, 2011). Oba testy je nutno potvrdit jiným diagnostickým testem. PPRM je možno stanovit na základě měření koncentrace prolaktinu ve vaginální tekutině. Koncentrace tohoto hormonu totiž vzrůstá s blížícím se porodem (Buyukbayrak *et al.*, 2004). Jiným indikátorem začínajícího PPRM je zvýšená koncentrace β podjednotky lidského choriového gonadotropinu (β -hCG) v krvi (oproti FG) (Tian *et al.*, 2014). Dalším způsobem jak PPRM diagnostikovat je detekce α -fetoproteinu (AFP) ve vaginální tekutině nebo v cervikálním sekretu. AFP se v plodové vodě nachází ve vysoké koncentraci na rozdíl od ostatních tělních tekutin, za které by mohla být plodová voda zaměněna (Kishida *et al.*, 1995). Začínající PPRM lze identifikovat také detekcí IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) ve vaginální tekutině, protože jeho koncentrace v plodové vodě je mnohonásobně vyšší než v jiných tekutinách, s nimiž by mohla být plodová voda zaměněna (Darj, Lyrenäs, 1998). Diagnostikovat PPRM lze také na základě zvýšené koncentrace fetálního fibronektinu

(fFN) (Abdelazim, 2012) či diaminooxidázy (DAO) (Gaucherand *et al.*, 1997) ve vaginální tekutině. Hodnotící kritéria popsaných testů jsou zobrazeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Výsledky hodnotících kritérií diagnostických testů detekujících nástup PPRM

Název testu/detekovaná látka	Hraniční hodnota	Senzitivita (%)	Specifická (%)	PPV (%)	NPV (%)
Nitrazinový test	pozitivní/negativní	90-97	16-70	93-75	80-93
Ferning test	pozitivní/negativní	51-98	70-88	84-93	87-97
Prolaktin	> 30-50 μ IU/ml	70-95	76-78	72-87	75-93
β -hCG	> 40-65 μ IU/ml	68-95	70-95	73-91	78-97
AFP	> 30 μ g/l	90-94	95-100	94-100	91-94
IGFBP-1	> 3 μ g/l	74-97	74-98	73-97	56-95
fFN	> 50 ng/ml	97-98	70-97	74-93	98-100
DAO	> 25 μ IU/test	83	90-100	100	89

(Upraveno dle Caughey *et al.*, 2008; Di Renzo *et al.*, 2011; El-Messidi, Cameron, 2010)

3.7. Léčba PPRM

Při prokázání odtoku plodové vody je nezbytná hospitalizace, stanovení infekčních markerů (počet leukocytů, hladina C-reaktivního proteinu, případně hladina cytokinů IL-6 a TNF- α), provedení mikrobiologického vyšetření s odebráním vzorku na kultivaci z hrdla a pochvy u předčasného porodu a za přítomnosti zánětlivých markerů a vyloučení distresu plodu provedením kardiokografie. Za přítomnosti infekce či kolonizace pochvy streptokoků skupiny B dochází k okamžité provokaci porodu a intravenóznímu podání antibiotik. Jestliže existují kontraindikace k vaginálnímu vedení porodu, je těhotenství ukončeno elektivním císařským řezem (Měchurová, Rokyťová, 2002).

Pokud nejsou přítomny známky infekce plodu a matky, známky distresu plodu ani pozitivní výsledek kultivace streptokoků skupiny B, je u gestačního stáří nižšího než 28. týdnů doporučen expektační postup a individuální přístup, u 28. až 31. týdne těhotenství je porod provokován za 72 hodin po odtoku plodové vody (24 hodin po ukončení indukce plicní zralosti), u 32. až 34. gestačního týdne za 48 hodin a u 35. až 36. gestačního týdne za 24 hodin. Profylakticky je doporučeno podání antibiotik. Do 34. týdne těhotenství je preventivně aplikována tokolýza po dobu maturace plic. Kortikosteroidy jsou podávány do

34. týdne těhotenství a pouze při negativních infekčních markerech. Pokud se vyskytnou známky infekce matky nebo infekce či distres plodu je nutno přistoupit k radikálnímu postupu v kterékoli fázi těhotenství. V případě extrémně nezralého plodu (do 26. gestačního týdne) je doporučen individuální přístup. Pokud je plod v poloze koncem pánevním do hmotnosti 2 500 gramů, u vícečetného těhotenství do 32. gestačního týdne, u starších těhotenství a nejsou-li plody v poloze podélně hlavičkou, je indikován elektivní císařský řez (Měchurová, Rokytová, 2002).

4. Úloha microRNA v těhotenství

Velmi důležitou roli v těhotenství hraje placenta. Je to dočasný orgán sloužící k oboustrannému spojení matky a plodu. Zprostředkovává výměnu živin, dýchacích plynů a odpadních látek. Zároveň je to také endokrinní orgán produkující hormony a růstové faktory potřebné pro embryonální vývoj. Správná placentace je nezbytná pro fyziologický vývoj plodu a udržení těhotenství.

4.1. Exprese microRNA v placentární tkáni

MicroRNA hrají důležitou roli v regulaci vývoje placenty a mnoho z nich bylo identifikováno v placentární tkáni (Barad *et al.*, 2004; Enquobahrie *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012). Byla popsána úloha miRNA v regulaci proliferace buněk trofoblastu, jejich migraci, invazi a apoptóze (Fu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2012). Mnohé miRNA exprimované především nebo výhradně v těhotenství se shlukují do jednoho chromozomálního regionu. Tento klastr může být řízen stejným promotorem, mít podobnou “seed” sekvenci a cílovou RNA.

C19MC (miRNA klastr na chromozomu 19) je placentárně specifický, nachází se v chromozomální oblasti 19q13.41 a je doposud největším objeveným lidským genovým klastrem. Obsahuje 46 genů pro miRNA a je dlouhý přibližně 100 kb (Bortolin-Cavaillé *et al.*, 2009). U C19MC se uplatňuje genomový imprinting a dochází k preferenční expresi genů z paternální alely. Exprese je regulována odlišnou metylací CpG bohaté oblasti promotoru nacházející se upstream od C19MC (Noguer-Dance *et al.*, 2010).

MiRNA klastr na chromozomu 14 (C14MC) je dlouhý přibližně 40 kb a nachází se v chromozomální oblasti 14q32. Klastr je tvořen 40 geny pro miRNA a vykazuje tkáňově specifickou expresi ve vyvíjejícím se embryu a v placentě. Uplatňuje se u něj také genomový imprinting, ale na rozdíl od C19MC je C14MC exprimován pouze z maternální alely. Exprese genů tohoto klastru může být regulována metylací IG-DMR (intergenic-derived differentially methylated region) oblasti nacházející se přibližně 200 kb upstream od C14MC (Seitz *et al.*, 2004).

Míra exprese jednotlivých miRNA se mezi prvním a třetím trimestrem těhotenství mění. Morales-Prieto a kolegové popsali vzrůstající trend v expresi C19MC miRNA v placentární tkáni od prvního (interrupce) do třetího trimestru a přesně opačný trend v expresi C14MC miRNA (Morales-Prieto *et al.*, 2012). Odlišný výsledek publikovali Gu

a kolegové. Prezентují, že C19MC i C14MC miRNA jsou v placentární tkáni v prvním trimestru upregulované ve srovnání se třetím trimestrem (Gu *et al.*, 2013). Z následujících důvodů shledávám druhou zmíněnou práci méně důvěryhodnou. Jsou porovnávány vzorky placentární tkáně z prvního trimestru (interrupce) asijské populace a vzorky ze třetího trimestru americké populace. V prvním i ve třetím trimestru je testováno pouze 6 vzorků a vzorky ze třetího trimestru pocházejí z porodů mezi 30. – 38. týdnem těhotenství. To je dlouhý časový interval, ale hlavně pod hranicí gestačního stáří porodu v termínu. Odlišné exprese v prvním a třetím trimestru naznačují, že jsou miRNA těchto klastrů během vývoje rozdílně regulovány a mají specifickou funkci v rozdílných stádiích těhotenství.

4.2. Exprese microRNA u PTB a PPRM

Bylo popsáno, že poruchy ve funkci a vývoji placenty souvisí s několika těhotenskými komplikacemi jako je preeklampsie nebo fetální růstová retardace. U těchto komplikací byla popsána rozdílná exprese miRNA zmíněných klastrů oproti fyziologickým graviditám a pravděpodobná regulace pomocí miRNA (Hromadnikova *et al.*, 2015b). Lze tedy předpokládat možnou souvislost patofyziologie předčasného porodu (jak spontánního předčasného porodu, tak předčasného porodu s rupturou plodových obalů) s regulací pomocí microRNA.

Existuje však pouze několik studií zkoumajících možný vliv microRNA v regulaci molekulárních mechanismů vedoucích k patofyziologii předčasného porodu (PTB i PPRM). Montenegro a kolegové zkoumali expresní profil 455 miRNA z buněk chorioamniionu. Chorioamniion obaluje amniální dutinu a hraje roli v předčasném porodu i ve fyziologickém porodu v termínu (Haddad *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). Pomocí microarray odhalili odlišnou expresi 39 miRNA u vzorků pocházejících z předčasného porodu oproti vzorkům z porodů v termínu. 31 z těchto miRNA bylo downregulovaných u porodů v termínu. Následnou PCR analýzou byly potvrzeny 4 microRNA - miR-338, miR-449, miR-136, miR-199a*, u nichž byla exprese u porodů v termínu nižší oproti předčasným porodům. Po provedení počítačové predikce byla PLA2G4B mRNA vytipována jako možný cíl miR-338. Fosfolipáza A2 skupiny IVB (PLA2G4B) je člen proteinové rodiny cytosolických fosfolipáz A₂, jejichž funkce v chorioamniionu je klíčová pro biosyntézu prostaglandinů během porodu (Okazaki *et al.*, 1981; Skannal *et al.*, 1997). Provedení několika dalších experimentálních analýz potvrdilo výsledky počítačové predikce (Montenegro *et al.*, 2009).

Ve studii Mayor-Lynn a kolegů byla sledována exprese 820 microRNA v placentární tkáni pomocí microarray. Exprese byla porovnávána u pacientek s PTB a FG. U 141 microRNA byla odlišná exprese mezi porovnávanými skupinami, přičemž u PTB bylo 113 miRNA upregulovaných a 23 downregulovaných oproti fyziologickým porodům v termínu. Po provedení upřesňující analýzy pomocí kvantitativní PCR odhalili u PTB sníženou expresi 4 miRNA (miR-15b, miR-181, miR-210 a miR-483-5p) a trend ke zvýšené expresi miR-496 oproti porodům v termínu (Mayor-Lynn *et al.*, 2011).

V další studii analyzovali Elovitz a kolegové miRNA v buňkách cervixu odebraných během 20. – 28. týdne těhotenství. Pomocí microarray analyzovali 5640 miRNA, přičemž exprese u 99 z nich se lišila u pacientek s PTB oproti ženám, u nichž probíhal porod v termínu. Po provedení validace primárních dat pomocí kvantitativní PCR byly upregulované pouze miR-143, miR-145 a miR-199b-5p v období mezi 24. – 28. týdnem těhotenství a v období mezi 20. – 24. týdnem těhotenství byla upregulovaná pouze miR-106b* (Elovitz *et al.*, 2014).

Elovitz a kolegové v další studii zkoumali expresi miRNA v krevním séru předčasně rodících pacientek a žen, u nichž probíhal porod v termínu. Stejně jako v předchozí studii analyzovali 5640 miRNA pomocí microarray a u 4 z nich se exprese lišila mezi 2 zkoumanými skupinami. Z těchto 4 miRNA byly maturované pouze miR-200a* a miR-4695-5p. U žádné z těchto miRNA však nebyl více než dvojnásobný rozdíl v expresi mezi testovanými skupinami a validace pomocí kvantitativní PCR nebyla provedena (Elovitz *et al.*, 2015).

V nedávné studii zkoumali Enquobahrie a kolegové expresi miRNA pomocí kvantitativní PCR v buňkách amnionu a chorionu u fyziologicky rodících žen v termínu a u pacientek s PTB a pacientek s PPRM. Prezentovali signifikantní rozdíl v expresi miR-223 v amnionu u PTB i u PPRM oproti kontrolám (Enquobahrie *et al.*, 2016).

Z výsledků zmíněných studií lze konstatovat, že byla identifikována jedna miRNA asociovaná s patofyziologií PPRM a pouze několik málo miRNA asociovaných s PTB.

5. Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda některé microRNA hrají roli v patofyziologii spontánního předčasného porodu (PTB) a porodu s předčasným odtokem plodové vody (PPROM). Za tímto účelem byla porovnána exprese 15 placentárně specifických microRNA kódovaných genovým klastrem na chromozomu 19 (C19MC) v placentární tkáni mezi fyziologickými graviditami, u nichž proběhl porod v termínu, graviditami s PTB a graviditami s PPRM. 15 testovanými, placentárně specifickými microRNA byly: miR-512-5p, miR-515-5p, miR-516b-5p, miR-517-5p, miR-518b, miR-518f-5p, miR-519a-5p, miR-519d-3p, miR-519e-5p, miR-520a-5p, miR-520h, miR-524-5p, miR-525-5p, miR-526a a miR-526b-5p. Jako endogenní kontroly sloužily RNU6B a RNU38B.

Dalším cílem bylo určit, zda přítomnost mikrobiální infekce amniální dutiny (MIAC) či přítomnost histologické chorioamnionitidy (HCA) ovlivňuje genovou expresi C19MC miRNA u těhotných žen s PPRM. Z tohoto důvodu byla porovnána exprese výše zmíněných 15 miRNA v rámci skupiny PPRM pacientek v závislosti na přítomnosti MIAC a HCA.

Posledním cílem bylo určit, zda exprese 15 zmíněných miRNA koreluje s gestačním stářím plodu v době porodu u skupiny pacientek s PPRM a s PTB.

6. Materiál

Jako zpracovávaný materiál sloužila část placentární tkáně z oblasti centrálního kotyledonu (fetální část placenty). Vzorky placentární tkáně s těhotenskými komplikacemi (PTB a PPRM) poskytla Fakultní nemocnice Hradec Králové a vzorky fyziologických gravidit s porodem v termínu (FG) byly poskytnuty Ústavem pro péči o matku a dítě v Praze Podolí. Ze studie byly vyloučeny pacientky s vícečetným těhotenstvím a pacientky vykazující gestační hypertenzi, preeklampsii, diabetes mellitus a viditelné vaginální krvácení. Zároveň byly vyloučeny ženy, jejichž plody jeví známky fetální růstové retardace, fetální hypoxie a plody s přítomností kongenitálních a chromozomálních abnormalit. Biologický materiál byl poskytnut na základě informovaného souhlasu pacientek a se souhlasem etické komise.

Materiál poskytlo celkem 119 těhotných žen. Studovaný soubor tvořilo 24 žen se spontánním předčasným porodem, 75 pacientek s předčasným odtokem plodové vody a 20 žen s fyziologickou graviditou a porodem v termínu. Gestační stáří v době porodu bylo u PTB v rozmezí 25+1 – 36+2 (medián 34+0), u PPRM 24+0 – 36+5 (medián 34+0) a u FG 38+5 – 40+4 (medián 39+6). Gestační stáří bylo stanoveno ultrasonograficky.

Tabulka č. 2: Počet analyzovaných vzorků rozdělený dle diagnóz pacientek a minimum a maximum gestačního stáří v době porodu odpovídající diagnostické skupině

Diagnóza	Počet pacientek ve skupině se stejnou diagnózou	Rozsah gestačního stáří v době porodu ve skupině se stejnou diagnózou
PTB	24	25+1 – 36+2
PPROM	75	24+0 – 36+5
FG	20	38+5 – 40+4

Fyziologická gravidita byla definována normálním průběhem těhotenství a porodem zdravého novorozence v termínu s hmotností větší než 2500 gramů.

Předčasný porod byl definován přítomností pravidelných děložních stahů s frekvencí nejméně 2 kontrakce za 10 minut, které byly doprovázeny změnou děložního čípku vedoucí k porodu před dokončeným 37. týdnem těhotenství.

Předčasný odtok plodové vody byl definován jako únik amniální tekutiny s porodem zahájeným nejdříve za 2 hodiny. PPRM byl diagnostikován vizuálně a v případě nutnosti potvrzen pozitivním testem na přítomnost IGFBP-1 (insulin-like

growth factor-binding protein-1) (ACTIM PROM test; Medix Biochemica, Kauniainen, Finland) ve vaginálním sekretu.

Pacientkám s PPRM bez známek infekce, u nichž došlo k začátku porodu před 34. týdnem těhotenství, byly podány kortikosteroidy k urychlení zrání plic, tokolytika po dobu 48 hodin a antibiotika. Pacientkám, u nichž začal porod po 34. týdnu těhotenství, nebyla indikována žádná léčba kromě podání antibiotik. U PPRM pacientek došlo k indukci porodu nebo k císařskému řezu do 72 hodin od ruptury plodových obalů.

Ze 75 pacientek s PPRM vykazovalo 19 známky mikrobiální invaze amniální dutiny (MIAC), 10 trpělo intraamniálním zánětem s mikrobiální infekcí (IAI) a u 47 byla diagnostikována histologická chorioamnionitida (HCA). Ze všech PPRM pacientek vykazovaly 3 pouze MIAC a 27 pouze HCA. U 17 pacientek byla přítomna MIAC i HCA zároveň a 22 žen nemělo ani MIAC ani HCA.

Tabulka č. 3: Počet analyzovaných vzorků PPRM pacientek rozdělený dle výskytu a typu přítomné infekce.

Typ přítomné infekce	Počet pacientek s danou diagnózou
MIAC	19
HCA	47
IAI	10
pouze MIAC	3
pouze HCA	27
MIAC i HCA současně	17
bez MIAC a HCA	22

MIAC byla definována jako pozitivní výsledek analýzy PCR na genitální mycoplasmata (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma species*) a/nebo *Chlamydia trachomatis* a/nebo 16S rRNA gen v plodové vodě.

Intraamniální zánět asociovaný s mikrobiální infekcí byl definován přítomností MIAC s koncentrací IL-6 v plodové vodě vyšší než 745 pg/ml (měřeno laterální průtokovou immunoassayí).

HCA byla diagnostikována na základě infiltrace neutrofilů do choriodeciduy (stupeň 3-4) a/nebo do chorionu (stupeň 3-4) a/nebo do pupečníku (stupeň 1-4) a/nebo do amnionu (stupeň 1-4) dle kritérií Salafia a kolegů (Salafia *et al.*, 1989).

7. Metody

7.1. Prvotní zpracování materiálu

Vzorky biologického materiálu byly odebrány ihned po porodu a vloženy do RNAlateru (Ambion, Austin, USA). Po doručení na Oddělení molekulární biologie a patologie buňky, 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze byly promývány PBS a lyzačním roztokem, aby došlo k odstranění krve. Následně byly zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v RNAlateru, kde byly uchovávány, dokud nedošlo k jejich dalšímu zpracování.

7.2. Izolace RNA obohacené o miRNA z placentární tkáně

Vzorky placentární tkáně byly před zpracováním rozmrazeny a 30 – 70 mg tkáně bylo odděleno za účelem izolace. K extrakci RNA obohacené o miRNA z placentární tkáně byl použit mirVana microRNA Isolation kit (Ambion, Austin, USA). Dle údajů výrobce byl k placentární tkáni o výše zmíněné hmotnosti na ledu přidán desetinásobek lyzačního pufru (Lysis/Binding Buffer) (např. 70 mg tkáně odpovídá 700 μl Lysis/Binding Bufferu) a vzorek byl homogenizován tkáňovým homogenizátorem (TissueRuptor, Qiagen). K takto vytvořené homogenní suspenzi byl přidán homogenizační roztok (Homogenate Additive) v objemu odpovídajícím 1/10 objemu přidaného Lysis/Binding Bufferu (např. 700 μl Lysis/Binding Bufferu odpovídá 70 μl Homogenate Additive). Směs byla promíchána a inkubována 10 minut na ledu. Po uplynutí této doby byl ke směsi přidán fenol-chloroform v objemu odpovídajícím objemu přidaného Lysis/Binding Bufferu. Vzorek byl následně důkladně zvortexován, rozalíkvtován do 2 ml zkumavek a centrifugován při 10 000 x g po dobu 5 minut. V tomto stádiu došlo ve vzorku k oddělení vodné a organické fáze. DNA zůstala v organické fázi a vodná fáze obsahující RNA byla odsáta do samostatné zkumavky. K odebrané vodné fázi byl přidán 100% ethanol v objemu odpovídajícím 1/3 objemu vodné fáze. Vše bylo promícháno a vzorek byl nanesen na kolonku a vortexován po dobu 15 sekund. V takto nízké koncentraci ethanolu prošly malé RNA skrz kolonku, ale velké RNA zůstaly zachyceny na kolonce. Aby v dalším kroku došlo k zachycení malých RNA na kolonce, byl k filtrátu přidán 100% etanol v objemu 2/3 filtrátu. Po promíchání byl vzorek znovu aplikován na novou kolonku a centrifugován 15 sekund při 10 000 x g. Nepotřebný filtrát byl slit a malé RNA zachycené na kolonce byly několikrát promyty promývacími roztoky (1x Wash Solution 1, 2x Wash Solution 2/3). Po

promývacích krocích byl vzorek centrifugován 1 minutu při 10 000 x g kvůli odstranění reziduální tekutiny. Nakonec byla RNA zachycená na kolonce eluována 100 µl elučního roztoku (Elution Solution) o teplotě 95 °C.

K minimalizaci DNA kontaminace bylo k eluátu přidáno 5 µl DNázy I (Fermentas International, Ontario, Canada) a následovala inkubace po dobu 30 minut při 37 °C. K odstranění případných PCR inhibitorů bylo ke vzorku po skončení inkubace přidáno 5 µl EDTA (Fermentas International, Ontario, Canada) a vzorek byl inkubován 10 minut při 65 °C.

Koncentrace a kvalita vyizolované RNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). Koncentrace byla měřena v ng/µl a čistota výsledné RNA byla zjišťována poměrem absorbancí (A) při specifických vlnových délkách. A(260/280) se pohybovala mezi 1,8 – 2,0, což vylučuje kontaminaci proteiny nebo fenoly absorbující při 280 nm. A(260/230) byla větší než 1,6, což dokazuje zanedbatelnou přítomnost polysacharidů nebo jiných látek absorbujících při 230 nm. Na základě změřené koncentrace byl vzorek před reverzní transkripcí naředěn na koncentraci 3 ng/µl.

7.3. MiRNA, jejichž exprese byla testována

V této práci bylo vybráno k analýze 15 placentárně specifických microRNA exprimovaných na chromozomálních klastru C19MC, jejichž exprese je detekovatelná pouze u těhotných žen. V placentární tkáni lze tyto miRNA detekovat ve 100 % případů.

Jako endogenní kontroly pro normalizaci exprese testovaných miRNA sloužily RNU6B a RNU38B. Tyto miRNA byly vybrány pomocí softwaru GeNorm (Primer Design, Ltd., Southampton University, Highfield Campus, Southampton Haunts, UK). Expese kontrolních miRNA není omezena pouze na placentární tkáň. Poslední detekovanou miRNA byla syntetická cel-miR-39, která byla do studie zařazena kvůli minimalizaci fluktuace dat. Sekvence analyzovaných miRNA a jejich tkáňová specifická jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Seznam analyzovaných miRNA, jejich sekvence a tkáňová specifita

miRNA	Sekvence miRNA (5'-3')	Tkáňová specifita
hsa-miR-512-5p	CACUCAGCCUUGAGGGCACUUUC	placentárně specifická
hsa-miR-515-5p	UUCUCCAAAAGAAAGCACUUUCUG	placentárně specifická
hsa-miR-516b-5p	AUCUGGAGGUAAGAAGCACUUU	placentárně specifická
hsa-miR-517-5p	CCUCUAGAUGGAAGCACUGUCU	placentárně specifická
hsa-miR-518b	CAAAGCGCUCCCUUUAGAGGU	placentárně specifická
hsa-miR-518f-5p	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCUC	placentárně specifická
hsa-miR-519a-5p	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG	placentárně specifická
hsa-miR-519d-3p	CAAAGUGCCUCCCUUUAGAGUGU	placentárně specifická
hsa-miR-519e-5p	UUCUCCAAAAGGGAGCACUUUC	placentárně specifická
hsa-miR-520a-5p	CUCCAGAGGGAAGUACUUUCU	placentárně specifická
hsa-miR-520h	ACAAAGUGCUUCCCUUUAGAGU	placentárně specifická
hsa-miR-524-5p	CUACAAAGGGAAGCACUUUCUC	placentárně specifická
hsa-miR-525-5p	CUCCAGAGGGAUGCACUUUCU	placentárně specifická
hsa-miR-526a	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCUG	placentárně specifická
hsa-miR-526b-5p	CUCUUGAGGGAAGCACUUUCUGU	placentárně specifická
has-RNU6B	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAG CGTTCCATATTTTT	tkáňově nespecifická
hsa-RNU38B	CCAGTTCTGCTACTGACAGTAAGTGAAG ATAAAGTGTGTCTGAGGAGA	tkáňově nespecifická
syn-cel-miR-39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	(syntetická)

(www.mirbase.org, www.thermofisher.com)

7.4. Reverzní transkripce

Všechny miRNA, které měly být detekovány, byly reverzní transkripcí přepsány do komplementární DNA za použití TaqMan MicroRNA Assay obsahující microRNA-specifické stem-loop RT primery a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Branchburg, USA) dle pokynů od výrobce. Reakční objem pro kontrolní miRNA (RNU6B a RNU38B) byl 10 µl a pro ostatní miRNA, které byly předmětem výzkumu (miR-512-5p, miR-515-5p, miR-516b-5p, miR-517-5p, miR-518b, miR-518f-5p, miR-519a-5p, miR-519d-3p, miR-519e-5p, 520a-5p, miR-520h, miR-524-5p, miR-525-5p, miR-526a, miR-526b-5p), 32 µl. Složení obou typů reakčních směsí je popsáno v tabulce číslo 5.

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Složka reakční směsi	Objem složky pro 10 μ l reakci - kontrolní miRNA [μ l]	Objem složky pro 32 μ l reakci - miRNA, které jsou předmětem výzkumu [μ l]
dNTPs (100mM)	0,10	0,32
Reverzní transkriptáza (MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50U/ μ l)	0,70	2,13
Pufr pro RT (10x Reverse Transcription Buffer)	1,00	3,20
Inhibitor RNáz (RNase Inhibitor, 20 U/ μ l)	0,10	0,43
Nuclease-free voda	2,70	8,85
RT primery (Megaplex™ RT Primers)	2,00	6,40
Vzorek	3,40	10,70

Reverzní transkripce byla prováděna v cycleru 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Branchburg, USA) za následujících teplotních parametrů: 30 minut při 16 °C, 30 minut při 42 °C, 5 minut při 85 °C a 10 minut při 4 °C.

7.5. Kvantitativní PCR v reálném čase

Po dokončení reverzní transkripce byla výsledná cDNA amplifikována a kvantifikována pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. K jednotlivým typům cDNA byly následně přidány příslušné specifické PCR primery, TaqMan MGB sondy (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems, Branchburg, USA) a složky TaqMan Universal PCR Master Mixu (Applied Biosystems, Branchburg, USA), přičemž celkový reakční objem byl 35 μ l. Složení reakční směsi je popsáno v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR

Typ reagensie	Objem reagensie pro 35 μ l reakci - kontrolní miRNA [μ l]	Objem reagensie pro 35 μ l reakci - miRNA, které jsou předmětem výzkumu [μ l]
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix	17,5	18,2
Nuclease-free voda	11,3	0,0
PCR primery (20x TaqMan MicroRNA Assay mix)	1,8	1,8
cDNA	4,4	15,0

PCR reakce probíhala úvodních 10 minut při 95 °C pro aktivaci DNA polymerázy a poté následovalo 50 cyklů s teplotním profilem: 15 sekund při 95 °C a 60 sekund při 60 °C. Reakce byla provedena v cycleru 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Branchburg, USA).

Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech a při každé PCR reakci byly použity negativní kontroly obsahující místo cDNA vodu a referenční vzorek, tj. vzorek jedné náhodně zvolené placenty pocházející z fyziologického průběhu těhotenství s porodem v termínu. Negativní kontroly nevykazovaly žádný amplifikační signál a stanovované vzorky byly považovány za pozitivní, pokud amplifikační signál překročil práh reakce (Ct) před 40. cyklem.

7.6. Relativní kvantifikace placentárně specifických microRNA

Expres jednotlivých placentárně specifických miRNA byla stanovena pomocí relativní kvantifikace s využitím komparativní Ct metody (Livak, Schmittgen, 2001). U této metody je Ct vzorku porovnáváno vůči geometrickému průměru Ct hodnot zvolených endogenních kontrol vykazujících stálou expresi ve všech analyzovaných vzorcích. Jako referenční vzorek, vůči kterému byla porovnávána exprese miRNA všech studovaných placentárních vzorků, sloužil vzorek jedné náhodně zvolené placentární tkáně pocházející z fyziologického průběhu těhotenství s porodem v termínu. Pro každý vzorek byl spočítán rozdíl Ct hodnoty (ΔCt) příslušné microRNA a geometrického průměru dvou námi vybraných endogenních kontrol (RNU6B a RNU38B). Od ΔCt byla následně odečtena Ct hodnota referenčního vzorku, čímž byla získána hodnota $\Delta\Delta Ct$. K získání finální hodnoty byla hodnota $\Delta\Delta Ct$ přepočítána dle vzorce $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7.7. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v program Statistica 9.0 (StatSoft, Inc., USA). V rámci jednotlivých analyzovaných skupin (FG, PTB, PPRM) bylo nejprve testováno normální rozložení dat pomocí Shapiro-Wilkova testu. Vzhledem k tomu, že rozložení v jednotlivých diagnostických skupinách normální nebylo, byly ke statistické analýze použity neparametrické testy. Pro porovnání exprese miRNA mezi dvěma skupinami byl použit Mann-Whitneyův test a pro porovnání mezi třemi skupinami sloužil Kruskal-Wallisův test. Výsledky Kruskal-Wallisova i Mann-Whitneyova testu byly použitím

Spearmanovy parciální korelace adjustovány na gestační stáří v době porodu. Hladina významnosti (p hodnota) prováděného testu byla stanovena na hodnotu 0,05.

Korelace mezi expresí miRNA v placentární tkáni a gestačním stářím v době porodu u PPRM pacientek a u PTB pacientek byla stanovena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (ρ). Hodnota korelačního koeficientu od -0,5 do 0 znamená mírnou negativní korelaci. Hladina významnosti byla stanovena na hodnotu 0,05.

8. Výsledky

V první části práce byla porovnána genová exprese placentárně specifických miRNA mezi jednotlivými skupinami pacientek s PTB, s PPROM a ženami s fyziologickým průběhem gravidity, které porodily v termínu.

Ve druhé části práce byla porovnána relativní genová exprese placentárně specifických miRNA mezi skupinami pacientek s PPROM s přítomností a pacientek s PPROM s absencí MIAC. V další části práce byla porovnána genová exprese příslušných miRNA mezi skupinami pacientek s PPROM s výskytem a absencí HCA.

V poslední části práce byla zjišťována závislost mezi relativní genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu ve skupinách pacientek s PPROM a PTB.

8.1. Porovnání exprese placentárně specifických miRNA: PTB vs. PPROM vs. FG

Pomocí Kruskal-Wallisova testu byla porovnána relativní genová exprese mezi třemi hodnocenými skupinami. Výsledky byly adjustovány na gestační stáří v době porodu. Skupina fyziologických gravidit s porodem v termínu zahrnovala 20 pacientek, skupinu pacientek se spontánním předčasným porodem tvořilo 24 žen a skupina pacientek s předčasným odtokem plodové vody zahrnovala 75 žen. Výsledky dílčích p hodnot mezi testovanými skupinami jsou prezentovány v tabulce č. 7. MiRNA se signifikantně odlišnou expresí a s rozdílem exprese na hranici statistické signifikance jsou zvýrazněny tučným písmem. Výsledky exprese těchto miRNA jsou zobrazeny v grafech č. 1 – 8 a počty predikovaných cílů těchto miRNA jsou shrnuty v tabulce č. 8.

U skupiny pacientek s PTB byly v porovnání s ženami s FG identifikovány 3 z 15 miRNA (miR-516b-5p: $p = 0,02$; miR-519d-3p: $p = 0,04$ a miR-524-5p: $p = 0,01$), které byly statisticky signifikantně upregulované. U dalších 4 miRNA (miR-518b: $p = 0,07$; miR-519a-5p: $p = 0,09$; miR-520h: $p = 0,06$ a miR-526a: $p = 0,08$) byl pozorován trend k upregulaci. U skupiny pacientek s PPROM byl v porovnání se skupinou žen s FG pozorován trend k downregulaci u 3 z 15 miRNA (miR-519d-3p: $p = 0,07$; miR-520h: $p = 0,08$ a miR-526b-5p: $p = 0,07$).

Při porovnání genové exprese mezi skupinami pacientek s PTB a PPROM bylo identifikováno 5 miRNA (miR-516b-5p: $p = 0,05$; miR-518b: $p = 0,01$; miR-519d-3p: $p =$

0,05; miR-520h: $p = 0,04$; miR-526a: $p = 0,03$), jejichž exprese byla u skupiny pacientek s PTB výrazně vyšší. U skupiny pacientek s PTB byl pozorován trend ke zvýšené expresi u 2 miRNA (miR-519a-5p: $p = 0,09$ a miR-524-5p: $p = 0,07$).

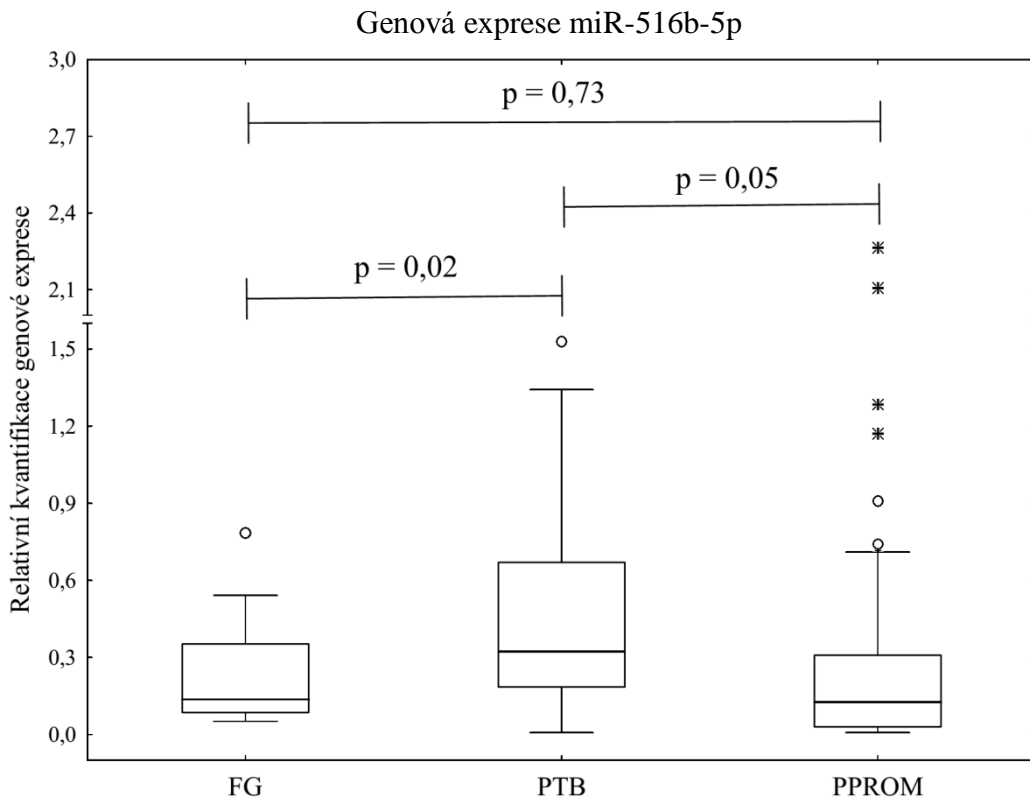
Tabulka č. 7: Výsledky porovnání genové exprese placentárně specifických miRNA mezi skupinami pacientek s PTB, PPRŮM a FG

miRNA	p hodnota PTB vs. FG	p hodnota PPRŮM vs. FG	p hodnota PTB vs. PPRŮM
miR-512-5p	0,71	0,74	0,95
miR-515-5p	0,22	0,81	0,89
miR-516b-5p	0,02	0,73	0,05
miR-517-5p	0,12	0,97	0,11
miR-518b	0,07	0,31	0,01
miR-518f-5p	0,43	0,99	0,15
miR-519a-5p	0,09	0,54	0,09
miR-519d-3p	0,04	0,07	0,05
miR-519e-5p	0,55	0,52	0,17
miR-520a-5p	0,35	0,64	0,33
miR-520h	0,06	0,08	0,04
miR-524-5p	0,01	0,40	0,07
miR-525-5p	0,23	0,28	0,11
miR-526a	0,08	0,76	0,03
miR-526b-5p	0,80	0,07	0,83

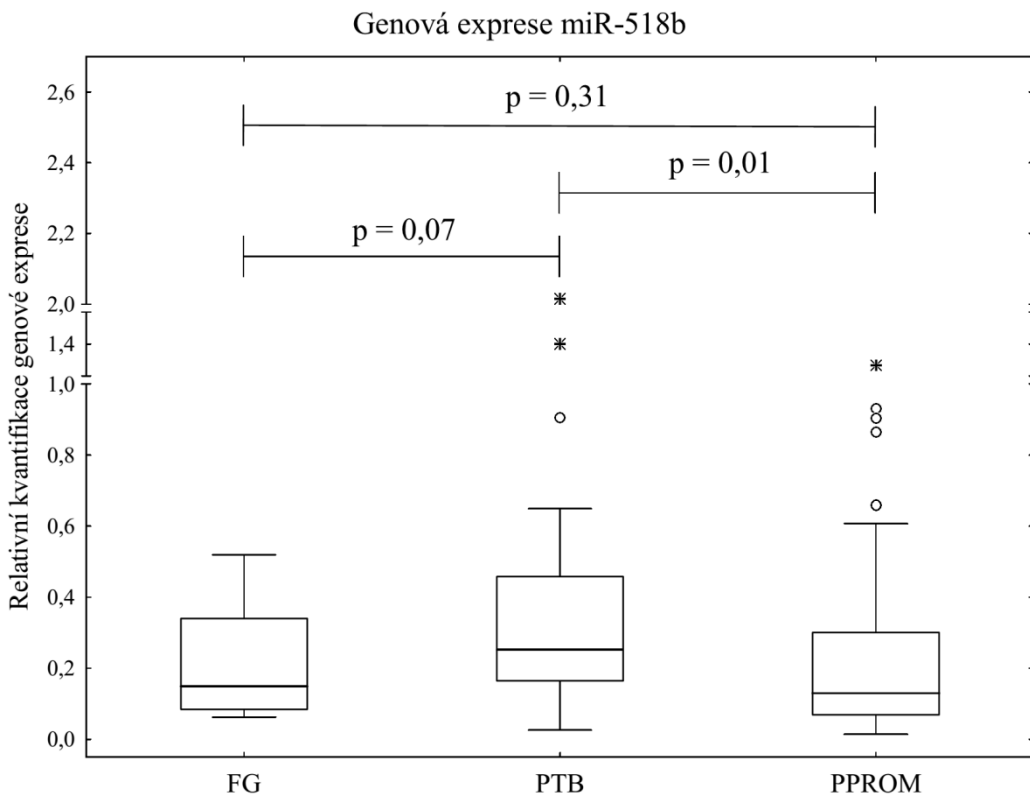
Popisky ke grafům č. 1 – 8:

- Medián
- 25%-75%
- ┆ Rozsah neodleh.
- Odlehlé
- * Extrémy

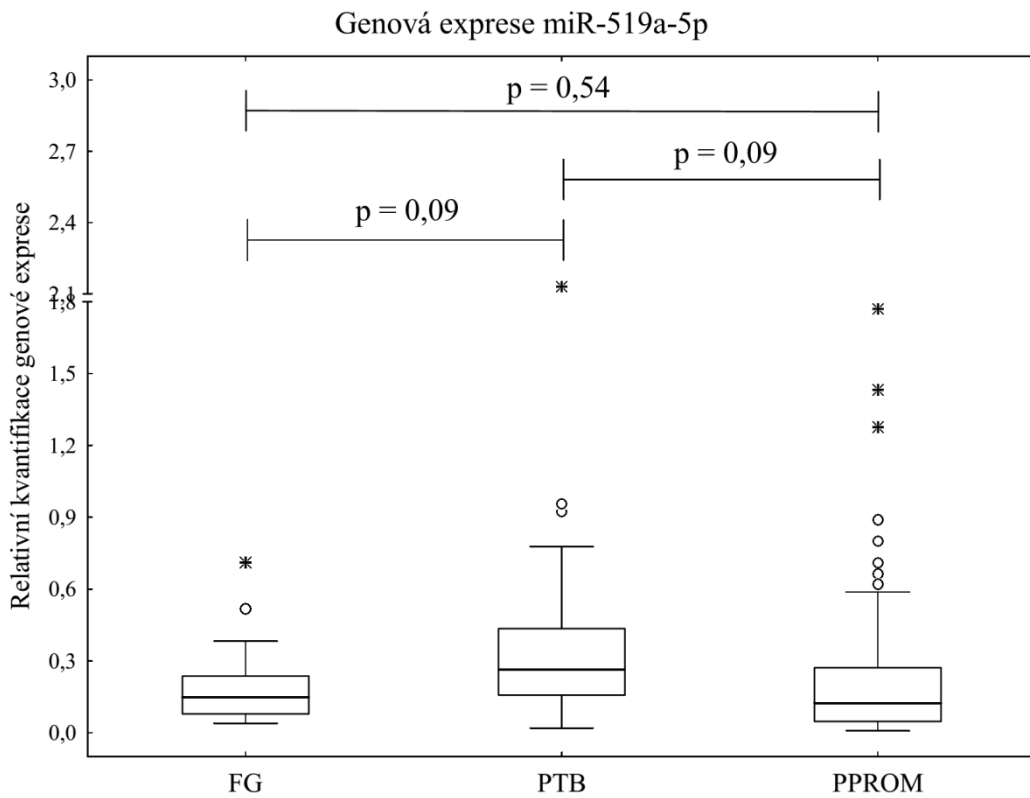
Graf č. 1: Genová exprese miR-516b-5p



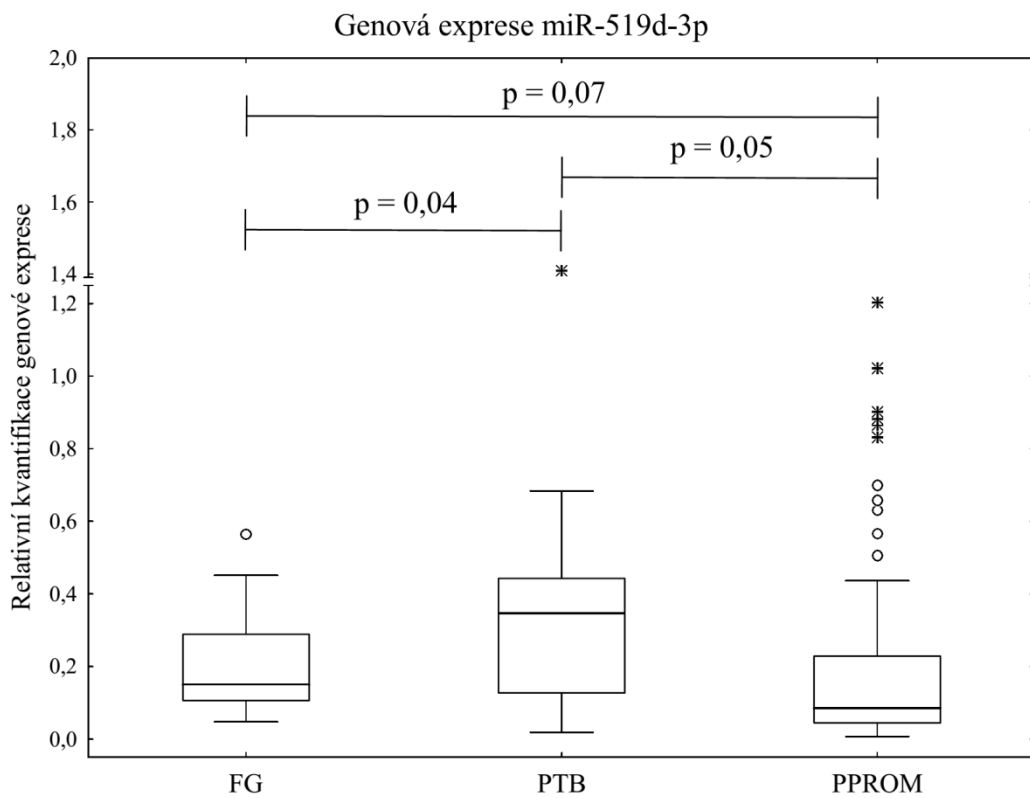
Graf č. 2: Genová exprese miR-518b



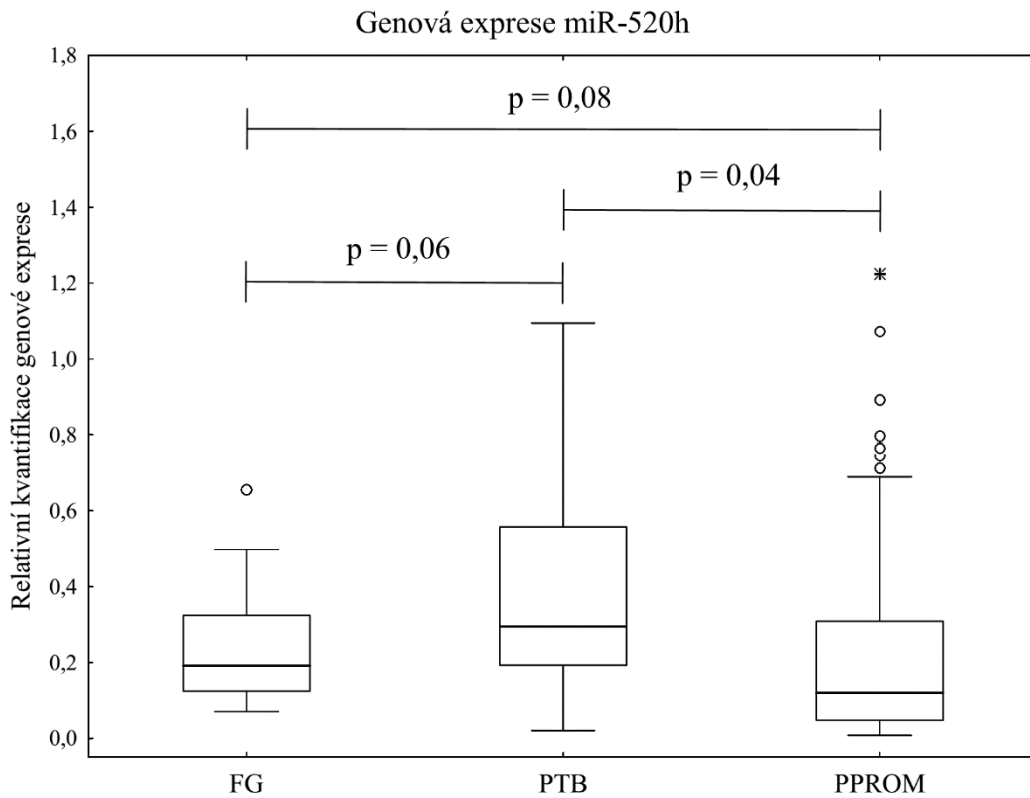
Graf č. 3: Genová exprese miR-519a-5p



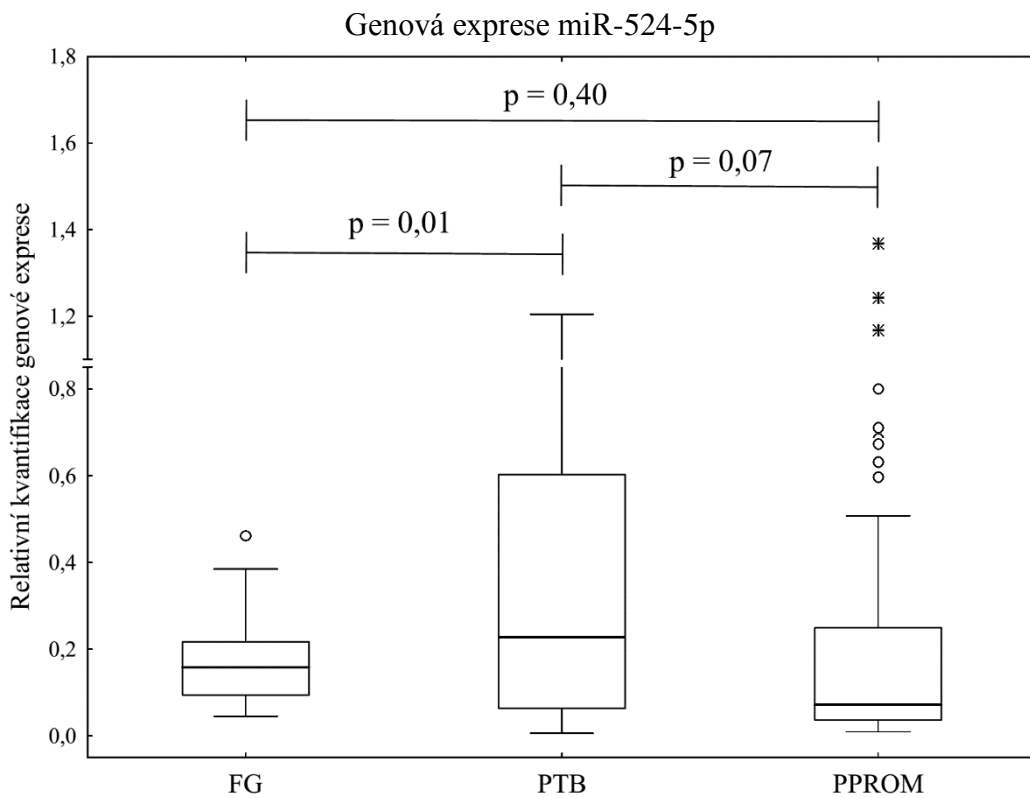
Graf č. 4: Genová exprese miR-519d-3p



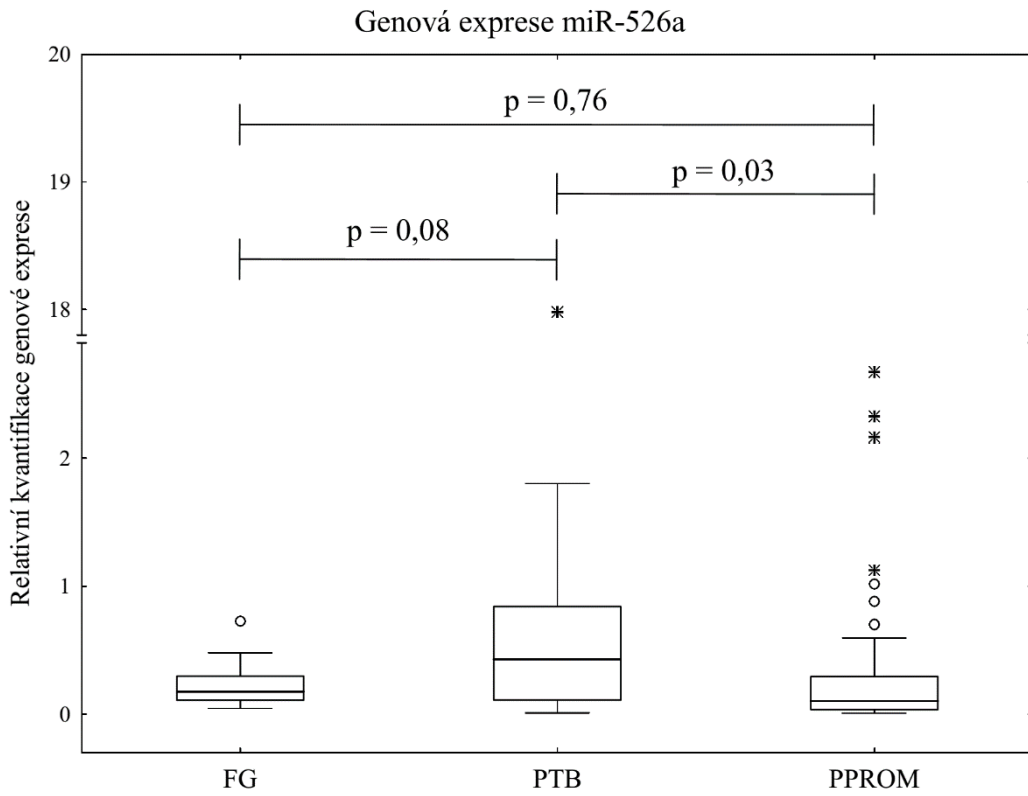
Graf č. 5: Genová exprese miR-520h



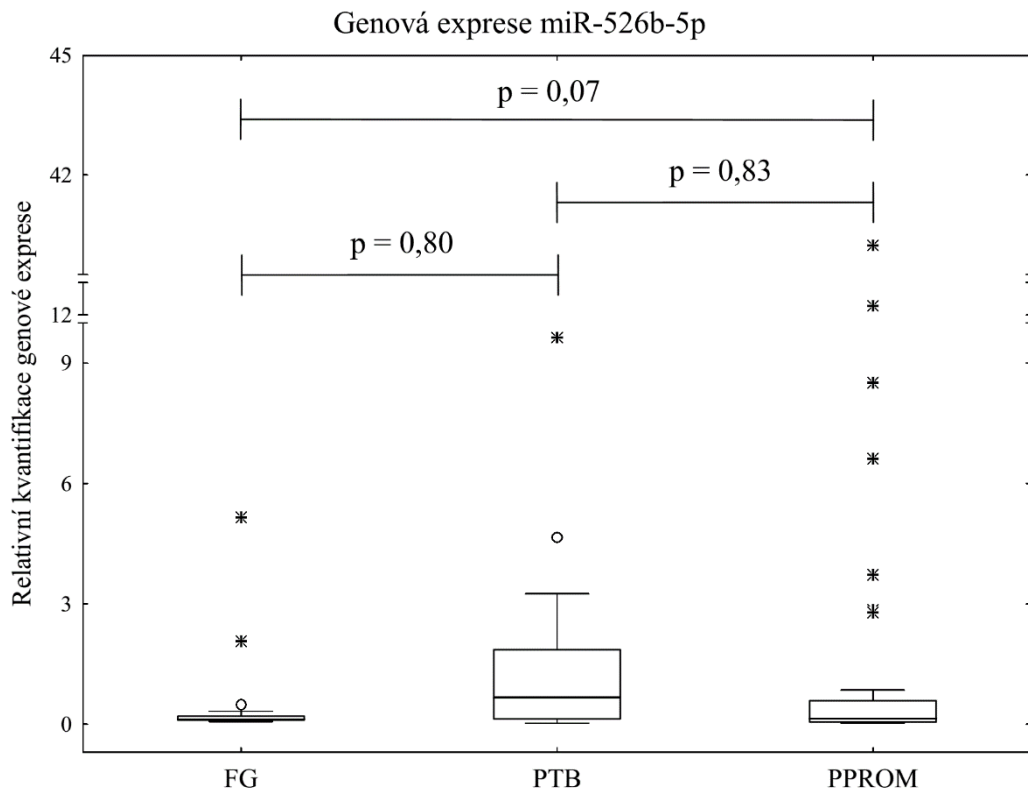
Graf č. 6: Genová exprese miR-524-5p



Graf č. 7: Genová exprese miR-526a



Graf č. 8: Genová exprese miR-526b-5p



Tabulka č. 8: Počet predikovaných cílů (genů) pro miRNA se signifikantně odlišnou genovou expresí a s rozdílem v genové expresi na hranici statistické signifikance mezi skupinami pacientek s PTB, PPRM a FG

miRNA	počet predikovaných cílů
miR-516b-5p	416
miR-518b	30
miR-519a-5p	206
miR-519d-3p	844
miR-520h	462
miR-524-5p	916
miR-526a	215
miR-526b-5p	221

Vyhledání cílů uvedených miRNA bylo provedeno v miRDB databázi pro predikci miRNA cílů (<http://mirdb.org/miRDB>).

8.2. Porovnání genové exprese placentárně specifických miRNA ve skupině PPRM pacientek s ohledem na přítomnost a absenci MIAC

Pomocí Mann-Whitneyova testu byla porovnána relativní genová exprese testovaných miRNA ve skupině PPRM pacientek v závislosti na přítomnosti či absenci mikrobiální invaze amniální dutiny. Výsledky byly adjustovány na gestační stáří v době porodu. Skupina PPRM pacientek s výskytem MIAC zahrnovala 19 žen a skupina pacientek bez výskytu MIAC zahrnovala 49 žen. Žádná z testovaných microRNA nevykazovala po adjustaci na gestační stáří v době porodu statisticky významný rozdíl mezi testovanými skupinami. Výsledky jsou prezentovány v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: Výsledky porovnání genové exprese placentárně specifických miRNA ve skupině pacientek s PPROM s ohledem na přítomnost a absenci MIAC

miRNA	p hodnota
miR-512-5p	0,65
miR-515-5p	0,67
miR-516b-5p	0,85
miR-517-5p	0,69
miR-518b	0,44
miR-518f-5p	0,19
miR-519a-5p	0,66
miR-519d-3p	0,34
miR-519e-5p	0,52
miR-520a-5p	0,81
miR-520h	0,52
miR-524-5p	0,58
miR-525-5p	0,98
miR-526a	0,93
miR-526b-5p	0,47

8.3. Porovnání genové exprese placentárně specifických miRNA ve skupině PPROM pacientek s ohledem na přítomnost a absenci HCA

Pomocí Mann-Whitneyova testu byla porovnána relativní genová exprese testovaných miRNA u PPROM pacientek v závislosti na přítomnosti či absenci histologické chorioamnionitidy. Výsledky byly adjustovány na gestační stáří v době porodu. Skupina PPROM pacientek s výskytem HCA zahrnovala 47 žen a skupina bez výskytu HCA zahrnovala 27 žen. Žádná z testovaných microRNA nevykazovala po adjustaci na gestační stáří v době porodu statisticky významný rozdíl mezi testovanými skupinami. Výsledky jsou prezentovány v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Výsledky porovnání genové exprese placentárně specifických miRNA ve skupině pacientek s PPROM s ohledem na přítomnost a absenci HCA

miRNA	p hodnota
miR-512-5p	0,31
miR-515-5p	0,34
miR-516b-5p	0,45
miR-517-5p	0,42
miR-518b	0,43
miR-518f-5p	0,30
miR-519a-5p	0,38
miR-519d-3p	0,75
miR-519e-5p	0,70
miR-520a-5p	0,55
miR-520h	0,83
miR-524-5p	0,43
miR-525-5p	0,49
miR-526a	0,21
miR-526b-5p	0,89

8.4. Vztah mezi genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu u PPROM

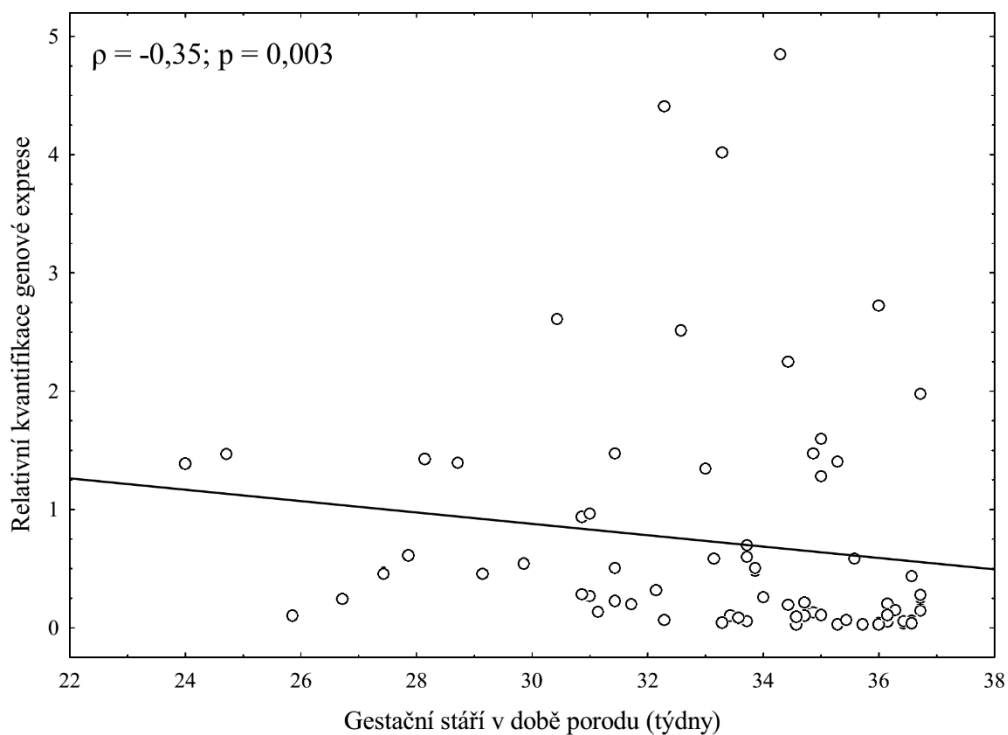
Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu byl zjišťován vztah mezi genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu ve skupině pacientek s PPROM. Skupina PPROM pacientek zahrnovala 75 žen. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 11. Všechny testované miRNA vykazovaly statisticky významnou závislost se slabou negativní korelací. Příslušné p hodnoty jsou vyznačeny tučně. S nárůstem gestačního stáří docházelo k poklesu genové exprese všech testovaných miRNA a naopak s poklesem gestačního stáří docházelo k nárůstu genové exprese testovaných miRNA. Výsledky korelace gestačního stáří v době porodu a genové exprese všech testovaných miRNA jsou zobrazeny v grafech č. 9 – 23.

Tabulka č. 11: Vztah mezi genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu u PPROM

miRNA	korelační koeficient ρ	p hodnota
miR-512-5p	-0,35	0,003
miR-515-5p	-0,34	0,004
miR-516b-5p	-0,33	0,006
miR-517-5p	-0,27	0,02
miR-518b	-0,39	0,001
miR-518f-5p	-0,35	0,004
miR-519a-5p	-0,32	0,007
miR-519d-3p	-0,35	0,003
miR-519e-5p	-0,28	0,02
miR-520a-5p	-0,28	0,02
miR-520h	-0,37	0,002
miR-524-5p	-0,37	0,002
miR-525-5p	-0,30	0,01
miR-526a	-0,33	0,006
miR-526b-5p	-0,47	<0,001

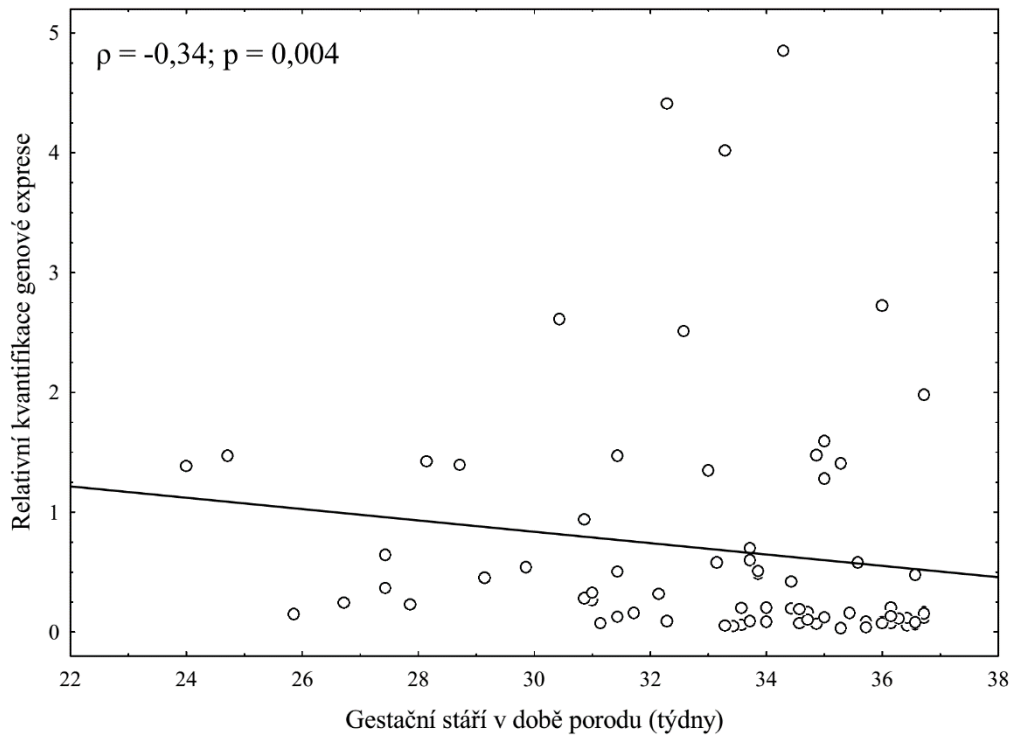
Graf č. 9: Vztah mezi genovou expresí miR-512-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM

Vztah mezi genovou expresí miR-512-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM



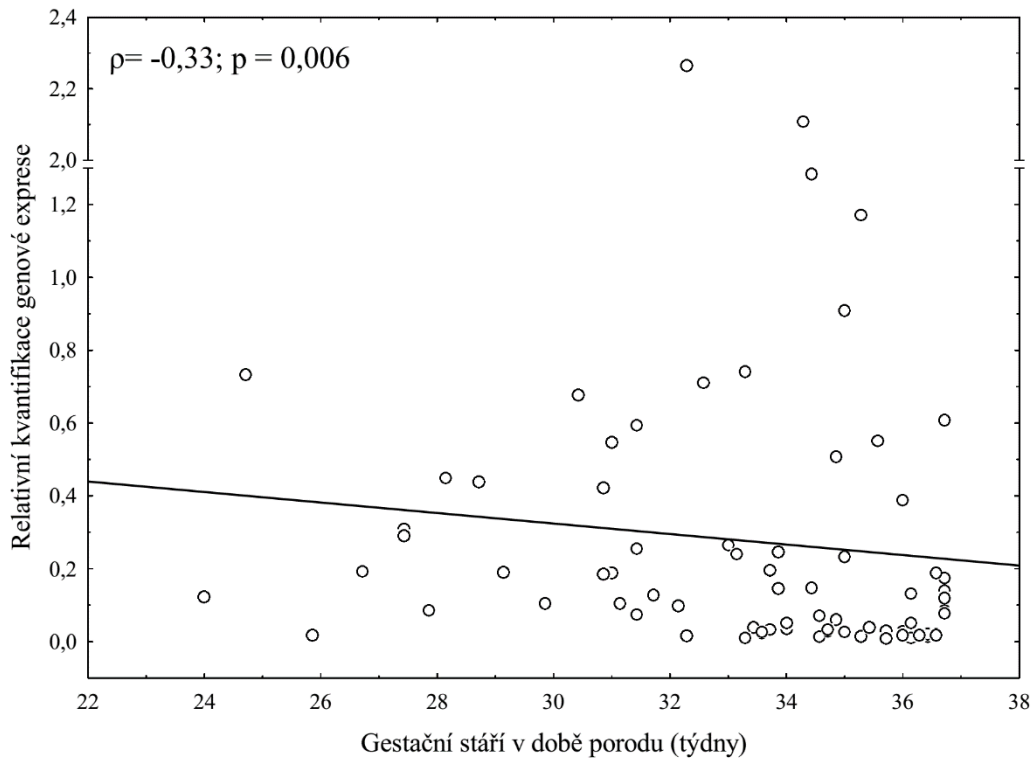
Graf č. 10: Vztah mezi genovou expresí miR-515-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-515-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM



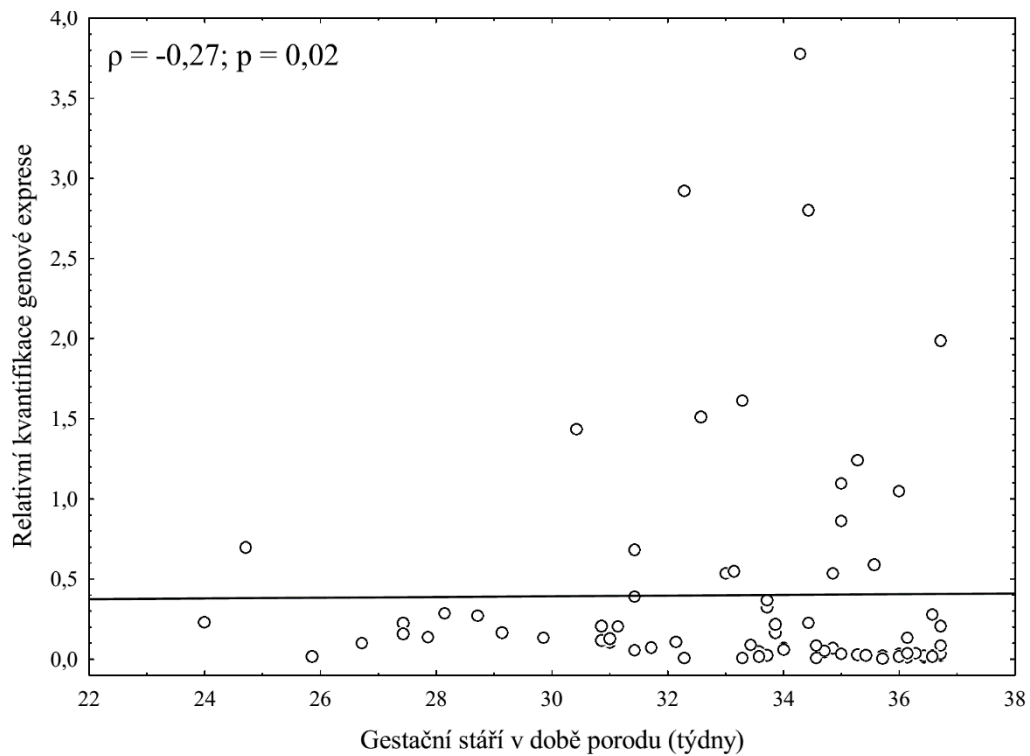
Graf č. 11: Vztah mezi genovou expresí miR-516b-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-516b-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM



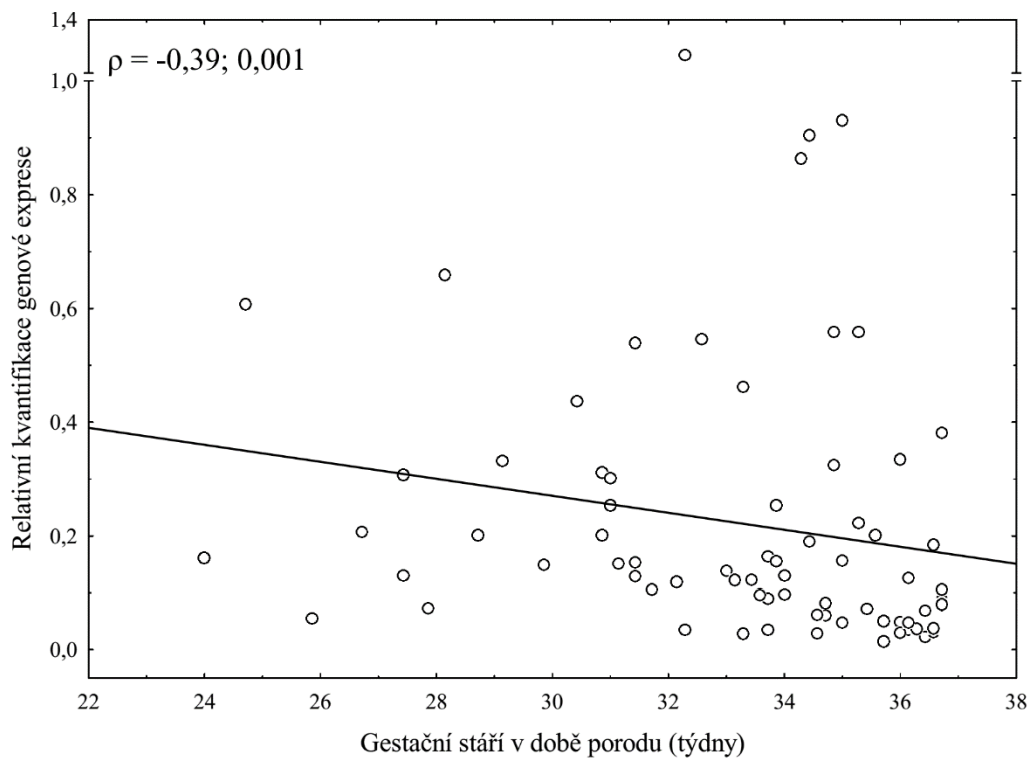
Graf č. 12: Vztah mezi genovou expresí miR-517-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-517-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM



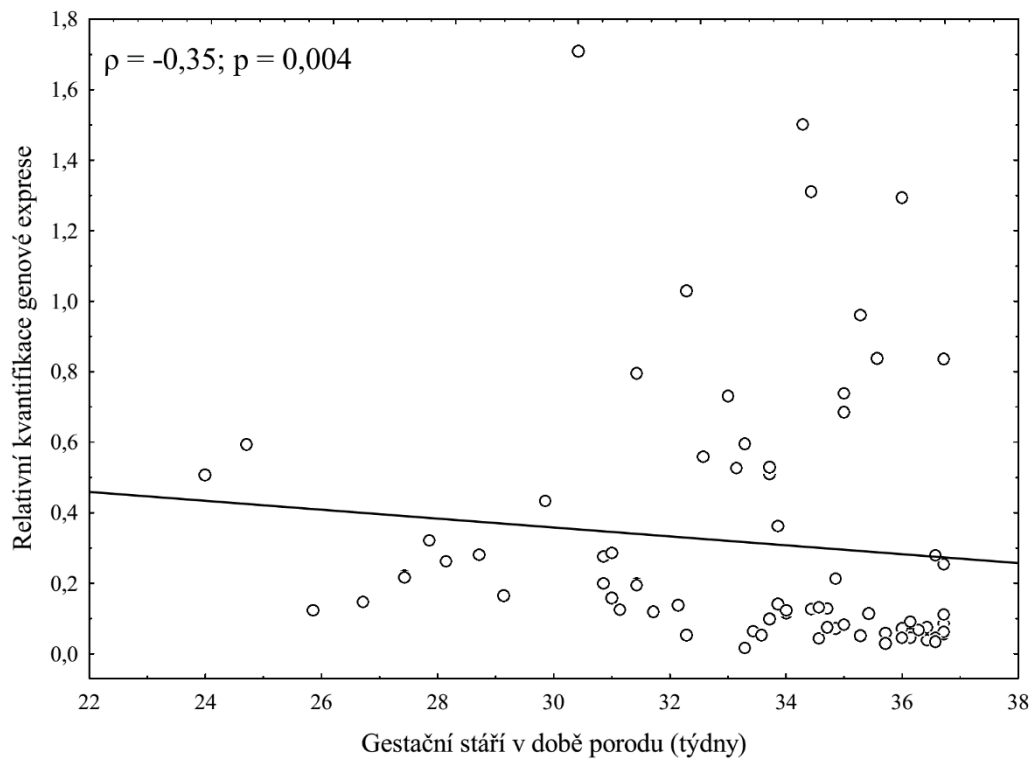
Graf č. 13: Vztah mezi genovou expresí miR-518b a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-518b a gestačním stářím v době porodu u PPRM



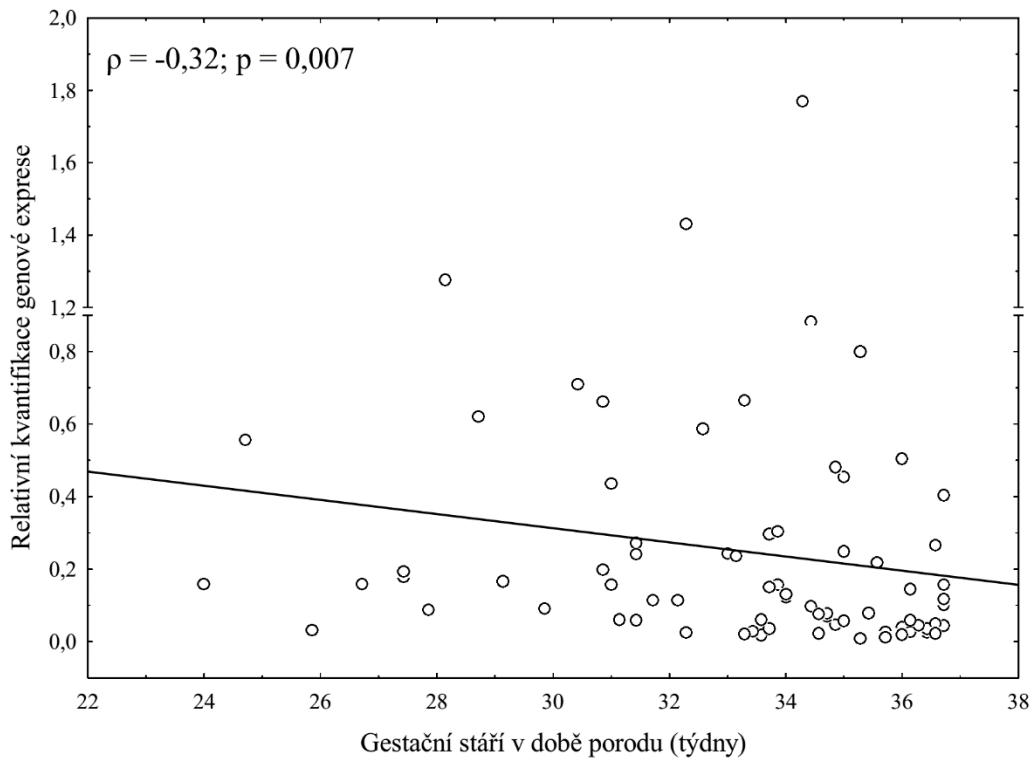
Graf č. 14: Vztah mezi genovou expresí miR-518f-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM

Vztah mezi genovou expresí miR-518f-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM



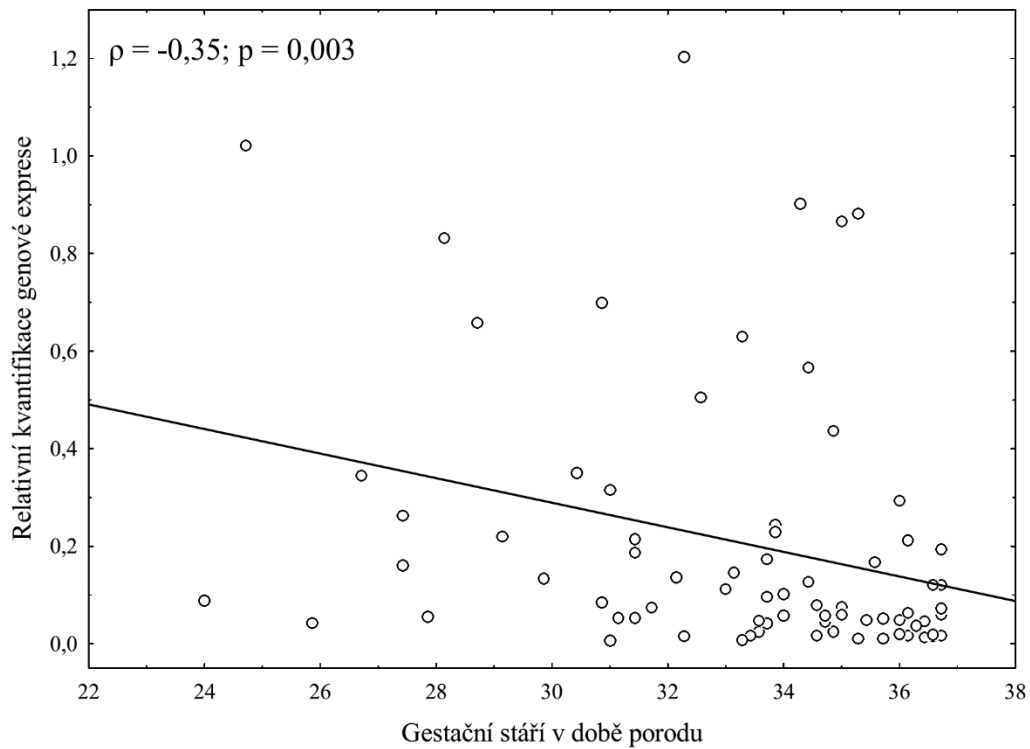
Graf č. 15: Vztah mezi genovou expresí miR-519a-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM

Vztah mezi genovou expresí miR-519a-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM



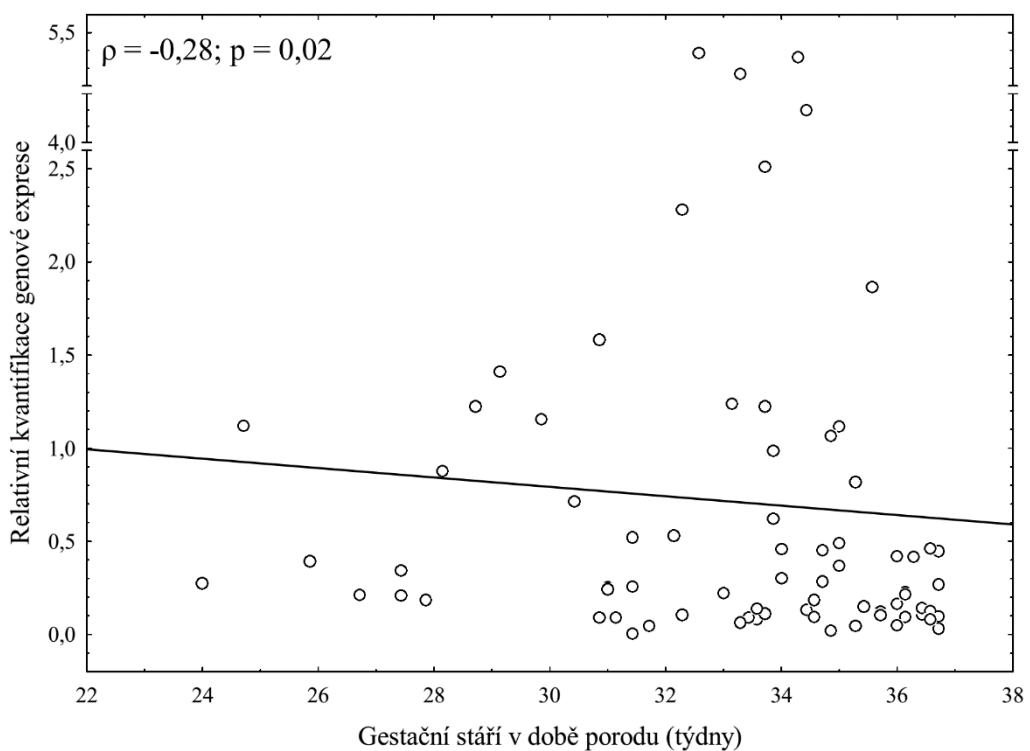
Graf č. 16: Vztah mezi genovou expresí miR-519d-3p a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-519d-3p a gestačním stářím v době porodu u PPRM



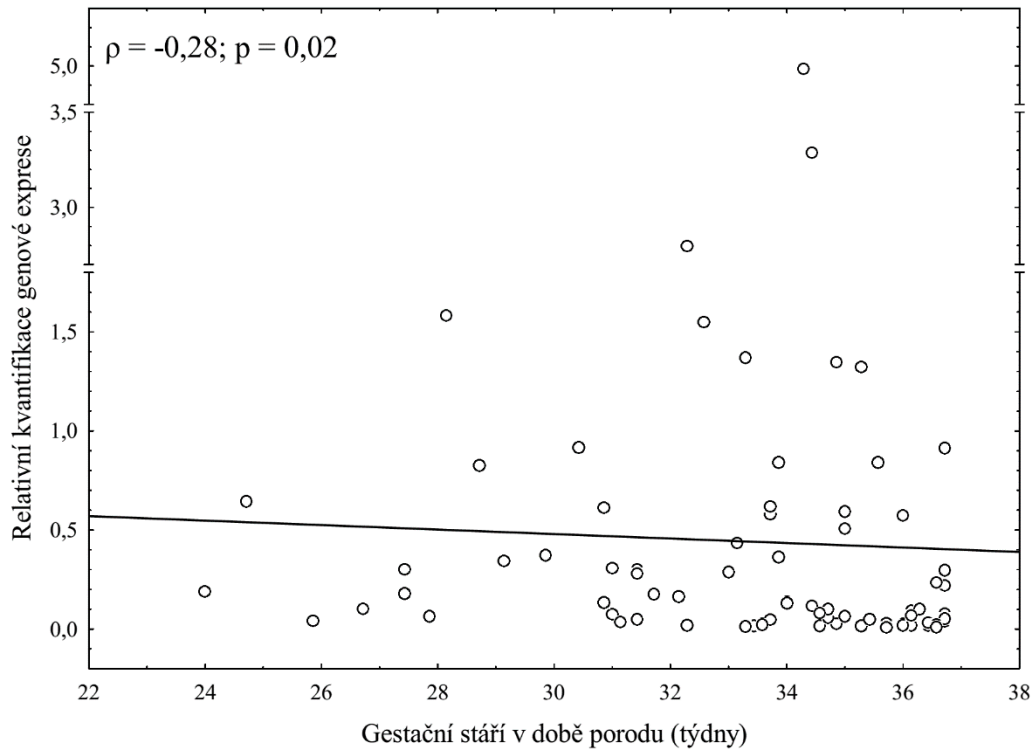
Graf č. 17: Vztah mezi genovou expresí miR-519e-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-519e-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM



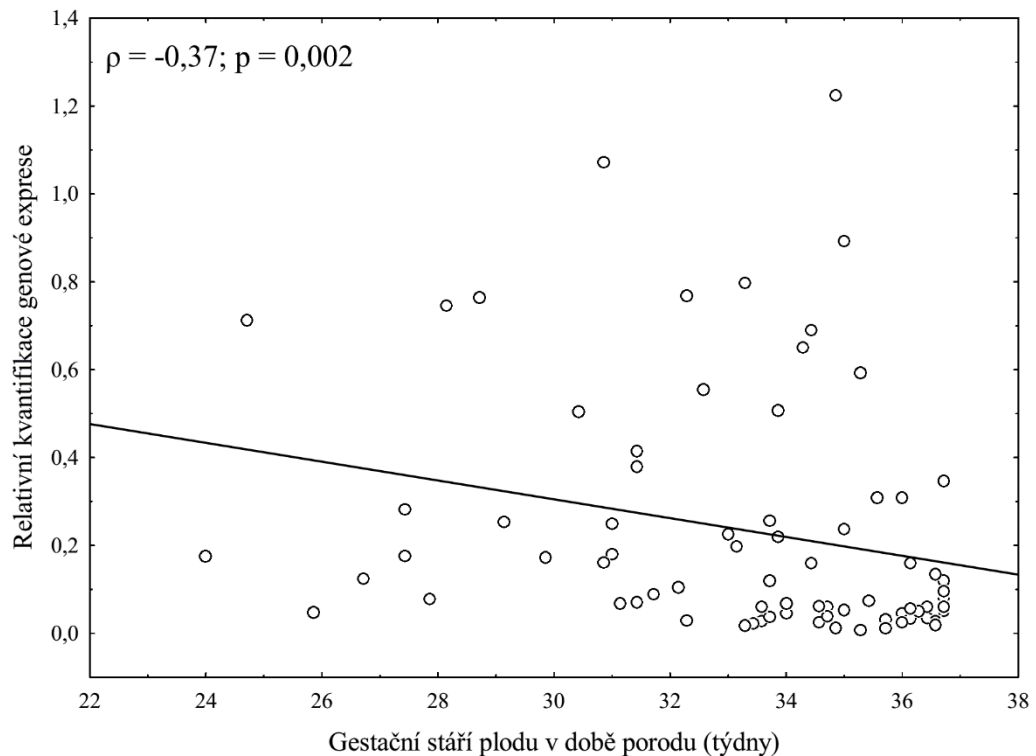
Graf č. 18: Vztah mezi genovou expresí miR-520a-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-520a-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM



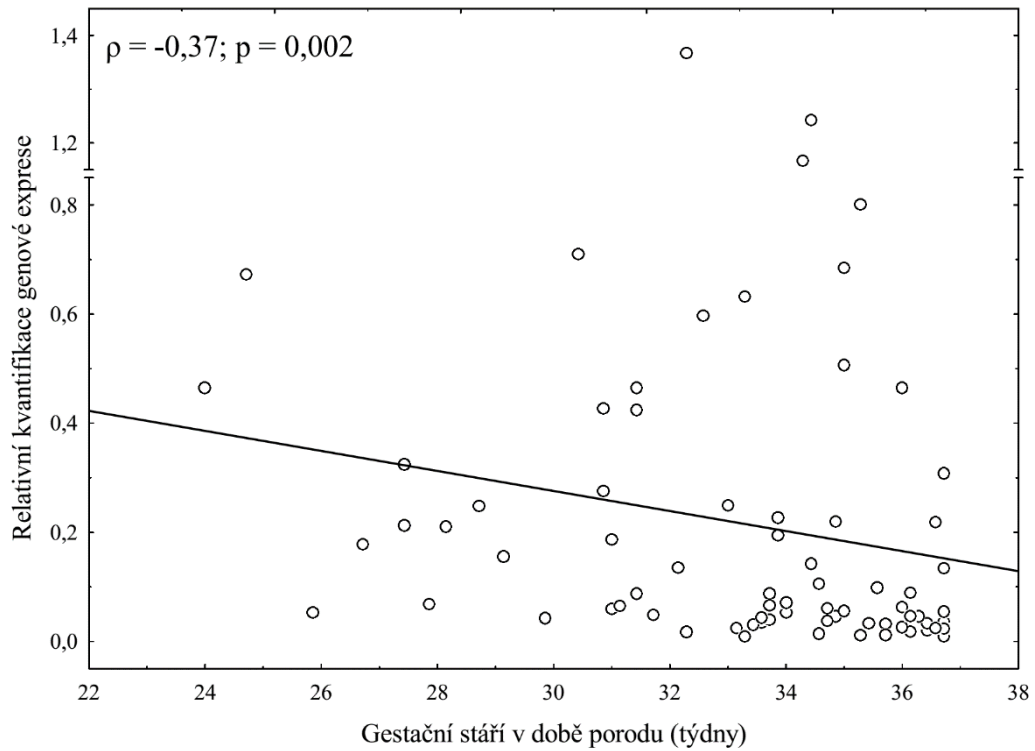
Graf č. 19: Vztah mezi genovou expresí miR-520h a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-520h a gestačním stářím v době porodu u PPRM



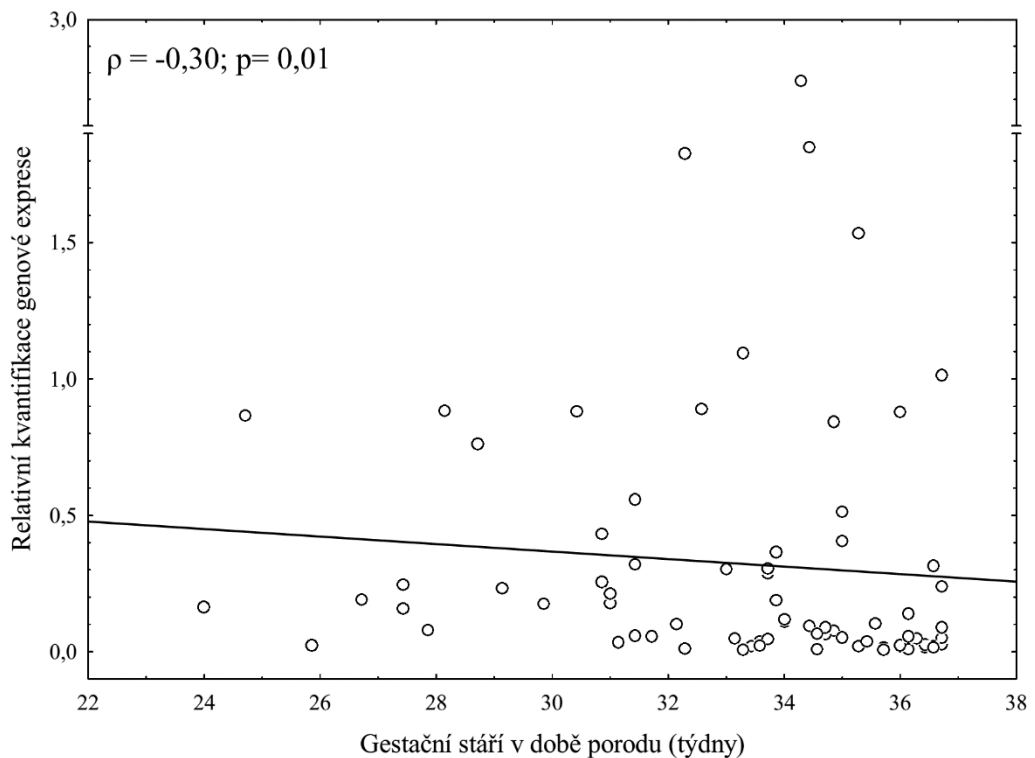
Graf č. 20: Vztah mezi genovou expresí miR-524-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM

Vztah mezi genovou expresí miR-524-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM



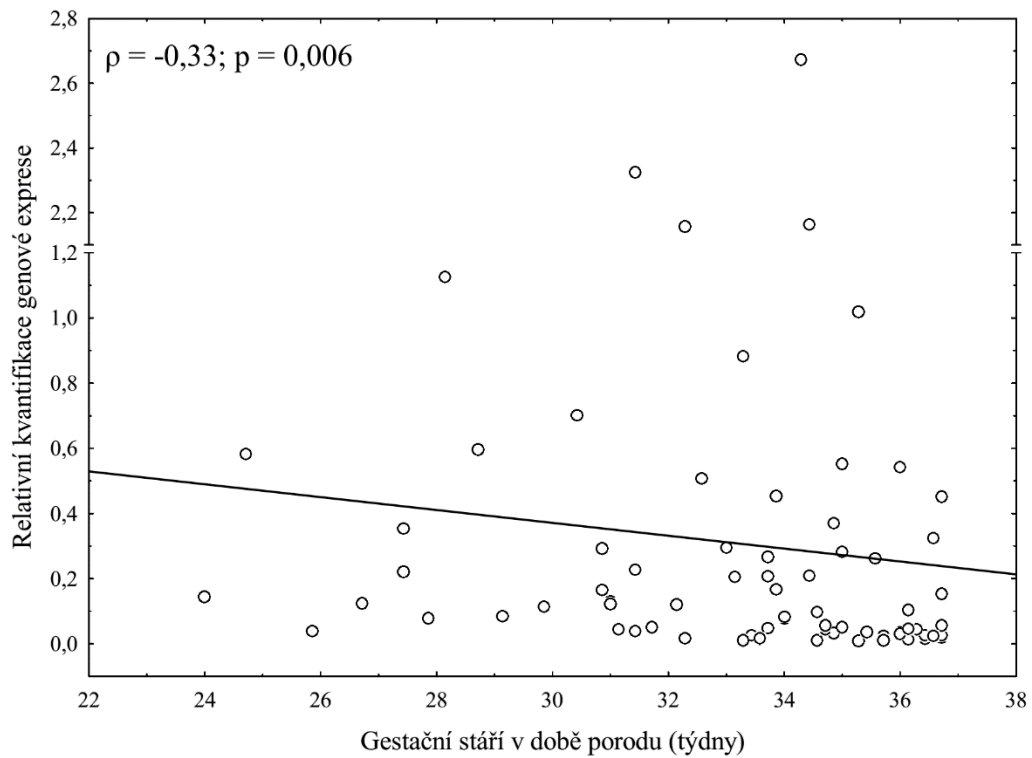
Graf č. 21: Vztah mezi genovou expresí miR-525-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM

Vztah mezi genovou expresí miR-525-5p a gestačním stářím v době porodu u PPROM



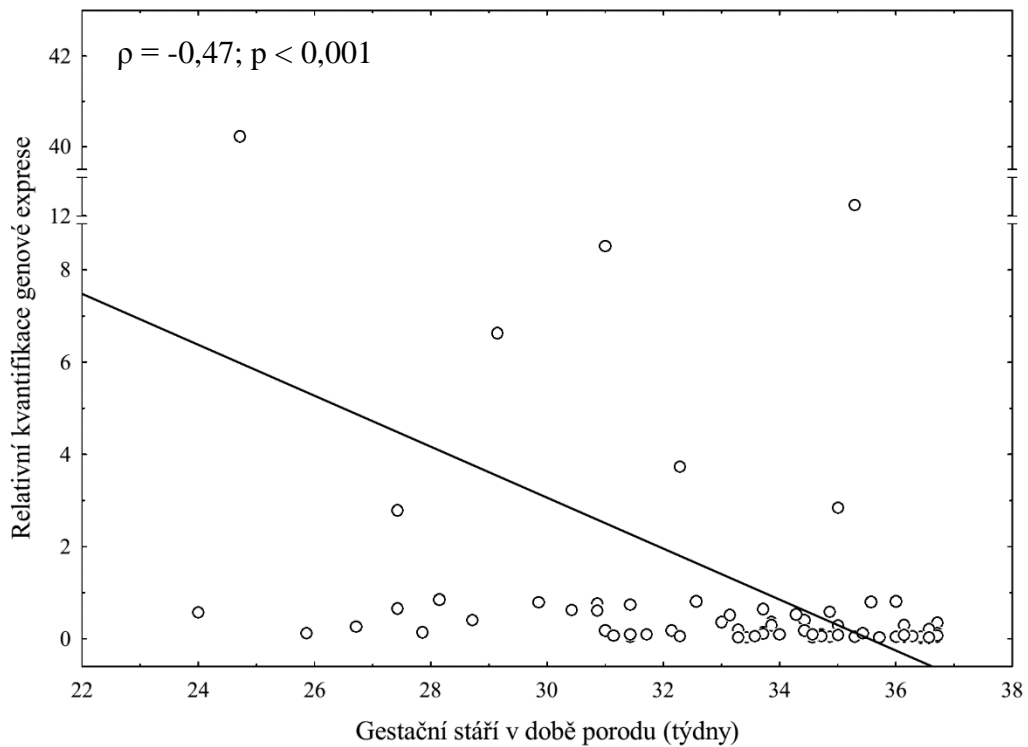
Graf č. 22: Vztah mezi genovou expresí miR-526a a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-526a a gestačním stářím v době porodu u PPRM



Graf č. 23: Vztah mezi genovou expresí miR-526b-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM

Vztah mezi genovou expresí miR-526b-5p a gestačním stářím v době porodu u PPRM



8.5. Vztah mezi genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu u PTB

Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu byl zjišťován vztah mezi genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu ve skupině pacientek s PTB. Skupinu PTB pacientek tvořilo 24 žen. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 12. Žádná z testovaných miRNA nevykazovala signifikantní závislost genové exprese na gestačním stáří plodu v době porodu.

Tabulka č. 12: Vztah mezi genovou expresí placentárně specifických miRNA a gestačním stářím plodu v době porodu u PTB

miRNA	korelační koeficient ρ	p hodnota
miR-512-5p	-0,03	0,89
miR-515-5p	-0,11	0,60
miR-516b-5p	0,11	0,60
miR-517-5p	0,17	0,42
miR-518b	0,12	0,59
miR-518f-5p	-0,05	0,83
miR-519a-5p	0,008	0,97
miR-519d-3p	0,25	0,25
miR-519e-5p	-0,22	0,30
miR-520a-5p	-0,09	0,67
miR-520h	0,18	0,40
miR-524-5p	0,26	0,22
miR-525-5p	0,15	0,49
miR-526a	0,28	0,19
miR-526b-5p	-0,11	0,61

9. Diskuze

V diplomové práci jsem stanovila expresní profil 15 placentárně specifických miRNA (miR-512-5p, miR-515-5p, miR-516b-5p, miR-517-5p, miR-518b, miR-518f-5p, miR-519a-5p, miR-519d-3p, miR-519e-5p, miR-520a-5p, miR-520h, miR-524-5p, miR-525-5p, miR-526a a miR-526b-5p) v placentární tkáni pacientek se spontánním předčasným porodem (PTB), pacientek s předčasným odtokem plodové vody (PPROM) a žen s fyziologickým průběhem gravidity a porodem v termínu (FG). Ve skupině pacientek s PTB byly 3 miRNA signifikantně upregulovány (miR-516b-5p, miR-519-3p a miR-524-5p) a genová exprese u 4 miRNA (miR-518b, miR-519a-5p, miR-520h a miR-526a) vykazovala trend k upregulaci. U PPRM pacientek byl v porovnání s FG pozorován trend k downregulaci u 3 testovaných miRNA (miR-519d-3p, miR-520h a miR-526b-5p). Při porovnání genové exprese mezi skupinami pacientek s PTB a PPRM bylo identifikováno 5 miRNA (miR-516b-5p, miR-518b, miR-519d-3p, miR-520h a miR-526a), které byly u PTB signifikantně upregulovány a 2 miRNA (miR-519a-5p a miR-524-5p) s trendem k upregulaci ve skupině PTB.

Předpokládala jsem, že vzhledem k rozdílné expresi testovaných miRNA u fyziologické a patologické gravidity (PTB a PPRM) by bylo možné vytipovat miRNA s diagnostickým potenciálem, které by sloužily k testování v dalších studiích. Zároveň jsem předpokládala, že by u odlišně exprimovaných C19MC miRNA mezi skupinami pacientek s PTB, PPRM a FG bylo možné predikovat geny, které hrají roli v patogenezi předčasného porodu.

Doposud byly publikovány tři studie se statisticky významnými rozdíly v genové expresi miRNA v placentě či plodových obalech u PTB a jedna studie u PPRM ve srovnání s fyziologickými graviditami s porodem v termínu. V první studii byly v chorioamnionu identifikovány 4 microRNA (miR-338, miR-449, miR-136 a miR-199a*) se signifikantně upregulovanou expresí u PTB oproti fyziologickým graviditám s porodem v termínu (Montenegro *et al.*, 2009). Ve druhé studii detekující miRNA v placentární tkáni byly identifikovány 4 jiné miRNA (miR-15b, miR-181, miR-210 a miR-483-5p) s odlišnou expresí u PTB. Na rozdíl od předchozí studie byla exprese u PTB oproti fyziologickým graviditám s porodem v termínu downregulovaná (Mayor-Lynn *et al.*, 2011). V nedávno publikované studii byla studována exprese miRNA v amnionu a v chorionu u pacientek s PTB a u pacientek s PPRM. V amnionu byla u PTB i PPRM downregulovaná miR-

223, ale v chorionu žádné signifikantní rozdíly v genové expresi popsány nebyly (Enquobahrie *et al.*, 2016). Žádné z výše uvedených miRNA však v naší studii nebyly testovány.

U miRNA s výrazně odlišnou genovou expresí mezi testovanými skupinami jsem následně vyhledala predikované cíle (geny), jejichž funkci by mohly uvedené miRNA regulovat (<http://mirdb.org/miRDB>). U miR-516b-5p jsem vyhledala 416 potenciálních cílů, u miR-518b 30 potenciálních cílů, u miR-519a-5p bylo cílů 206, u miR-519d-3p jsem našla 844 cílů, u miR-520h 462 cílů, u miR-524-5p bylo cílů 916, u miR-526 bylo nalezeno 215 cílů a u miR-526b-5p jsem vyhledala 221 potenciálních cílů. Vzhledem k vysokému počtu predikovaných cílů, jež by jednotlivé miRNA mohly regulovat, jsem se zabývala pouze těmi, které byly popsány v literatuře, že hrají roli v patogenezi PPRM a PTB. Expze jednoho genu může být regulována prostřednictvím celé řady microRNA a souhrn jejich up- a down-regulací finálně rozhoduje o míře expze konkrétního genu.

Matrixová metaloproteináza 2 (MMP-2, gen *MMP2*) je jeden z potenciálních cílů miR-519d-3p a miR-520h. Expze genu *MMP2* může být regulována dalšími 57 miRNA (miR-548e-3p, miR-548f-3p, miR-4516, miR-548a-3p, miR-548ar-3p, miR-548az-3p, miR-4755-3p, miR-6774-5p, miR-4434, miR-5703, miR-760, miR-3064-3p, miR-5006-5p, miR-4446-3p, miR-1305, miR-6883-5p, miR-4708-5p, miR-4728-5p, miR-149-3p, miR-2110, miR-6785-5p, miR-6829-5p, miR-330-3p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-106b-5p, miR-93-5p, miR-526b-3p, miR-499b-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p, miR-5685, miR-4690-3p, miR-1538, miR-4745-3p, miR-4293, miR-4656, miR-5010-5p, miR-4525, miR-4651, miR-3064-5p, miR-4441, miR-186-3p, miR-5689, miR-4433b-3p, miR-6716-5p, miR-6807-5p, miR1273g-5p, miR-6853-3p, miR-3148, miR-635, miR-520g-3p, miR-5586-3p, miR-4691-5p, miR-4783-3p, miR-6792-3p a miR-4296). Zvýšená expze MMP-2 v plodových obalech byla potvrzena u skupiny pacientek s PPRM (Fortunato *et al.*, 2000) a u skupiny pacientek s předčasným porodem (PTB a PPRM nerozlišeno) (Yonemoto *et al.*, 2006) ve srovnání s fyziologickou graviditou a porodem v termínu. V placentární tkáni u skupiny pacientek s předčasným porodem (PTB a PPRM nerozlišeno) nebyl publikován statisticky významný rozdíl v expresi MMP-2 v porovnání s kontrolami (Xu *et al.*, 2002). Odlišné výsledky jednotlivých studií mohou být způsobeny rozdílným zastoupením PTB a PPRM ve skupině pacientek s předčasným porodem a malým testovaným souborem studie Xu a kolegů. Dosud publikované studie popisují MMP-2 jako možný efektor degradace ECM plodových obalů, ale žádná z nich toto tvrzení nepotvrdila.

V *in vitro* studii prováděné na buňkách trofoblastu bylo potvrzeno, že overexprese miR-519d-3p downreguluje expresi mRNA a proteinu MMP-2 (Ding *et al.*, 2015).

Jako potenciální cíl miR-519a-5p a miR-526a byl identifikován TLR-2 (Toll-like receptor 2). Exprese genu *TLR2* může být regulována dalšími 36 miRNA (miR-561-3p, miR-3126-3p, miR-6165, miR-7108-5p, miR-5588-5p, miR-4720-5p, miR-4799-3p, miR-548l, miR-654-3p, miR-5699-5p, miR-376b-3p, miR-4793-5p, miR-376a-3p, miR-5692b, miR-548ap-3p, miR-548aa, miR-5692c, miR-548t-3p, miR-4307, miR-520c-5p, miR-519c-5p, miR-518d-5p, miR-518f-5p, miR-522-5p, miR-519b-5p, miR-518e-5p, miR-523-5p, miR-4294, miR-6870-3p, miR-4475, miR-548h-3p, miR-548ac, miR-548d-3p, miR-548z, miR-548bb-3p a miR-6768-5p). Zvýšená exprese TLR-2 byla pozorována pouze v plodových obalech u skupin pacientek s PTB a PPRM za přítomnosti histologické chorioamnionitidy (Kim *et al.*, 2004). Ačkoli nebyly publikovány studie popisující asociaci TLR-2 s předčasným porodem bez výskytu histologické chorioamnionitidy, existuje studie popisující souvislost polymorfismu v *TLR2* genu (-16934TA/AA a 753ArgGln/GlnGln) s předčasným porodem (Krediet *et al.*, 2007).

Jako další potenciální cíl miR-519d-3p byla nalezena matrixová metaloproteináza 3 (MMP-3). Gen *MMP3* může být regulován dalšími 18 miRNA (miR-888-3p, miR-6800-5p, miR-371b-3p, miR-367-5p, miR-4803, miR-146b-3p, miR-623, miR-4501, miR-6794-3p, miR-574-5p, miR-4672, miR-93-5p, miR-20b-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-526b-3p, miR-106b-5p a miR-106a-5p). Ve studii Sundrani a kolegů byla popsána asociace předčasného porodu (PTB tvořilo 70 % této skupiny) se zvýšenou hladinou MMP-3 v placentární tkáni (Sundrani *et al.*, 2013). Nicméně studie potvrzující, že MMP-3 je schopna degradovat ECM plodových obalů publikovány nebyly.

Porovnání genové exprese testovaných miRNA u PPRM pacientek v závislosti na přítomnosti MIAC a HCA nepřineslo po adjustaci výsledků na gestační stáří žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami. Z těchto výsledků se nezdá být pravděpodobné, že by přítomnost mikrobiální invaze amniální dutiny nebo histologické chorioamnionitidy ovlivňovala expresi testovaných placentárně specifických miRNA u PPRM. Studie hodnotící genovou expresi u PTB v závislosti na přítomnosti HCA v plodových obalech identifikovala 2 miRNA (miR-223 a miR-338), u nichž byla exprese těchto miRNA mnohonásobně vyšší u pacientek s HCA (Montenegro *et al.*, 2007). Náš soubor PTB pacientek nebyl ale dostatečně velký, aby po rozdělení na pacientky s přítomností a absencí HCA poskytoval relevantní výsledky.

V poslední části práce byla prokázána slabá negativní korelace mezi expresí všech 15 testovaných placentárně specifických miRNA a gestačním stářím v době porodu ve skupině pacientek s PPRM. Ve skupině pacientek s PTB však nebyla potvrzena závislost genové exprese žádné z testovaných miRNA na gestačním stáří v době porodu. Expresi miRNA v chorioamnionu u PTB pacientek v závislosti na gestačním stáří v době porodu zkoumal Montenegro a kolegové. Na rozdíl od výsledků této práce bylo ve zmíněné studii popsáno 13 miRNA (miR-199b, miR-373, miR-218, miR-154, miR-338, miR-198, miR-214, miR-370, miR-213, miR-107, miR-199a, miR-222 a miR-330), jejichž exprese s nárůstem gestačního stáří klesala (Montenegro *et al.*, 2007). Jednalo se však o jiné miRNA než byly námi sledovány. Studie hodnotící změny v genové expresi miRNA s nárůstem gestačního stáří v době porodu u PPRM pacientek dosud publikována nebyla.

10. Závěr

Ve své práci jsem porovnávala metodou relativní kvantifikace genovou expresi 15 placentárně specifických miRNA (kódovaných genovým klastrem na chromozomu 19) v placentární tkáni mezi skupinami pacientek s fyziologickým průběhem gravidity s porodem v termínu (FG), spontánním předčasným porodem (PTB) a předčasným odtokem plodové vody (PPROM). V placentární tkáni PTB pacientek byly v porovnání s FG identifikovány 3 signifikantně upregulované microRNA (miR-516b-5p, miR-519d-3p a miR-524-5p) a 4 miRNA (miR-518b, miR-519a-5p, miR-520h a miR-526a) s trendem k upregulaci. Skupina PPRM pacientek vykazovala trend k downregulaci u 3 miRNA (miR-519d-3p, miR-520h a miR-526b-5p) v porovnání s FG. U skupiny PTB pacientek bylo v porovnání s PPRM pacientkami detekováno 5 signifikantně upregulovaných miRNA (miR-516b-5p, miR-518b, miR-519d-3p, miR-520h a miR-526a) a 2 miRNA s trendem k upregulaci (miR-519a-5p a miR-524-5p).

Dále jsem porovnávala genovou expresi těchto placentárně specifických miRNA ve skupině pacientek s PPRM v závislosti na přítomnosti a absenci mikrobiální infekce amniální dutiny (MIAC) a histologické chorioamnionitidy (HCA). Genová exprese testovaných miRNA se signifikantně nelišila mezi pacientkami s výskytem a absencí MIAC ani HCA.

Na závěr jsem zjišťovala, zda koreluje genová exprese výše zmíněných miRNA s gestačním stářím plodu v době porodu ve skupině pacientek s PPRM a PTB. U všech testovaných miRNA (miR-512-5p, miR-515-5p, miR-516b-5p, miR-517-5p, miR-518b, miR-518f-5p, miR-519a-5p, miR-519d-3p, miR-519e-5p, miR-520a-5p, miR-520h, miR-524-5p, miR-525-5p, miR-526a a miR-526b-5p) jsem identifikovala slabou negativní korelaci mezi genovou expresí miRNA a gestačním stářím v době porodu ve skupině pacientek s PPRM. Závislost genové exprese testovaných miRNA na gestačním stáří v době porodu ve skupině pacientek s PTB potvrzena nebyla.

Dle prezentovaných výsledků jsou PTB a PPRM charakterizovány unikátním expresním profilem placentárně specifických C19MC miRNA a výše zmíněné miRNA patrně hrají roli v patofyziologii těchto těhotenských komplikací. Identifikované miRNA mohou být předmětem dalšího výzkumu směřujícího k časné diagnostice předčasného porodu.

11. Seznam použité literatury

- Abdelazim, I.A. (2012). Fetal fibronectin (Quick Check fFN test®) for detection of premature rupture of fetal membranes. *Archives of gynecology and obstetrics*, 287, 205–210.
- Abdelazim, I.A., Makhlof, H.H. (2011). Placental alpha microglobulin-1 (AmniSure® test) for detection of premature rupture of fetal membranes. *Archives of gynecology and obstetrics*, 285, 985–989.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., *et al.* (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9, 277–279.
- Arend, W.P. (1991). Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *The Journal of clinical investigation*, 88, 1445–1451.
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., *et al.* (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. *Genome research*, 14, 2486–2494.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*, 81, 1–5.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M.Z., Chou, D., Moller, A.-B., Narwal, R., Adler, A., Vera Garcia, C., Rohde, S., Say, L., *et al.* (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *The Lancet*, 379, 2162–2172.
- Bortolin-Cavaillé, M.-L., Dance, M., Weber, M., Cavaillé, J. (2009). C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic acids research*, 37, 3464–3473.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M. (2003). *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 113, 25–36.
- Buyukbayrak, E.E., Turan, C., Unal, O., Dansuk, R., Cengizoğlu, B. (2004). Diagnostic power of the vaginal washing-fluid prolactin assay as an alternative method for the diagnosis of premature rupture of membranes. *The Journal of maternal-fetal & neonatal medicine*, 15, 120–125.
- Canzoneri, B.J., Feng, L., Grotegut, C.A., Bentley, R.C., Heine, R.P., Murtha, A.P. (2013). The chorion layer of fetal membranes is prematurely destroyed in women with preterm premature rupture of the membranes. *Reproductive sciences*, 20, 1246–1254.

- Caughey, A.B., Robinson, J.N., Norwitz, E.R. (2008). Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Reviews in obstetrics and gynecology*, 1, 11–22.
- 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., *et al.* (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*, 33, e179–e179.
- Chen, C.-Y.A., Zheng, D., Xia, Z., Shyu, A.-B. (2009). Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nature structural & molecular biology*, 16, 1160–1166.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*, 5, 99–118.
- Crider, K.S., Whitehead, N., Buus, R.M. (2005). Genetic variation associated with preterm birth: a HuGE review. *Genetics in medicine*, 7, 593–604.
- Darj, E., Lyrenäs, S. (1998). Insulin-like growth factor binding protein-1, a quick way to detect amniotic fluid. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 77, 295–297.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of immunological methods*, 354, 34–39.
- Di Renzo, G.C., Roura, L.C., Facchinetti, F., Antsaklis, A., Breborowicz, G., Gratacos, E., Husslein, P., Lamont, R., Mikhailov, A., Montenegro, N., *et al.* (2011). Guidelines for the management of spontaneous preterm labor: identification of spontaneous preterm labor, diagnosis of preterm premature rupture of membranes, and preventive tools for preterm birth. *The Journal of maternal-fetal & neonatal medicine*, 24, 659–667.
- Ding, J., Huang, F., Wu, G., Han, T., Xu, F., Weng, D., Wu, C., Zhang, X., Yao, Y., Zhu, X. (2015). MiR-519d-3p Suppresses invasion and migration of trophoblast cells via targeting MMP-2. *PLoS one*, 10, e0120321.
- Dizon-Townson, D.S., Major, H., Varner, M., Ward, K. (1997). A promoter mutation that increases transcription of the tumor necrosis factor- α gene is not associated with preterm delivery. *American journal of obstetrics and gynecology*, 177, 810–813.
- El-Messidi, A., Cameron, A. (2010). Diagnosis of premature rupture of membranes: inspiration from the past and insights for the future. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada*, 32, 561–569.
- Elovitz, M.A., Brown, A.G., Anton, L., Gilstrap, M., Heiser, L., Bastek, J. (2014). Distinct cervical microRNA profiles are present in women destined to have a preterm birth. *American journal of obstetrics and gynecology*, 210, 221.e1-221.e11.
- Elovitz, M.A., Anton, L., Bastek, J., Brown, A.G. (2015). Can microRNA profiling in maternal blood identify women at risk for preterm birth? *American journal of obstetrics and gynecology*, 212, 782.e1-782.e5.

- Enquobahrie, D.A., Abetew, D.F., Sorensen, T.K., Willoughby, D., Chidambaram, K., Williams, M.A. (2011). Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 204, 178.e12-178.e21.
- Enquobahrie, D.A., Hensley, M., Qiu, C., Abetew, D.F., Hevner, K., Tadesse, M.G., Williams, M.A. (2016). Candidate gene and microRNA expression in fetal membranes and preterm delivery risk. *Reproductive sciences*, 23, 731–737.
- Ernest, J.M., Meis, P.J., Moore, M.L.R., Swain, M.R. (1989). Vaginal pH: a marker of preterm premature rupture of the membranes. *Obstetrics and gynecology*, 74, 734–738.
- Ferrand, P.E., Parry, S., Sammel, M., Macones, G.A., Kuivaniemi, H., Romero, R., Strauss, J.F. (2002). A polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with increased risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Molecular human reproduction*, 8, 494–501.
- Fortunato, S.J., Menon, R. (2001). Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 184, 1399–1406.
- Fortunato, S.J., Menon, R. (2003). IL-1 β is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta*, 24, 922–928.
- Fortunato, S.J., Menon, R., Bryant, C., Lombardi, S.J. (2000). Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 182, 1468–1476.
- Fortunato, S.J., Menon, R., Lombardi, S.J. (2002). Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *American journal of obstetrics and gynecology*, 187, 1159–1162.
- Fu, G., Ye, G., Nadeem, L., Ji, L., Manchanda, T., Wang, Y., Zhao, Y., Qiao, J., Wang, Y.-L., Lye, S., *et al.* (2013). MicroRNA-376c impairs transforming growth factor- β and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion. *Hypertension*, 61, 864–872.
- Fujimoto, T., Parry, S., Urbanek, M., Sammel, M., Macones, G., Kuivaniemi, H., Romero, R., Strauss, J.F. (2002). A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes. *The Journal of biological chemistry*, 277, 6296–6302.
- Gaucherand, P., Salle, B., Sergeant, P., Guibaud, S., Brun, J., Bizollon, C.A., Rudigoz, R.C. (1997). Comparative study of three vaginal markers of the premature rupture of membranes: Insulin like growth factor binding protein 1 Diamine-oxidase pH. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 76, 536–540.
- Genç, M.R., Gerber, S., Nesin, M., Witkin, S.S. (2002). Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *American journal of obstetrics and gynecology*, 187, 157–163.

- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*, 6, 995–1001.
- Goepfert, A.R., Goldenberg, R.L., Andrews, W.W., Hauth, J.C., Mercer, B., Iams, J., Meis, P., Moawad, A., Thom, E., VanDorsten, J.P., *et al.* (2001). The preterm prediction study: association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. *American journal of obstetrics and gynecology*, 184, 483–488.
- Goldenberg, R.L., Culhane, J.F., Iams, J.D., Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet*, 371, 75–84.
- Gonzalez, S., Rodrigo, L., Martinez-Borra, J., Lopez-Vazquez, A., Fuentes, D., Nino, P., Cadahia, V., Saro, C., Dieguez, M.A., Lopez-Larrea, C. (2003). TNF- α - 308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF- α production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *American journal of gastroenterology*, 98, 1101–1106.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA registry. *Nucleic acids research*, 32, D109–D111.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., Dongen, S. van, Bateman, A., Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34, D140–D144.
- Gu, Y., Sun, J., Groome, L.J., Wang, Y. (2013). Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 304, E836–E843.
- Guo, L., Yang, Q., Lu, J., Li, H., Ge, Q., Gu, W., Bai, Y., Lu, Z. (2011). A comprehensive survey of miRNA repertoire and 3' addition events in the placentas of patients with pre-eclampsia from high-throughput sequencing. *PloS one*, 6, e21072.
- Ha, M., Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15, 509–524.
- Haddad, R., Tromp, G., Kuivaniemi, H., Chaiworapongsa, T., Kim, Y.M., Mazor, M., Romero, R. (2006). Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression signature. *American journal of obstetrics and gynecology*, 195, 394–405.e12.
- 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 & development*, 18, 3016–3027.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6, 986–994.
- Hibbard, J.U., Wilkins, I., Sun, L., Gregory, K., Haberman, S., Hoffman, M., Kominiarek, M.A., Reddy, U., Bailit, J., Branch, D.W., *et al.* (2010). Respiratory morbidity in late preterm births. *Journal of the American Medical Association*, 304, 419–425.

- Hoffmann, S.C., Stanley, E.M., Cox, E.D., DiMercurio, B.S., Koziol, D.E., Harlan, D.M., Kirk, A.D., Blair, P.J. (2002). Ethnicity Greatly Influences Cytokine Gene Polymorphism Distribution. *American journal of transplantation*, 2, 560–567.
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Hympanova, L., Krofta, L. (2015a). Cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs are dysregulated in placental tissues affected with gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction. *PloS one*, 10, e0138383.
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Ondrackova, M., Pirkova, P., Kestlerova, A., Novotna, V., Hympanova, L., Krofta, L. (2015b). Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue in pregnancy-related complications. *DNA and cell biology*, 34, 437–457.
- Huang, J., Zhao, L., Xing, L., Chen, D. (2010a). MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem cells*, 28, 357–364.
- Huang, X., Le, Q.-T., Giaccia, A.J. (2010b). MiR-210 – micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in molecular medicine*, 16, 230–237.
- Hurme, M., Santtila, S. (1998). IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 β genes. *European journal of immunology*, 28, 2598–2602.
- Hutvágner, G., Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297, 2056–2060.
- Kalinka, J., Bitner, A. (2009). [Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of Polish women]. *Ginekologia polska*, 80, 111–117.
- Kalish, R.B., Vardhana, S., Gupta, M., Chasen, S.T., Perni, S.C., Witkin, S.S. (2003). Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and multifetal pregnancy outcome. *American journal of obstetrics and gynecology*, 189, 911–914.
- Kim, Y.M., Romero, R., Chaiworapongsa, T., Kim, G.J., Kim, M.R., Kuivaniemi, H., Tromp, G., Espinoza, J., Bujold, E., Abrahams, V.M., *et al.* (2004). Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 191, 1346–1355.
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 129, 1141–1151.
- Kishida, T., Yamada, H., Negishi, H., Sagawa, T., Makinoda, S., Fujimoto, S. (1995). Diagnosis of preterm premature rupture of the membranes using a newly developed AFP monoclonal antibody test kit. *European journal of obstetrics and gynecology, and reproductive biology*, 58, 67–72.
- Koch, W.H. (2004). Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature reviews. Drug discovery*, 3, 749–761.

- Koshkin, A.A., Wengel, J. (1998). Synthesis of novel 2',3'-linked bicyclic thymine ribonucleosides, *The journal of organic chemistry*, 63, 2778–2781.
- Krediet, T.G., Wiertsema, S.P., Vossers, M.J., Hoeks, S.B.E.A., Fleer, A., Ruven, H.J.T., Rijkers, G.T. (2007). Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. *Pediatric research*, 62, 474–476.
- Kwon, S.C., Nguyen, T.A., Choi, Y.-G., Jo, M.H., Hohng, S., Kim, V.N., Woo, J.-S. (2016). Structure of human DROSHA. *Cell*, 164, 81–90.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853–858.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 858–862.
- Lee, R.C., Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 862–864.
- Lee, H.Y., Zhou, K., Smith, A.M., Noland, C.L., Doudna, J.A. (2013). Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic acids research*, 41, 6568–6576.
- 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. *The EMBO journal*, 21, 4663–4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23, 4051–4060.
- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115, 787–798.
- Li, W., Ruan, K. (2009). MicroRNA detection by microarray. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394, 1117–1124.
- Li, P., Guo, W., Du, L., Zhao, J., Wang, Y., Liu, L., Hu, Y., Hou, Y. (2013). microRNA-29b contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis, invasion and angiogenesis of trophoblast cells. *Clinical science*, 124, 27–40.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC genomics*, 8, 166.
- Lind, K., Ståhlberg, A., Zoric, N., Kubista, M. (2006). Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *BioTechniques*, 40, 315–319.

- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402–408.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303, 95–98.
- Luo, L., Ye, G., Nadeem, L., Fu, G., Yang, B.B., Honarparvar, E., Dunk, C., Lye, S., Peng, C. (2012). MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *Journal of cell science*, 125, 3124–3132.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., *et al.* (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317, 1764–1767.
- Maymon, E., Romero, R., Pacora, P., Gomez, R., Athayde, N., Edwin, S., Yoon, B.H. (2000a). Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *American journal of obstetrics and gynecology*, 183, 94–99.
- Maymon, E., Romero, R., Pacora, P., Gervasi, M.-T., Bianco, K., Ghezzi, F., Yoon, B.H. (2000b). Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 183, 914–920.
- Mayor-Lynn, K., Toloubeydokhti, T., Cruz, A.C., Chegini, N. (2011). Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reproductive sciences*, 18, 46–56.
- McLaren, J., Taylor, D.J., Bell, S.C. (2000). Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: Implications for membrane remodeling and rupture. *American journal of obstetrics and gynecology*, 182, 409–416.
- Měchurová, A., Rokyťová, V. (2002). Doporučený postup - předčasný odtok plodové vody. *Česká gynekologie*, 67, 33–36.
- Menghini, R., Casagrande, V., Cardellini, M., Martelli, E., Terrinoni, A., Amati, F., Vasa-Nicotera, M., Ippoliti, A., Novelli, G., Melino, G., *et al.* (2009). MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation*, 120, 1524–1532.
- Menon, R. (2008). Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: Etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 87, 590–600.
- Menon, R., Fortunato, S.J., Milne, G.L., Brou, L., Carnevale, C., Sanchez, S.C., Hubbard, L., Lappas, M., Drobek, C.O., Taylor, R.N. (2011). Amniotic fluid eicosanoids in preterm and term births: effects of risk factors for spontaneous preterm labor. *Obstetrics and gynecology*, 118, 121–134.

- Menon, R., Yu, J., Basanta-Henry, P., Brou, L., Berga, S.L., Fortunato, S.J., Taylor, R.N. (2012). Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PloS one*, 7, e31136.
- Menon, R., Boldogh, I., Hawkins, H.K., Woodson, M., Poletini, J., Syed, T.A., Fortunato, S.J., Saade, G.R., Papaconstantinou, J., Taylor, R.N. (2014). Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *The American journal of pathology*, 184, 1740–1751.
- Mercer, B.M. (2003). Preterm premature rupture of the membranes. *Obstetrics and gynecology*, 101, 178–193.
- Mercer, B.M., Goldenberg, R.L., Moawad, A.H., Meis, P.J., Iams, J.D., Das, A.F., Caritis, S.N., Miodovnik, M., Menard, M.K., Thurnau, G.R., *et al.* (1999). The preterm prediction study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. *American journal of obstetrics and gynecology*, 181, 1216–1221.
- Montenegro, D., Romero, R., Pineles, B.L., Tarca, A.L., Kim, Y.M., Draghici, S., Kusanovic, J.P., Kim, J.-S., Erez, O., Mazaki-Tovi, S., *et al.* (2007). Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human chorioamniotic membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 197, 289.e1-289.e6.
- Montenegro, D., Romero, R., Kim, S., Tarca, A., Draghici, S., Kusanovic, J., Kim, J., Lee, D., Erez, O., Gotsch, F., *et al.* (2009). Expression patterns of microRNAs in the chorioamniotic membranes: a role for microRNAs in human pregnancy and parturition. *The Journal of pathology*, 217, 113–121.
- Monzón-Bordonaba, F., Vadillo-Ortega, F., Feinberg, R.F. (2002). Modulation of trophoblast function by tumor necrosis factor- α : A role in pregnancy establishment and maintenance? *American journal of obstetrics and gynecology*, 187, 1574–1580.
- Moore, R.M., Schatz, F., Kumar, D., Mercer, B.M., Abdelrahim, A., Rangaswamy, N., Bartel, C., Mansour, J.M., Lockwood, C.J., Moore, J.J. (2010). Alpha-lipoic acid inhibits thrombin-induced fetal membrane weakening in vitro. *Placenta*, 31, 886–892.
- Moore, S., Ide, M., Randhawa, M., Walker, J. j., Reid, J. g., Simpson, N. a. b. (2004). An investigation into the association among preterm birth, cytokine gene polymorphisms and periodontal disease. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 111, 125–132.
- Morales Prieto, D.M., Markert, U.R. (2011). MicroRNAs in pregnancy. *Journal of reproductive immunology*, 88, 106–111.
- Morales-Prieto, D.M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., Markert, U.R. (2012). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*, 33, 725–734.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51, 263–273.

- Musilova, I., Kutová, R., Pliskova, L., Stepan, M., Menon, R., Jacobsson, B., Kacerovsky, M. (2015). Intraamniotic inflammation in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PloS one*, 10, e0133929.
- Mwaniki, M.K., Atieno, M., Lawn, J.E., Newton, C.R. (2012). Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *The Lancet*, 379, 445–452.
- Noguer-Dance, M., Abu-Amero, S., Al-Khtib, M., Lefèvre, A., Coullin, P., Moore, G.E., Cavallé, J. (2010). The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Human molecular genetics*, 19, 3566–3582.
- Okazaki, T., Sagawa, N., Bleasdale, J.E., Okita, J.R., Macdonald, P.C., Johnston, J.M. (1981). Initiation of human parturition: XIII. phospholipase C, phospholipase A2, and diacylglycerol lipase activities in fetal membranes and decidua vera tissues from early and late gestation. *Biology of reproduction*, 25, 103–109.
- Papanicolaou, D.A., Wilder, R.L., Manolagas, S.C., Chrousos, G.P. (1998). The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of intern medicine*, 128, 127–137.
- Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J., Kim, V.N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475, 201–205.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, 21, 533–542.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., *et al.* (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature methods*, 2, 269–276.
- de Planell-Saguer, M., Rodicio, M.C. (2013). Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clinical biochemistry*, 46, 869–878.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, 11, 1640–1647.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvié, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901–906.
- Rizzo, G., Capponi, A., Vlachopoulou, A., Angelini, E., Grassi, C., Romanini, C. (1998). Interleukin-6 concentrations in cervical secretions in the prediction of intrauterine infection in preterm premature rupture of the membranes. *Gynecologic and obstetric investigation*, 46, 91–95.
- Roberts, A.K., Monzon-Bordonaba, F., Van Deerlin, P.G., Holder, J., Macones, G.A., Morgan, M.A., Strauss III, J.F., Parry, S. (1999). Association of polymorphism within the

promoter of the tumor necrosis factor α gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 180, 1297–1302.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14, 1902–1910.

Romero, R., Avila, C., Santhanam, U., Sehgal, P.B. (1990). Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. *The Journal of clinical investigation*, 85, 1392–1400.

Romero, R., Miranda, J., Chaiworapongsa, T., Korzeniewski, S.J., Chaemsaitong, P., Gotsch, F., Dong, Z., Ahmed, A.I., Yoon, B.H., Hassan, S.S., *et al.* (2014). Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *American journal of reproductive immunology*, 72, 458–474.

Romero, R., Miranda, J., Chaemsaitong, P., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J.P., Dong, Z., Ahmed, A.I., Shaman, M., Lannaman, K., Yoon, B.H., *et al.* (2015). Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of maternal-fetal & neonatal medicine*, 28, 1394–1409.

Sadowsky, D.W., Novy, M.J., Witkin, S.S., Gravett, M.G. (2003). Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1 β -induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *American journal of obstetrics and gynecology*, 188, 252–263.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487–491.

Salafia, C.M., Weigl, C.B., Silberman, L. (1989). The prevalence and distribution of Acute placental inflammation in uncomplicated term pregnancies. *Obstetrics and gynecology*, 73, 383–389.

Schmittgen, T.D., Jiang, J., Liu, Q., Yang, L. (2004). A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic acids research*, 32, e43–e43.

Schmittgen, T.D., Lee, E.J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T.S., Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 44, 31–38.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115, 199–208.

Seitz, H., Royo, H., Bortolin, M.-L., Lin, S.-P., Ferguson-Smith, A.C., Cavallé, J. (2004). A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome research*, 14, 1741–1748.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593–602.

- Shi, R., Chiang, V.L. (2005). Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques*, 39, 519–525.
- Simhan, H.N., Krohn, M.A., Roberts, J.M., Zeevi, A., Caritis, S.N. (2003). Interleukin-6 promoter -174 polymorphism and spontaneous preterm birth. *American journal of obstetrics and gynecology*, 189, 915–918.
- Skannal, D.G., Brockman, D.E., Eis, A.L.W., Xue, S., Siddiqi, T.A., Myatt, L. (1997). Changes in activity of cytosolic phospholipase A2 in human amnion at parturition. *American journal of obstetrics and gynecology*, 177, 179–184.
- So, T., Ito, A., Sato, T., Mori, Y., Hirakawa, S. (1992). Tumor necrosis factor- α stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biology of reproduction*, 46, 772–778.
- Sundrani, D., Chavan-Gautam, P., Pisal, H., Mehendale, S., Joshi, S. (2013). Matrix metalloproteinases-2, -3 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 in placentas from preterm pregnancies and their association with one-carbon metabolites. *Reproduction*, 145, 401–410.
- Tian, C.-F., Lv, F.-H., Wang, M., Gu, X.-S. (2014). Serum β -human chorionic gonadotropin and interleukin-1 as diagnostic biomarkers for the premature rupture of membranes and chorioamnionitis. *Biomedical reports*, 2, 905–909.
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, 1931–1934.
- Vermeulen, A., Behlen, L., Reynolds, A., Wolfson, A., Marshall, W.S., Karpilow, J., Khvorova, A. (2005). The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA*, 11, 674–682.
- Wang, B., Yanez, A., Novina, C.D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5343–5348.
- Welch, C., Chen, Y., Stallings, R.L. (2007). MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 26, 5017–5022.
- Witkin, S.S., Gravett, M.G., Haluska, G.J., Novy, M.J. (1994). Induction of interleukin-1 receptor antagonist in rhesus monkeys after intraamniotic infection with group B streptococci or interleukin-1 infusion. *American journal of obstetrics and gynecology*, 171, 1668–1672.
- Wu, L., Fan, J., Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 4034–4039.
- Xu, P., Alfaidy, N., Challis, J.R.G. (2002). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87, 1353–1361.

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, 4622–4629.

Yonemoto, H., Young, C.B., Ross, J.T., Guilbert, L.L., Fairclough, R.J., Olson, D.M. (2006). Changes in matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the fetal amnion and chorion during gestation and at term and preterm labor. *Placenta*, 27, 669–677.

Yoontae Lee, Chiyoung Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Jaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, Provost, P., Rådmark, O., Sunyoung Kim, *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415.

Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118, 57–68.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & Development*, 12, 2424–2433.

Internetové zdroje

MiRBase [online]. [cit. 2016-07-17]. Dostupné z: <http://mirbase.org/> <http://www.mirbase.org/>

MiRDB – MicroRNA Target Prediction And Functional Study Database [online]. [cit. 2016-07-17]. Dostupné z: <http://mirdb.org/miRDB>

Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2016-07-17]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>